

Aus der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Schäfers

Genexpression in der dilatierten ascendierenden Aorta bei Patienten mit  
unterschiedlichen Aortenklappenanomalien

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES  
DOKTORS DER MEDIZIN  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Simon Gauer

geb. am: 02.06.1989 in Püttlingen

Tag der Promotion: 20.02.2020

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Schäfers

Prof. Dr. E. Meese

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Zusammenfassung.....	7
1.1. Zusammenfassung .....	7
1.2. Summary .....	9
2. Einleitung .....	11
2.1. Anatomie.....	11
2.2. Aortenklappenanomalien und das thorakale Aortenaneurysma.....	13
2.2.1. Epidemiologie .....	13
2.2.2. Prävalenz und Ätiologie thorakaler Aortenaneurysmen.....	13
2.2.3. Muster der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspid angelegter Aortenklappe .....	15
2.2.4. Pathophysiologie der Aneurysmenentwicklung.....	15
2.2.5. Natürlicher Krankheitsverlauf.....	18
2.3. Gene in Zusammenhang mit Aortenaneurysmen .....	19
2.3.1. eNOS .....	19
2.3.2. Fibrillin-1 und TGF $\beta$ R1 .....	20
2.3.3. GATA5 .....	21
2.3.4. COL3A1 .....	22
2.4. Fragestellung .....	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1. Proben .....	24
3.2. Homogenisierungen/Zellaufschluss.....	27
3.3. RNA-Isolierung.....	28
3.3.1. Grundregeln der RNA-Isolierung .....	28
3.3.2. DNA-Extraktion mit Acid-Phenol-Chloroform .....	28
3.3.3. DNA-Fällung.....	28
3.3.4. Reinigung der Filter .....	29
3.3.5. RNA-Eluierung .....	29
3.3.6. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA .....	30

3.3.7. cDNA-Synthese .....	32
3.3.8. Master Mix Ansatz (Endvolumen 10 µl) .....	32
3.4. Real Time PCR (qPCR) .....	35
3.5. RIN Zahl.....	40
3.6. Statistische Auswertung.....	42
4. Ergebnisse .....	43
4.1. Zeigt die normale ascendierende Aorta unterschiedliche Genexpressionen?.....	43
4.2. Gibt es unterschiedliche Expressionsmuster in Abhängigkeit vom morphologischen Aortenklappentyp? .....	46
4.3. Gibt es lokalisationsabhängige Unterschiede in der Genexpression? .....	49
4.4. Gibt es spezifische Genexpressionsmuster bei Patienten mit dilatierter Aorta im Vergleich zu Patienten mit normaler Aorta? .....	64
4.5. Gibt es Unterschiede in der Genexpression von BAV-Patienten, die sich im Fusionstyp unterscheiden ? .....	74
5. Diskussion.....	84
5.1. eNOS/GATA5 .....	87
5.2. FBN1/TGF-beta Rezeptor 1 .....	91
5.3. COL3A1 .....	95
6. Fazit .....	97
7. Anhang.....	100
8. Publikationen.....	101
9. Danksagung .....	102
10. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
11. Literaturverzeichnis .....	103

## Abkürzungsverzeichnis

### A

AAA	abdominelles Aortenaneurysma
ADAM-Studie	Aneurysm Detection and Management-Studie

### B

BAA	Bauchaortenaneurysma
BAV	Bicuspide Aortenklappe

### C

cDNA	complementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Threshold Cycle

### D

DNA	Desoxyribonukleinsäure
-----	------------------------

### E

et al.	et alia (lat.), und andere
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

### H

HZV	Herzzeitvolumen
-----	-----------------

### I

IAA	inflammatorisches Aortenaneurysma
-----	-----------------------------------

### J

J.	Jahr
----	------

### K

Klf2	Krüppel like factor 2
------	-----------------------

### M

mRNA	messenger RNA
miRNA	micro RNA

### N

NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer

### O

O <sub>2</sub>	Sauerstoffdioxid
----------------	------------------

### P

Pg	Pikogramm
PCR	Polymerase Kettenreaktion

**R**

Real-time PCR	Echtzeit-PCR
RIN	RNA-Integritätsnummer
Rn	Ratio normalized reporter
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease (Enzym)
RQ	relative Quantifizierung
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur / Reverse- Transkription

**T**

TAA	thorakales Aortenaneurysma
TAV	Trikuspide Aortenklappe
Taq	Thermophilus aquaticus (Bakterium)
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
tRNA	transfer RNA

**U**

UAV	Unicuspide Aortenklappe
U	unit, Einheit der Enzymaktivität

**Symbole**

°	Grad Celcius
μ	Mikro
Δ	Delta
%	Prozent
-/-	doppel knockout

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Zusammenfassung

### Hintergrund

Die bicuspid und die unicuspid angelegte Aortenklappe sind seltene angeborene Anomalien, die im Zusammenhang mit Aneurysmen der Aorta ascendens stehen. Es gibt Anhaltspunkte, dass sich die Genexpression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspid oder unicuspid angelegter Aortenklappe im Vergleich zu Patienten mit normal angelegter Aortenklappe unterscheiden. Bis dato ist der Pathomechanismus nur ansatzweise verstanden. Noch weniger ist über den Zusammenhang zwischen unicuspid angelegter Aortenklappe und Aneurysma der Aorta ascendens bekannt.

### Fragestellung

Somit ist zu klären, ob Unterschiede in der Genexpression in der Aortenwand von Patienten mit Aortenklappenanomalien im Vergleich zu Patienten mit normal angelegten Aortenklappen existieren? Um mögliche Pathomechanismen zu eruieren, untersuchten wir die Expression von Genen des eNOS- (GATA5, eNOS) und TGF- $\beta$ -Signalweges (FBN1, TGFBR1) sowie von Genen, die mit thorakalen Aortenaneurysmen assoziiert sind (COL3A1).

### Material und Methoden

Von 107 Patienten (TAV 48, BAV 38, UAV 21), welche an der Aortenklappe und/oder der Aorta ascendens operiert wurden, konnten intraoperativ von verschiedenen Lokalisationen der Aorta ascendens Gewebeproben entnommen werden. Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe und normalkalibriger Aorta ascendens. Die Bestimmung der Genexpression und möglicher Korrelationen erfolgte über die Isolation der RNA, anschließend die reverse Transkription in cDNA sowie schließlich die quantitative real-time PCR. Bestimmt wurde somit die Expression der mRNA für die untersuchten Gene.

### Ergebnisse

Bei Patienten mit tricuspidaler Aortenklappe und normaler Aorta ascendens zeigten sich in der Genexpression in der Aortenwand von GATA5, eNOS, TGFBR1, FBN1 und COL3A1 keine regionalen Unterschiede. Hingegen konnten wir nachweisen, dass Patienten mit Aortenklappenanomalien und Dilatation der Aorta ascendens signifikante

Unterschiede in der regionalen Genexpression aufwiesen. Auch bei Patienten mit tricuspidaler Aortenklappen und Dilatation der Aorta ascendens zeigten sich signifikante Unterschiede in den lokalen Genexpressionsmustern, welche sich zudem von Patienten mit Aortenklappenanomalien unterscheiden. So sieht man z.B. bei Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe und Aortenaneurysma eine signifikant höhere Genexpression von NOS3 in der Konkavität der Aorta ascendens im Vergleich zur Konvexität.

### **Schlussfolgerung**

Da sich regionale Genexpressionunterschiede bei Patienten mit Aortenklappenanomalien ergeben haben, welche sich nach aktuellem Wissensstand nicht durch eine erhöhte Scherspannung und der damit nachgeschalteten Signalkaskaden erklären lassen, liegt es nahe, dass als Ursache der Aneurysmen ein genetischer Pathomechanismus heranzuziehen ist.

Beteiligt hierbei sind der eNOS-Signalweg und der TGF $\beta$ -Signalweg, welche sich auch untereinander beeinflussen. Pharmakologische Eingriffe in diese Signalkaskaden könnten einen therapeutischen Ansatz bieten. Genauere molekularbiologische Interaktionskaskaden sind Bestandteil aktueller Forschungsprojekte.

## 1.2. Summary

### Gene expression in the dilated ascending aorta in patients with different aortic valve abnormalities

#### Background

Unicuspid and bicuspid aortic valves are congenital cardiac anomalies predisposing to ascending aortic aneurysm. For BAV there is evidence that gene expression in the ascending aorta differ from patients with tricuspid aortic valves. Less is known on the aor-topathy associated with UAVs.

#### Objective

Are there differences in gene expression in the aortic wall of patients with aortic valve abnormalities compared to patients with normal aortic valves? To elucidate possible pathomechanisms, the expression of genes of the eNOS (GATA5, eNOS) and TGF- $\beta$  signalling pathway (FBN1, TGFBR1) as well as genes associated with thoracic aortic aneurysms (COL3A1) were investigated.

#### Material and Methods

Samples from 107 patients undergoing aortic or aortic valve surgery (48 TAV, 38 BAV, 21 UAV) were harvested intraoperatively from different locations of the ascending aortic wall. Specimens were obtained close to the sinotubular junction at convexity (A1) and concavity (A2) of the aorta. In aneurysm specimens were also obtained from the convexity (B1) and concavity (B2) of the mid-ascending aorta. Patients with tricuspid aortic valves and normal ascending aortic diameter served as controls. In order to find correlations mRNA expression was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction to assess gene expression levels.

#### Results

Patients with tricuspid aortic valves and normal ascending aorta show no regional differences in gene expression of GATA5, eNOS, TGFBR1, FBN1 and COL3A1 eNOS in the ascending aortic wall. However patients with aortic valves anomalies and aortic dilatation showed significant differences in regional gene expressions. Also patients with tricuspid aortic valves and aortic aneurysm showed differences in genexpression-design, compared to those with valve anomalies. For example, patients with tricuspid aortic valves and dilated ascending aorta showed a significantly higher genexpression of eNOS in the concavity adverse the convexity of the acending aortic wall.

## **Conclusion**

Since regional differences in gene expressions have resulted in patients with aortic valve anomalies, which, according to the current state of knowledge, can not be explained by an increased shear stress and the subsequent signal cascades. Thus, it is obvious that a genetic pathomechanism is the cause of the aneurysms.

This mechanism leads to a dysregulation of the eNOS signal path and the TGF $\beta$  signal path. It can be supposed, as already known in literature, that both influence each other. Pharmacological interventions in these signaling cascades could provide a therapeutic approach. For a safe application, more details about the molecular biology interaction cascades are needed.

## 2. Einleitung

### 2.1. Anatomie

Die normal angelegte Aortenklappe besteht aus drei Taschen. Jede von ihnen tritt halbmondförmig in Erscheinung. Die Taschen sind in einer kleinen Erweiterung der proximalen Aorta, dem Sinus Valsalvae, beherbergt. Das entsprechende Koronararterienostium definiert die jeweilige Tasche als linken, rechten und nicht-koronaren Sinus, die in ihrer Gesamtheit den Bulbus aortae formen. Jede Klappentasche ist mit dem äußeren halbkreisförmigen Saum an der Aorta befestigt. Der Befestigungspunkt zwischen den Klappentaschen wird als Kommissur bezeichnet.

Anatomisch wird die Aorta in einen ascendierenden Teil (ca. 5 cm lang und 20 - 37 mm im Durchmesser), den Aortenbogen und einen descendierenden Teil gegliedert. Der tubuläre Teil der ascendierenden Aorta beginnt distal der Aortenwurzel (sinutubulärer Übergang) und endet am Ursprung der Arteria anonyma. Der Aortenbogen wird begrenzt durch den Ursprung der Arteria anonyma, die Arteria carotis communis sinistra und die linke Arteria subclavia.

Die bicuspide Aortenklappe besteht typischerweise aus zwei Klappentaschen unterschiedlicher Größe [53, 170]. Unterschieden werden diese durch ihren Fusionstyp. Am häufigsten kommt es zur Fusion der rechten mit der linken Tasche (RL-Fusion), gefolgt von der Fusion der rechten mit der nichtkoronaren Tasche (RN-Fusion) und sehr selten ist die Fusion der linken mit der nichtkoronaren Tasche (LN-Fusion).

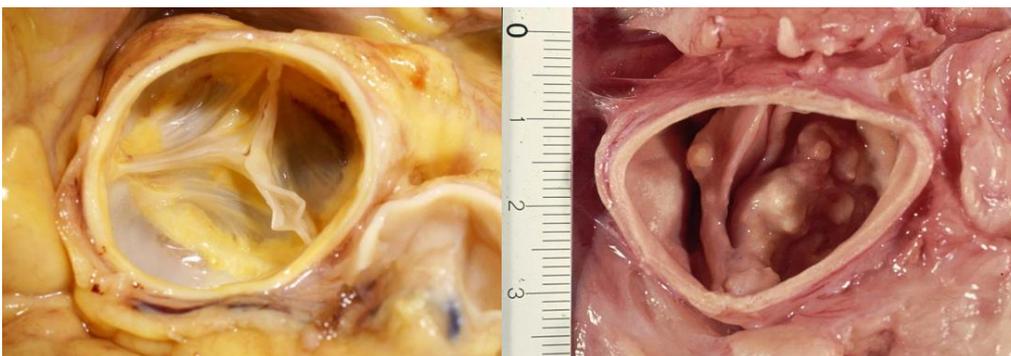


Abbildung 1: tricuspide Aortenklappe (links) und bicuspide Aortenklappe mit nodulärer Kalzifikation (rechts)

Die unicuspide Aortenklappe wird in 2 Typen unterteilt: akommissural lochblendenförmig und unikommissural schlitzförmig [43]. Der akommissurale Typ mit drei rudimentären Kommissuren unterhalb der Koronararterienostien, etwa 8 % aller

unicuspiden Aortenklappen, hat keinen lateralen Kontakt zur Aorta und eine zentrale Öffnung [151]. Der häufigere unikommissurale Typ mit normal entwickelter Kommissur auf Höhe der Koronararterienostien hat einen Kontaktpunkt mit einer exzentrischen Öffnung meist links posterior im Anulus der Aortenklappe [49, 51, 153, 165].

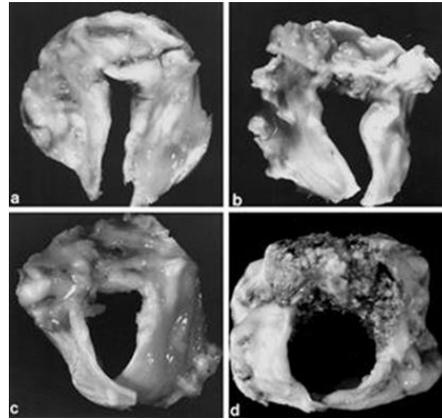
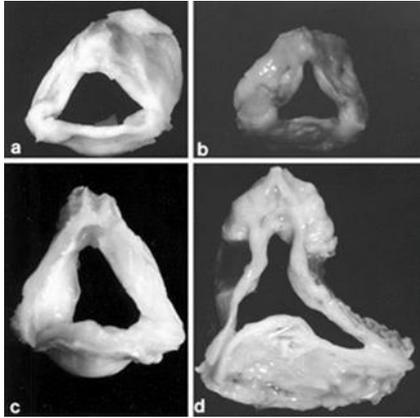


Abbildung 2: unicuspid unicommissurale Aortenklappe(links) und unicuspid aicommissurale Aortenklappe (rechts) [152]

## **2.2. Aortenklappenanomalien und das thorakale Aortenaneurysma**

### **2.2.1. Epidemiologie**

Die bicuspidale Aortenklappe ist der häufigste angeborene Herzfehler bei Erwachsenen und verursacht mehr Komplikationen und eine höhere Todesrate als alle anderen angeborenen Herzfehler zusammen. 1,3 % der Weltbevölkerung sind betroffen, das sind bei einer aktuellen Weltbevölkerung von 7,2 Milliarden Menschen ca. 93 Millionen Personen [53, 170].

Die Aortenstenose ist die am häufigsten vergesellschaftete Komplikation einer bicuspiden Aortenklappe. Häufig ist die BAV mit anderen angeborenen Herzfehlern wie Aortenisthmusstenose, Ventrikelseptumdefekt und persistierendem Ductus arteriosus assoziiert. Zusätzlich zeigt sich in annähernd 50% der Betroffenen eine Erweiterung einiger oder aller Segmente der ascendierenden Aorta, von der Aortenwurzel bis zum Aortenbogen [20, 53, 64, 119, 170].

Die unicuspidale Aortenklappe ist die zweithäufigste Anomalie der Aortenklappe und tritt mit einem Verhältnis von 1:50 zur bicuspiden Aortenklappe bei Patienten älter als 20 Jahre auf [181]. Die unicuspidale Aortenklappe ist eine sehr seltene, angeborene kardiovaskuläre Anomalie, welche häufig als bicuspidale Aortenklappe falsch diagnostiziert wird [43]. Die wahre Inzidenz der unicuspiden Aortenklappe wird vermutlich in der asymptomatischen Bevölkerung unterschätzt [5, 134]. 0,019% der echokardiographierten und 5,59% der Patienten mit einem Aortenersatz erbrachten das Bild der unicuspiden Klappe [49, 126, 134, 134]. Auch Roberts et al. zeigten in einer Kohorte von 932 Patienten mit Aortenklappenersatz aufgrund Aortenklappenstenose in 5 % der Fälle eine unicuspidale Aortenklappe [152].

### **2.2.2. Prävalenz und Ätiologie thorakaler Aortenaneurysmen**

Das Aortenaneurysma ist eine Erweiterung (griechisch ἀνεύρισμα = Aneurysma) der Aorta. Die Aneurysmen lassen sich in die thorakalen Aortenaneurysmen (TAA) sowie die Bauchaortenaneurysmen (BAA) einteilen.

Aneurysmen der thorakalen Aorta werden nach ihrer Lokalisation untergliedert in Aneurysmen der Aortenwurzel, der tubulären Aorta ascendens, des Aortenbogens und der Aorta descendens. Etwa 60 % liegen im Bereich der Aortenwurzel und der tubulären Aorta ascendens. Thorakale Aortenaneurysmen bleiben in den meisten Fällen bis zum Auftreten von Komplikationen asymptomatisch, so steigt ihre Inzidenz erst mit zunehmendem Alter. In der Literatur wird eine Inzidenz von etwa 12 pro

100.000 pro Jahr angegeben. Die Hauptkomplikationen von Aortenaneurysmen stellen die Dissektion und die Ruptur dar, die beide mit einer hohen Letalität assoziiert sind. Mit dem Aortendurchmesser steigt das Risiko einer Aortendissektion oder -ruptur. Ab einem Durchmesser von 6 cm steigt die Rate an Komplikationen deutlich an und die Wahrscheinlichkeit eine thorakale Aortendissektion zu erleiden, beträgt etwa 6,9 % pro Jahr, die Letalität 11,8 % pro Jahr. Das Risiko an einer akuten Typ A-Dissektion nach Stanford zu versterben, beträgt etwa 1 - 2 % pro Stunde nach Symptombeginn. Trotz notfallmäßiger chirurgischer Therapie liegt die Krankenhausletalität der Typ A-Dissektion bei etwa 12 – 26 %.

Aneurysmen der thorakalen Aorta kommen vor allem im Rahmen von Syndromen, im Zusammenhang mit hereditären Bindegewebserkrankungen und angeborenen Anomalien der Aortenklappe vor. Weiterhin gehören zu den Ursachen entzündliche abakterielle Erkrankungen, bakterielle Infektionen [92] oder rheumatisches Fieber.

Unter den syndromalen Bindegewebserkrankungen ist das Marfan-Syndrom mit einer Prävalenz von etwa 1:5000 für den größten Teil der genetisch bedingten thorakalen Aortenaneurysmen verantwortlich. Bei betroffenen Patienten liegt bis zum Alter von 20 Jahren in etwa 70 % der Fälle ein thorakales Aortenaneurysma vor.

Weitere Bindegewebserkrankungen sind die zystische Medianekrose Erdheim-Gsell und das Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV. Isolierte familiäre Aneurysmen der Aorta ascendens sind mit Mutationen in ACTA2 und MYH11 assoziiert (familial thoracic aortic aneurysms and dissections, FTAAD).

Die Prävalenz der dilatierten ascendierenden Aorta unter Personen mit einer bicuspiden Aortenklappe bewegt sich zwischen 40 bis 60 % [38, 53, 73, 133, 157, 170, 174]. Die Prävalenzen der Aortenaneurysmen bei Patienten mit einer unicuspiden Aortenklappe liegen bei 36 – 61 % [19, 53, 134]. Im Mittel tritt die Aortendissektion bei Patienten mit unicuspider Aortenklappe in der 4. Lebensdekade auf; hingegen bei bicuspider Aortenklappe in der 5. Dekade und in der 6. Dekade bei tricuspider Aortenklappe [1]. Patienten mit einer unicuspiden Aortenklappe sind zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 14 und 30 Jahre alt [3, 8], und das mittlere Operationsalter liegt in der 3. Dekade im Vergleich zur 4. Dekade bei Patienten mit bicuspider Aortenklappe [27–29]. Ähnlich der bicuspiden Aortenklappe neigt die unicuspide Aortenklappe zu einer Dilatation oder Dissektion der Aorta mit Beteiligung der Aortenwurzel [84, 89], der ascendierenden Aorta oder des Aortenbogens [165], welche typischerweise eine Operation erfordern. Andere vergesellschaftete Störungen sind die

Aortenisthmusstenose, eine aberrierende Arteria subclavia dextra [43], eine singuläre Koronararterie und ein Ventrikelseptumdefekt [43, 84].

### 2.2.3. Muster der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspid angelegter Aortenklappe

Die Aortendilatation kann in drei morphologische Typen eingeteilt werden, siehe Abbildung 3.

Typ 1, der häufigste Typ, beinhaltet die Dilatation der tubulären ascendierenden Aorta (besonders entlang der Konvexität), begleitet von unterschiedlichen Ausmaßen der Aortenwurzeldilatation. Dieser Typ wird mit einem höheren Alter (>50 Jahre) zum Zeitpunkt der Diagnose, Klappenstenose und dem RL Fusionsmuster assoziiert [36, 64, 164, 162].

Typ 2 präsentiert sich mit einer isolierten Dilatation des tubulär ascendierenden Teils der Aorta (meist ohne Beteiligung der Aortenwurzel), häufig mit einer Ausbreitung in den transversalen Teil des Aortenbogens und einer Assoziation mit dem RN Fusionsmuster [50, 64, 156, 164, 162].

Typ 3, auch als Wurzel-Phänotyp bezeichnet, beschreibt die isolierte Dilatation der Aortenwurzel. Dieser seltene Typ wird mit einem jüngeren Diagnosealter (< 40 Jahre), männlichem Geschlecht und Aortenregurgitation assoziiert. Unter den bicuspiden Aortenpathologien wird diesem Typ die größte genetische Komponente zugeschrieben [64, 65, 79].

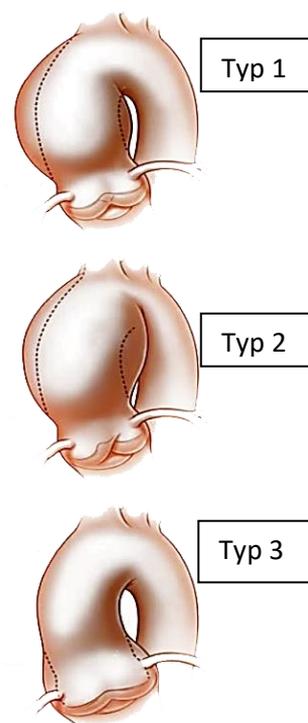


Abbildung 3: Morphologische Typen der Aortendilatation [1]

### 2.2.4. Pathophysiologie der Aneurysmenentwicklung

Die Entwicklung der Aortendilatation bei Patienten mit einer Aortenklappenanomalie ist noch nicht vollständig verstanden. Es werden eine genetische sowie eine hämodynamische Genese vertreten. Vermutlich wirken beide Faktoren zusammen. Der jeweilige Beitrag der genetischen oder hämodynamischen Komponente ist jedoch ungeklärt [38, 53, 64, 136, 159, 174]. Nach weiterer Klassifizierung der Fusionstypen und Dilatationsvarianten könnte sich eine hämodynamische oder genetische Komponente in den Vordergrund spielen.

Publikationen, welche eine genetische Grundlage stärken, beinhalten die folgenden Beobachtungen:

Die Aortenpathologie tritt häufig bei Verwandten ersten Grades mit einer bicuspiden Aortenklappe auf [10]. Chan et al screenen echokardiographisch 30 Familien von betroffenen Individuen. 11 (36,7%) von ihnen hatten Verwandte ersten Grades mit BAV. Die hohe Inzidenz von familiären Clustern passt zu einer autosomal dominanten Vererbung mit reduzierter Penetranz [30, 81].

Differenzen in der Ausdehnung der Aorta bei Personen mit einer bicuspiden Aortenklappe persistieren selbst nach Einstellung des Blutdrucks, der aortalen Spitzenflüsse und der linksventrikulären Auswurfzeit. Auch bei Patienten mit scheinbar normal funktionierenden bicuspiden Aortenklappen wurde eine Progression der Aortendilatation beobachtet [53, 155, 170, 174]. Die Prävalenz der Aortendilatation bei Personen mit bicuspiden Aortenklappen ist höher als man dies aus dem Schweregrad der Aortenstenose oder Aortenregurgitation vermuten würde [13, 64, 73, 157, 174, 181].

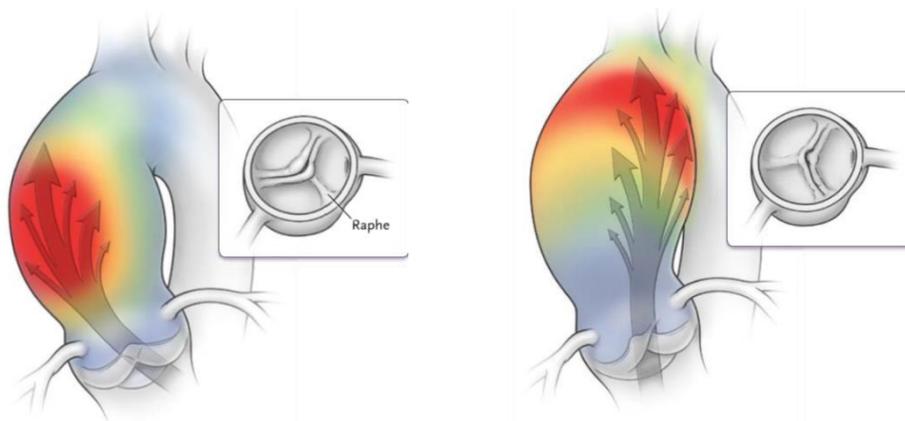
Die Entwicklung der Aorten- und Lungenklappen ist eng mit der Septierung des Ausflusstraktes und dem Umbau der Aortenbögen verbunden. Interaktionen zwischen dem zweiten Herzfeld und den Neuralleistenzellen sind wichtig, um die Entwicklung des Ausflusstraktes mit dem Aortenbogen aus dem gemeinsamen Arterienstamm zu koordinieren [78, 115].

Die abnorme Migration der Neuralleistenzellen wurde als gängiger Mechanismus postuliert, der in einer bicuspiden Aortenklappe und einer Aortendilatation mündet [174]. Die histologischen Veränderungen in der bicuspiden Aortenpathologie, bisher als zystische Medianekrose benannt, sind das Endresultat einer abnormen Signalregulation der glatten Gefäßmuskulatur in der Media. Für den genetischen Ursprung der Aortenaneurysmen spricht auch, dass sich zusätzlich in der Gefäßwand des Truncus pulmonalis, der mit der Aorta ascendens eine gemeinsame embryologische Herkunft besitzt, bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine zystische Medianekrose präsentiert [75, 94, 116].

Das Konzept, dass eine abnorme Klappendynamik zu einer Dilatation der Aorta führt, basiert auf der Beobachtung, dass selbst normal funktionierende bicuspiden Aortenklappen abnorme transvalvuläre Flussmuster haben können, resultierend in regional gesteigerten Scherspannungen, welche weitgehend durch die

morphologischen Gegebenheiten der bicuspiden Aortenklappen vorbestimmt sind [6, 64, 79, 154].

Magnetresonanztomographisch gestützte Studien haben gezeigt, dass der RL Fusionstyp mit Flussausrichtung zur rechts-anterioren Aortenwand einhergeht, welcher sich in einer rechtsdrehenden spiralförmigen Richtung ausbreitet (Abbildung 4) [181].



Die Fusionskonfiguration der Aortenklappentaschen legt die Grundlage für die Veränderungen der Flussmuster und der daraus resultierenden Scherspannungen auf die Aortenwand. In dem rechts-links Fusionsmuster (Feld A), ist der Fluss in Richtung rechts-anterioren Wand der ascendierenden Aorta ausgerichtet, welcher sich in rechtsdrehender spiralförmiger Richtung fortleitet, um vorwiegend Dilatationen in der ascendierenden Aorta zu begünstigen. Im rechts-nichtkoronaren Fusionsmuster (Feld B) ist der Fluss zur posterioren Aortenwand ausgerichtet, wodurch die Muster der Scherspannungen eine Dilatation des proximalen Aortenbogens begünstigen

Abbildung 4: Morphologische Merkmale der bicuspiden Aortenklappe, welche die Muster der Aortenpathologie beeinflussen [53]

Die gesteigerten regionalen Wandschubspannungen könnten die Grundlage des Zusammenhangs zwischen dem RL Fusionsmuster mit Dilatation der Aortenwurzel und der asymmetrischen Dilatation der tubulär ascendierenden Aorta sein [181]. Entgegengesetzt resultiert ein RN Fusionsmuster mit einer Flussrichtung zur posterioren Aorta hin mit gesteigerter Wandschubspannung in der rechts posterioren Aorta (Abbildung 4) zu einer Dilatation des Aortenbogens. Ein spiralförmiges Flussprofil zeigte sich auch bei Patienten mit unicuspiden oder quadricuspiden Aortenklappen [45].

Zur Pathologie der Aortendilatation bei Patienten mit unicuspidaler Klappe gibt es so gut wie keine Daten. Eine Studie aus dem Jahre 1984 von Larson et al. zeigt eine Tendenz des aggressiveren Fortschreitens der Aortendilatation bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen [102]. So muss man auf die Pathologie der Aortendilatation bei

bicuspiden Aortenklappe verweisen, die sich ähnlich der zystischen Medianekrose präsentiert [19].

### **2.2.5. Natürlicher Krankheitsverlauf**

Das Aortenaneurysma und die Aortendissektion sind die zwei Hauptkomplikationen der bicuspiden Aortenpathologie [21, 131]. Die Wachstumsrate des Durchmessers der ascendierenden Aorta bei Personen mit einer bicuspiden Aortenklappe (0,2 mm bis 1,9 mm pro Jahr) ist deutlich höher als die bei Personen mit einer tricuspiden Aortenklappe [34, 47, 48, 174, 189]. Der erstmalig gemessene Aortendurchmesser ist ein wichtiger Prädiktor der künftigen Aortenausdehnung. Eine Studie mit 88 Patienten zeigte eine Ausdehnungsrate von annähernd 2,1 mm pro Jahr bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappe, welche einen ursprünglichen Aortendurchmesser von 35 bis 40 mm hatten, im Vergleich zu einer Wachstumsrate von 5,6 mm pro Jahr in einer Patientengruppe mit Ursprungsdurchmesser von mehr als 60 mm [82].

Weitere Einflussfaktoren, die das Fortschreiten der bicuspiden Aortenpathologie beeinflussen, sind: hohes Alter, männliches Geschlecht, erhöhter systolischer Blutdruck, koexistierende Aortenklappenstenose oder -regurgitation und morphologische Merkmale der Klappen (RL Fusionsmuster) [18, 52, 85, 136, 170].

Die Inzidenz der Aortendissektion wurde ursprünglich auf 5% veranschlagt, war aber in aktuellen Studien wesentlich niedriger. Die Inzidenz der Aortendissektion war 0,1 % pro Patientenjahr in einer „follow up“ Studie aus Toronto mit 642 Patienten mit einer bicuspiden Aortenklappe [130].

## 2.3. Gene in Zusammenhang mit Aortenaneurysmen

### 2.3.1. eNOS

Stickstoffmonoxid (NO), ursprünglich als Vasodilatator identifiziert, ist heute als ein wichtiges Molekül verstanden, welches in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Immunregulation, Neurotransmission, Antithrombose, Apoptose und Zellwachstum involviert ist [107, 149, 158].

Das Enzym endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) katalysiert die Bildung von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid, welches als Signalmolekül im kardiovaskulären System fungiert [168].

Es gibt drei verschiedene NOS Isoformen. Neuronale NOS (NOS1), induzierbare NOS (NOS2) und endotheliale NOS (NOS3). Jede Isoform wird von einem eigenen Gen verschlüsselt und in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert. NO von NOS1 und NOS3 spielt bei der intrazellulären Signalkaskade eine Rolle, wohingegen NOS2 bei entzündlichen Prozessen vorrangig ist [60, 107].

NO vermittelt verschiedene gefäßprotektive Eigenschaften, wie die Inhibierung des Wachstums der glatten Gefäßmuskulatur und Aufrechterhaltung endothelialer Funktionen [80, 118].

Induziert wird die NOS3 Expression z.B. durch Krüppel-like factor 2 (Klf2), ein endothelialer Transkriptionsfaktor, welcher an der Vasculogenese beteiligt ist [28, 35, 167, 169] oder durch Scherspannung während der Embryogenese des kardiovaskulären Systems eines Huhnes [69]. NO erzielt seinen Effekt über den cGMP-abhängigen Signalweg, sowie der Proteinmodifikation über S-Nitrosylierung [87, 172]. NO spielt eine Rolle bei der muskarin-cholinergen Hemmung der  $\beta$ -adrenergen-stimulierten Chronotropie [87], Inotropie [74] und der AV-Knoten Fortleitung. NO ist an der embryonalen Herzentwicklung beteiligt [67, 195]. Die Mitral- und Trikuspidalklappen stammen vom Endokard-kissen, während die Aorten- und Pulmonalklappen vom Endokardkissen mit zusätzlicher Beteiligung von Neuralleistenzellen entstehen [3, 183]. Die Gestaltung des atrioventrikulären Septums und der Klappen sind reguliert durch koordinierte Zellproliferationen, Apoptose und Remodelling [11, 15, 17, 160, 171].

Armstrong et al. zeigten zum ersten Mal, dass ein Mangel von NOS3 in eine Bildung von bicuspiden Aortenklappen mündet. Die erwachsenen NOS3  $-/-$  Mäuse hatten eine hohe Inzidenz von bicuspiden Aortenklappen (5/12, 42 %) [176]. Anschließende Studien bestätigten die hohe Inzidenz, ca. 30 %, von bicuspiden Aortenklappen in NOS3 -

/- Mäusen. In NOS3 -/- Mäusen fusioniert die rechts- mit der nichtkoronaren Tasche [55].

Interessanterweise konnten kürzlich publizierte Studien nachweisen, dass der Notch-Signalweg NOS3 und seine nachgeschalteten Ziele, die lösliche Guanylyl Zyklase mittels PI3K/Akt Pfad aktiviert [23]. Somit könnte NOS3 ein nachgeschaltetes Ziel des Notch Signalwegs sein, welches die Aortenklappenentwicklung und die postnatale Remodullierung steuert.

Aicher et al. demonstrierten einerseits erste Anhaltspunkte für eine Verbindung zwischen eNOS und BAV auf Proteinebene, die eine Herunterregulierung der eNOS-Expression im proximalen Teil der Aorta bei Patienten mit BAV im Vergleich zu Patienten mit TAV, sowie andererseits eine negative Korrelation der eNOS-Protein-Expression in der Aortenwand zum maximalen Aortendurchmesser und zum sinotubulären Durchmesser bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen [2]. Auch Ramzi et al. konnten eine verminderte Expression von eNOS im Gefäßendothel als auch eine erhöhte Prävalenz (>40%) [176] von bicuspiden Aortenklappen bei eNOS-/- Mäusen nachweisen [42, 44]. Wurde zusätzlich das Gen, welches für Apolipoprotein E kodiert, mittels Doppel-Knockout entfernt, stieg bei gleichzeitiger cholesterinreicher Diät die Anzahl der abdominalen Aortenaneurysmen und Aortendissektionen [143].

Mohamed et al. konnten, wenn auch bei kleiner Probandenzahl, unterschiedliche Expressionsraten des eNOS Proteins in unterschiedlichen Regionen des Aortenaneurysmas bei BAV und TAV Patienten nachweisen [123]. Die Hochregulierung von eNOS mRNA durch Scherspannungen ist etabliert [148]. Kürzlich zeigten Barker et al. mittels Phasenkontrast-Magnetresonanztomographie unterschiedliche Scherspannungen in der Aortenwand bei Patienten mit BAV und TAV [187]. Die Konvexität war bei BAV Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren hämodynamischen Kräften ausgesetzt, wohingegen gleiche Scherspannungen in der Konkavität nachzuweisen waren. Auch unterschiedliche Apotoseraten der VSMCs in der Konvexität und Konkavität von BAV ascendierenden Aortenaneurysmen wurden festgestellt [122]. Zusätzlich zeigte sich nach Inhibition von Caspase 3, einem Effektor-Enzym der Apoptose, welches durch eNOS produziertes Stickstoff inhibiert wird, eine verringerte Apoptose in der konkaven vs. der konvexen Aortenwand bei Patienten mit BAV [105].

### **2.3.2. Fibrillin-1 und TGF $\beta$ R1**

Fibrillin ist ein essentieller Baustein der elastischen Fasern sowie der Mikrofibrillen im Bindegewebe der aortalen Media [91, 141]. Zusätzlich ist es Bestandteil von

Signalkaskaden [24, 40]. Eine Mutation im Fibrillin-1 Gen führt in 90 % der Patienten zum Marfan Syndrom, dessen kardiovaskuläres Erscheinungsbild mannigfaltig ist und sich u.a. mit einer Aortendilatation präsentiert und meist letal in einer Aortendissektion endet [120, 125].

BAV und das Marfan-Syndrom teilen sich einige klinische Charakteristika wie die gesteigerte Inzidenz von thorakalen Aortenaneurysmen und Dissektionen sowie eine überlappende Histopathologie [109, 112, 128]. Auch das Auftreten der bicuspiden Aortenklappe ist mit 5 % erhöht. Assoziierend zeigen BAV Patienten mit Ausschluss des MFS, nach den klinisch-diagnostischen Gent-Kriterien, Mutationen im Fibrillin-1 Gen [52, 111, 132, 140, 147, 177].

Fibrillin-1 spielt auch bei der Regulation der Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$ 1 eine Rolle. Der "transforming growth factor  $\beta$ 1" kontrolliert das Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und die Apoptose [12]. TGF $\beta$  R1 ist einer der entsprechenden Rezeptoren, der auf vielen Zellen präsentiert wird [124, 180]. Demzufolge führen veränderte TGF $\beta$  Signalwege zum Marfan-Syndrom wie auch artverwandte Krankheiten wie das Shprintzen-Goldberg-Syndrom, das durch Mutationen des Gens verursacht wird, das für den TGF- $\beta$ -Repressor SKI codiert, zu thorakalen Aortenaneurysmen [41, 113, 179].

Eine heterozygote Mutation des TGF $\beta$ R1 kann zu einem Loeys–Dietz Syndrom führen, bei dem es zu Aortendissektion, arterieller Tortositas und einem gehäuften Auftreten von bicuspiden Aortenklappen kommt [9, 27, 63, 86, 110]. Forte et al. konnten erstmals erhöhte Expressionen von TGF $\beta$  in Patienten mit BAV nachweisen, wohingegen Arrington et al. bei isoliert auftretenden BAV keine Mutationen im TGFBR1 nachwiesen [4, 59, 68].

Involviert in den TGF- $\beta$ -Signalweg sind auch die Gene ACTA2 und MYH11, welche  $\alpha$ -Actin und die  $\beta$ -Myosin Schwereketten codieren, deren Mutation zum familiären thorakalen Aortenaneurysma führt [71, 138, 139, 178].

### **2.3.3. GATA5**

GATA5 ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine führende Rolle in der Entwicklung des Endokardkissens und Ausflusstraktes zugeschrieben wird. Zudem ist er an der Differenzierung der kardialen glatten Gefäßmuskulatur beteiligt. Durch einen Knockout von GATA5 im Mausmodell entwickelten sich bei 25% der Fälle eine bicuspiden Aortenklappe [100, 101, 142]. Zudem gilt GATA5 als Aktivator der eNOS-Transkription. Henn und Perttunen verfolgten diesen Weg und wiesen eine gesteigerte Expression von eNOS und GATA5 in Patienten mit unicuspiden Aortenklappe im Vergleich zu

Patienten mit tricuspiden Aortenklappen nach. Zusätzlich korrelierten hier die Genexpression von eNOS und GATA5 positiv sowie deren Genexpression zum Aortendurchmesser negativ [77].

#### **2.3.4. COL3A1**

Als facettenreiche Erbkrankheit bekannt, zeigt sich das Ehlers-Danlos-Syndrom in seinem vierten Typ als vaskuläre Variante. Durch eine Mutation im COL3A1-Gen, welches für die pro- $\alpha$ 1(III)-Kette des Kollagens Typ III codiert, führt dieser Typ zu einem frühzeitigen Auftreten von Aortenaneurysmen [137].

Wågsäter et al. richteten unseren Fokus auf Kollagen, indem sie in Aneurysmen bei Patienten mit BAV im Vergleich zu Patienten mit nichtdilatierten TAV eine reduzierte Kollagen-Quervernetzung nachwiesen. Dies begründeten sie durch einen Defekt in der posttranslationalen Kollagenmodifikation [185].

## 2.4. Fragestellung

Obwohl geeignete Beweise vorliegen, dass die BAV eine vererbte Erkrankung ist, gibt es eine große Kontroverse über die Pathogenese der Dilatation der ascendierenden Aorta bei Patienten mit bicuspidaler oder unicuspidaler Aortenklappe.

Zu Beginn ging man von einer hämodynamischen Genese der BAV aus, jedoch hat die genetische Theorie in der letzten Dekade zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der ätiopathogenetische Paradigmenwechsel hat eine aggressivere Behandlungsempfehlung bei solchen Patienten, z.B. mit Marfan-Syndrom, nach sich gezogen [29, 46].

Kontrovers hat sich herauskristallisiert, dass sich bei klinisch unauffälligen BAV Patienten abnorme Flussmuster und asymmetrisch gesteigerte Scherspannungen in der ascendierenden Aorta nachweisen ließen. Wiederum gibt es eine Subgruppe (10 – 15 %) von jungen männlichen Patienten mit BAV und Aortendilatation, welche die überwiegend genetische Form der BAV darstellen könnte. Zusätzlich unterstützt Kean et al die genetische Theorie mit seiner Aussage, dass Patienten, nach matching der Flussmuster, mit BAV einen größeren Aortendurchmesser als Patienten mit TAV haben [114].

Desweiteren besteht die Feststellung, dass das Aneurysma nach Ersatz der bicuspidalen Aortenklappe weiterwächst [14, 32, 66, 127, 150].

Die hohe Relevanz dieses Themas mündet in der Fragestellung nach der Indikation für eine operative Intervention und zum anderen nach einer möglichen medikamentösen Therapie [39].

In Anbetracht dieser wichtigen Erkenntnisse, folgen wir der vorherrschenden genetischen Theorie und stellen uns den Fragen:

1. Muster der Genexpression in der normalen Aorta?
2. Gibt es unterschiedliche Expressionsmuster in Abhängigkeit vom morphologischen Aortenklappentyp?
3. Gibt es lokalisationsabhängige Unterschiede in der Genexpression?
4. Gibt es spezifische Genexpressionsmuster bei Patienten mit dilatierter Aorta im Vergleich zu Patienten mit normaler Aorta?
5. Gibt es Unterschiede in der Genexpression von BAV-Patienten, die sich im Fusionstyp unterscheiden?

### 3. Material und Methoden

Dieses prospektive Studiendesign wurde gemäß der Deklaration von Helsinki geleitet und von der lokalen Studienkommission genehmigt. (Ethikkommission bei der Ärztekammer des Saarlandes, No. 205/10). Alle Patienten legten eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

#### 3.1. Proben

Von 107 Patienten, die einer offenen Herzoperation im Rahmen einer Aortenklappenrekonstruktion oder eines Aortenklappenersatz bei insuffizienter oder stenosierter ascendierender Aorta unterzogen wurden, sind Gewebeproben aus der ascendierenden Aortenwand gewonnen worden. Dabei wurden 5 unterschiedliche Lokalisationen ausgewählt (Abbildung 5). Im Operationssaal wurde die Gewebeprobe direkt aus dem Situs vom Operateur, maximal 5 Minuten nach Klemmen der Aorta, auf eine RNase-freie Petrischale gegeben. Die Probe wurde unter sterilen Bedingungen in Cryo-Röhrchen (Fa. Greiner, Deutschland) auf  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um das Aortenwandstück effizient zu nutzen, wurde das Gewebestück - Durchmesser größer 1,5 cm - geteilt. Die Cryo-Röhrchen wurden zuvor durch die Personalien des Patienten und einer fortlaufenden Nummer klar gekennzeichnet.

Mittels der transösophagealen Echokardiographie wurde präoperativ der aortale Durchmesser auf Höhe des aortoventrikulären Übergangs (AV), des Sinus Valsalva, des sinotubulären Übergangs (ST) sowie der tubulären Aorta ascendens gemessen (Abbildung 5).

Die ascendierende Aorta wurde bei einem Sinus-Durchmesser oder einem tubulären Aortendurchmesser von  $\geq 40\text{ mm}$  als dilatiert definiert. Die Proben wurden intraoperativ an der Konvexität und Konkavität auf Höhe des sinotubulären Übergangs (A1 und A2) und der tubulären Aorta 2 cm über dem sinotubulären Übergang (B1 und B2; Abbildung 5) entnommen. Die aus Entnahmeort C gewonnen Proben wurden nicht für diese Studie verwendet.

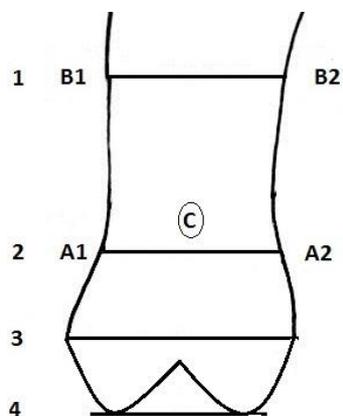


Abbildung 5: Bestimmung der Durchmesser der ascendierenden Aorta via transösophageale Echokardiographie: 1. Tubuläre Aorta ascendens, 2. Sinotubulären Übergang (ST), 3. Sinus Valsalva, 4. Aortoventrikulärer Übergang

Bei der Aufnahme der Patientendaten wurde insbesondere auf folgende klinische Merkmale geachtet:

Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Größe, Gewicht, Nierenerkrankungen, Tagesausscheidung, Urinmenge, arterielle Hypertonie, Raucher, pAVK, KHK, Arrhythmie, SM-Träger, Diabetes, Insulin, Nephropathie, PNP, Retinopathie, Medikation ( $\beta$ -Blocker, ACE-Hemmer, AT-Blocker, ASS, Plavix, NSAR, Diuretika).

Die Patienten wurden je nach Klappen- und Aortenmorphologie (nach Anzahl der Aortenklappen erfolgte Einteilung in uni-, bi- oder tricuspide), dem Fusionstyp sowie dem Aortendurchmesser auf der Wurzelebene, dem Sinus, dem sinutubulären Übergang und der ascendierenden Aorta in 6 verschiedene Gruppen eingeteilt:

UAV-D: unicuspidale Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens

UAV-ND: unicuspidale Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens

BAV-D: bicuspidale Aortenklappe mit Dilatation der Aorta ascendens

BAV-ND: bicuspidale Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens

TAV-N: tricuspide Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens

TAV-ND: tricuspide Aortenklappe ohne Dilatation der Aorta ascendens

	TAV-D (n=19)	TAV-N (n=29)	BAV-D (n=28)	BAV-N (n=10)	UAV-D (n=12)	UAV-N (n=9)
<b>Alter (Jahre)</b>						
<b>M</b>	59,7	66,7	52,9	59,4	43,3	31,9
<b>SE</b>	$\pm 5,4$	$\pm 7,2$	$\pm 8,3$	$\pm 4,7$	$\pm 5,6$	$\pm 5,8$
<b>Geschlecht (m/w)</b>	16/3	18/11	26/1	08/2	11/2	06/3
<b>Maximaler Aortendurchmesser (mm)</b>						
<b>M</b>	5,3	3,2	4,7	3,6	4,9	3,1
<b>SE</b>	$\pm 1,1$	$\pm 0,8$	$\pm 0,48$	$\pm 0,24$	$\pm 1,2$	$\pm 0,6$
<b>Spannweite</b>	42-81	24-39	40-53	32-39	42-57	20-39

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

Die klinischen Daten der Patienten, die in die Studie einbezogen wurden, sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Das Gewebe von Patienten mit tricuspiden Aortenklappen ohne Dilatation der Aorta ascendens wurde als Kontrollgewebe verwendet.

	<b>Tricuspid (n=48)</b>	<b>Bicuspid (n=38)</b>	<b>Unicuspid (n=21)</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	63,9 ± 13,6	54,7 ± 15,1	37,8 ± 13,0
<b>Geschlecht (m/w)</b>	33/15	35/3	16/3
<b>Aortenklappen-Pathologie</b>			
<b>Stenose</b>	13 (27,1%)	29 (76,3%)	4 (19,0%)
<b>Insuffizienz</b>	27 (56,3%)	3 (7,9%)	9 (42,9%)
<b>Kombiniertes Vitium</b>	8 (16,7)	6 (15,8%)	8 (38,1%)
<b>Begleiterkrankungen</b>			
<b>Hypertonie</b>	29 (60,4%)	12 (31,6%)	3 (14,3%)
<b>Diabetes mellitus</b>	2 (4,2%)	0	0
<b>Hyperlipidämie</b>	7 (14,6%)	7 (18,4%)	0
<b>KHK</b>	14 (29,2%)	2 (5,3%)	1 (4,8%)
<b>Medikation</b>			
<b>β-Blocker</b>	20 (41,7%)	17 (44,7%)	6 (28,6%)
<b>ACE-Hemmer</b>	19 (39,6%)	14 (36,8%)	5 (23,8%)
<b>AT1-Rezeptor-Antagonisten</b>	7 (14,6)	5 (13,2%)	1 (4,8%)
<b>Diuretikum</b>	14 (29,2%)	13 (34,2%)	1 (4,8%)
<b>Insulin</b>	3 (6,3%)	0	0
<b>Kalziumkanal Blocker</b>	10 (20,8%)	3 (7,9%)	1 (4,8%)
<b>Statin</b>	15 (31,3%)	7 (18,4%)	0
<b>Aldosteron-Antagonisten</b>	6 (12,5%)	1 (2,6%)	1 (4,8%)

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

### 3.2. Homogenisierungen/Zellaufschluss

Die Homogenisierung erfolgte unter einem Abzug und RNase-freien Bedingungen.

In ein steriles PP-Tube (Fa. Sarstedt) wurden 625 µl „Ambion Cell Disruption Buffer“ mit 625 µl „2xDenaturation Solution“ aus dem mirVanaParisKit (Fa. Ambion) pipettiert. Zuvor wurde die „2xDenaturation Solution“, mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-ME zu je 1 ml RLT-Puffer) versetzt. Die 2 Reagenzien, „Ambion Cell Disruption Buffer“ und „2xDenaturation Solution“, wurden im Wasserbad (Mettler®) auf 25/37 °C temperiert und mit einer Frequenz von 108 min<sup>-1</sup> durchmischt.

Zur Homogenisierung wurde von der bei -80 °C gelagerten Aortenwand auf einer RNase-freien Petrischale mit einem sterilen Skalpell ein Stück Gewebe abgeschnitten. Dieses Gewebestück wurde, ohne aufzutauen, in die vorbereitete sterile Tube mit dem Reagenziengemisch überführt und das Gewicht des Gewebestücks ermittelt. Dieses Stück Aortenwand wurde mittels der Präzisionswaage BP 310 S (Sartorius AG) gewogen. Die zu homogenisierende Gewebemenge sollte zwischen 60 – 100 mg liegen, um in den anschließenden Schritten genügend RNA für die PCR zu gewinnen.

Die Aortenwand wurde mittels eines „ULTRA -TURRAX® high-performance disperser by IKA®“ im vorbereiteten Reagenziengemisch homogenisiert. Bei diesem Verfahren wurden die Zellen aufgeschlossen, um die RNA daraus isolieren zu können. Der Ultra Turrax wurde auf höchster Stufe unter Vermeidung von Schaumbildung verwendet. Nach dem Zerkleinern wurde die Probe mittels Ultraschallgerät (Ultraschallprozessor UP100H, Fa. Hielscher) mit der Einstellung Cycle 0,5 und Amplitude 50 weiter aufgeschlossen. Danach wurde das Homogenisat 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf zwei Reaktionsgefäße zu gleichem Volumen von 625 µl verteilt und im weiteren Verlauf gleich behandelt. Das Homogenisat, falls nicht direkt im Anschluss die Isolierung folgte, wurde auf -80 °C tiefgefroren.

Während des ganzen Vorgangs wurden die Proben auf Eis gelagert. Nach jedem Vorgang wurden die Geräte gründlich mit Frekanol und anschließend mit sterilem Wasser gereinigt.

### 3.3. RNA-Isolierung

#### 3.3.1. Grundregeln der RNA-Isolierung

Grundsätzlich während allen Arbeitsschritten der RNA-Isolierung ist zu beachten, dass nur RNase-freie Lösungen und Reaktionsgefäße zu benutzen sind und Einmalhandschuhe getragen werden, um RNA-Kontaminationen zu vermeiden.

Zur RNA-Isolierung der Aortenproben wurde das mirVanaParis® Kit der Firma „Ambion“ verwendet. Um eine Kontamination der zu isolierenden RNA mit DNA auszuschließen, wurde während der RNA-Isolierung ein RNase-Free DNase Set (#79254) der Firma Qiagen verwendet. Die hier enthaltene DNase I wurde in den anschließenden Waschschrinen wie andere Kontaminationen ausgewaschen. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

#### 3.3.2. DNA-Extraktion mit Acid-Phenol-Chloroform

Das Homogenisat wurde direkt nach der Homogenisierung oder nach Auftauen von -80 °C auf zerkleinertem Eis der Extraktion zugeführt. Zur Extraktion der DNA wurde zum Lysat die 1,25-fache Menge Acid-Phenol-Chloroform hinzugegeben und mittels Vortex gemischt, um der Entstehung von Präzipitaten entgegen zu wirken. Das Gemisch wurde bei 4 °C für 20 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG). Durch die Zentrifugation wurde das Lysat-Acid-Phenol-Chloroform-Gemisch in drei Phasen aufgeteilt. Die oberste Phase ist wässrig und enthält die RNA, die mittlere Phase/Interphase enthält die DNA und die untere Phase/Chloroformphase enthält die Proteine. Danach wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in den Folgeschritten die darin enthaltene RNA durch Zugabe von Ethanol präzipitiert (siehe 3.3.3)

#### 3.3.3. DNA-Fällung

Bei der Ethanol-fällung wird die DNA unter leicht sauren Bedingungen (pH 5,2) in einer weniger polaren Umgebung aufgrund der Verringerung der Löslichkeit ausgefällt [88]. Die DNA-Fällung dient der Auftrennung der Zellextrakte in DNA, RNA und Proteine. Der klare Überstand beider Reaktionsgefäße, die oberste Schicht, in welcher sich die RNA befindet, wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,7 ml) überführt. Die Nukleinsäuren verbleiben aufgrund ihres hydrophilen Charakters in der oberen wässrigen Phase gelöst.

Das Volumen des abpipettierten klaren Überstandes der obersten Schicht wurde bestimmt und 1/3 des bestimmten Volumens Ethanol 96 % hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß mit L-Filter zur Immobilisation

der RNA mittels Glasfasern gegeben. Die Filter konnten maximal mit 700µl Homogenisat pro Zyklus beschickt werden. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 Sekunden bei 4 °C mit 9000 x g (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG). Der Durchfluss wurde in ein Mikroreaktionsgefäß für die SRNA pipettiert. [Die SRNA=small RNA; ist eine Basensequenz von weniger als 25 Nukleotiden, während die mRNA eine Länge von mehreren Tausend Nukleotiden aufweisen kann. Sie greifen regulierend in vielfältige Prozesse ein, die auf dem Weg von der nackten genetischen Information zum fertigen Protein ablaufen.]

Das Durchflussvolumen wurde bestimmt und 2/3 des Volumens x Ethanol 96% hinzugefügt und in einem Mikroreaktionsgefäß mit S-Filter 4 °C mit 9000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss aus dem Mikroreaktionsgefäß mit S-Filter wurde verworfen. Die Schritte wurden so oft wiederholt, bis das gesamte Lysat die Filter (Säulenmembran aus Glasfasern) durchflossen hatte. Die Filter, L-Filter und S-Filter, wurden auf Eis gelagert [88].

#### **3.3.4. Reinigung der Filter**

Es folgten drei Waschschriffe, deren Waschlösungen sich in der Konzentration von Ethanol unterschieden. Beide Filter wurden gleich behandelt. Beim ersten Waschschriffe wurden auf die Filter jeweils 350 µl miRNA wash solution 1 (30 ml RPE-Puffer-Konzentrat versetzt mit 21ml 100% Ethanol) pipettiert und anschließend bei 4°C mit 9000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Folgend wurde die DNA auf der Säulenmembran mit DNase I verdaut (RNase-Free DNase Set # 79254, QIAGEN). Dazu wurden 10 µl DNase I-Lösung mit 70 µl RDD-Puffer gemischt, direkt auf die Membran pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Beim zweiten Waschschriffe wurden die Säulen erneut mit 350 µl wash solution 1 gewaschen und anschließend bei 4 °C mit 9000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Beim dritten Waschschriffe wurde der Filter mit Wash Solution 2/3 (50ml RPE-Puffer-Konzentrat versetzt mit 40 ml 100% Ethanol) pipettiert und für 30 Sekunden bei 4 °C und 9000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Zyklus, mit der Wash Solution 2/3, wurde ein zweites Mal wiederholt.

#### **3.3.5. RNA-Eluierung**

Nach den Waschschriffen wurden die Säulen zum Trocknen eine Minute bei 9000 x g und 4 °C zentrifugiert. Um die RNA zu eluieren, wurden die Säulen anschließend in

neue Reaktionsgefäße (1,7 ml) überführt. Die Säule wurde mit 40 µl 96 °C warmer Elutionslösung beschickt und für 1 Minute bei 9000 x g zentrifugiert. Im Zentrifugat befindet sich nun die L- und S-RNA. Von dieser gewonnenen RNA wurden 6 µl für die photometrische Konzentrationsbestimmung entnommen. Die restliche RNA (ca. 34 µl) wurde bis zur weiteren Verwendung (cDNA-Synthese, siehe 3.3.6) bei -80 °C gelagert.

Exemplarisch sind die Schritte DNA-Extraktion, DNA-Fällung, Reinigung der Filter und RNA-Eluierung in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

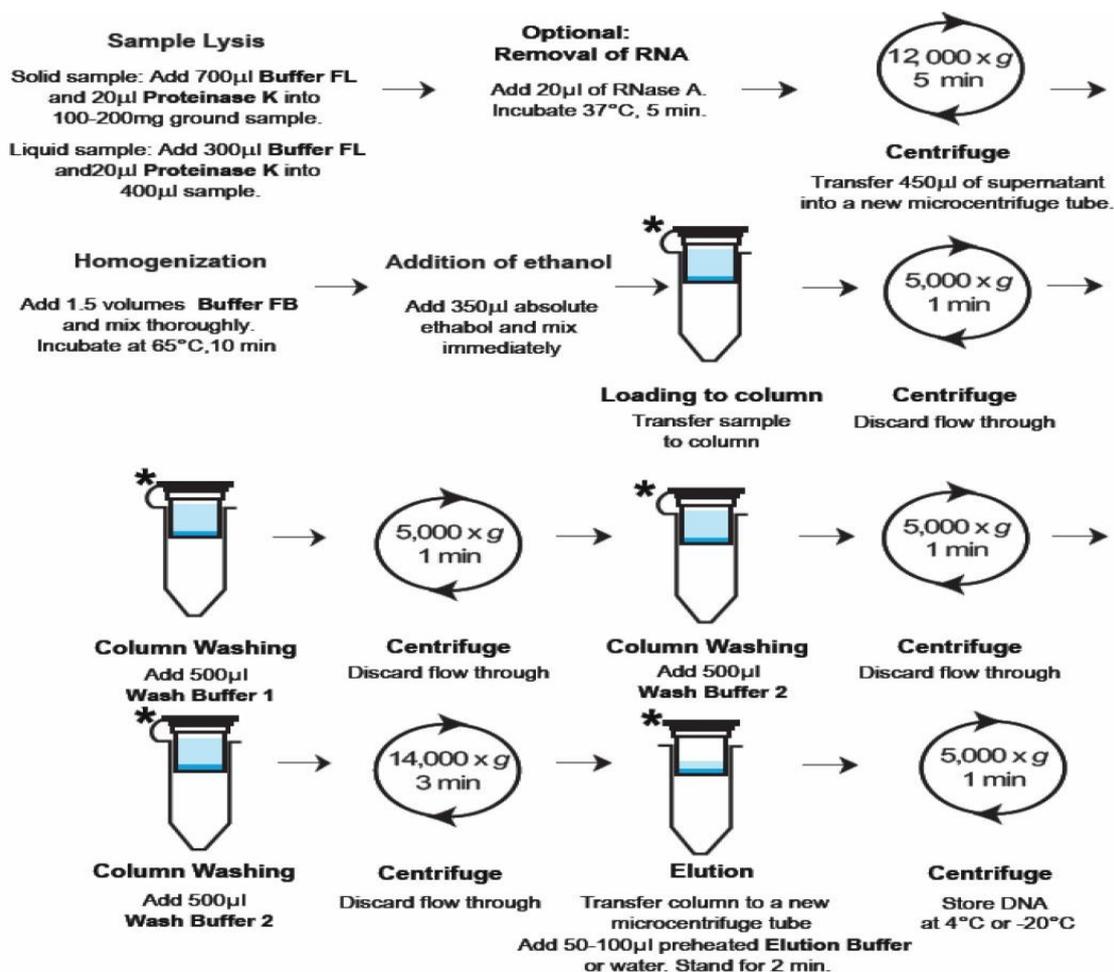


Abbildung 6: Schritte DNA-Extraktion, DNA-Fällung, Reinigung der Filter und RNA-Eluierung [121]

### 3.3.6. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde mit dem "TECAN infinite M200" (Fa. Tecan) mittels einer „Nano Quant Platte-Tecan 16 Flat Bottom black Quarz/Alu durchgeführt und mit der Software „i-control 1.6“ ausgewertet. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption der Nucleinsäuren bei 260 nm und 280 nm gemessen und nach der Formel:

Nucleinsäurekonzentration (µg/ml) = Faktor x A<sub>260</sub>,

berechnet, wobei der Faktor bei Doppelstrang - DNA 50 µg/ml, bei Einzelstrang - RNA oder –DNA 40 µg/ml beträgt. Diese Angaben beziehen sich auf DNA -freie RNA bzw. auf RNA – freie DNA. Mögliche Verunreinigungen von Phenolresten oder Proteinen können bei 280 nm detektiert werden, weshalb die Reinheit der Präparation aus dem Quotienten (Ratio) von A260/A280 ermittelt wurde. Qualitativ reine RNA weist nach Sambrook [173] und Chomczynski [26] et al. einen Quotienten von 2,0 auf.

Das Isolat wurde gut gemischt (10 x mit 20 µl Pipette langsam auf und ab pipettieren) und die Konzentrationsbestimmung als Triplikat durchgeführt. Zur Nullwerteneinstellung (Blank) wurde die Elutionslösung aus dem mirVana Kit benutzt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der Probe auf die Quarzglasfelder der Platte pipettiert.

Als Qualitätssiegel unserer Resultate galt ein Sollwert für den Extinktions-Quotienten zwischen 1,8 bis 2,1 und eine RNA-Konzentration größer 60ng/µl, sodass für die folgenden Experimente genügend RNA isoliert werden konnte. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Exemplarisch wird in Abbildung 7 die Konzentrationsbestimmung der RNA mittels des Programms „Tecan i-control“ dargestellt.

Sample Typ:		RNA		1		2	
A	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,1732 OD	<b>138,56 ng/µl</b>	260	0,0188 OD	<b>15,04 ng/µl</b>	
	280	0,0804 OD	<b>2,15 ratio</b>	280	0,0089 OD	<b>2,11 ratio</b>	
B	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,1702 OD	<b>136,16 ng/µl</b>	260	0,0189 OD	<b>15,12 ng/µl</b>	
	280	0,0786 OD	<b>2,17 ratio</b>	280	0,009 OD	<b>2,1 ratio</b>	
C	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,1329 OD	<b>106,32 ng/µl</b>	260	0,0143 OD	<b>11,44 ng/µl</b>	
	280	0,0619 OD	<b>2,15 ratio</b>	280	0,0079 OD	<b>1,81 ratio</b>	
D	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,1352 OD	<b>108,16 ng/µl</b>	260	0,0147 OD	<b>11,76 ng/µl</b>	
	280	0,0625 OD	<b>2,16 ratio</b>	280	0,0085 OD	<b>1,73 ratio</b>	
E	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,1304 OD	<b>104,32 ng/µl</b>	260	0,0078 OD	<b>6,24 ng/µl</b>	
	280	0,0612 OD	<b>2,13 ratio</b>	280	0,0043 OD	<b>1,81 ratio</b>	
F	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,1298 OD	<b>103,84 ng/µl</b>	260	0,0085 OD	<b>6,8 ng/µl</b>	
	280	0,0608 OD	<b>2,13 ratio</b>	280	0,0046 OD	<b>1,85 ratio</b>	
G	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,2362 OD	<b>188,96 ng/µl</b>	260	0,0084 OD	<b>6,72 ng/µl</b>	
	280	0,1095 OD	<b>2,16 ratio</b>	280	0,0045 OD	<b>1,87 ratio</b>	
H	Abs	Value		Abs	Value		
	260	0,2352 OD	<b>188,16 ng/µl</b>	260	0,0079 OD	<b>6,32 ng/µl</b>	
	280	0,1087 OD	<b>2,16 ratio</b>	280	0,0042 OD	<b>1,88 ratio</b>	

Abbildung 7: Konzentrationsbestimmung der RNA mittels des Programms „Tecan i-control“

### 3.3.7. cDNA-Synthese

Für die anschließende Durchführung der qPCR musste die einsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden.

Bei dieser reversen Transkription (RT) findet eine Umschreibung der mRNA in cDNA statt, wobei die Sequenzabfolge der mRNA als Vorlage/Matrize dient. Diese wird durch das Enzym Reverse Transkriptase in die komplementäre DNA umgeschrieben. Die Tatsache, dass mRNA-Moleküle am 3`-Ende polyadenyliert sind, ermöglicht es einen Oligo-dT-Primer als Startpunkt für die cDNA Synthese zu verwenden. Dieser Primer ist ein Oligonukleotid aus ca. 15 Thymin-Nukleotiden, welches spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet.

Die Umschreibung der RNA – auch als RT-PCR bezeichnet – erfolgte mit dem „High capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ von Applied Biosystems unter Verwendung des PCR-Cyclers „GeneAmp®PCR System 9700“.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte unter der Werkbank „captair®bio by erlab“ durchgeführt.

Das bei –80 °C gefrorene Isolat und die Komponenten des „High capacity cDNA Reverse Transcription Kits“, DEPC Wasser, Reverse Transkriptase, dNTP-Mix, RNase Inhibitor, Buffer und Random Primer wurden langsam auf Eis aufgetaut.

### 3.3.8. Master Mix Ansatz (Endvolumen 10 µl)

Komponente	1 x Ansatz (µl)	13 x Ansatz (µl)
Nuclease free water	0-3,2*2Berechnung	0- 41,6
10x RT Buffer	2,0	26,0
10 RTRandom Primer	2,0	26,0
25x dnTPMix 100mM	0,8	10,4
RNase Inhibitor	1,0	13,0
MultiscribeRT	1,0	13,0
Total per Reaktion	6,8-10,0	88,4-130,0

Tabelle 3: Exemplarisch wird hier ein einfacher und ein dreizehnfacher Ansatz dargestellt.

Der Master Mix (MM, Endvolumen 10 µl) wurde in der folgenden Reihenfolge in Sicherheitsreaktionsgefäße („Multi®-SafeSeal®Tubes farblos“, Füllvol./Nennvol. 1,5/1,7 ml, Carl Roth GmbH+Co. KG, Artikel 7080.1) pipettiert.

3,2 µl „Nuclease free water“ (Wasser, DEPC-behandelt, steril und autoklaviert, Art.-Nr. T143.3“, Carl Roth GmbH RT-Kit auf -20 °C gelagert.), 2 µl „10xRT Buffer“, 2 µl „10 RT

Random Primers“, 0,8 µl “25xdNTP Mix 100 mM, 1 µl “RNase Inhibitor“ und 1 µl “Multiscribe RT“. Anschließend 1 Sekunde mit dem Vortex gemischt. 10 µl MM in PCR TW Tube (0,2 ml, farblos, frosted“, Biozym Scientific GmbH, Art.-Nr.: 712028) um pipettiert. Die berechnete RNA Menge (Tabelle 3) hinzugegeben und bis zu einem Endvolumen von 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. 2 µl des Isolats für den Bioanalyser (siehe Schritt 3.5) auf -80 °C aufbewahrt.

Zur Effizienzsteigerung wurde ein vielfacher MM Ansatz verwendet. Es wurde immer ein Ansatz zusätzlich pipettiert, um den Pipettierverlust auszugleichen.

Von dem angesetzten MasterMix wurden 10 µl in ein 0,2 ml PCR TW Tube (Biozym Scientific GmbH) pipettiert. Pro Reaktion wurden 2.000 ng RNA eingesetzt und die dafür berechnete RNA Menge hinzugegeben und bis zu einem Endvolumen von 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Zur Bestimmung der RIN-Zahl (siehe 3.5) wurden 2µl des Isolats bei 70 °C, 2 min erhitzt und sofort bei -80 °C eingefroren.

#### Pipettieren von H<sub>2</sub>O + MasterMix + RNA in PCR-Tubes

1. Ziel ist es max. 2000 ng RNA aus unserer Probe umzuschreiben.

RNA	0,1 – 13,2 µl	*Berechnung
H <sub>2</sub> O	0-13,1 µl	* <sup>2</sup> Berechnung
MM	6,8 µl	Fix Wert
Endvolumen	20 µl	

Tabelle 4: Pipettierschema

2. \*Berechnung des RNA Volumens:  $(2.000 \text{ ng}) / (c \text{ der Probe ng/}\mu\text{l})$   
 (z.B.  $2.000 \text{ ng} / 200 \text{ ng/}\mu\text{l} = 10 \mu\text{l}$   
 $2.000 \text{ ng} / 400 \text{ ng/}\mu\text{l} = 5 \mu\text{l}$   
 $2.000 \text{ ng} / 57 \text{ ng/}\mu\text{l} = 34,9 \mu\text{l} = 13,2 \mu\text{l}$  (Endvolumen muss immer 20 µl sein und MM ist mindestens 6,8 µl, so ist das max. RNA Volumen 13,2 µl)
3. \*<sup>2</sup>Berechnung des H<sub>2</sub>O Volumens:  $20 \mu\text{l} - (\text{MM} + \text{RNA})$
4. Protokollieren
5. Sterilwerkbank desinfizieren

Jede RNA-Probe wurde wie auch bei den RNA-Proben Aortenwand auf Kontamination mit genomischer DNA überprüft, indem ein Parallelansatz ohne RT-Zusatz im MasterMix hergestellt wurde (RTnegKontrolle). Hier wurde dem MasterMix nur 10µl

RNase freies Wasser hinzugefügt. Dieses Reagenz enthielt keine RNA und konnte somit bei der Real Time PCR, da hier nichts amplifiziert werden konnte, als ein Maß für die saubere Arbeit herangezogen werden.

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das Gemisch in den Reaktionsgefäßen "PCR TW Tube, 0,2 ml, farblos, frosted" in den Thermocycler "GeneAmp®PCRSystem 9700" eingelegt. Die Gesamtlaufzeit betrug circa 140 Minuten.

Die RT-PCR wurde mit folgendem Zyklusablauf durchgeführt:

	Step1	Step2	Step3	Step4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120min (60min + 60min)	5 min	∞

Abbildung 8: Thermalschema Thermocycler

Im ersten Schritt (10min, 25 °C) erfolgt die Anlagerung der Primer an die RNA-Matrize (Annealing). In „Step2“ (120min, 37 °C) findet die cDNA Synthese durch die Reverse Transkriptase statt, die bei 37 °C ihr Aktivitätsmaximum besitzt. Diese wird anschließend bei 85 °C 5 min inaktiviert, damit sie bei der Real-Time PCR keinen störenden Einfluss hat). Im letzten Schritt wurde der Thermocycler auf 4 °C abgekühlt, um die cDNA stabil zu halten. Im Anschluss wurde der Arbeitsplatz mit Frekanol desinfiziert.

Exemplarisch sehen wir in 7. Anhang ein Musterblatt für den MasterMix Ansatz.

### 3.4. Real Time PCR (qPCR)

Im Jahr 1984 veröffentlichte Kary Mullis erstmals die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), eine der inzwischen wichtigsten und weit verbreitetsten Techniken der Molekularbiologie. Sie stellt eine leistungsfähige, einfach durchzuführende in vitro Methode zur gezielten Amplifikation (lat. *amplus*: reichlich; *facere*: machen) von Nukleinsäuren dar. Auch geringe Ausgangsmengen einer DNA- oder cDNA-Vorlage können schnell zu mehreren Milliarden Kopien vervielfacht werden, die dann für weitere Analysen wie Elektrophorese, Restriktionsverdau oder Klonierung zur Verfügung stehen.

Die zu amplifizierende Zielsequenz ist üblicherweise zwischen 100 und 1000 bp lang. Sie wird an ihrem 5`- bzw. 3`-Ende durch zwei etwa 15-30 bp lange Oligonukleotide, den so genannten Primern, flankiert. Hierbei ist der so genannte „forward“-Primer komplementär zum Anfangsstück der Zielsequenz im sogenannten „sense“-Strang der DNA. Der „reverse“-Primer hingegen ist dem Ende der Zielsequenz im „anti-sense“-Strang komplementär. Die klassische PCR besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Primer-Anlagerung („Annealing“) und Extension. Eine anfängliche Temperaturerhöhung auf 95 °C dient der Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge. Im nächsten Schritt, dem Annealing, erfolgt eine Abkühlung auf eine durch die Primer-Sequenz spezifisch festgelegte Temperatur. Die Primer können sich hierbei an die komplementäre Stelle der DNA heften und dienen in der folgenden Extensionsphase als Startpunkt für die Synthese des neuen DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase. Die Temperatur während der Extension ist höher als die während des Annealings und abhängig von der jeweilig verwendeten Polymerase. Das Aktivitätsoptimum der in diesem Fall verwendeten thermostabilen Taq Polymerase lag bei 72 °C. Da die Polymerase nur in 3`→5`-Richtung synthetisiert und ein kurzes Stück Doppelstrang (an die DNA angelagerte Primer) als Ausgangspunkt der Elongation benötigt, sind nach dem ersten Durchlauf der drei Schritte neben der ursprünglichen DNA-Vorlage auch kürzere Stücke vorhanden, die jeweils am forward-, bzw. reverse-Primer beginnen. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung, Annealing und Extension entstehen schon ab dem zweiten Zyklus DNA-Fragmente der gewünschten Zielsequenz, die durch die beiden Primer begrenzt werden und als Matrize für die nächsten PCR-Zyklen dienen. Auf diese Art und Weise findet eine spezifische, exponentielle Vervielfältigung der gewünschten Zielsequenz statt. Dabei binden zusätzlich zu den Primern zwei mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden direkt nebeneinander an die Amplifikate. Das abgestrahlte Licht erlaubt es, den zyklischen Vorgang in Echtzeit zu beobachten und quantitative DNA Analysen durchzuführen (qPCR). In der Regel werden 30 bis 40 Zyklen durchlaufen. Wir hatten 45 Zyklen

verwendet. Die einzelnen Schritte dauern zwischen 30 und 60 Sekunden. Um eine optimale Denaturierung der DNA zu gewährleisten, wird den Zyklen ein initialer Schritt mit 95 °C für 5 Minuten vorgeschaltet. Am Ende der PCR erfolgt eine „final extension“ für 5 bis 10 Minuten bei 72 °C. Alle Schritte werden vollautomatisch in einem programmierbaren Heizblock, einem so genannten Thermocycler, durchlaufen [95, 145].

Wir verwendeten den TaqMan® Gene Expression Master Mix (Part No. 4369016) der Firma Applied Biosystems zur Durchführung der Real-Time Polymerase Kettenreaktion. Primer und Sonden wurden durch die jeweiligen Custom TaqMan®Gene Expression Assay der Firma Applied Biosystem zugefügt.

Die qPCR wurde in 3-facher Bestimmung, mit je einem 20 µl Reaktionsendvolumen auf den TaqMan®Custum Plates (P/N: 4398986) von der Firma Applied Biosystems (Foster City), durchgeführt. Die Zielgene und die Gene der endogene Kontrolle sind in Tabelle 5 aufgelistet. Diese wurden mit den TaqMan assays der Firma Applied Biosystems amplifiziert.

Tabelle 5: Gene der endogenen Kontrolle und Zielgene

Endogene Kontrolle	Zielgene
ELF1_Hs00152844_m1	COL3A1_Hs00943809_m1
HMBS_Hs00609297_m1	GATA5_Hs00388359_m1
EIF2B1_Hs00426752_m1	TGFBR1_Hs00610320_m1
	FBN1_Hs00171191_m1
	NOS3_Hs01574659_m1

Als Gewebe wurde die Aortenwand aus der Lokalisation A1, A2, B1 und B2 mit einer unicuspiden, bicuspiden und tricuspiden Aortenklappe mit dilatierter ascendierender Aorta verwendet. Als Referenzgewebe diente die Aortenwand aus der Position A1 und A2 einer nicht dilatierten triscuspiden ascendierenden Aorta.

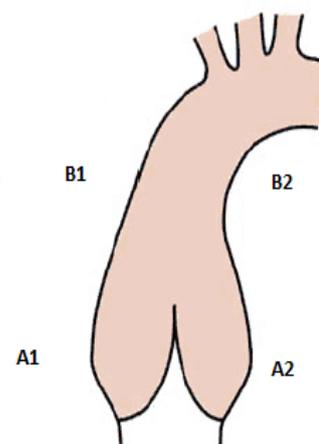


Abbildung 9: Lokalisationen Aorta ascendens [1]

Auf einer Platte, TaqMan®Custum Plates (P/N: 4398986), konnten jeweils 4 Proben bestimmt werden. In Abbildung 10 ist ein Pipettierschema für eine Platte dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TD 64 A2 U NOS3	TD 64 A2 U NOS3	TD 64 A2 U NOS3	TD 64 B1 U NOS3	TD 64 B1 U NOS3	TD 64 B1 U NOS3	TD 64 B2 U NOS3	TD 64 B2 U NOS3	TD 64 B2 U NOS3	TND 230 A2 U NOS3	TND 230 A2 U NOS3	TND 230 A2 U NOS3
B	TD 64 A2 U FBN1	TD 64 A2 U FBN1	TD 64 A2 U FBN1	TD 64 B1 U FBN1	TD 64 B1 U FBN1	TD 64 B1 U FBN1	TD 64 B2 U FBN1	TD 64 B2 U FBN1	TD 64 B2 U FBN1	TND 230 A2 U FBN1	TND 230 A2 U FBN1	TND 230 A2 U FBN1
C	TD 64 A2 U TGFBR1	TD 64 A2 U TGFBR1	TD 64 A2 U TGFBR1	TD 64 B1 U TGFBR1	TD 64 B1 U TGFBR1	TD 64 B1 U TGFBR1	TD 64 B2 U TGFBR1	TD 64 B2 U TGFBR1	TD 64 B2 U TGFBR1	TND 230 A2 U TGFBR1	TND 230 A2 U TGFBR1	TND 230 A2 U TGFBR1
D	TD 64 A2 U GATA5	TD 64 A2 U GATA5	TD 64 A2 U GATA5	TD 64 B1 U GATA5	TD 64 B1 U GATA5	TD 64 B1 U GATA5	TD 64 B2 U GATA5	TD 64 B2 U GATA5	TD 64 B2 U GATA5	TND 230 A2 U GATA5	TND 230 A2 U GATA5	TND 230 A2 U GATA5
E	TD 64 A2 U COL3A1	TD 64 A2 U COL3A1	TD 64 A2 U COL3A1	TD 64 B1 U COL3A1	TD 64 B1 U COL3A1	TD 64 B1 U COL3A1	TD 64 B2 U COL3A1	TD 64 B2 U COL3A1	TD 64 B2 U COL3A1	TND 230 A2 U COL3A1	TND 230 A2 U COL3A1	TND 230 A2 U COL3A1
F	TD 64 A2 U ELF1	TD 64 A2 U ELF1	TD 64 A2 U ELF1	TD 64 B1 U ELF1	TD 64 B1 U ELF1	TD 64 B1 U ELF1	TD 64 B2 U ELF1	TD 64 B2 U ELF1	TD 64 B2 U ELF1	TND 230 A2 U ELF1	TND 230 A2 U ELF1	TND 230 A2 U ELF1
G	TD 64 A2 U EIF2B1	TD 64 A2 U EIF2B1	TD 64 A2 U EIF2B1	TD 64 B1 U EIF2B1	TD 64 B1 U EIF2B1	TD 64 B1 U EIF2B1	TD 64 B2 U EIF2B1	TD 64 B2 U EIF2B1	TD 64 B2 U EIF2B1	TND 230 A2 U EIF2B1	TND 230 A2 U EIF2B1	TND 230 A2 U EIF2B1
H	TD 64 A2 U HMBS	TD 64 A2 U HMBS	TD 64 A2 U HMBS	RTKOneg 64 U HMBS	TD 64 B1 U HMBS	TD 64 B1 U HMBS	TD 64 B2 U HMBS	TD 64 B2 U HMBS	TD 64 B2 U HMBS	TND 230 A2 U HMBS	RTKOneg 230 A2 U HMBS	TND 230 A2 U HMBS

Abbildung 10: Pipettierschema 96 well plate mit den Genen NOS3, FBN1, TGFBR1, GATA5, COL3A1, ELF1, EIF2B1 und HMBS

Um ein optimales Resultat zu erzielen, benötigten wir eine Startmenge von 20 ng cDNA pro well. Die Kalkulierung dieser Menge ist aus Formel 1 zu entnehmen.

In jedem Reaktionsgefäß mit 20 µl Reagenz befinden sich maximal 2.000 ng cDNA

Nach der RT-PCR befindet sich in jedem Reaktionsgefäß in 20 µl Endvolumen maximal 2.000 ng cDNA.

Formel 1

Bestimmung der cDNA Menge pro Reaktionsgefäß

$$cDNA = [LRNA] \times V_{umgeschriebene\ Probe} \text{ (max. } 13,2 \mu\text{l)}$$

$$\text{z.B. } cDNA = \frac{137,36 \text{ ng}}{\mu\text{l}} \times 13,2 \mu\text{l} = 1813,15 \text{ ng}$$

Zur Ansetzung eines Triplikats und 4 Gewebeproben benötigten wir ein Gesamtvolumen von 540 ng cDNA (Pipettierverlust eingerechnet).

Formel 2 zeigt die Berechnung des benötigten Volumens aus dem Reaktionsgefäß mit 20 µl für eine Gesamtmenge von 540 ng cDNA.

Formel 2

$$[20 \mu\text{l}/\text{cDNA}] \times 540 \text{ ng} = \text{Volumen}$$

5 µl MasterMix wurden pro well benötigt. Bei 27 wells benötigten wir eine Gesamtmenge von 135 µl. Die benötigte H<sub>2</sub>O Menge wurde wie in Formel 3 berechnet.

Formel 3

$$\text{H}^2\text{O} = 10 \mu\text{l} - (5\mu\text{l MM} + 0,2 \mu\text{l cDNA}) = 4,8 \mu\text{l}$$

$$4,8 \mu\text{l H}_2\text{O} \times 27 \text{ wells} = 129,6 \mu\text{l}$$

Zuerst wurden das Wasser, dann der lichtempfindliche MM und zuletzt die cDNA pipettiert. Das Gemisch wurde kurz auf dem Vortex (M2 Minishaker) bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend kurz zentrifugiert.

Pro Platte wurden zur Kontrolle des MM, der Reinheit unserer cDNA und des Wassers drei Negativkontrollen- ausschließlich H<sub>2</sub>O und MM sowie H<sub>2</sub>O, MM und den entsprechenden Leerwert pipettiert. Die Platte konnte durch den MicroAmp™ Optical Adhesive Film (PCRCompatible, DNA/RNA/RNase Free P/N4311971) unter Zuhilfenahme des MicroAmp® Adhesive Film Applicator (Lot No. 4333183) abgedeckt werden. Anschließend wurde die Platte eine Minute bei Raumtemperatur und 1.000 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5430, Eppendorf), um sämtliche Flüssigkeit am Boden der Platte abzusetzen. Der PCR Cycler StepOnePlus™ Instrument von Applied Biosystems und die entsprechende Software StepOne Plus v2.3 wurden zur Auswertung verwendet. Die PCR wurde mit 45 Zyklen durchgeführt [96].

Ein Zyklus, bestehend aus „holding stage“ und „cycling stage“, wird in der Abbildung 11 dargestellt.

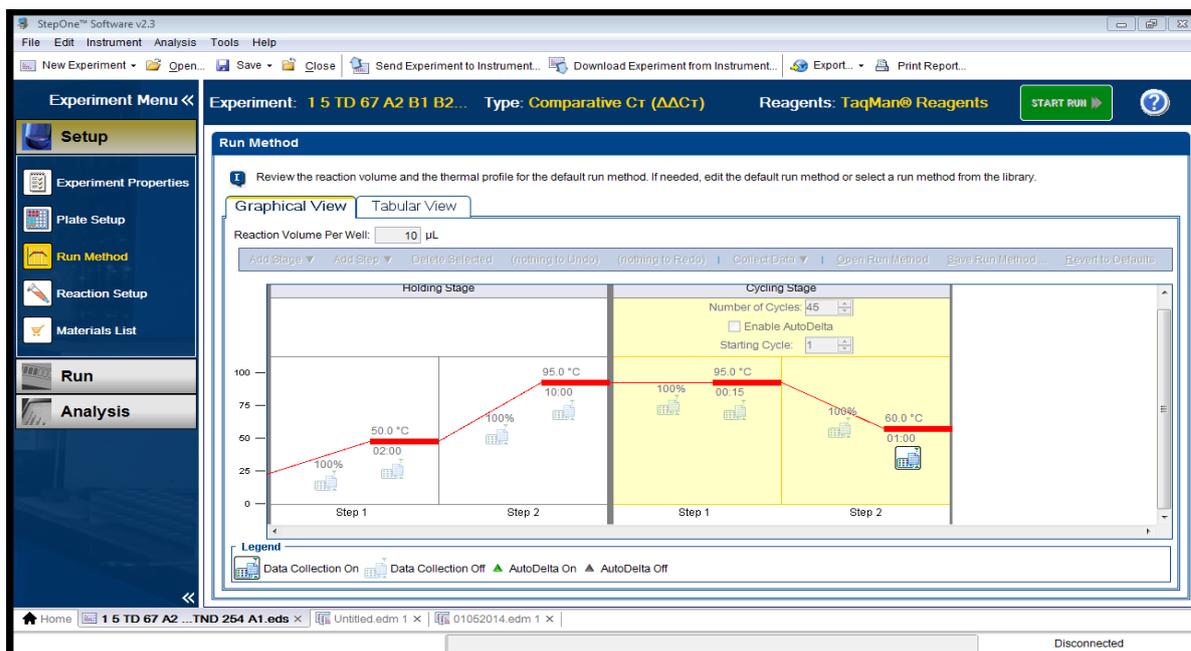


Abbildung 11: qPCR-Zyklus (StepOne™ Software v2.3)

In Abbildung 12 ist ein Amplifikation Plot dargestellt. Hier sehen wir die Anzahl der Amplifikation Zyklen (X-Achse) in Abhängigkeit zu  $\Delta Rn$  (Y-Achse). Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

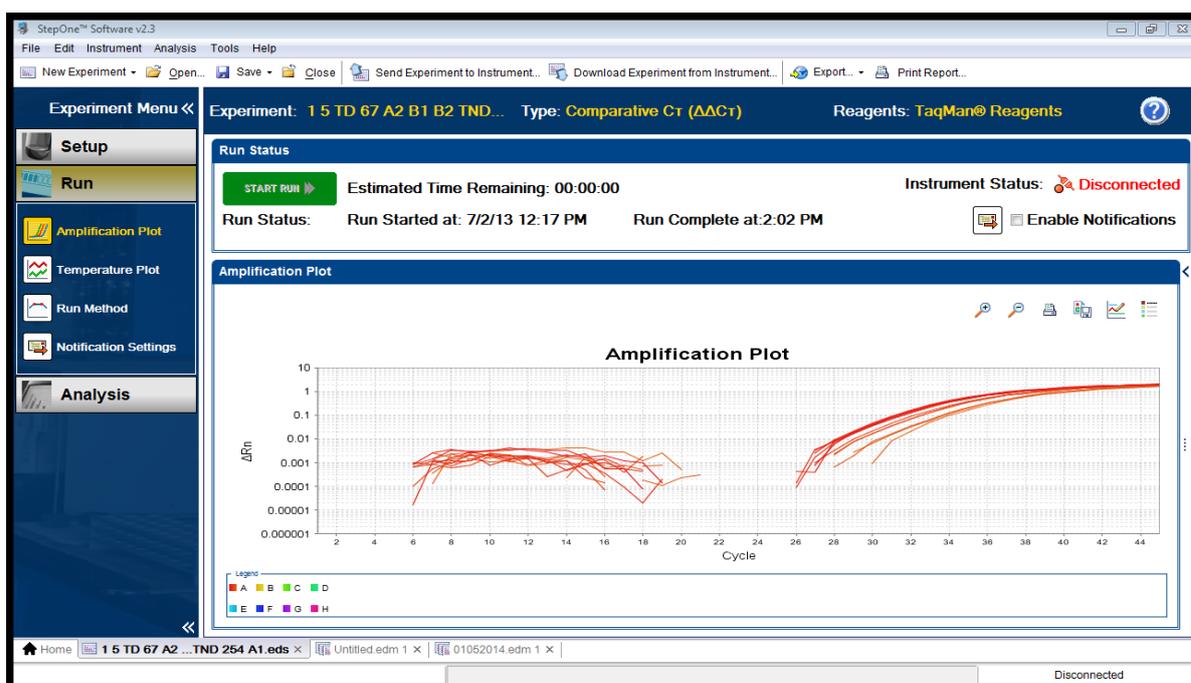


Abbildung 12: Amplifikation Plot (StepOne™ Software v2.3)

### 3.5. RIN Zahl

Die mRNA-Quantifizierung via real-time PCR birgt zahlreiche Fehlerquellen. Vor allem die Messung der RNA-Qualität führt bis dato ein Schattendasein. Das führt häufig zu ungenauen Ergebnissen oder erheblichen Variationen in den Expressionsmustern. Die Präzision der mRNA-Genexpressionsanalyse durch die Quantität und Qualität des Ausgangsmaterials, der Optimierung und Standardisierung der prä- und post-PCR stellt eine Herausforderung für eine valide mRNA-Quantifizierung dar. Signifikant können durch Optimierung der Probenaufbereitung und Bestimmung der RNA-Integrität die Ergebnisse verbessert werden.

Wir haben die RNA- Integrität mittels einer Kapillargelelektrophorese (Bioanalyser 2100, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) überprüft. Dies ist eine schnelle und sensitive RNA-Qualitätsbestimmung via Lab-on-Chip im pg-Bereich. (siehe Abbildung 14)

Das Qualitätslabel für dieses Verfahren ist die sogenannte RNA-Integritätsnummer. Bei diesem System wird der RNA-Qualität ein Zahlenwert, der RIN-Wert, zugeordnet. Eine Skala von 1 bis 10 wird auf der Basis der ribosomalen Untereinheit 28S- zu 18S-RNA und deren Verhältnis sowie degradierte Abbauprodukte ermittelt. 10 entspricht einer völlig intakten RNA und 1 einer vollständig degradierten RNA. Mit der RIN-Skala hat sich inzwischen ein weltweiter RNA-Qualitätsstandard entwickelt.

Eine hohe Variabilität der RIN-Werte wird durch höhere Anteile von Bindegewebe und/oder Fettgewebe, einer erhöhten Enzymaktivität oder durch erschwerte Bedingungen bei der Probenentnahme, der schnellen Degradation der RNA post vitam oder durch inadäquate Probenbearbeitung und Lagerung und den weiteren Amplifikationsschritten bedingt (Abbildung 12). Die RNA-Qualität hat einen Einfluss auf den ermittelten Ct Wert (Cycle threshold), so eignen sich RIN-Werte kleiner 5 auch nach einer Normalisierung nur bedingt zur Genexpressionsanalyse [56, 57].

Alle Messungen wurden gemäß Werksprotokoll durchgeführt. In der „Chip-Priming-Station“ erfolgte zunächst die Beladung des Chips mit 3 x 9µl Gel-Farbstoff-Gemisch. Die Verteilung des Gemisches im Kapillarsystem erfolgte über eine Applikationsspritze. Im Folgenden wurden je 5 µl RNA 6000 bzw. DNA 1000Marker sowie je 1 µl RNA-Größenstandard auf den Chip geladen. Danach erfolgte die Applikation der zu analysierenden Proben (je 1 µl) und eine Durchmischung der Ansätze auf dem IKA Vortex Mixer für 60 sec und 2400 rpm. Direkt im Anschluss erfolgte die automatische Analyse auf dem 2100 Bioanalyser.

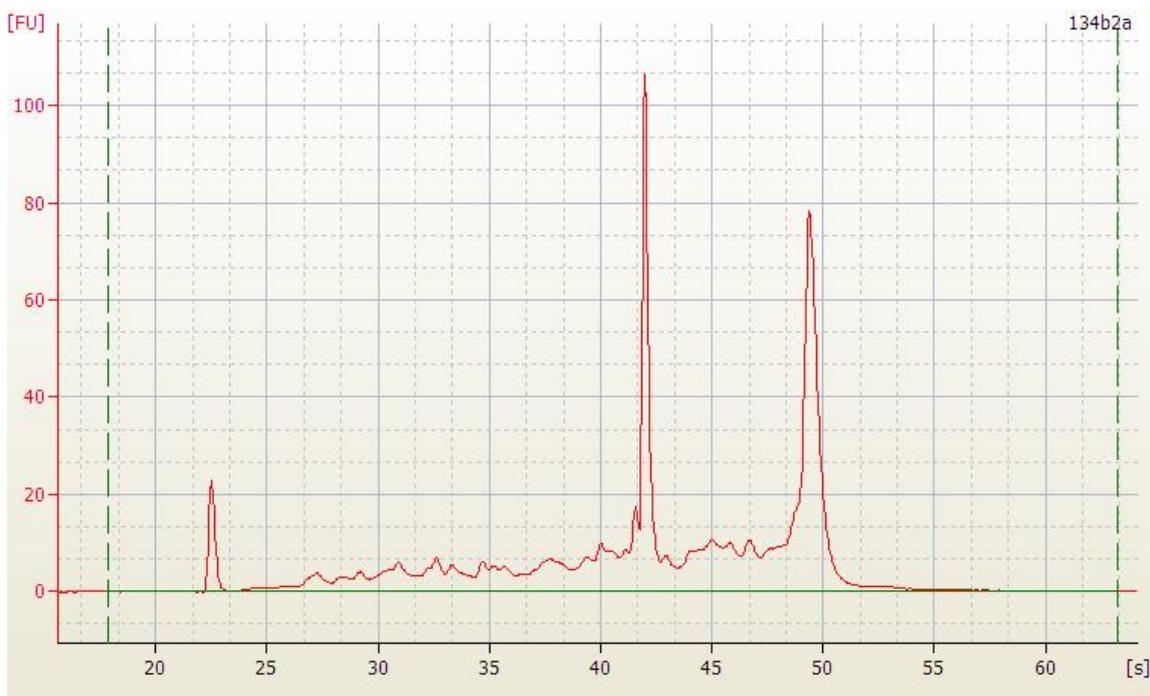


Abbildung 13: Elektropherogramm (2100 Expert Software; Agilent) zur Bestimmung der RIN für eine RNA-Probe (TAV-D, Lokalisation B2). Der erste Peak repräsentiert den Marker, der Zweite die 18 S und der dritte die 28 S ribosomale RNA. Die x-Achse repräsentiert die Zeit in Sekunden (s), die y-Achse repräsentiert die Stärke der Fluoreszenz in Fluoreszenzeinheiten (FU). RNA Integrity Number (RIN)

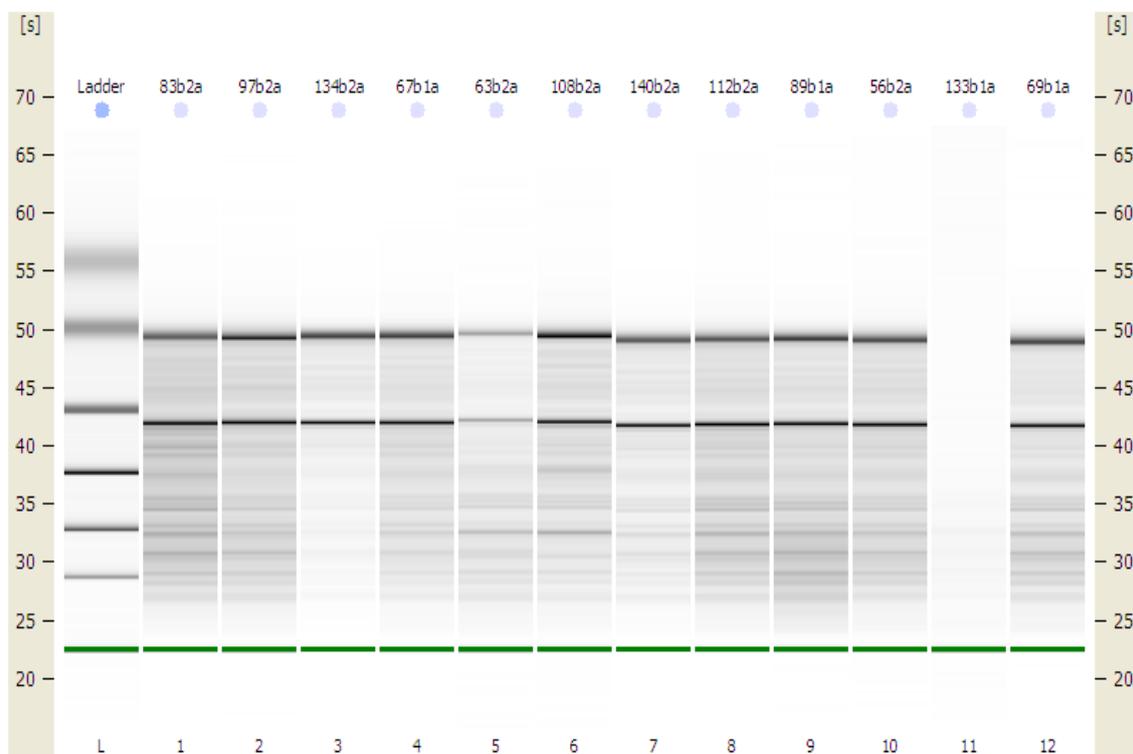


Abbildung 14: Gelelektropherogramm zur Bestimmung der RIN (2100 Expert Software; Agilent): RNA Ladder (linke Spalte) und RNA-Proben (rechte Spalten). Die beiden schwarzen Banden in der rechten Spalte repräsentieren die 28 S rRNA (obere Bande) und die 18 S rRNA. Die grünen Banden entsprechen dem Marker.

### 3.6. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit der Software SPSS Statistics 19 (IBM, Ehningen, Deutschland) 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.

Der Vergleich der Genexpression zwischen Patienten mit unicuspiden, bicuspiden 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.

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.

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.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zeigt die normale ascendierende Aorta unterschiedliche Genexpressionen?

Patienten mit einer normalen Klappenmorphologie und nicht dilatierten Aorta ascendens hatten keinen signifikanten Unterschied in der eNOS-Genexpression bezüglich der Lokalisationen A1 (M= 2,43; SE=0,41) und A2 (M= 2,54; SE=0,51; p=0,92).

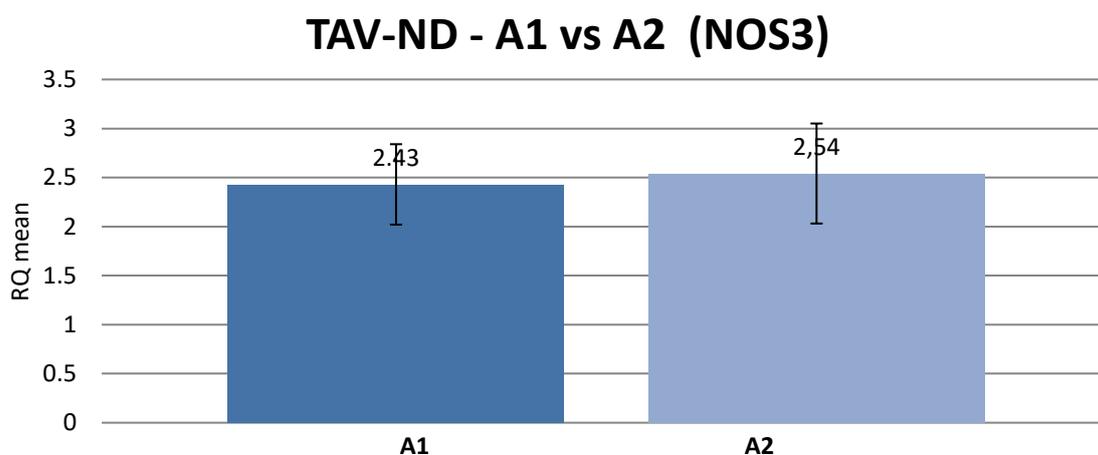


Abbildung 15: NOS3-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und normaler Aorta ascendens in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Patienten mit einer normalen Klappenmorphologie und nicht dilatierten Aorta ascendens hatten keinen signifikanten Unterschied in der FBN1-Genexpression bezüglich der Lokalisationen A1 (M= 1,28; SE=0,07) und A2 (M= 1,52; SE=0,13; p=0,96).

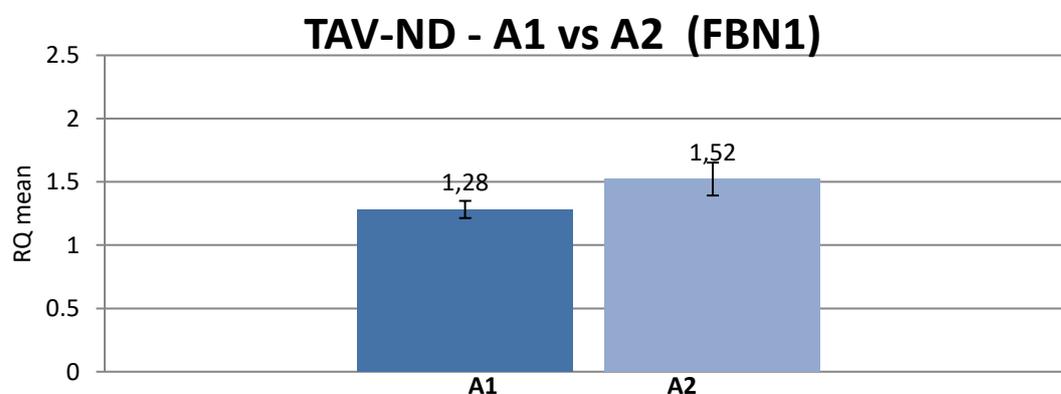


Abbildung 16: FBN1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und normaler Aorta ascendens in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Patienten mit einer normalen Klappenmorphologie und nicht dilatierten Aorta ascendens hatten keinen signifikanten Unterschied in der TGF $\beta$ R1-Genexpression bezüglich der Lokalisationen A1 (M= 1,56; SE=1,3) und A2 (M= 1,69; SE=0,27; p=0,79).

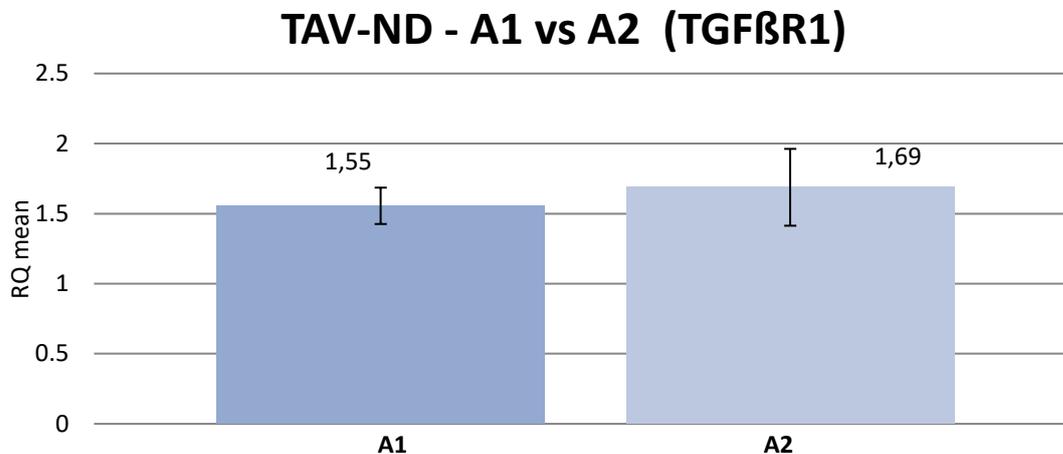


Abbildung 17: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und normaler Aorta ascendens in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Patienten mit einer normalen Klappenmorphologie und nicht dilatierten Aorta ascendens hatten keinen signifikanten Unterschied in der GATA5-Genexpression bezüglich der Lokalisationen A1 (M= 1,54; SE=1,3) und A2 (M= 1,40; SE=0,27; p=0,94).

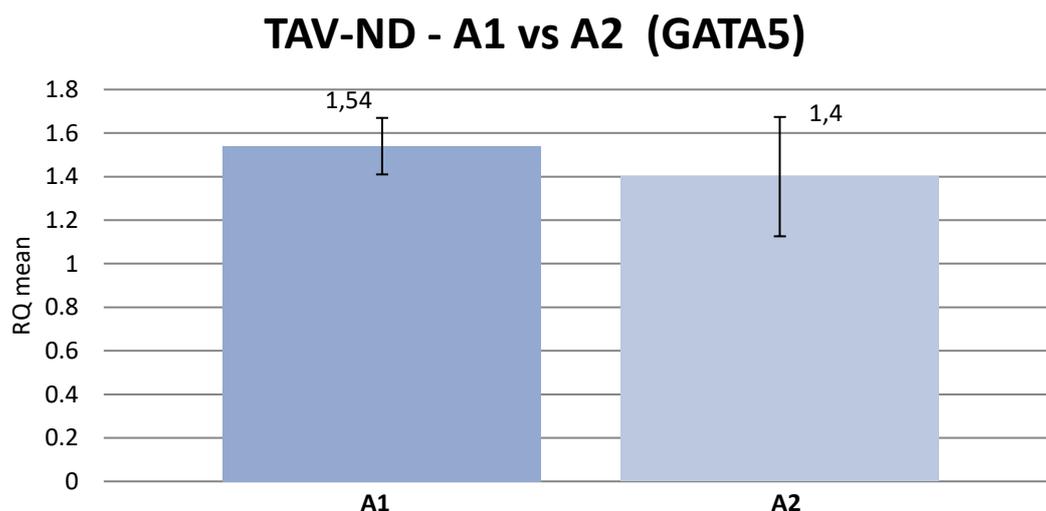


Abbildung 18: GATA5-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und normaler Aorta ascendens in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Patienten mit einer normalen Klappenmorphologie und nicht dilatierten Aorta ascendens hatten keinen signifikanten Unterschied in der COL3A1-Genexpression bezüglich der Lokalisationen A1 (M= 1,67; SE=0,24) und A2 (M= 1,54; SE=0,30; p=0,89).

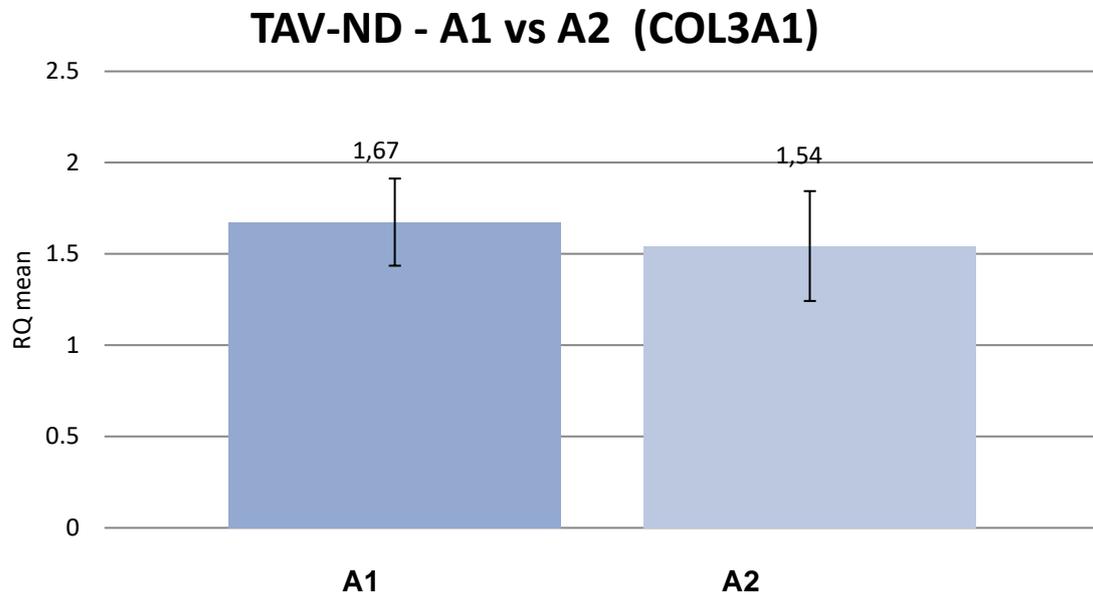


Abbildung 19: GATA5-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und normaler Aorta ascendens in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

## 4.2. Gibt es unterschiedliche Expressionsmuster in Abhängigkeit vom morphologischen Aortenklappentyp?

Patienten mit tri-, bi- oder unicuspiden Aortenklappen hatten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation keinen signifikanten Unterschied in der eNOS-Genexpression in Ihrer Aortenwand. Jedoch zeigt sich ein Trend zur erhöhten Genexpression bei Patienten mit UAV im Vergleich zu TAV. (UAV: M=2,97; SE=0,39; BAV: M=2,50; SE=0,29; TAV: M=2,09; SE=0,26; UAV vs BAV: p=0,34; BAV vs TAV: p=0,28; UAV vs TAV: p=0,06).

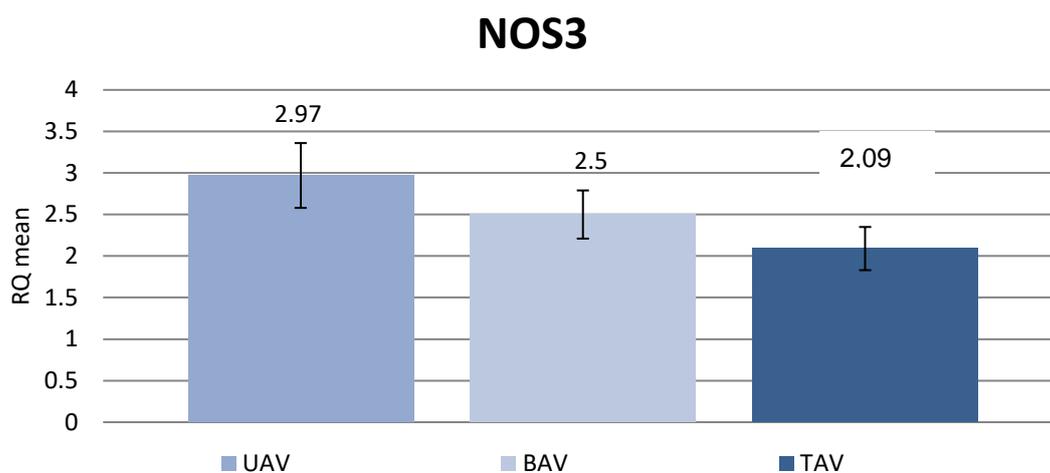


Abbildung 20: NOS3-Genexpression bei Patienten mit tri-,bi- oder unicuspiden Aortenklappen unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Patienten mit tri-, bi- oder unicuspiden Aortenklappen hatten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation einen signifikanten Unterschied in der FBN1-Genexpression in Ihrer Aortenwand (UAV: M=1,10; SE=0,07; BAV: M=0,93; SE=0,06; TAV: M=1,14; SE=0,05; UAV vs BAV:  $p=0,046$ ; BAV vs TAV:  $p=0,004$ ; UAV vs TAV:  $p=0,73$ ).

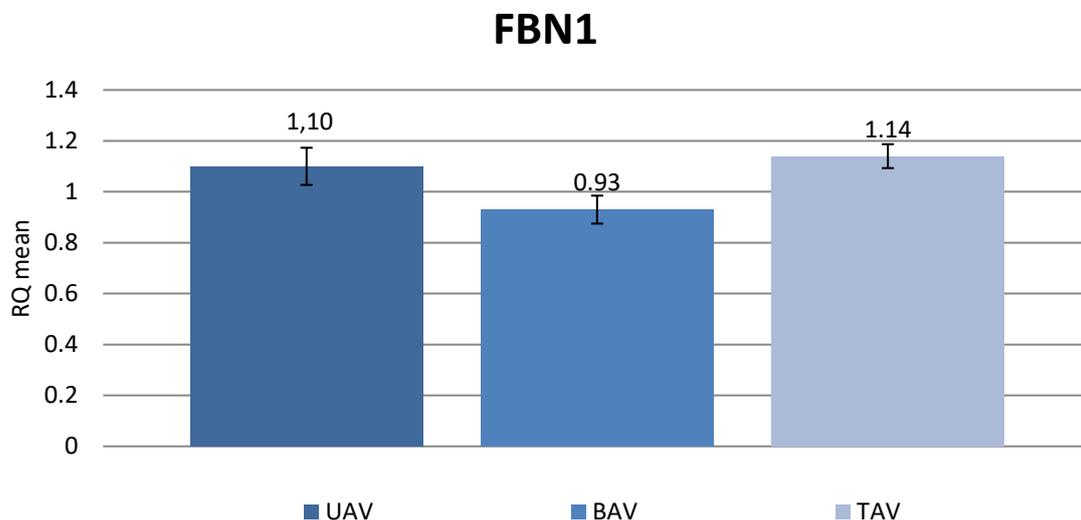


Abbildung 21: FBN1-Genexpression bei Patienten mit tri-,bi- oder unicuspiden Aortenklappen unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Patienten mit tri-, bi- oder unicuspiden Aortenklappen hatten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation keinen signifikanten Unterschied in der TGF $\beta$ 1-Genexpression in Ihrer Aortenwand (UAV: M=2,11; SE=0,15; BAV: M=2,05; SE=0,12; TAV: M=1,91; SE=0,10; UAV vs BAV:  $p=0,77$ ; BAV vs TAV:  $p=0,35$ ; UAV vs TAV:  $p=0,28$ ).

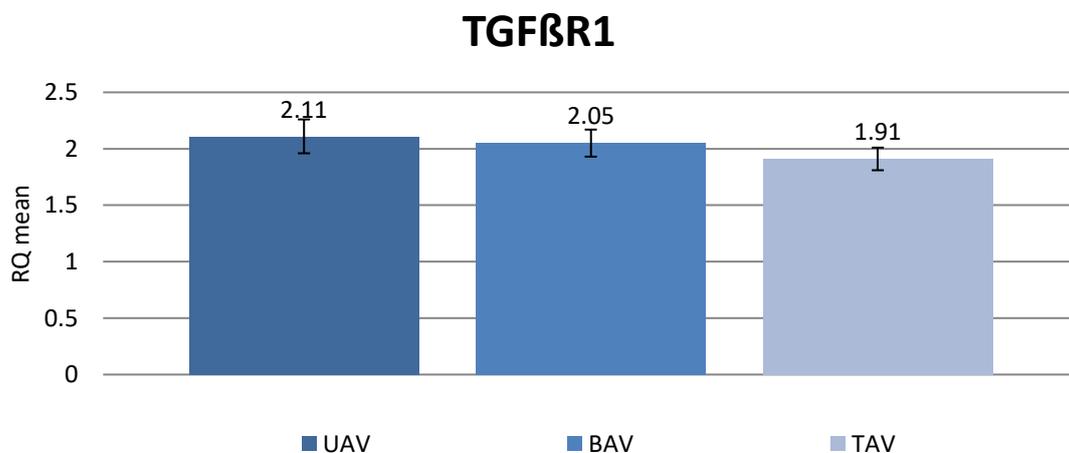


Abbildung 22: TGF $\beta$ 1-Genexpression bei Patienten mit tri-,bi- oder unicuspiden Aortenklappen unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Bei Patienten mit tri-, bi- oder unicuspiden Aortenklappen bestand unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation kein signifikanter Unterschied in der GATA5-Genexpression in Ihrer Aortenwand (UAV: M=1,87; SE=0,24; BAV: M=1,82; SE=0,20; TAV: M=2,14; SE=0,17; UAV vs BAV:  $p=0,87$ ; BAV vs TAV:  $p=0,24$ ; UAV vs TAV:  $p=0,36$ ).

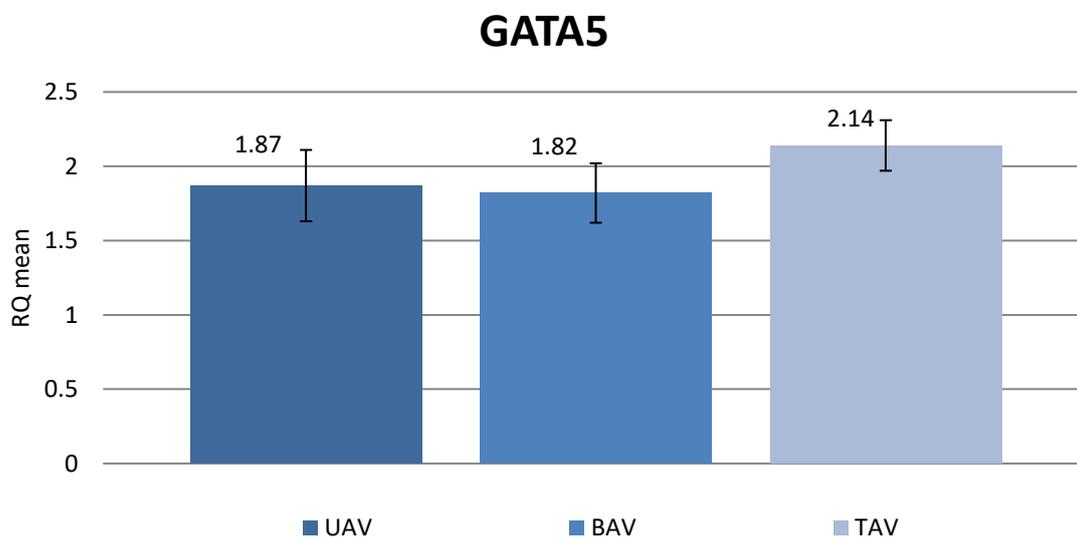


Abbildung 23: GATA5-Genexpression bei Patienten mit tri-, bi- oder unicuspiden Aortenklappen unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Patienten mit tri-, bi- oder unicuspiden Aortenklappen hatten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation einen signifikanten Unterschied in der COL3A1-Genexpression in Ihrer Aortenwand (UAV: M=1,57; SE=0,11; BAV: M=1,24; SE=0,09; TAV: M=1,18; SE=0,08; UAV vs BAV:  $p=0,03$ ; BAV vs TAV:  $p=0,60$ ; UAV vs TAV:  $p=0,005$ ).

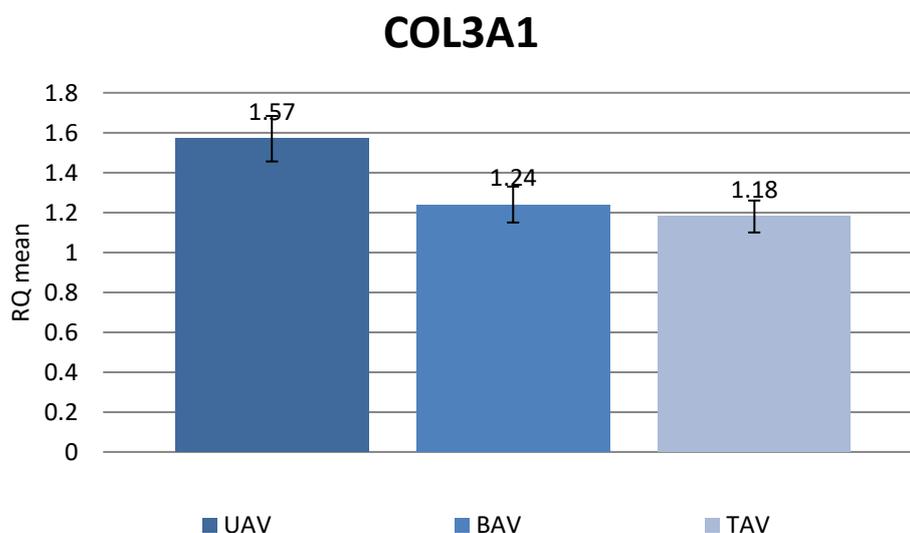


Abbildung 24: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit tri-, bi- oder unicuspiden Aortenklappen unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

### 4.3. Gibt es lokalisationsabhängige Unterschiede in der Genexpression?

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der TD Aorta signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (TD-A1:  $M=1,98$ ;  $SE=0,35$ ; TD-A2:  $M=3,42$ ;  $SE=0,78$ ;  $p<0,002$ ).

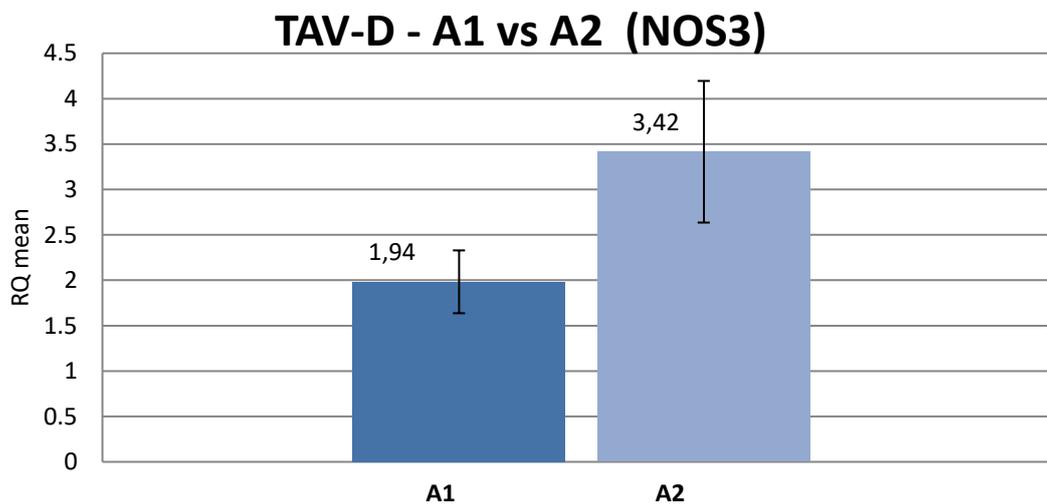


Abbildung 25: NOS3-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen B1 und B2 der TD Aorta signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (TD-B1:  $M=2,44$ ;  $SE=0,54$ ; TD-B2:  $M=4,02$ ;  $SE=0,36$ ;  $p<0,003$ ).

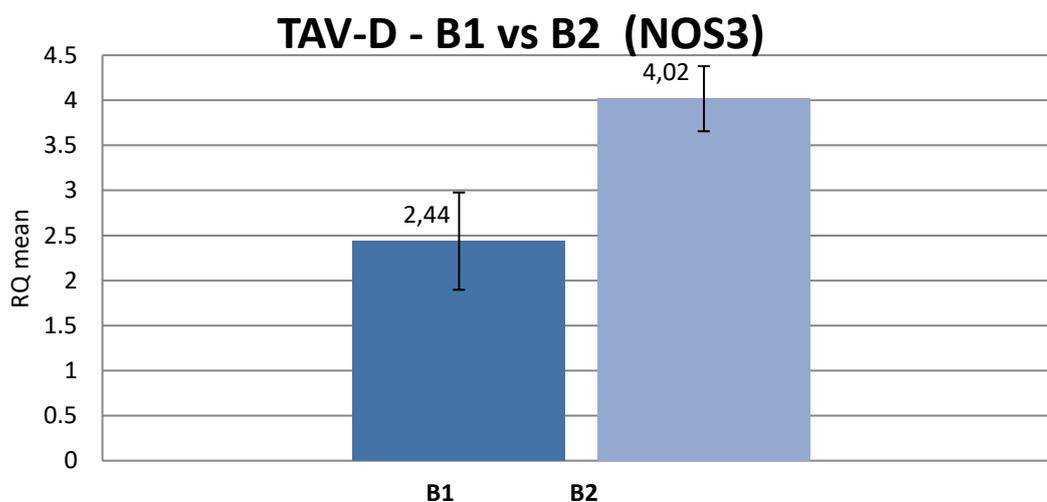


Abbildung 26: : NOS3-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der BD Aorta nicht signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (BD-A1: M=2,39; SE=0,33; BD-A2: M=2,43; SE=0,41; p=0,7).

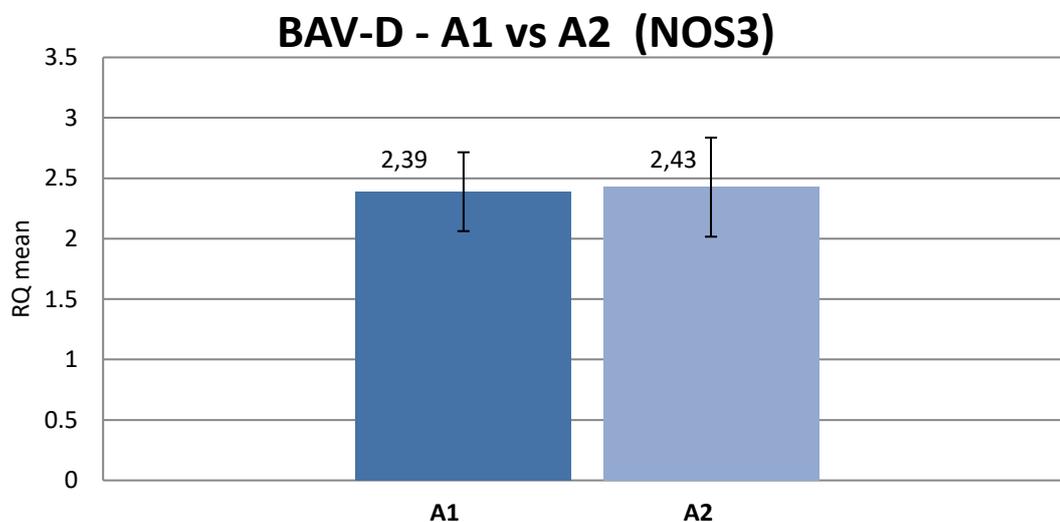


Abbildung 27: : NOS3-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen B1 und B2 der BD Aorta nicht signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (BD-B1: M=3,19; SE=0,58; BD-B2: M=3,28; SE=0,55; p=0,7).

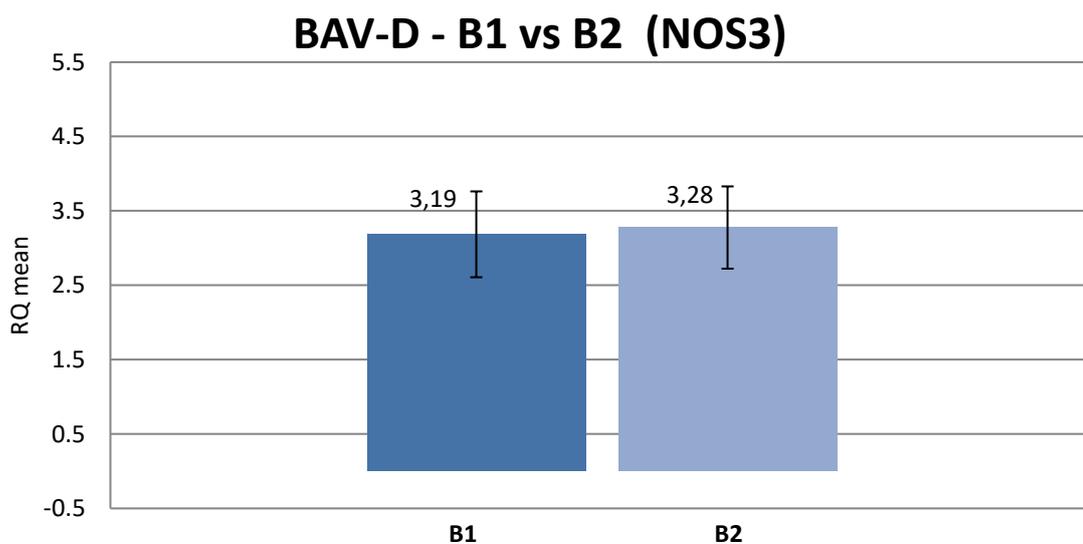


Abbildung 28: NOS3-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der UD Aorta nicht signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (UD-A1: M=2,89; SE=0,44; UD-A2: M=2,83; SE=0,46; p=0,8).

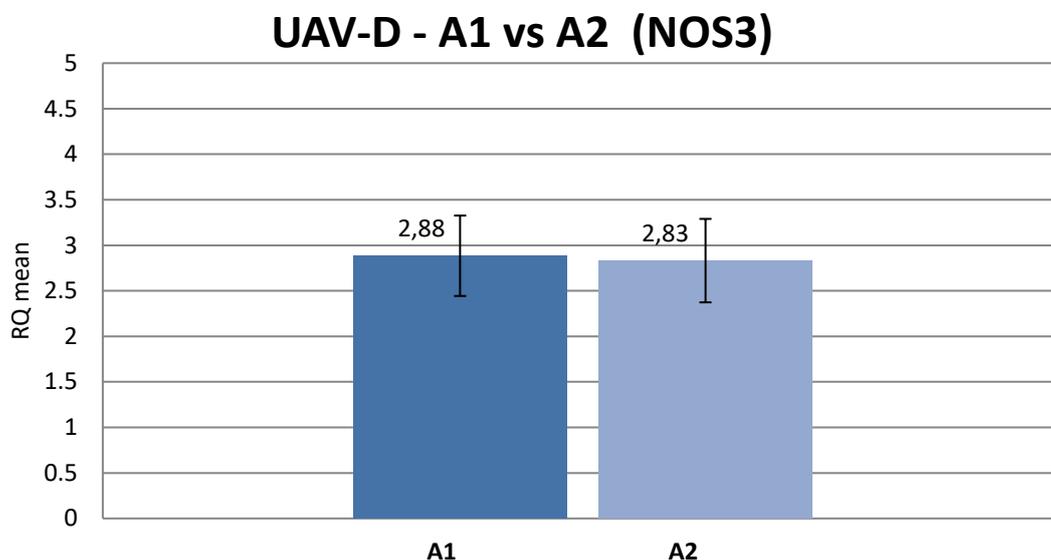


Abbildung 29: NOS3-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen B1 und B2 der UD Aorta nicht signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (UD-B1: M=4,61; SE=0,17; UD-B2: M=3,60; SE=1,00; p=0,09).

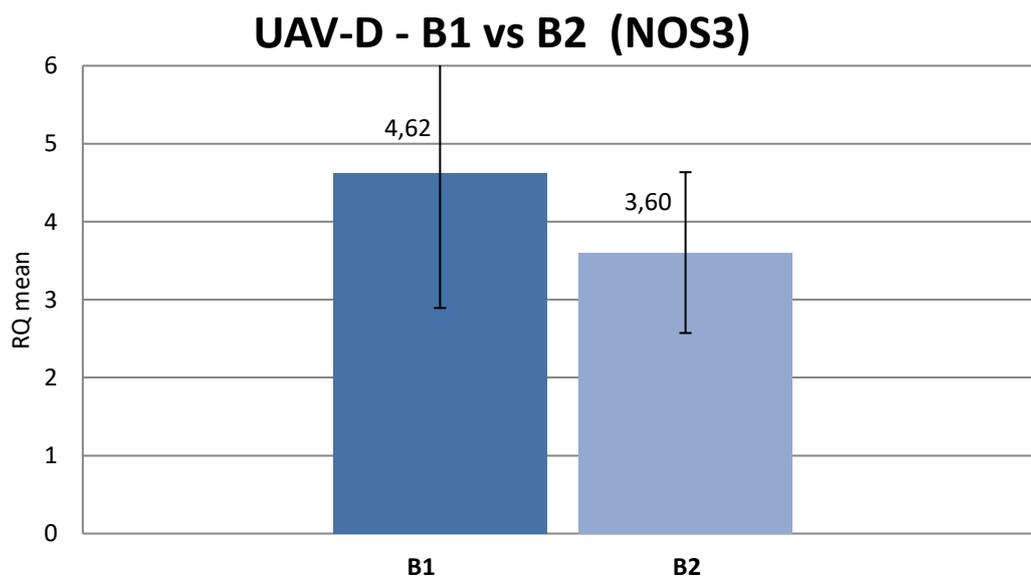


Abbildung 30: NOS3-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der TD Aorta nicht signifikant in ihrer FBN1-Genexpression (TD-A1: M=1,30; SE=0,01; TD-A2: M=1,48; SE=0,19; p=0,04).

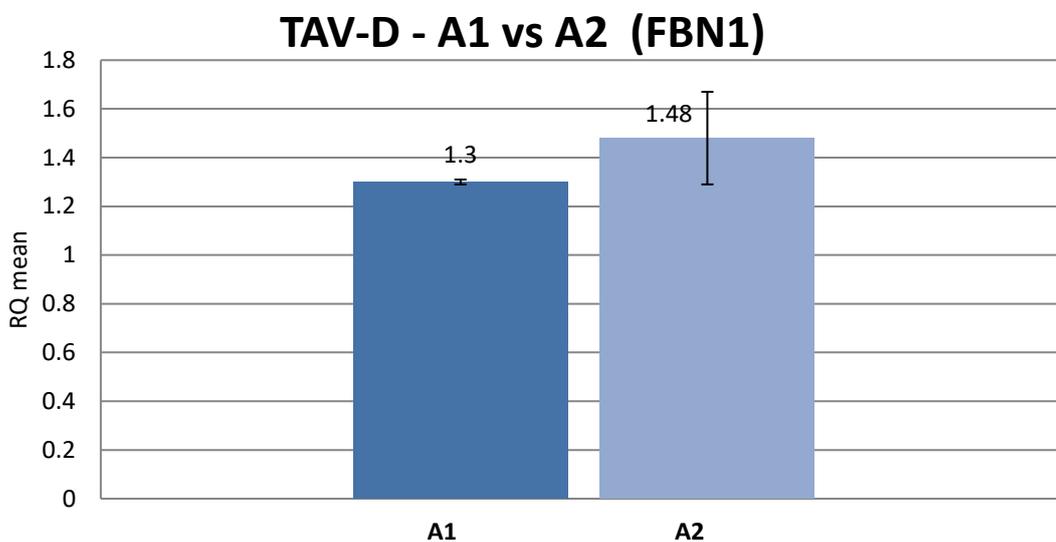


Abbildung 31: FBN1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der TD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (TD-B1: M=1,63; SE=0,25; TD-B2: M=1,58; SE=0,08; p=0,67).

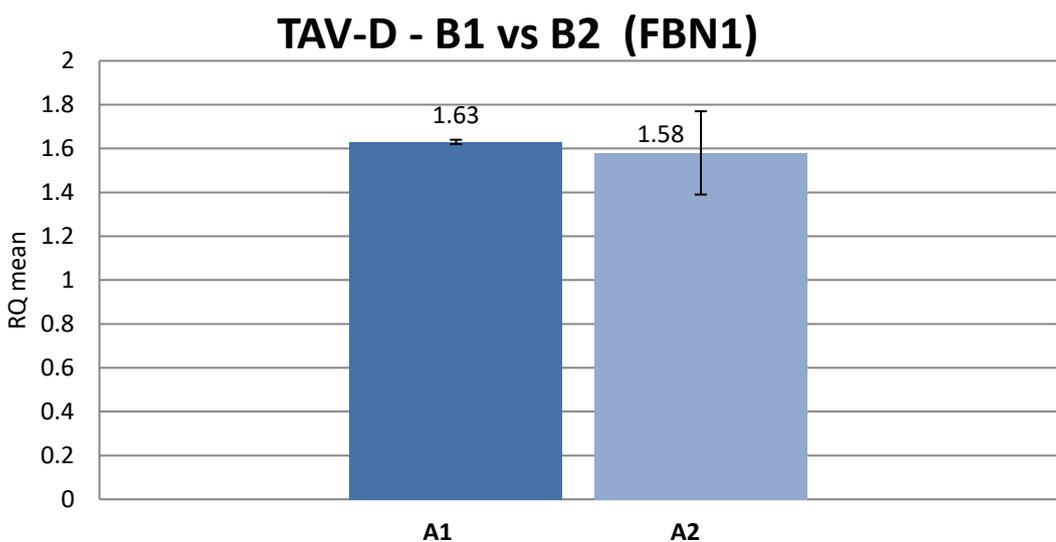


Abbildung 32: FBN1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der BD Aorta signifikant in ihrer FBN1-Genexpression (BD-A1: M=1,04; SE=0,05; BD-A2: M=1,83; SE=0,29; p=0,02).

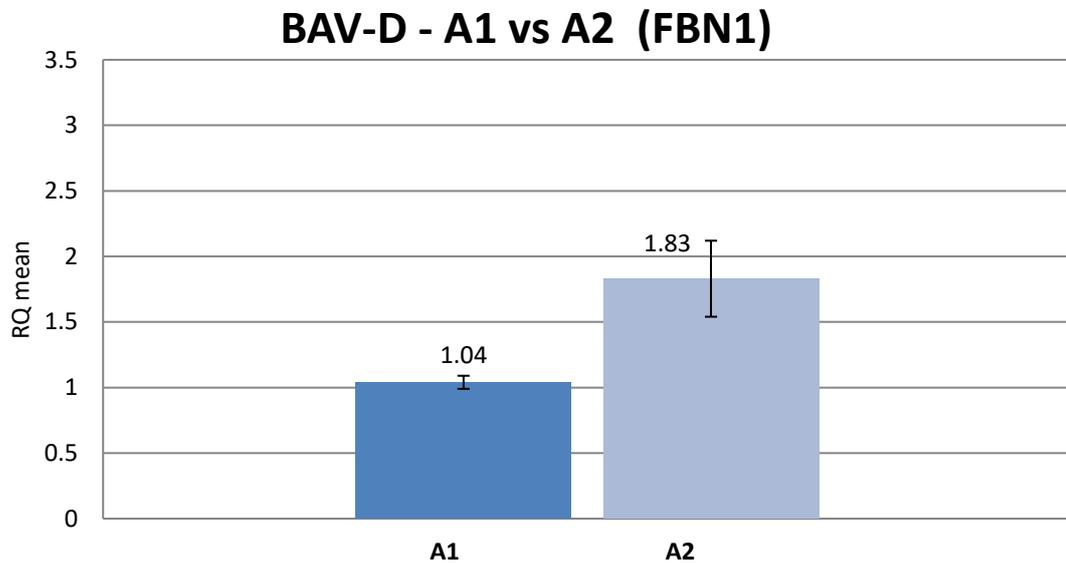


Abbildung 33: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der BD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer FBN1-Genexpression (BD-B1: M=1,68; SE=0,11; BD-B2: M=1,65; SE=0,08; p=0,76).

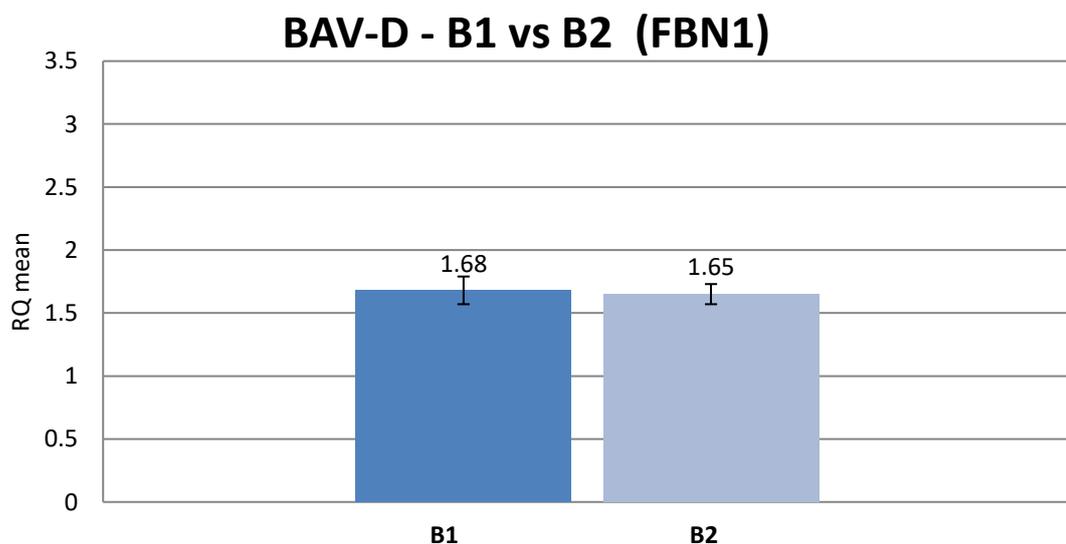


Abbildung 34: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der BD Aorta signifikant in ihrer FBN1-Genexpression (BD-A1: M=1,25; SE=0,15; BD-A2: M=1,88; SE=0,16; p=0,048).

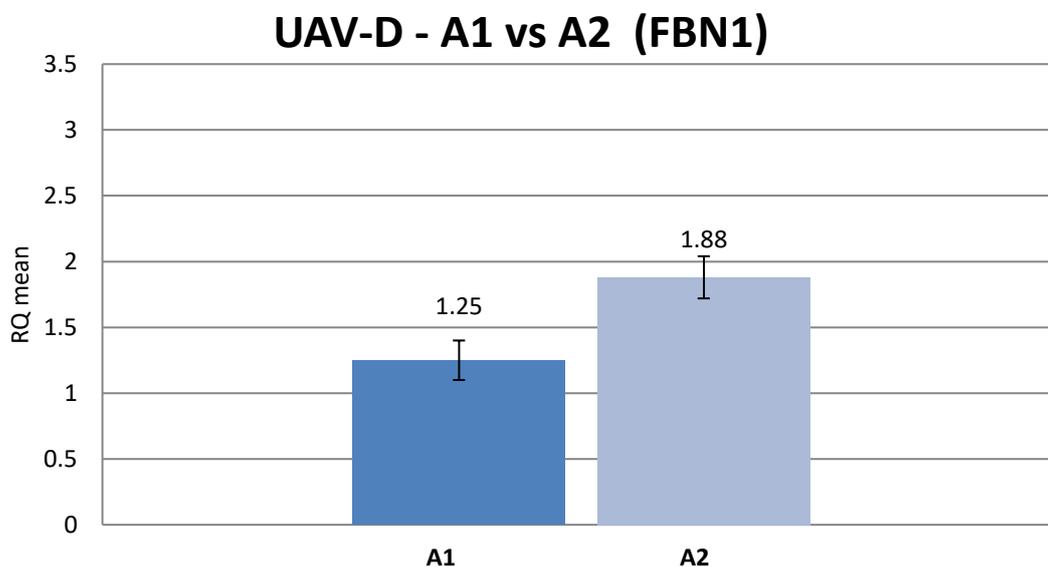


Abbildung 35: FBN1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der BD Aorta unterschieden sich signifikant in ihrer FBN1-Genexpression (BD-B1: M=2,81; SE=1,20; BD-B2: M=1,80; SE=0,25; p=0,032).

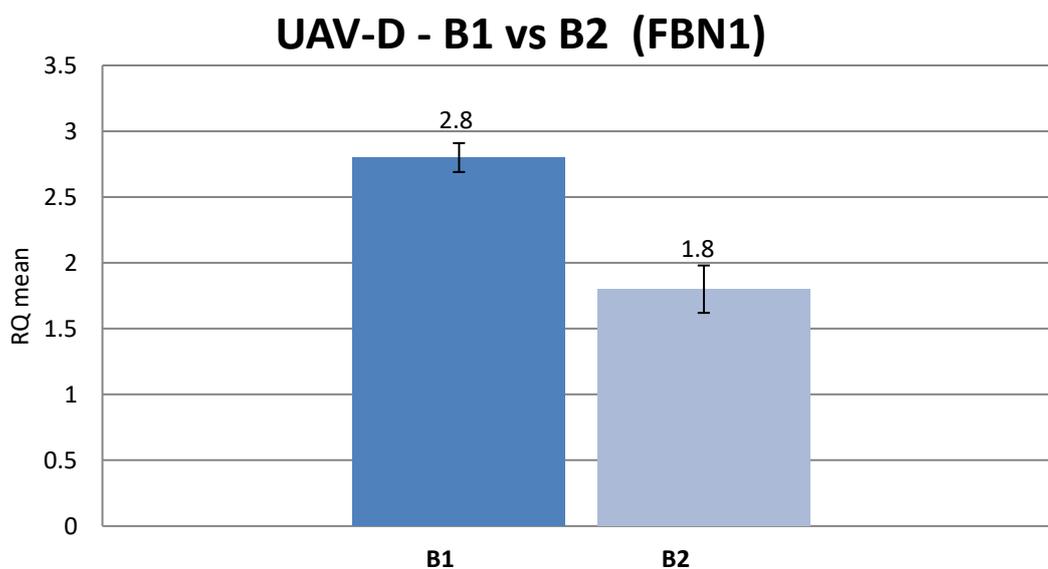


Abbildung 36: FBN1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der TD Aorta nicht signifikant in ihrer TGF $\beta$ R1-Genexpression (TD-A1: M=1,17; SE=0,11; TD-A2: M=1,20; SE=0,18; p=0,44).

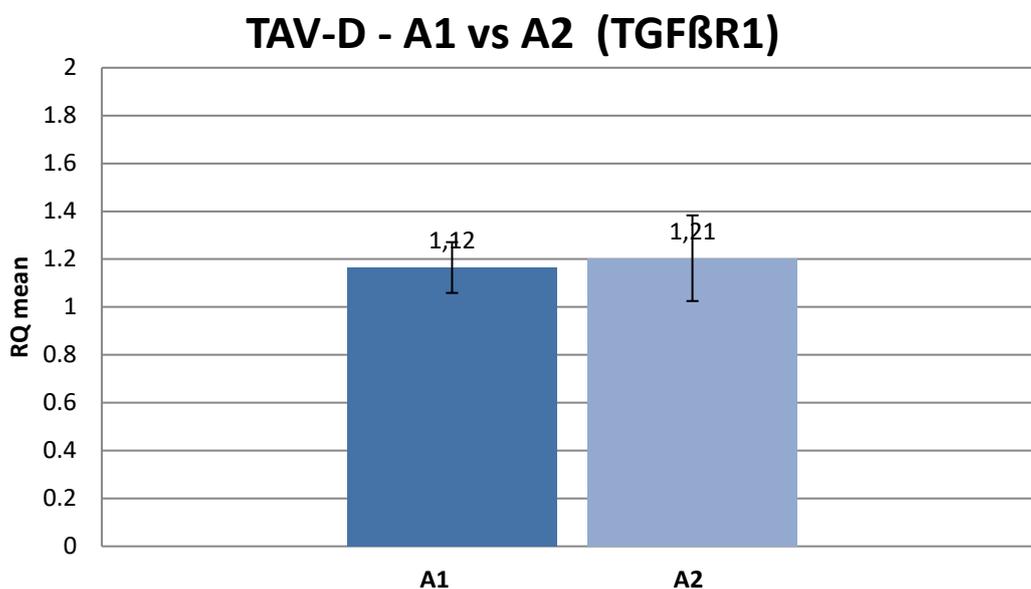


Abbildung 37: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der TD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer TGF $\beta$ R1-Genexpression (TD-B1: M=1,40; SE=0,21; TD-B2: M=1,46; SE=0,28; p=0,39).

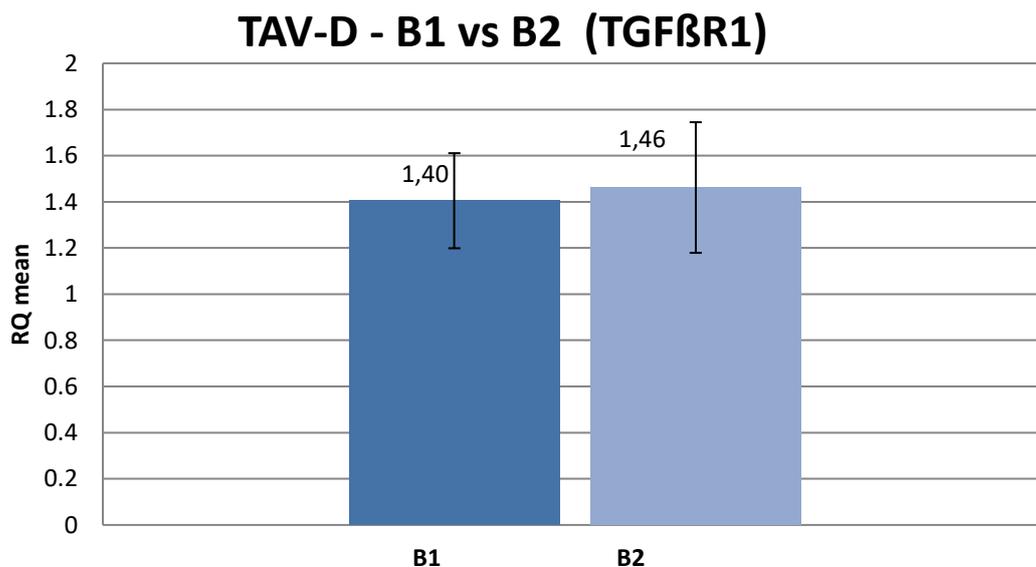


Abbildung 38: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der BD Aorta signifikant in ihrer TGF $\beta$ R1-Genexpression (BD-A1: M=1,18; SE=0,07; BD-A2: M=1,43; SE=0,18; p=0,04).

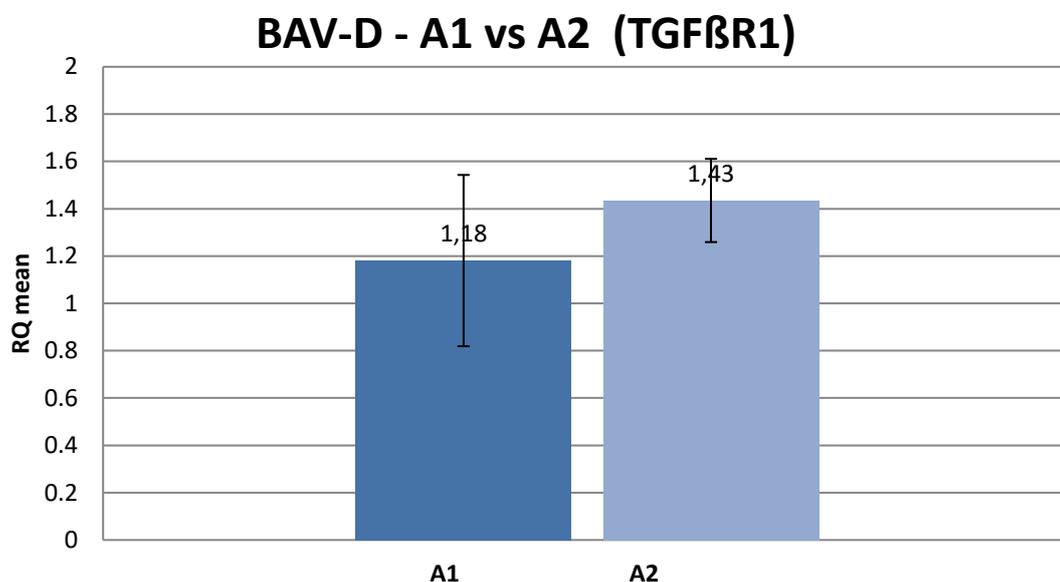


Abbildung 39: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der BD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer TGF $\beta$ R1-Genexpression (BD-B1: M=1,40; SE=0,22; BD-B2: M=1,89; SE=0,26; p=0,07).

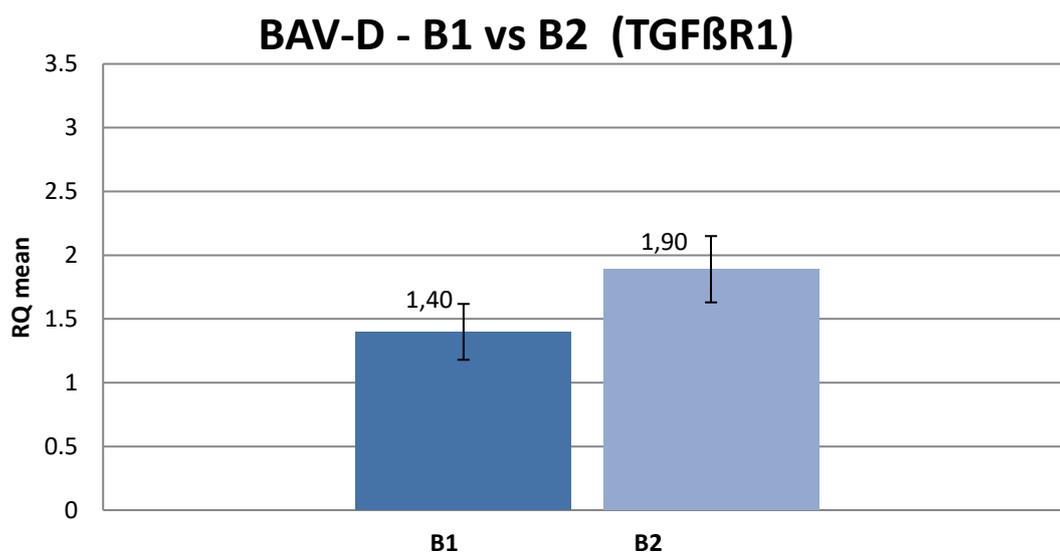


Abbildung 40: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der UD Aorta signifikant in ihrer TGF $\beta$ R1-Genexpression (UD-A1: M=1,35; SE=0,07; UD-A2: M=1,73; SE=0,28; p=0,04).

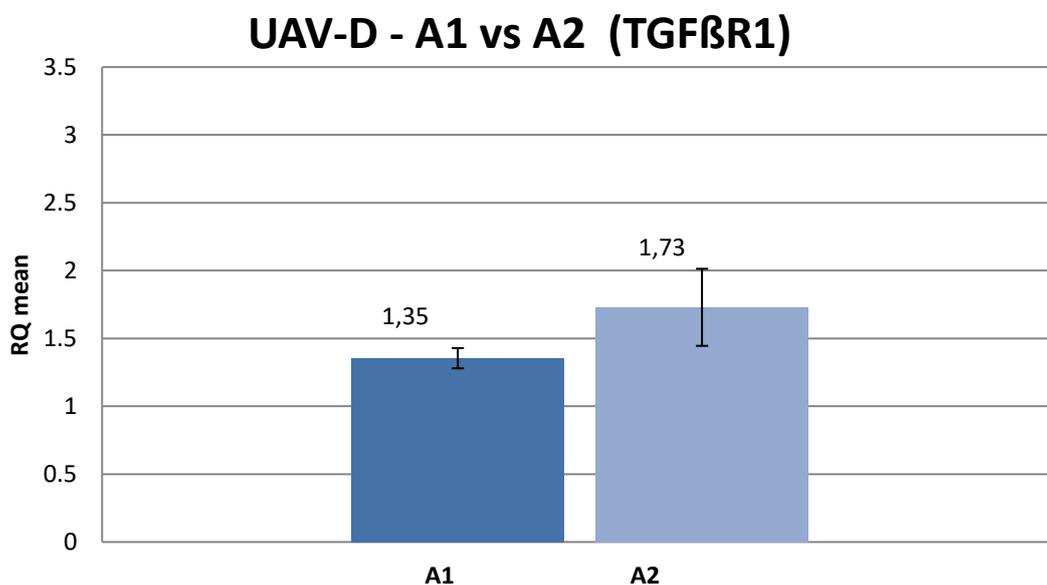


Abbildung 41: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der UD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer TGF $\beta$ R1-Genexpression (UD-B1: M=1,18; SE=0,24; UD-B2: M=1,53; SE=0,27; p=0,06).

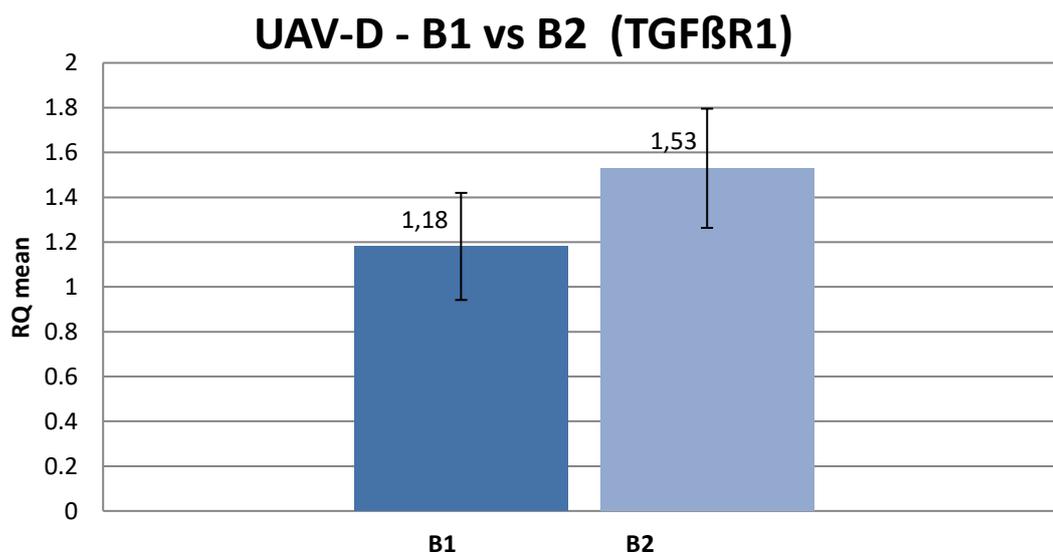


Abbildung 42: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der TD Aorta signifikant in ihrer GATA5-Genexpression (TD-A1: M=2,35; SE=0,34; TD-A2: M=1,58; SE=0,24;p=0,039).

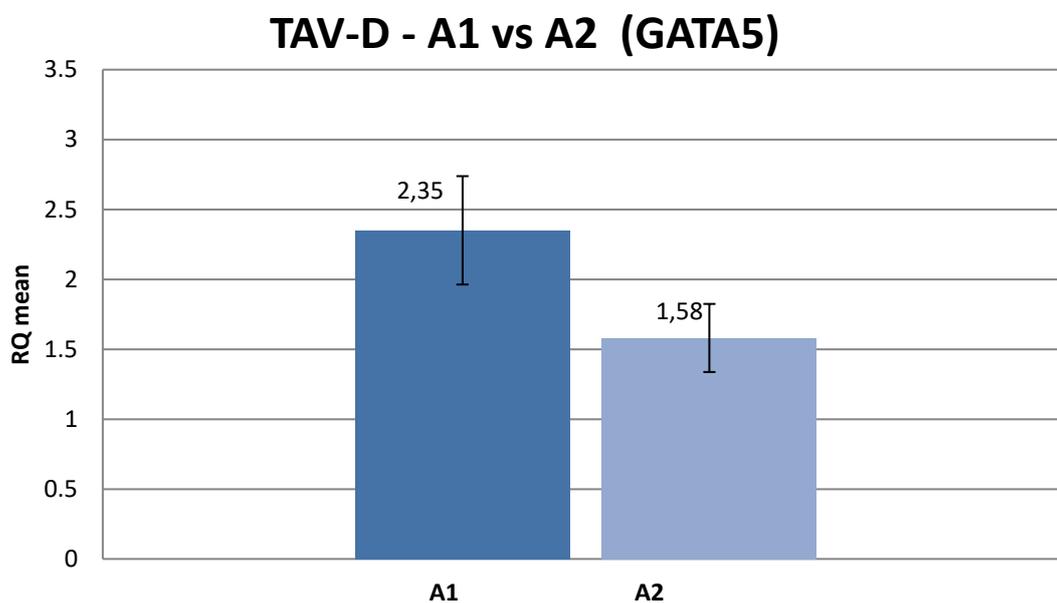


Abbildung 43: GATA5-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der TD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer GATA5-Genexpression (TD-B1: M=1,87; SE=0,44; TD-B2: M=1,91; SE=0,78; p=0,88).

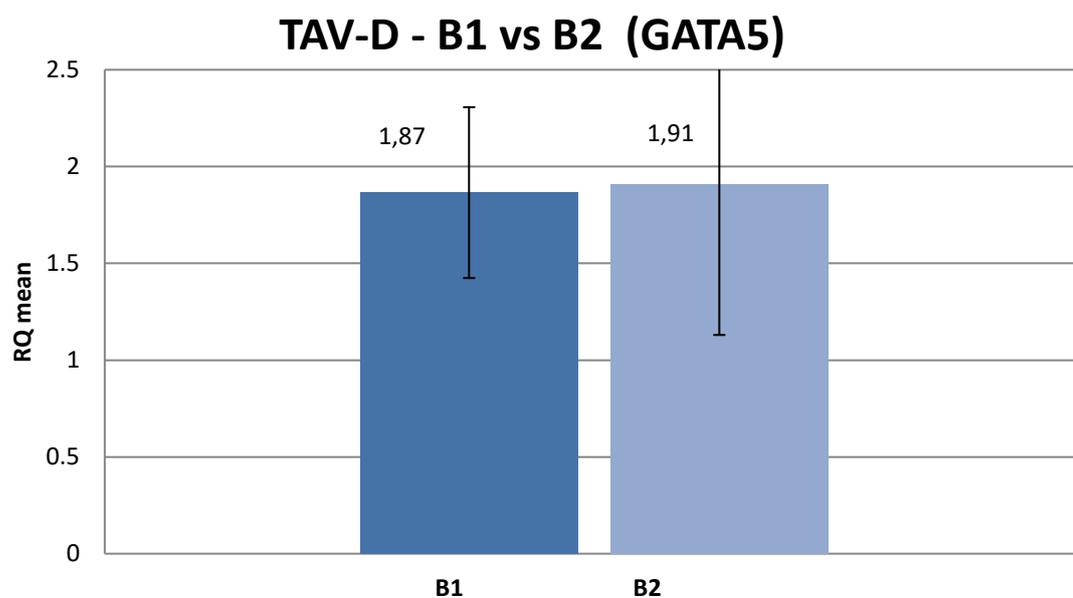


Abbildung 44: GATA5-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der BD Aorta nicht signifikant in ihrer GATA5-Genexpression (BD-A1: M=1,44; SE=0,19; BD-A2: M=1,69; SE=0,35; p=0,13).

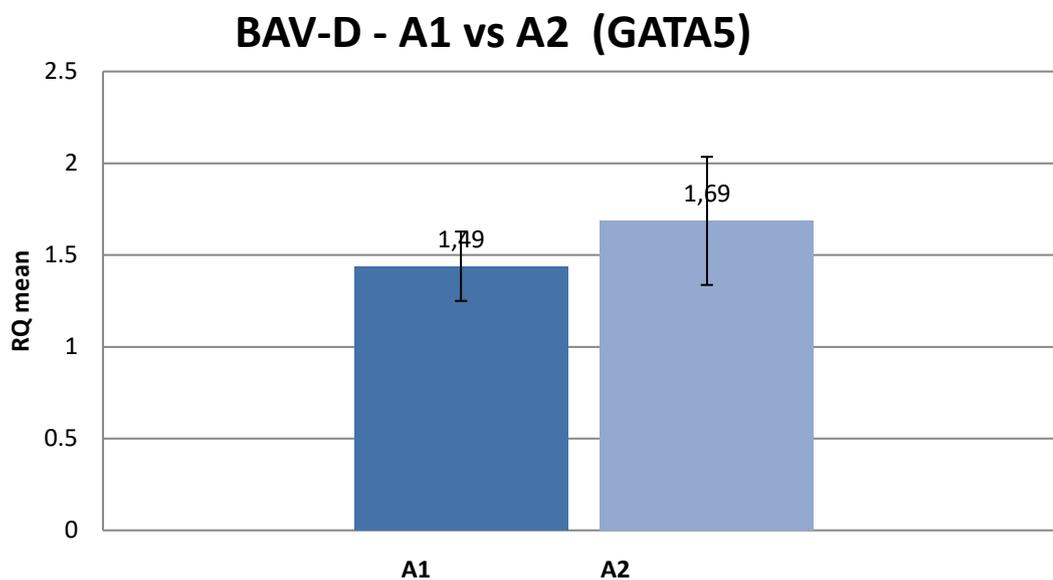


Abbildung 45: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen B1 und B2 der BD Aorta nicht signifikant in ihrer GATA5-Genexpression (BD-B1: M=1,21; SE=0,16; BD-B2: M=1,10; SE=0,16; p=0,34).

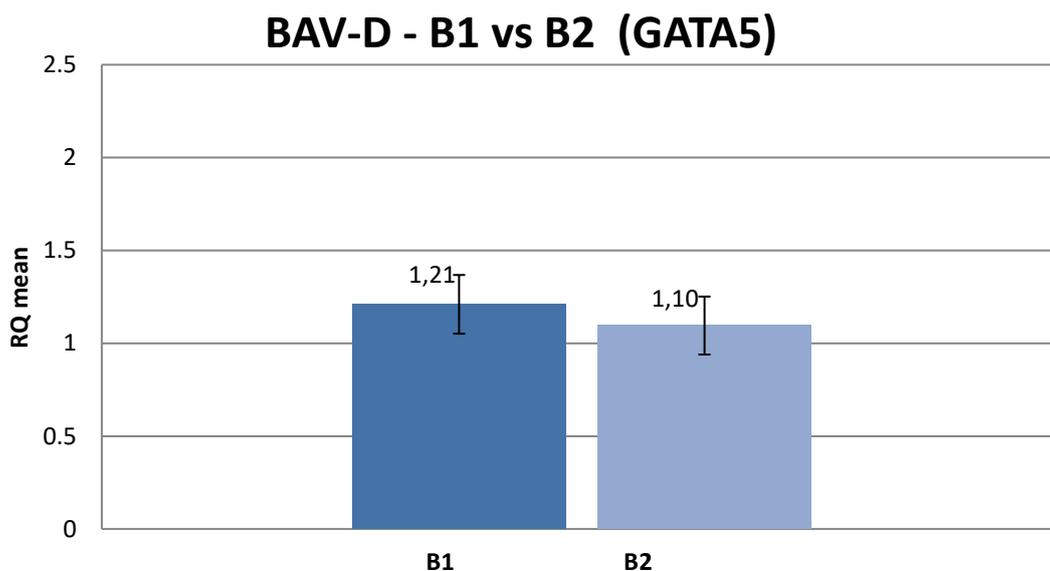


Abbildung 46: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der UD Aorta signifikant in ihrer GATA5-Genexpression (UD-A1:  $M=1,73$ ;  $SE=0,23$ ; UD-A2:  $M=1,45$ ;  $SE=0,33$ ;  $p=0,04$ ).

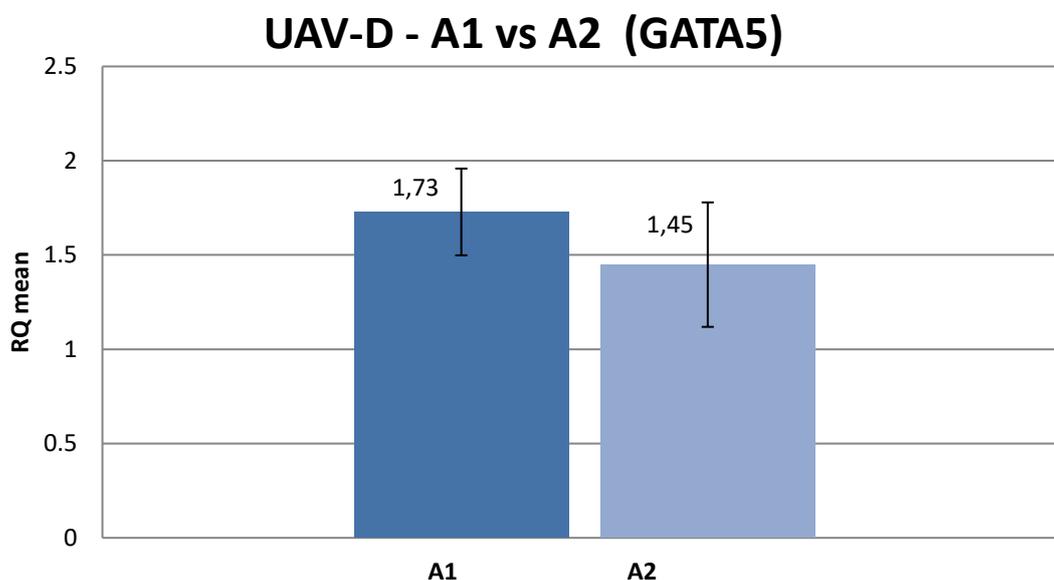


Abbildung 47: GATA5-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der UD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer GATA5-Genexpression (UD-B1:  $M=1,38$ ;  $SE=0,19$ ; UD-B2:  $M=1,19$ ;  $SE=0,31$ ;  $p=0,2$ ).

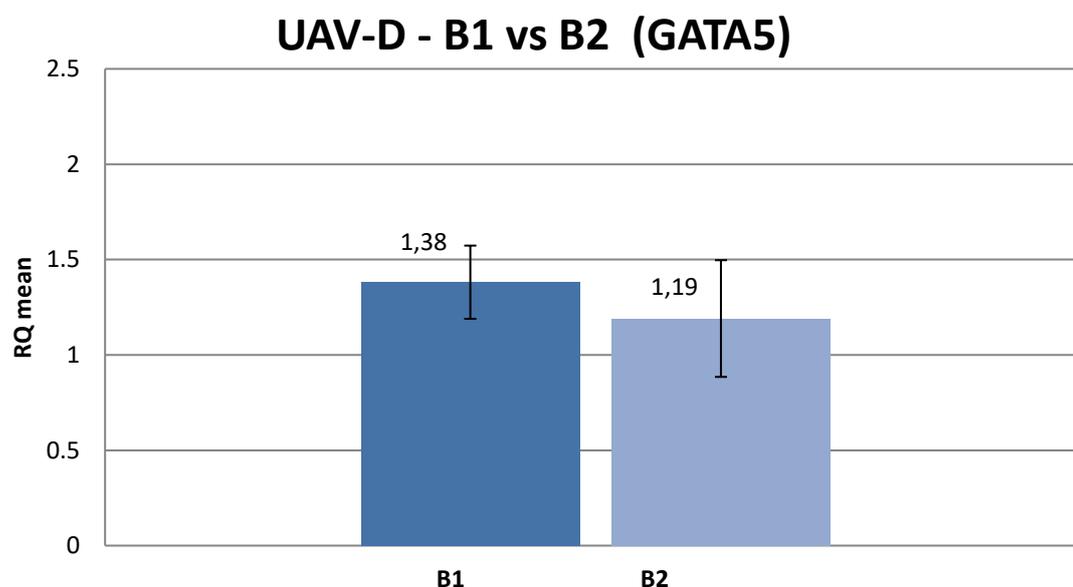


Abbildung 48: GATA5-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der TD Aorta signifikant in ihrer COL3A1-Genexpression (TD-A1: M=1,21; SE=0,11; TD-A2: M=1,35; SE=0,13; p=0,04).

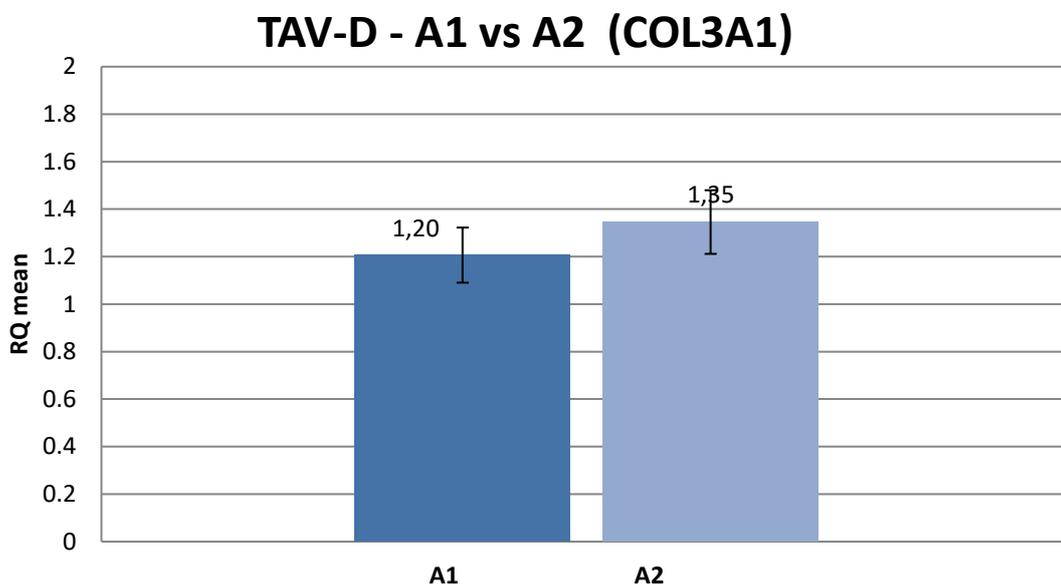


Abbildung 49: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der TD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer COL3A1-Genexpression (TD-B1: M=1,32; SE=0,34; TD-B2: M=1,22; SE=0,15; p=0,19)

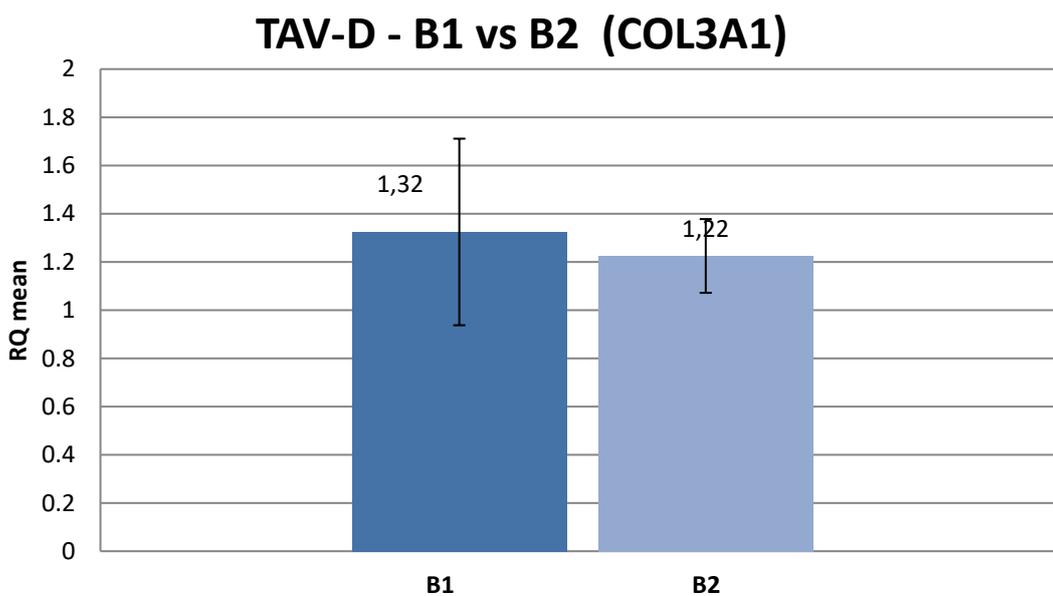


Abbildung 50: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der BD Aorta signifikant in ihrer COL3A1-Genexpression (BD-A1: M=1,22; SE=0,10; BD-A2: M=1,43; SE=0,84; p=0,88).

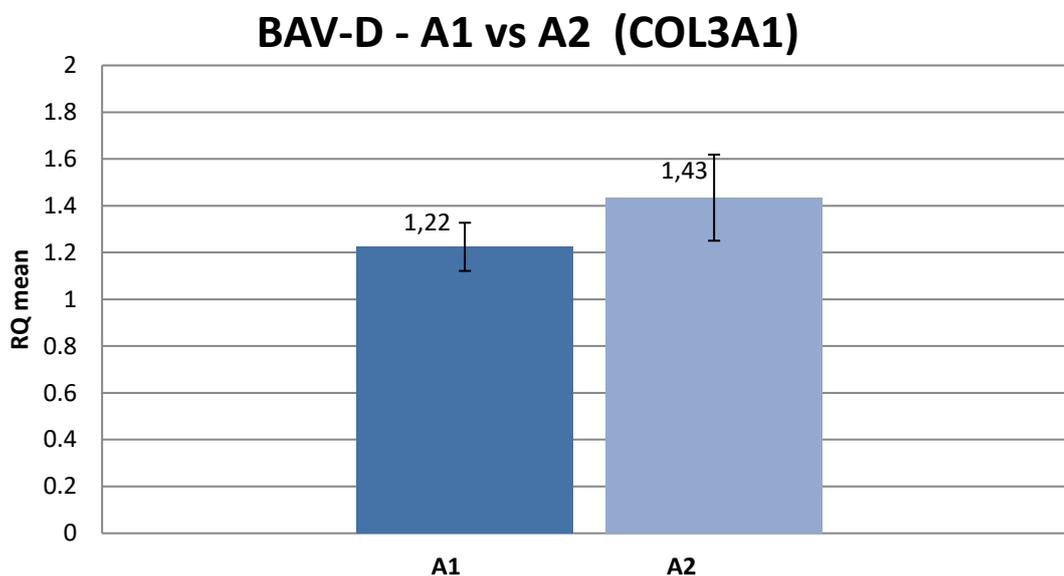


Abbildung 51: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der BD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer COL3A1-Genexpression (BD-B1: M=1,29; SE=0,12; BD-B2: M=1,29; SE=0,17; p=0,63).

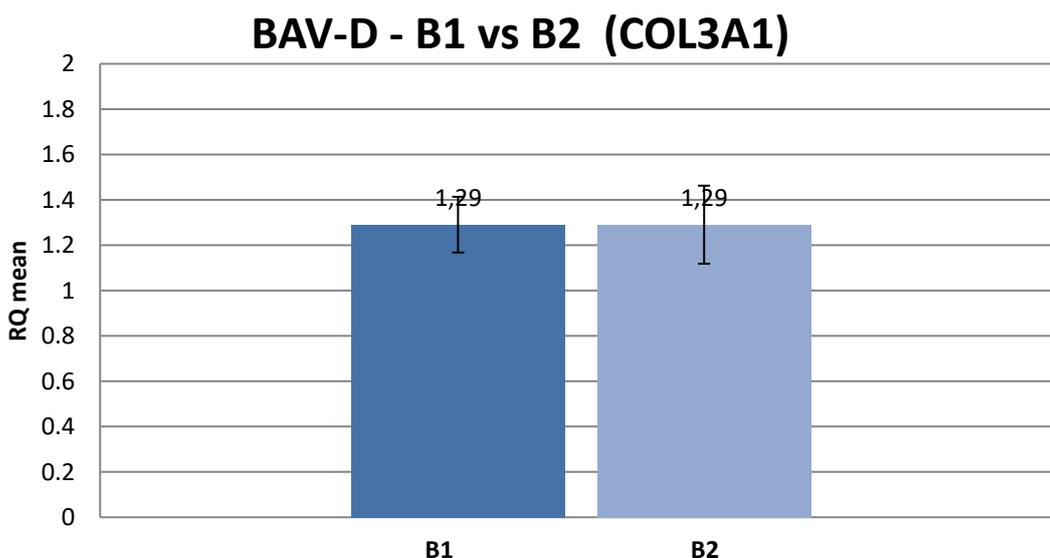


Abbildung 52: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterschieden sich die Lokalisationen A1 und A2 der UD Aorta signifikant in ihrer COL3A1-Genexpression (UD-A1: M=1,34; SE=0,28; UD-A2: M=1,65; SE=0,33; p=0,04).

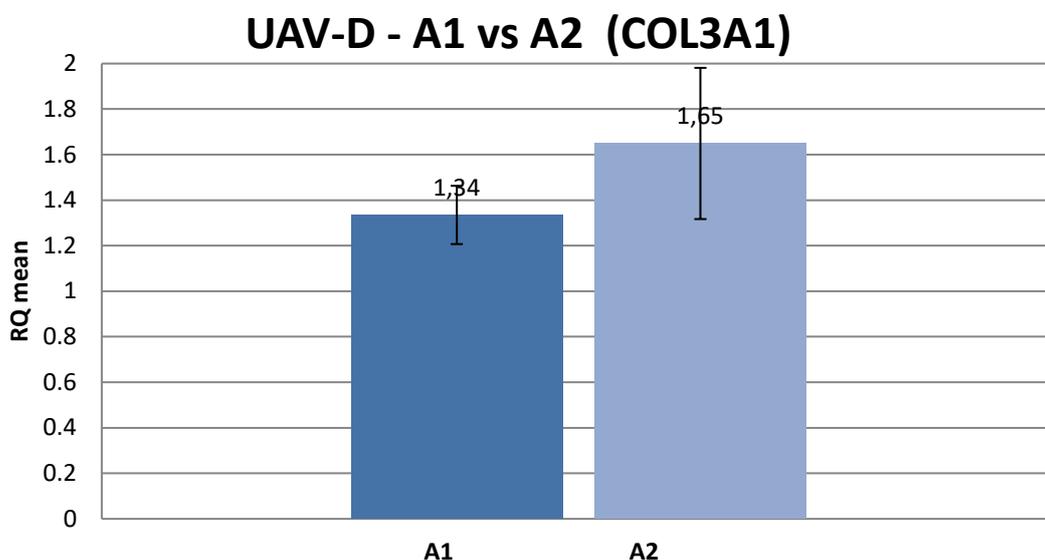


Abbildung 53: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation A1 und A2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

Die Lokalisationen B1 und B2 der UD Aorta unterschieden sich nicht signifikant in ihrer COL3A1-Genexpression (UD-B1: M=1,48; SE=0,25; UD-B2: M=1,47; SE=0,21; p=0,73).

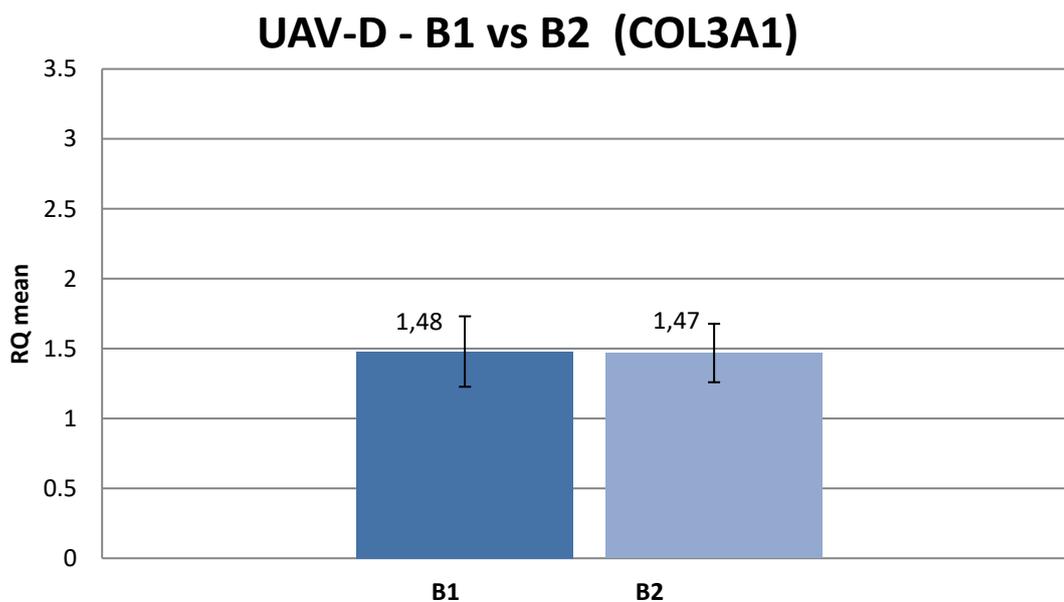


Abbildung 54: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen und Aortendilatation in Lokalisation B1 und B2 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

#### 4.4. Gibt es spezifische Genexpressionsmuster bei Patienten mit dilatierter Aorta im Vergleich zu Patienten mit normaler Aorta?

In der einfaktoriellen ANOVA unterscheiden sich die Patientengruppen (dilatiert und nicht-dilatiert) nicht signifikant in ihrer eNOS-Genexpression (D: M=2,5; SE=0,24; ND: M=2,54; SE=0,28; p=0,92)

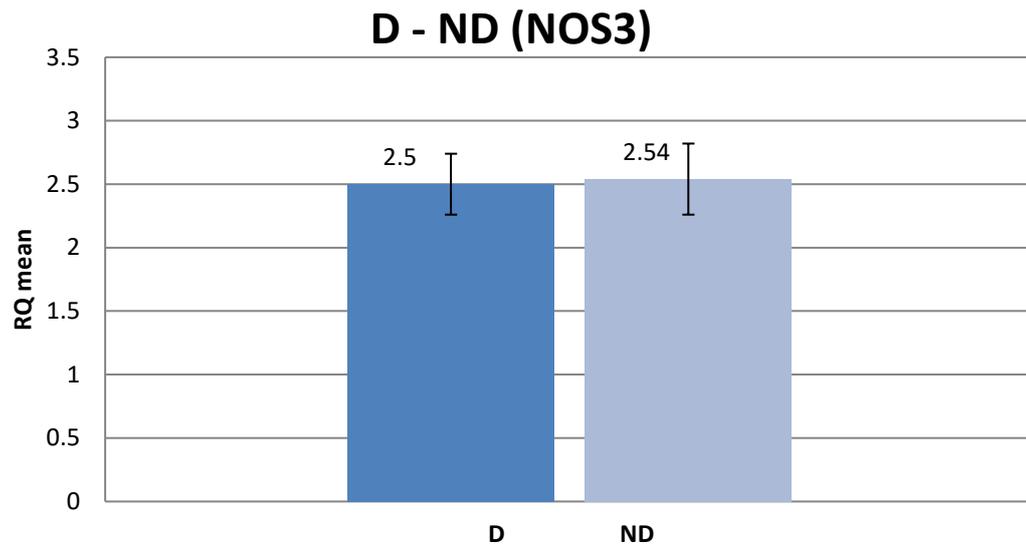


Abbildung 55: NOS3-Genexpression bei Patienten mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

TAV-ND: M=1,96; SE=0,33; TAV-D: M=2,21; SE=0,39; p=0,63

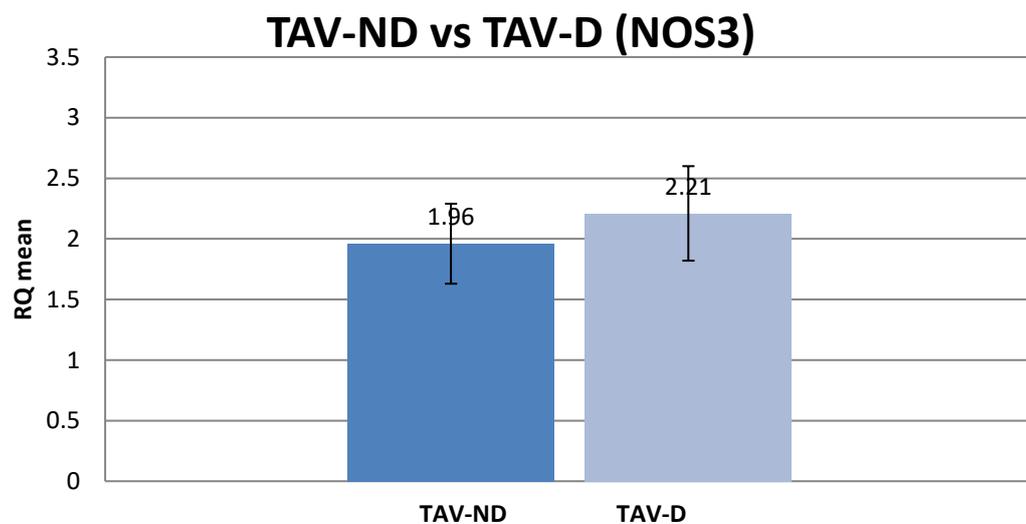


Abbildung 56: NOS3-Genexpression bei Patienten mit tricuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

BAV-ND: M=2,58; SE=0,46; BAV-D: M=2,42; SE=0,35; p=0,79

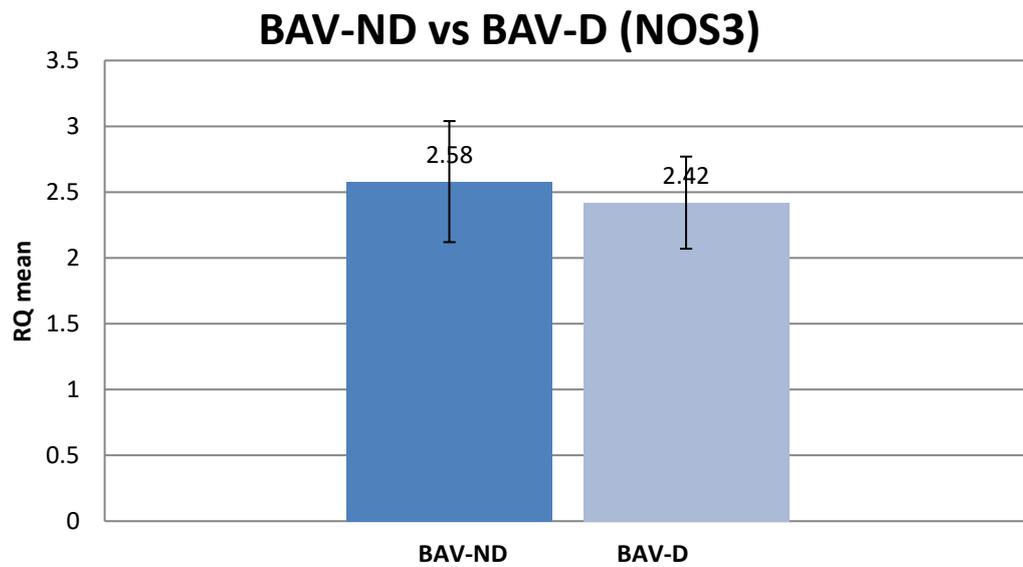


Abbildung 57: NOS3-Genexpression bei Patienten mit bicuspider Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

UAV-ND: M=3,07; SE=0,62; UAV-D: M=2,88; SE=0,48; p=0,80).

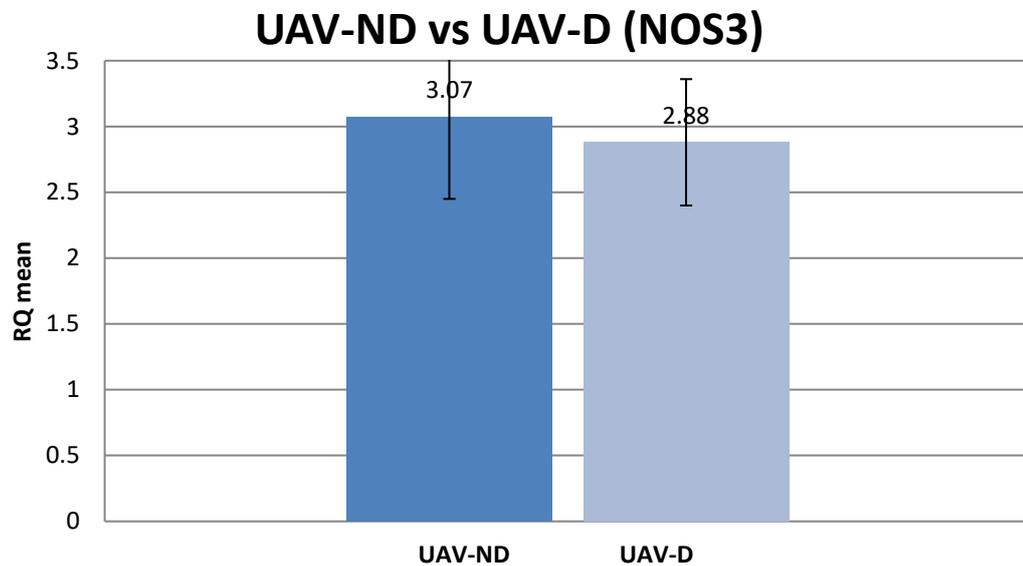


Abbildung 58: NOS3-Genexpression bei Patienten mit unicuspider Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterscheiden sich die Patientengruppen (dilatiert und nicht-dilatiert) nicht signifikant in ihrer FBN1-Genexpression (D: M=1,05; SE=0,04; ND: M=1,07; SE=0,05; p=0,79)

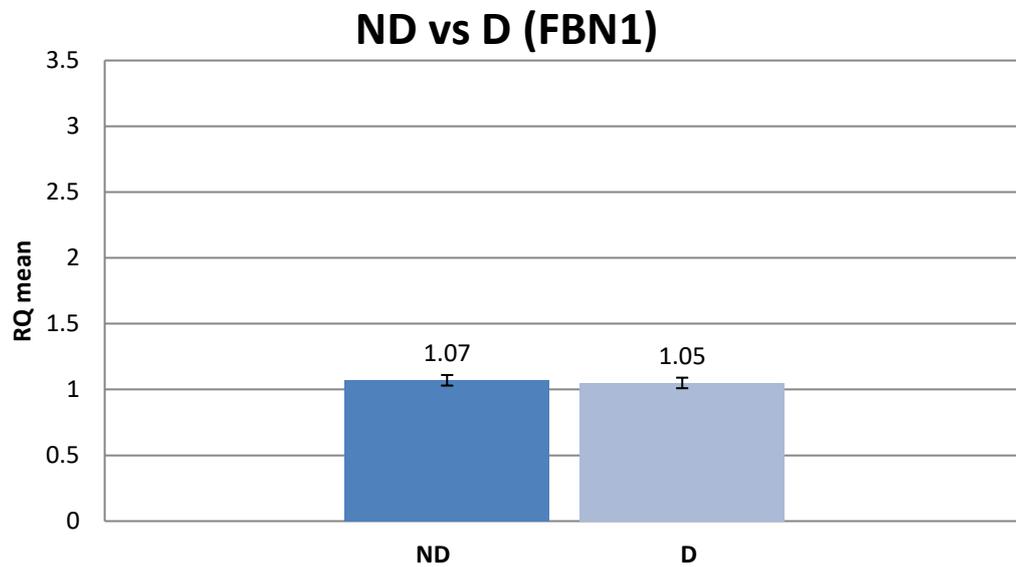


Abbildung 59: FBN1-Genexpression bei Patienten mit mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

TAV-ND: M=1,12; SE=0,06; TAV-D: M=1,16; SE=0,07; p=0,69

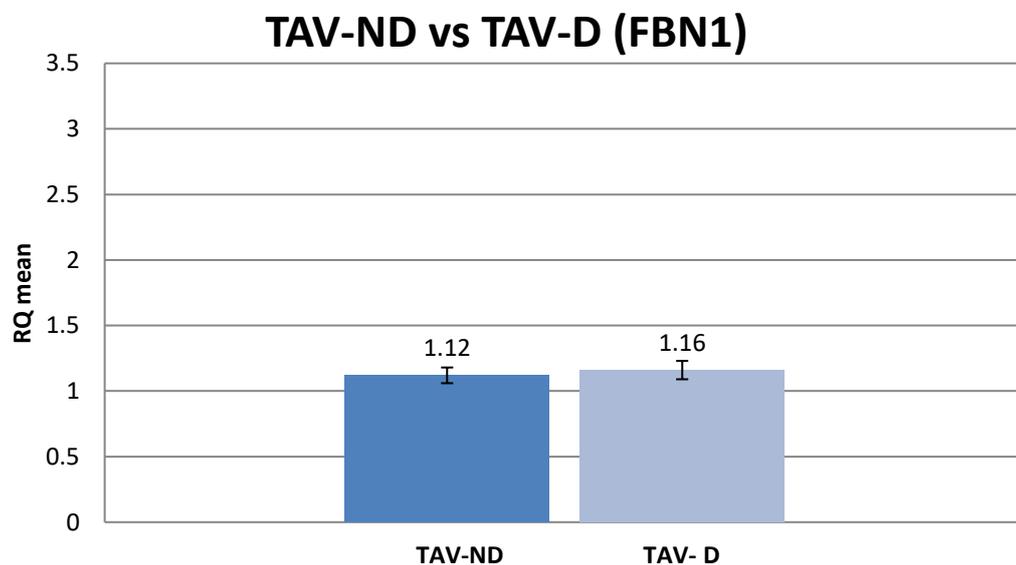


Abbildung 60: FBN1-Genexpression bei Patienten mit tricuspider Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

BAV-ND: M=0,95; SE=0,09; BAV-D: M=0,90; SE=0,17; p=0,68

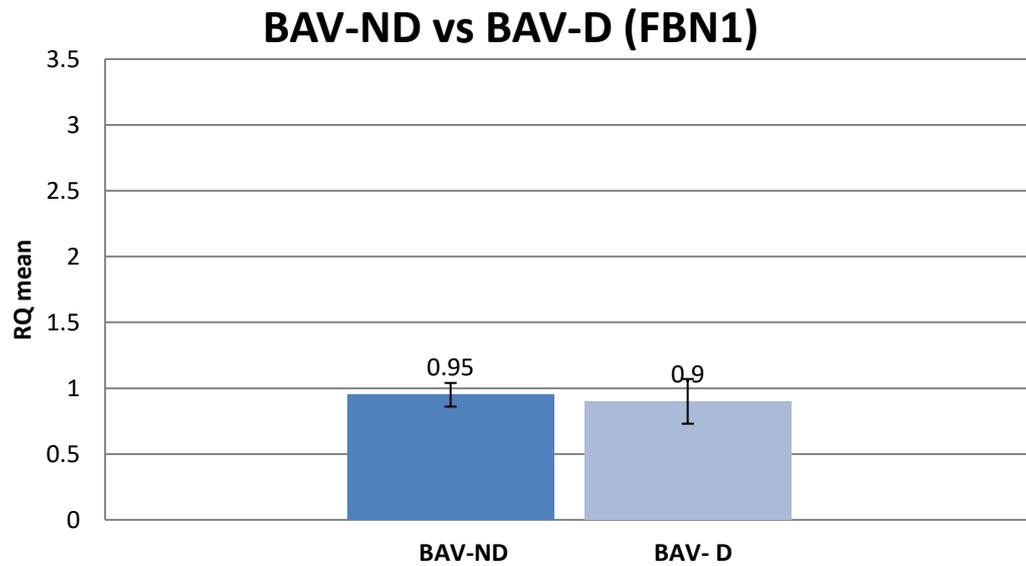


Abbildung 61: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

UAV-ND: M=1,13; SE=0,11; UAV-D: M=1,09; SE=0,09; p=0,74).

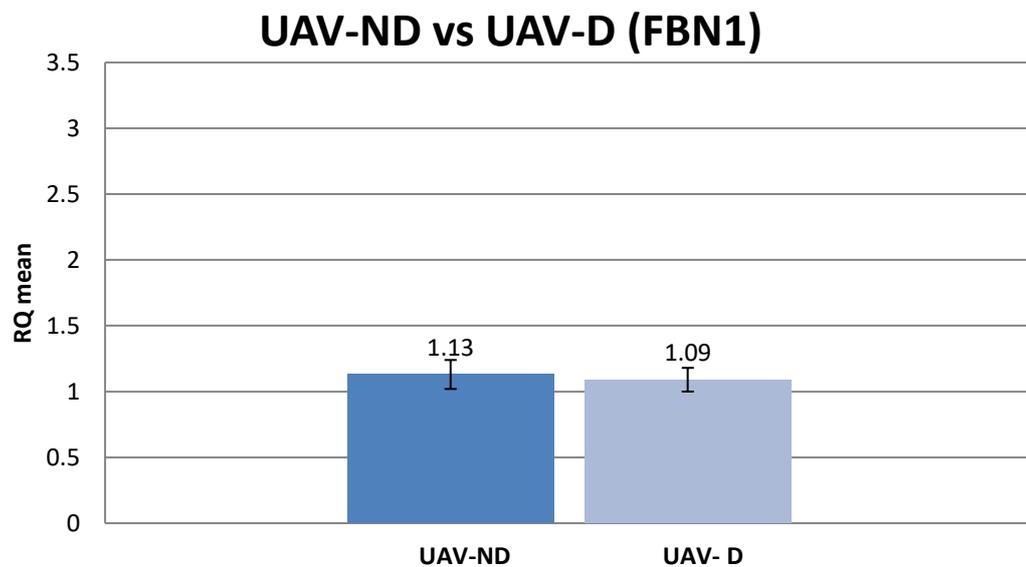


Abbildung 62: FBN1-Genexpression bei Patienten mit unicuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterscheiden sich die Patientengruppen (dilatiert und nicht-dilatiert) signifikant in ihrer TGF $\beta$ R1-Genexpression (D: M=1,84; SE=0,09; ND: M=2,20; SE=0,11; p=0,01)

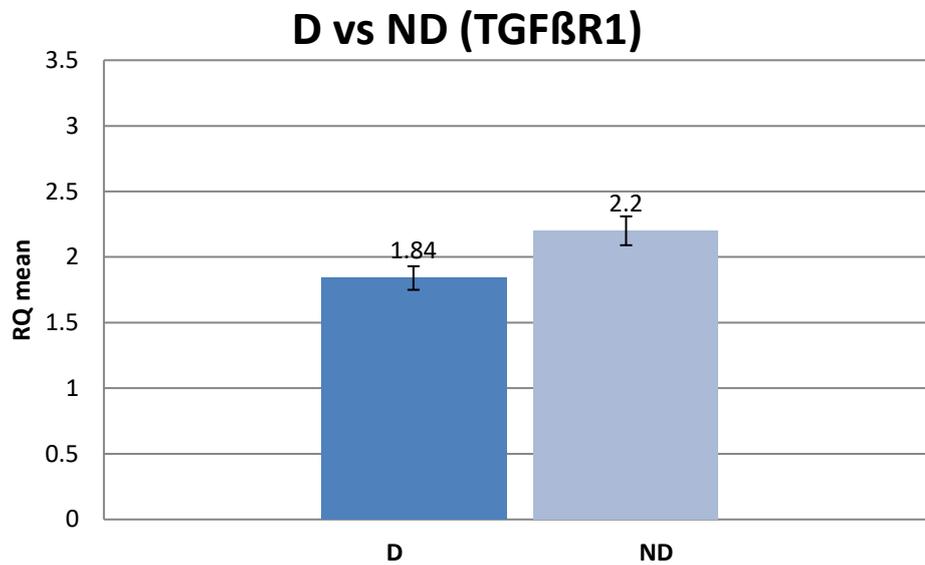


Abbildung 63: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

TAV-ND: M=2,08; SE=0,13; TAV-D: M=1,74; SE=0,15; p=0,09

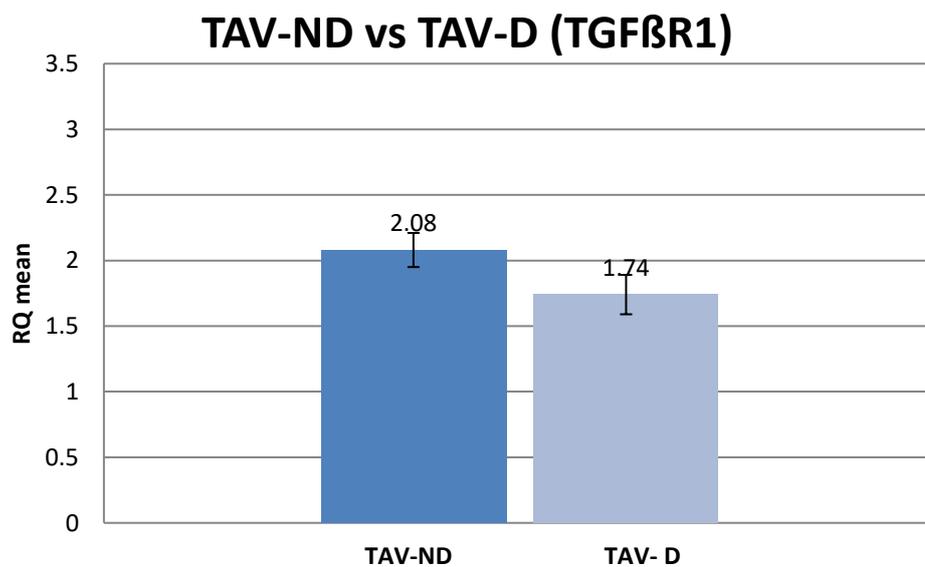


Abbildung 64: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit tricuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

BAV-ND: M=2,33; SE=0,19; BAV-D: M=1,78; SE=0,14; p=0,02

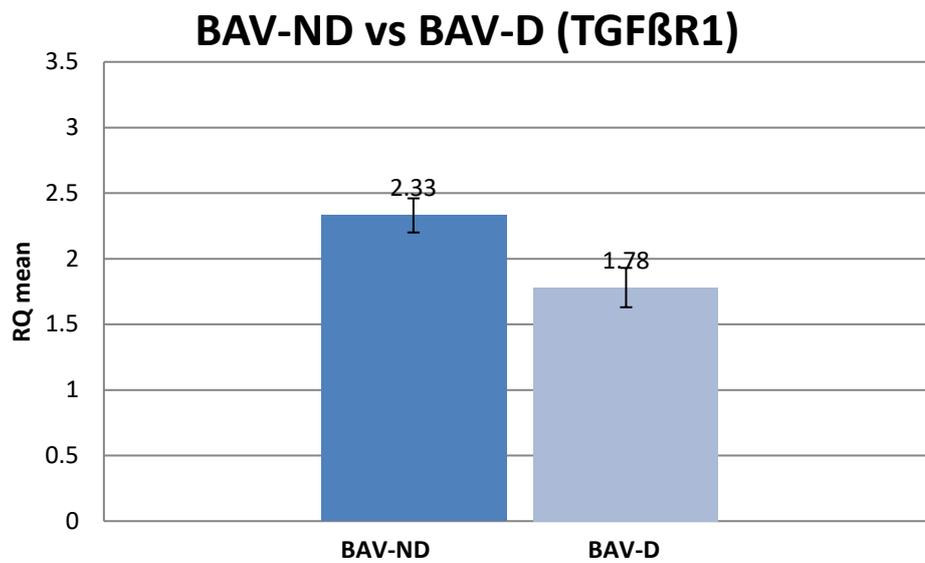


Abbildung 65: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

UAV-ND: M=2,21; SE=0,24; UAV-D: M=2,01; SE=0,19; p=0,52).

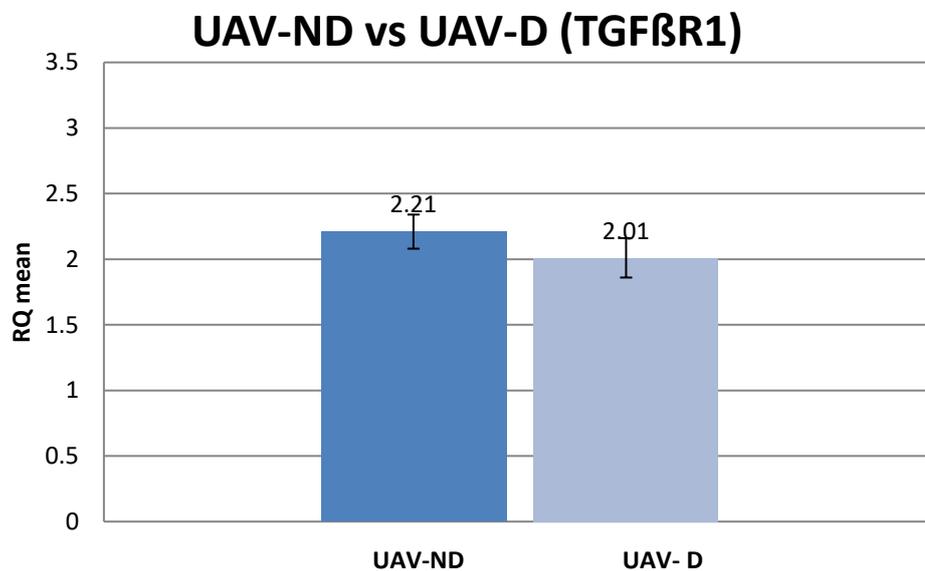


Abbildung 66: FBN1-Genexpression bei Patienten mit unicuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterscheiden sich die Patientengruppen (dilatiert und nicht-dilatiert) nicht signifikant in ihrer GATA5-Genexpression (D: M=1,99; SE=0,15; ND: M=1,90; SE=0,18; p=0,70)

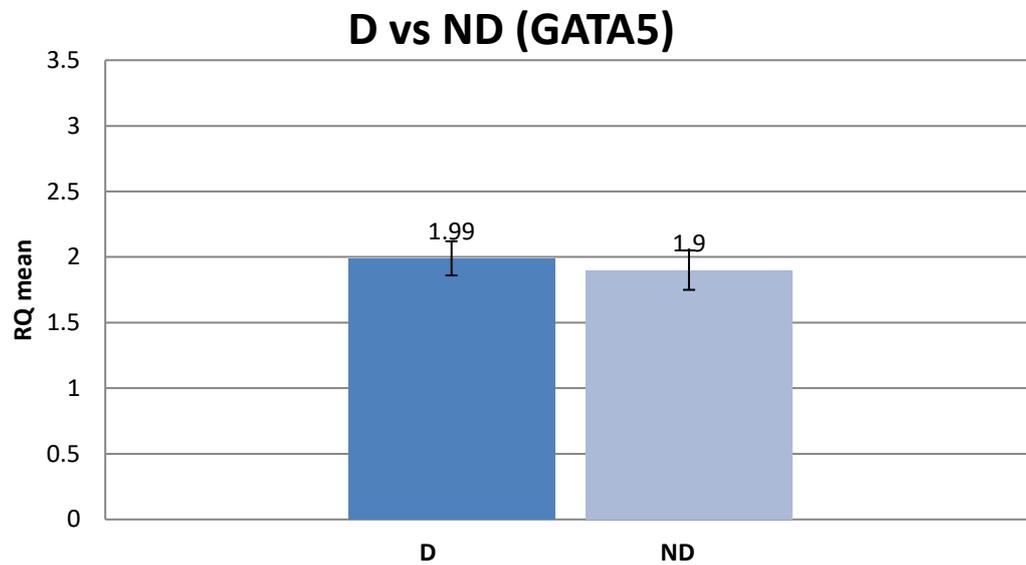


Abbildung 67: GATA5-Genexpression bei Patienten mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

TAV-ND: M=1,67; SE=0,22; TAV-D: M=2,60; SE=0,26; p=0,01

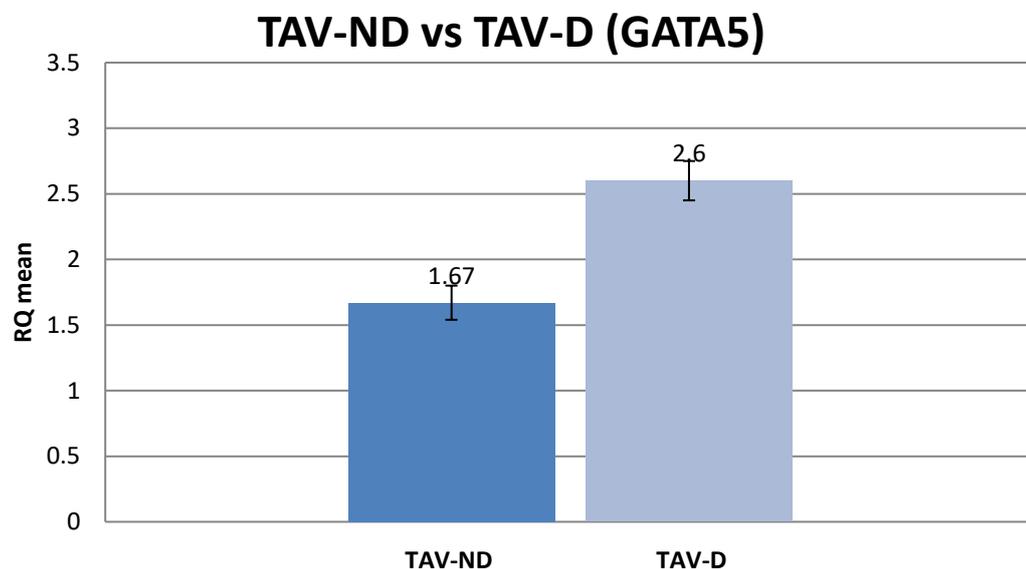


Abbildung 68: GATA5-Genexpression bei Patienten mit tricuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

BAV-ND: M=2,07; SE=0,33; BAV-D: M=1,57; SE=0,24; p=0,22

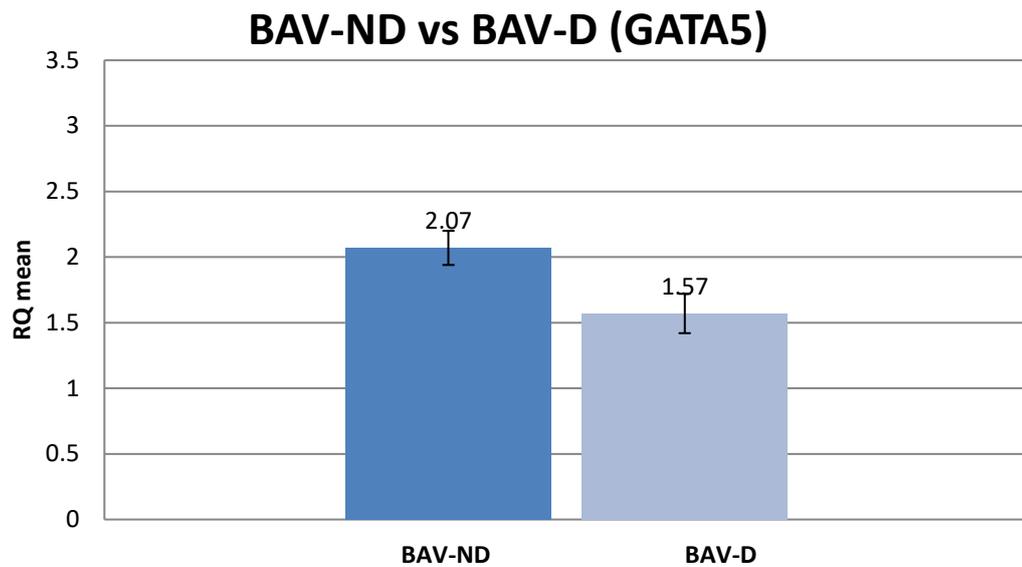


Abbildung 69: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

UAV-ND: M=1,95; SE=0,37; UAV-D: M=1,79; SE=0,29; p=0,75).

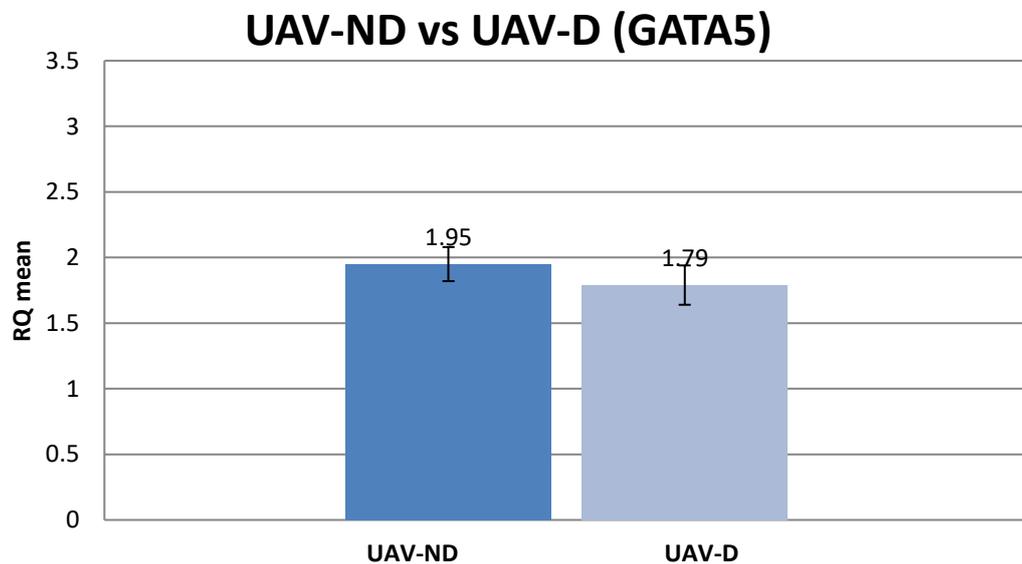


Abbildung 70: GATA5-Genexpression bei Patienten mit unicuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

In der einfaktoriellen ANOVA unterscheiden sich die Patientengruppen (dilatiert und nicht-dilatiert) nicht signifikant in ihrer COL3A1-Genexpression (D: M=1,39; SE=0,15; ND: M=1,22; SE=0,18; p=0,25)

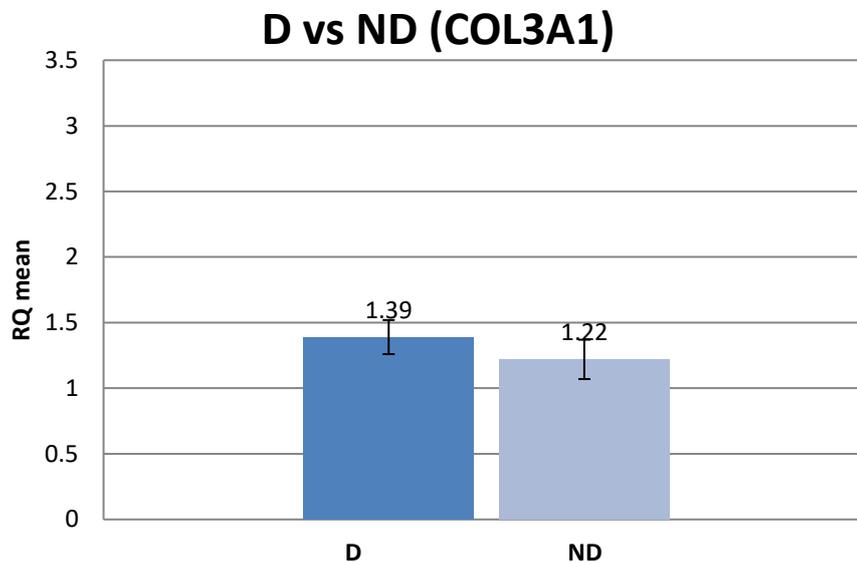


Abbildung 71: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

TAV-ND: M=1,14; SE=0,22; TAV-D: M=1,22; SE=0,12; p=0,61

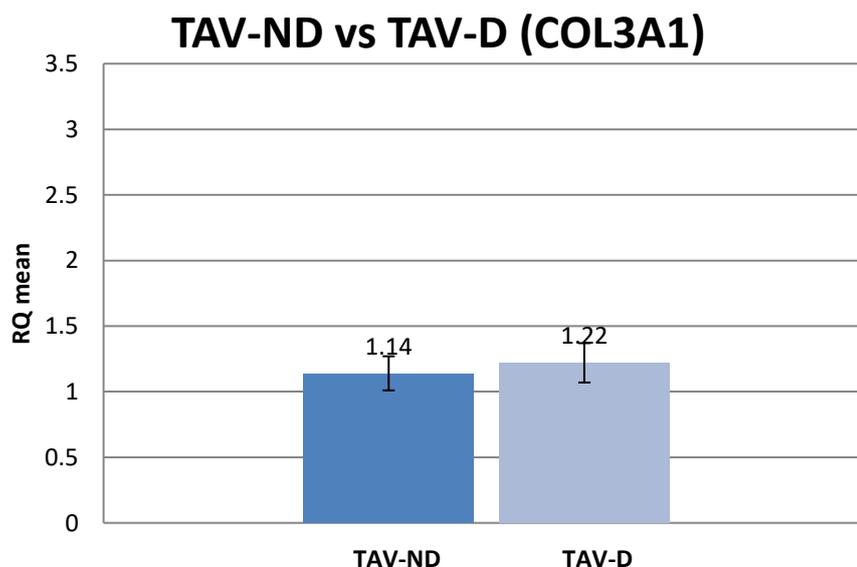


Abbildung 72: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit tricuspidar Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

BAV-ND: M=1,26; SE=0,15; BAV-D: M=1,23; SE=0,10; p=0,88

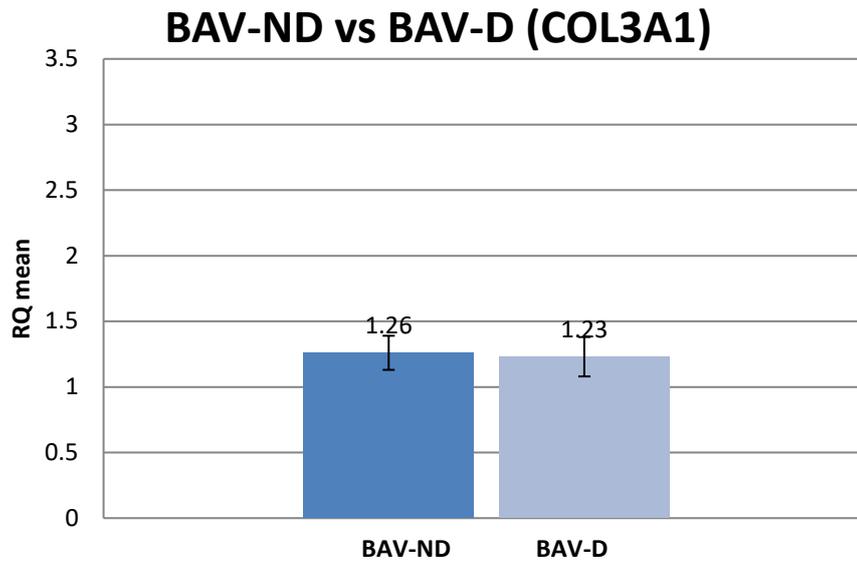


Abbildung 73: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspider Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

UAV-ND: M=1,78; SE=0,18; UAV-D: M=1,36; SE=0,14; p=0,06).

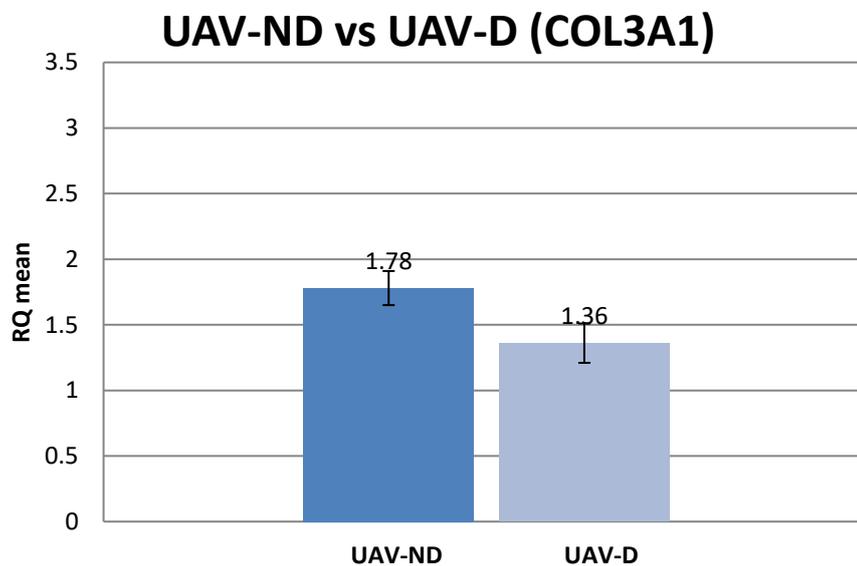


Abbildung 74: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit unicuspider Aortenklappe mit Aortendilatation und normaler Aorta (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

#### 4.5. Gibt es Unterschiede in der Genexpression von BAV-Patienten, die sich im Fusionstyp unterscheiden?

Ein Vergleich der eNOS-Genexpression zwischen den Fusionstypen (T-Test/Levene's Test of Equality of Variances) ergab keinen signifikanten Unterschied in allen Lokalisationen (A1 BAV R/L: M=2,4; SE=0,27; BAV R/A: M=2,68; SE=0,47; p=0,44

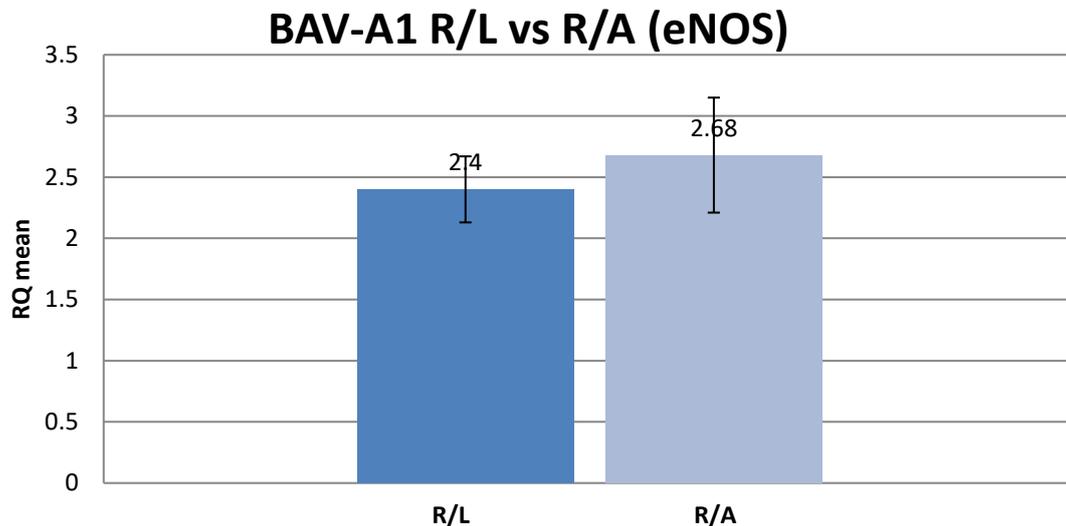


Abbildung 75: NOS3-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A1 (RQ = relative Quantität der qPCR +/- 1 SE)

A2 BAV R/L: M=3,26; SE=0,72; BAV R/A: M=2,12; SE=0,61; p=0,47 //

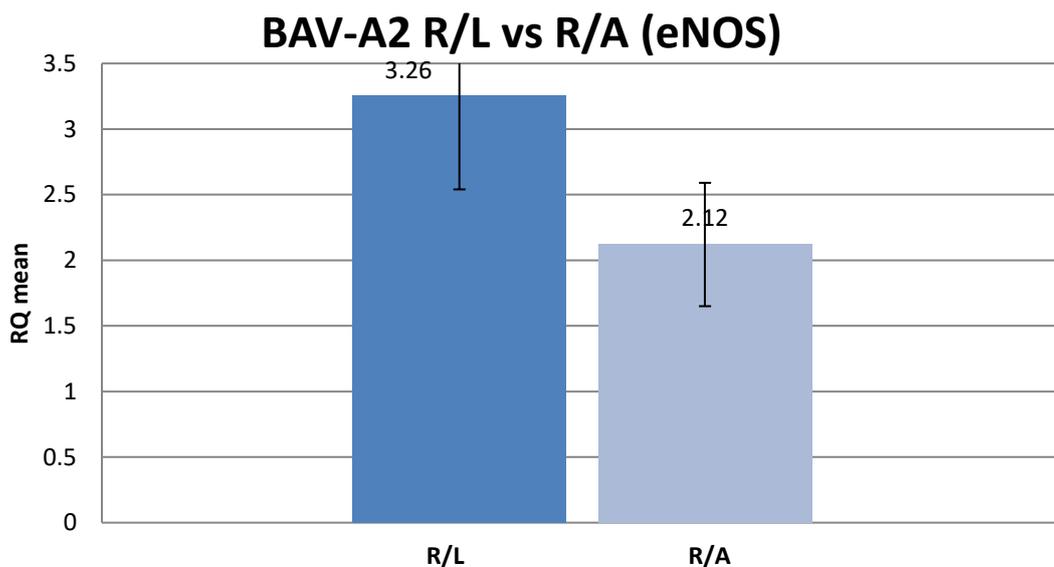


Abbildung 76: NOS3-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A2

B1 BAV R/L: M=3,37; SE=0,82;BAV R/A: M=3,67; SE=0,67; p=0,65 //

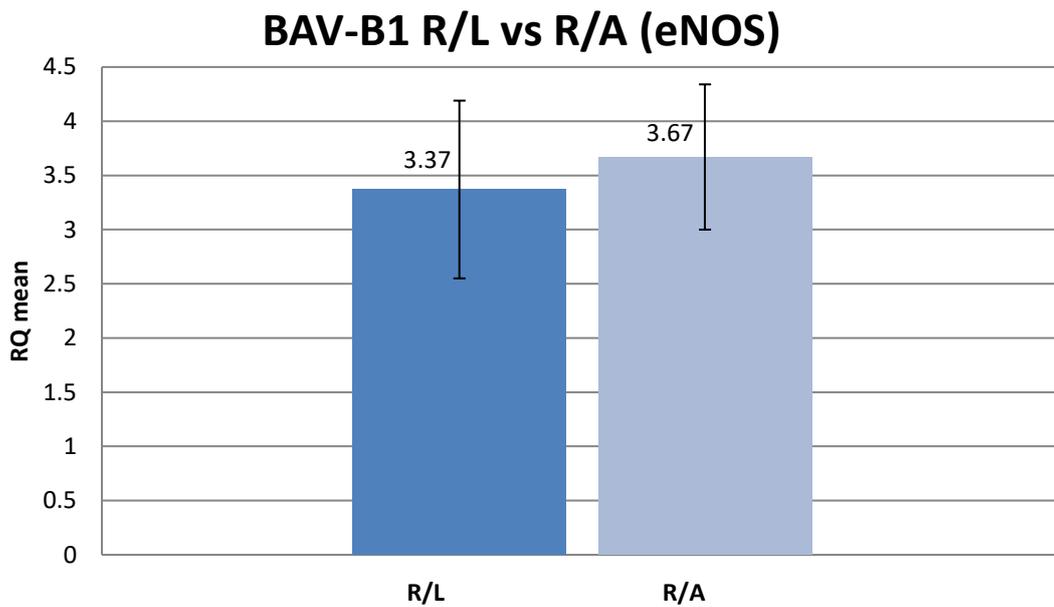


Abbildung 77: NOS3-Genexpression bei Patienten mit bicuspider Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B1

B2 BAV R/L: M=3,72; SE=0,75;BAV R/A: M=3,41; SE=0,74; p=0,46).

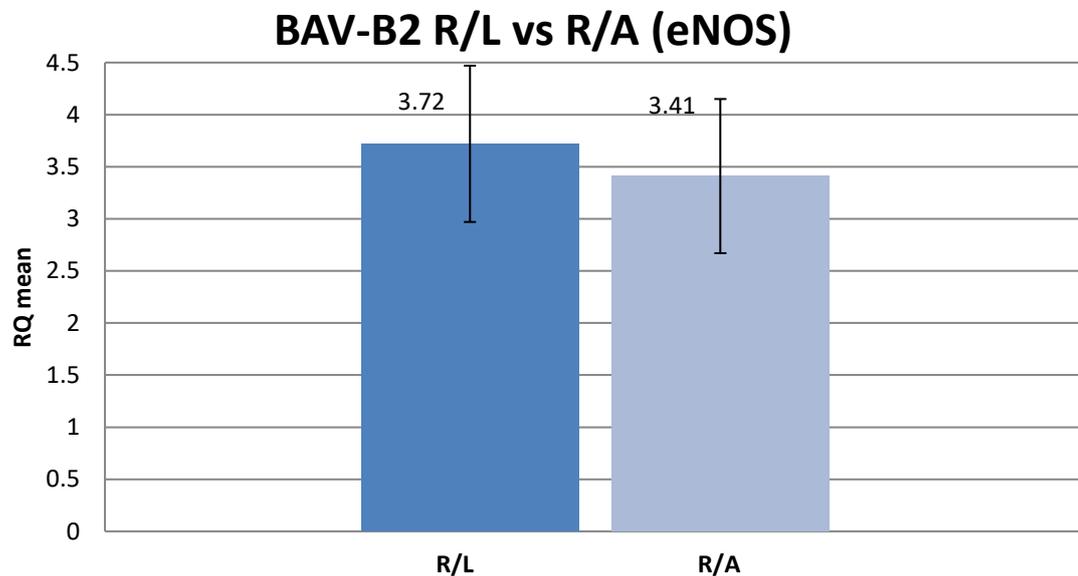


Abbildung 78: NOS3-Genexpression bei Patienten mit bicuspider Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B2

Auch der NPar Test/Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede (A1 R/L vs R/A p=0,81 asymp.Sig. (2-tailed); A2 p=0,25 ;B1 p=0,48; B2 p=0,89).

Ein Vergleich der FBN1-Genexpression zwischen den Fusionstypen (T-Test/Levene's Test of Equality of Variances) ergab keinen signifikanten Unterschied in allen Lokalisationen (A1 BAV R/L: M=1,06; SE=0,04; BAV R/A: M=1,05; SE=0,09; p=0,32 //

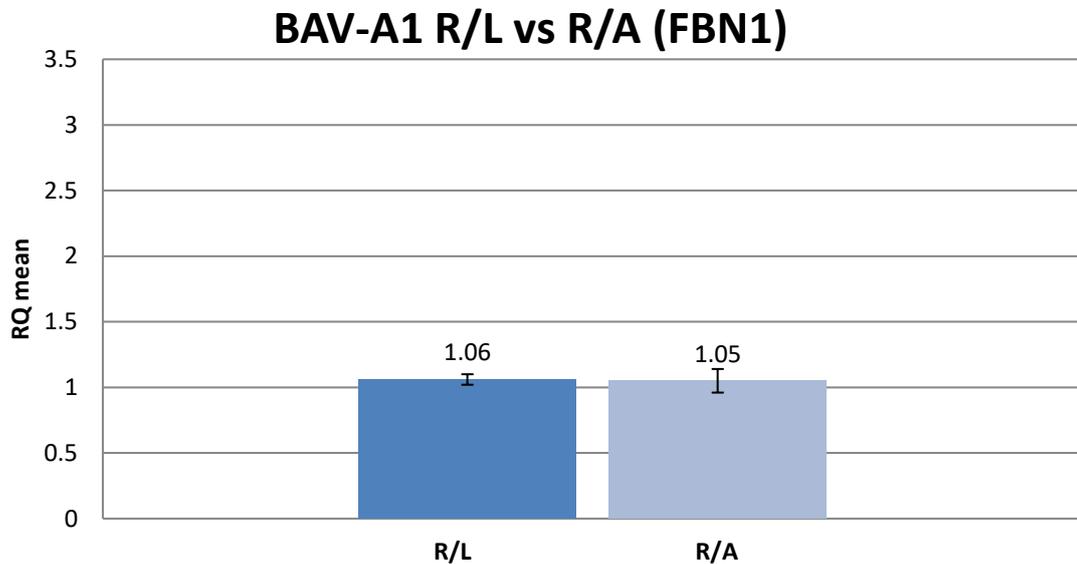


Abbildung 79: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A1

A2 BAV R/L: M=2,28; SE=0,51;BAV R/A: M=1,49; SE=0,14; p=0,15 //

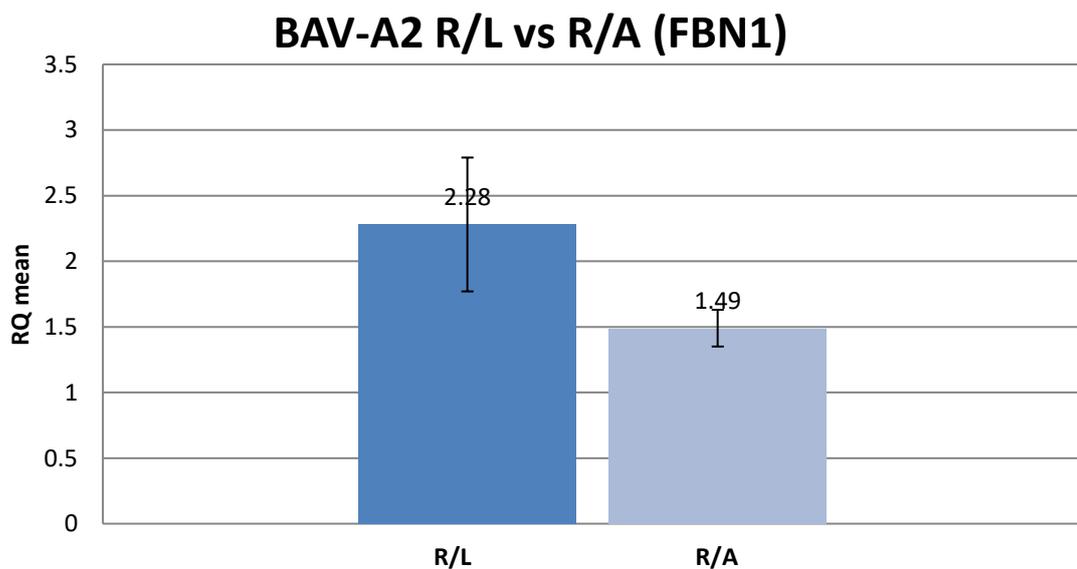


Abbildung 80: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A2

B1 BAV R/L: M=1,69; SE=0,16;BAV R/A: M=1,78; SE=0,16; p=0,80 //

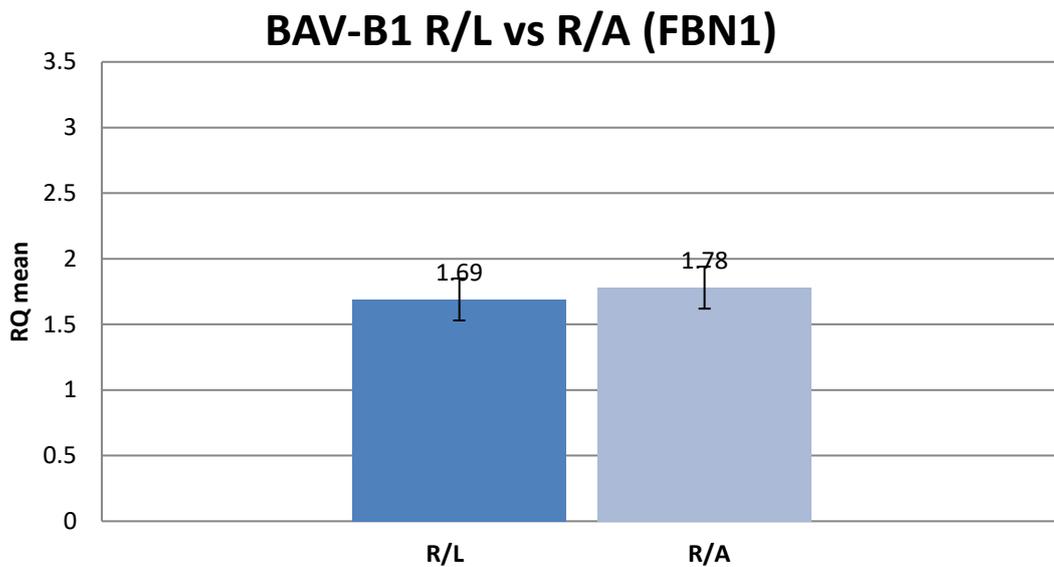


Abbildung 81: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B1

B2 BAV R/L: M=1,71; SE=0,12;BAV R/A: M=1,53; SE=0,25; p=0,46).

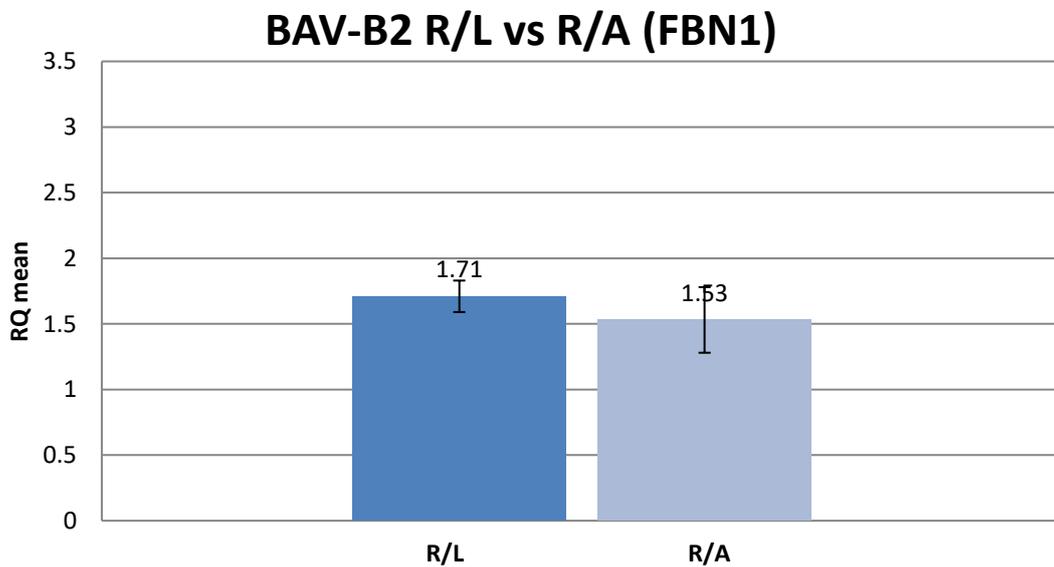


Abbildung 82: FBN1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B2

Auch der NPar Test/Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede (A1 R/L vs R/A p=0,94 asymp.Sig. (2-tailed); A2 p=0,10 ;B1 p=0,71; B2 p=0,72).

Ein Vergleich der TGF $\beta$ R1-Genexpression zwischen den Fusionstypen (T-Test/Levene's Test of Equality of Variances) ergab keinen signifikanten Unterschied in allen Lokalisationen (A1 BAV R/L: M=1,31; SE=0,09;BAV R/A: M=1,32; SE=0,15; p=0,75

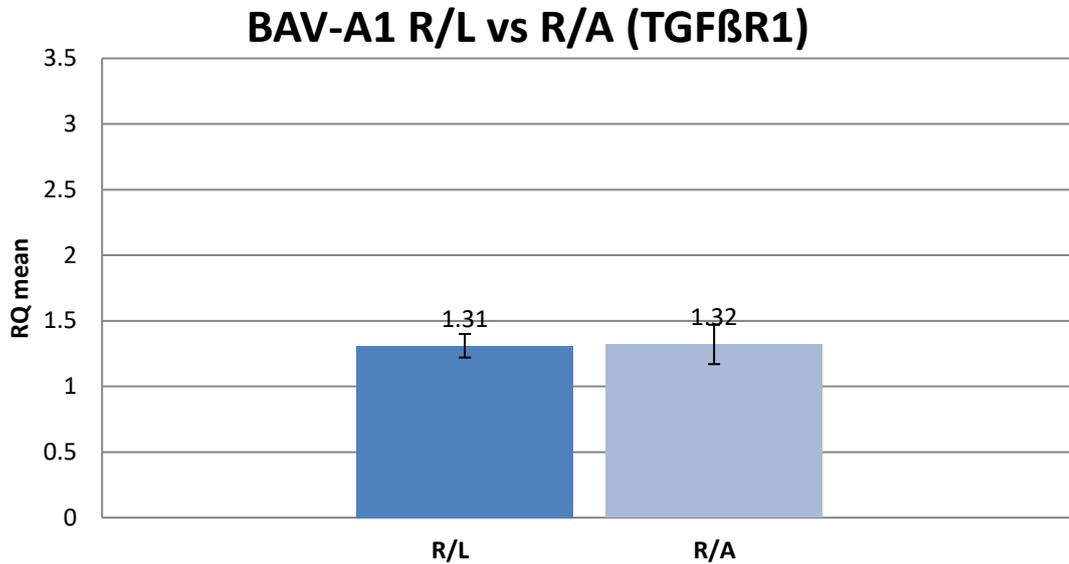


Abbildung 83: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A1

A2 BAV R/L: M=1,44; SE=0,25;BAV R/A: M=1,59; SE=0,27; p=0,95

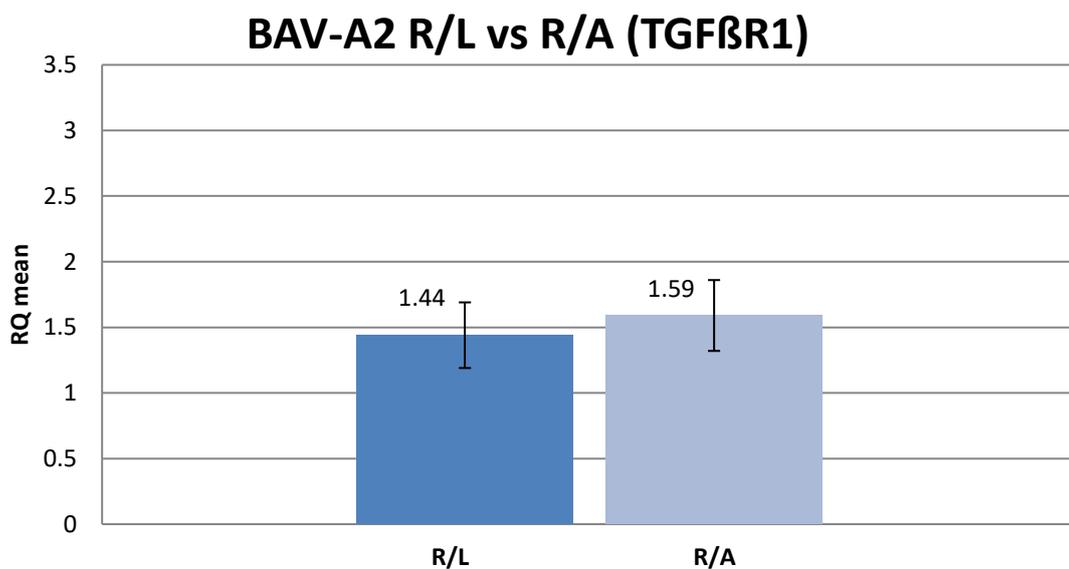


Abbildung 84: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A2

B1 BAV R/L: M=1,44; SE=0,37;BAV R/A: M=1,56; SE=0,22; p=0,43 //

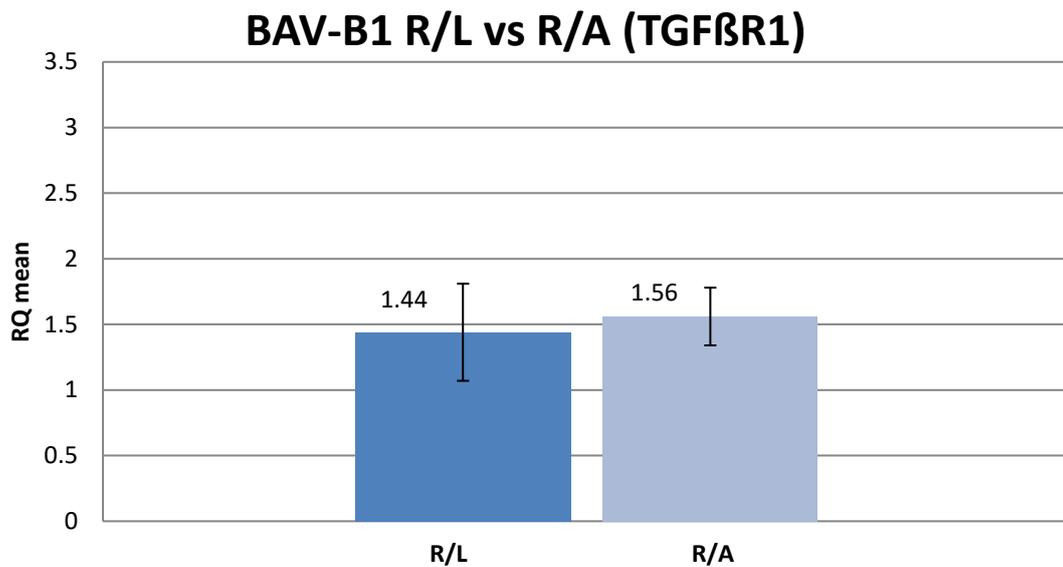


Abbildung 85: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B1

B2 BAV R/L: M=1,84; SE=0,46;BAV R/A: M=1,88; SE=0,36; p=0,53).

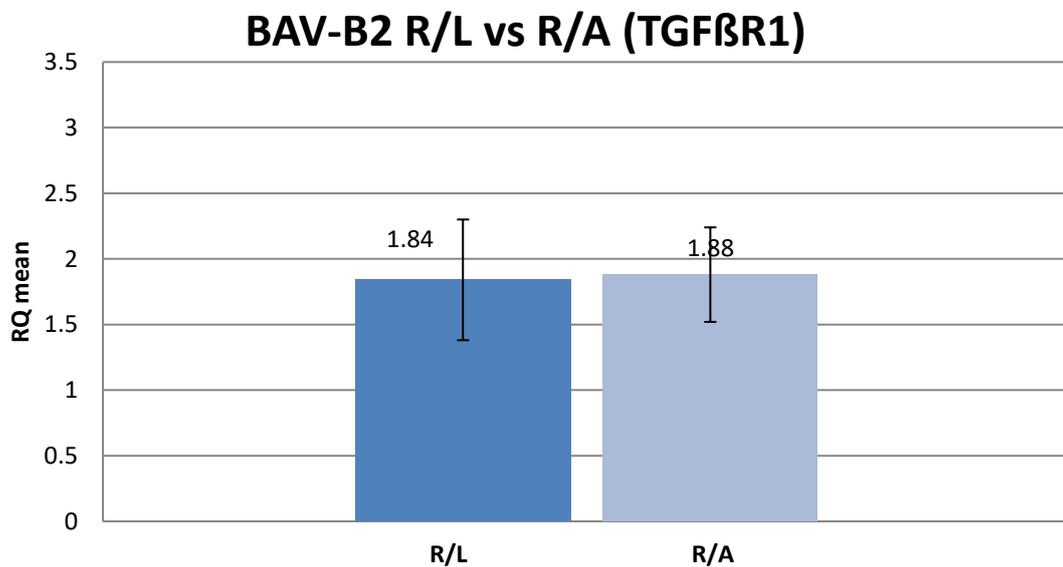


Abbildung 86: TGF $\beta$ R1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B2

Auch der NPar Test/Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede (A1 R/L vs R/A p=0,57 asymp.Sig. (2-tailed); A2 p=0,86 ;B1 p=0,47; B2 p=0,47).

Ein Vergleich der GATA5-Genexpression zwischen den Fusionstypen (T-Test/Levene's Test of Equality of Variances) ergab keinen signifikanten Unterschied in allen Lokalisationen (A1 BAV R/L: M=1,46; SE=0,19;BAV R/A: M=1,93; SE=0,36; p=0,69

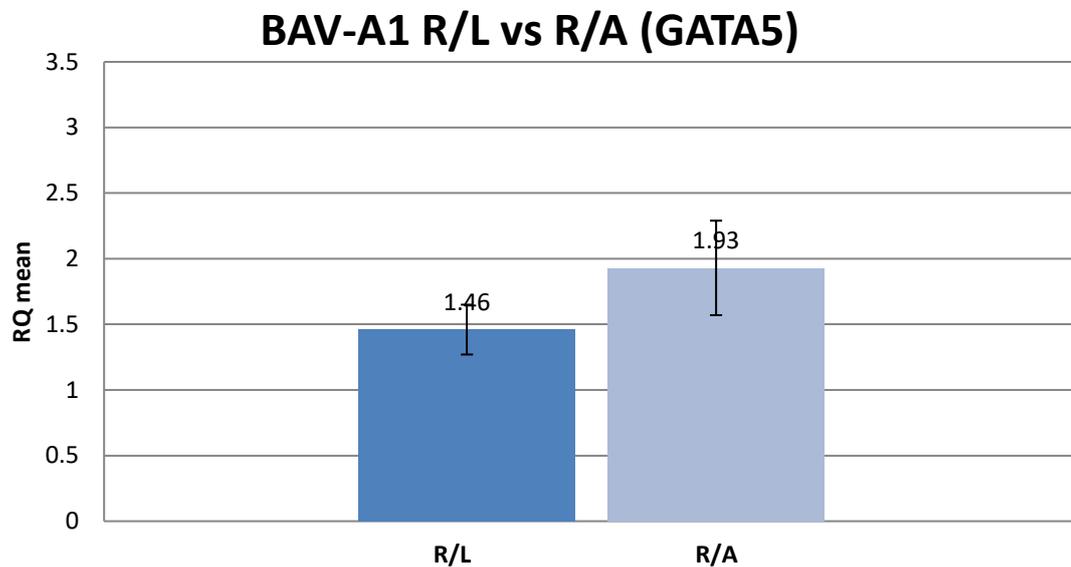


Abbildung 87: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A1

A2 BAV R/L: M=1,38; SE=0,23;BAV R/A: M=1,92; SE=0,76; p=0,18 //

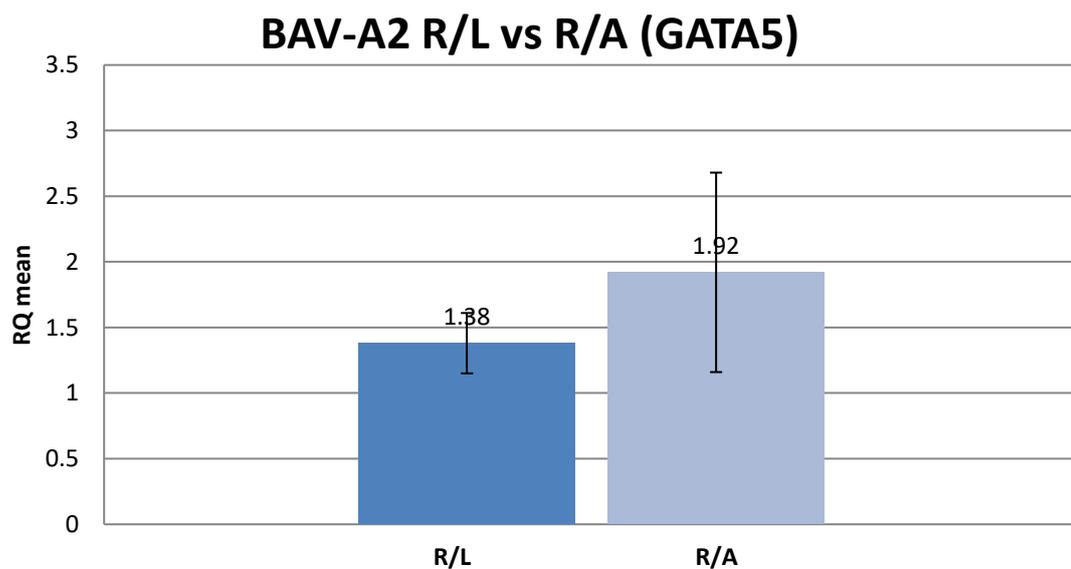


Abbildung 88: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A2

B1 BAV R/L: M=1,25; SE=0,28;BAV R/A: M=1,23; SE=0,10; p=0,90 //

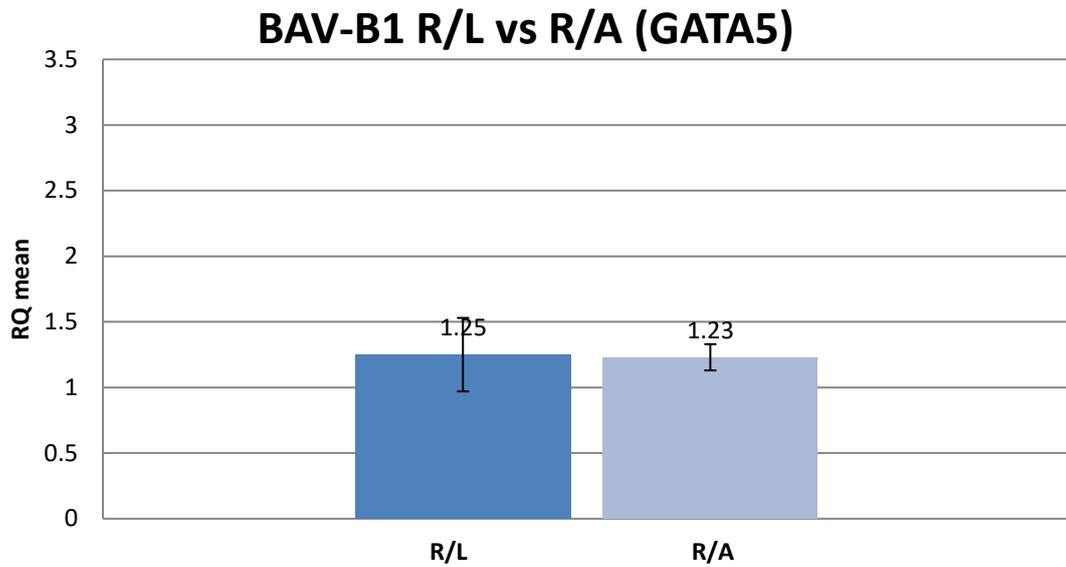


Abbildung 89: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B1

B2 BAV R/L: M=1,20; SE=0,24;BAV R/A: M=1,05; SE=0,23; p=0,52).

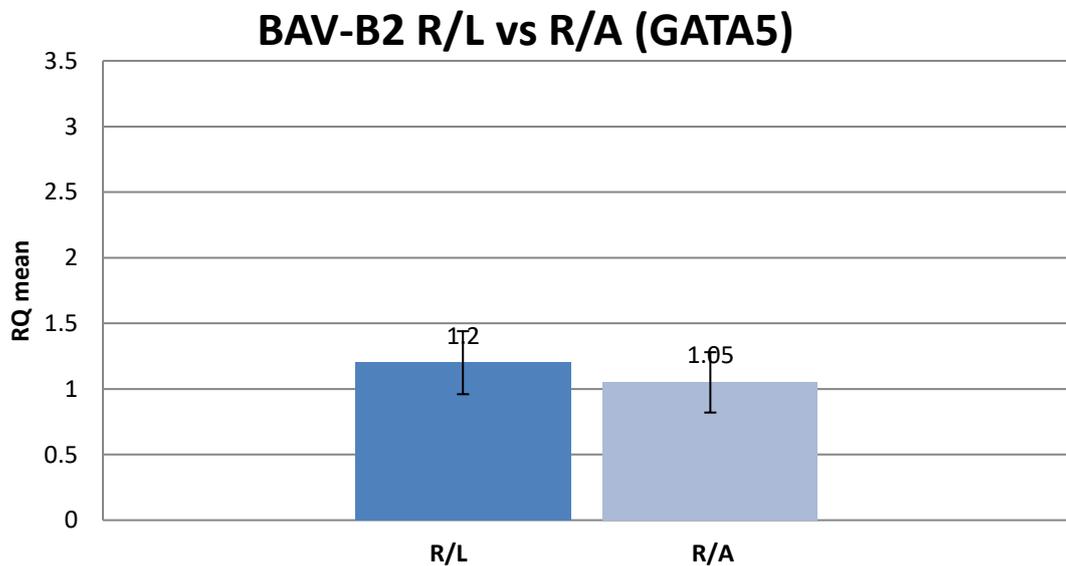


Abbildung 90: GATA5-Genexpression bei Patienten mit bicuspidar Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B2

Auch der NPar Test/Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede (A1 R/L vs R/A p=0,26 asymp.Sig. (2-tailed); A2 p=0,75 ;B1 p=0,72; B2 p=0,72).

Ein Vergleich der COL3A1-Genexpression zwischen den Fusionstypen (T-Test/Levene's Test of Equality of Variances) ergab keinen signifikanten Unterschied in allen Lokalisationen (A1 BAV R/L:  $M=1,25$ ;  $SE=0,10$ ; BAV R/A:  $M=1,17$ ;  $SE=0,12$ ;  $p=0,47$ )

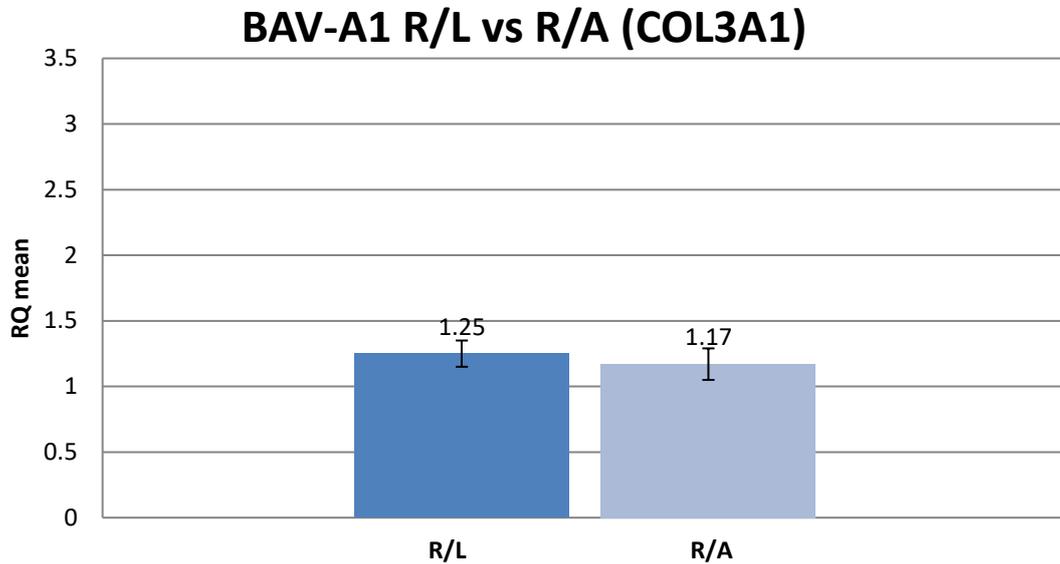


Abbildung 91: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A1

A2 BAV R/L:  $M=1,47$ ;  $SE=0,28$ ; BAV R/A:  $M=1,16$ ;  $SE=0,16$ ;  $p=0,26$

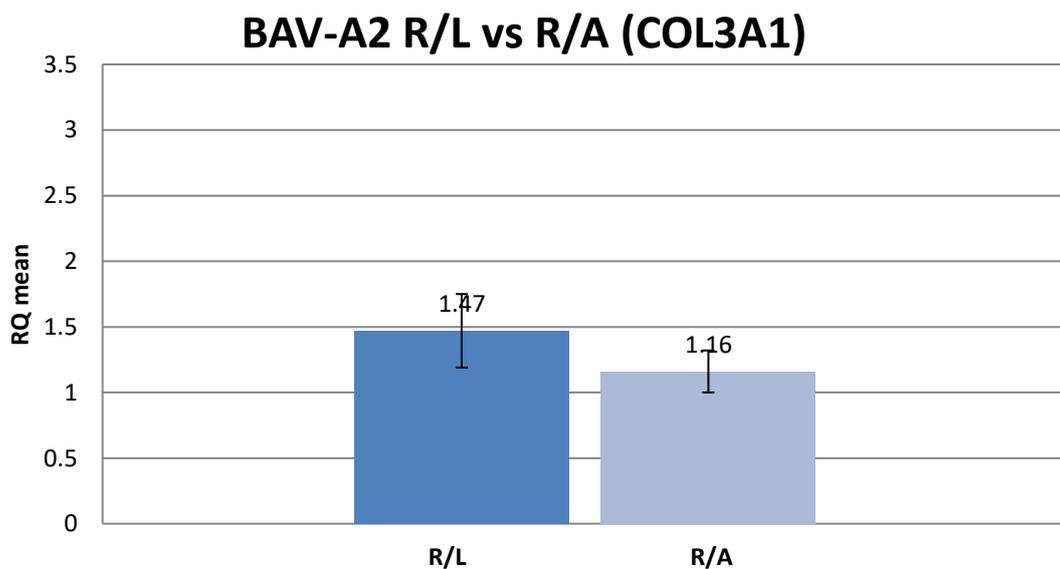


Abbildung 92: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation A2

B1 BAV R/L: M=1,34; SE=0,21;BAV R/A: M=1,27; SE=0,41; p=0,67

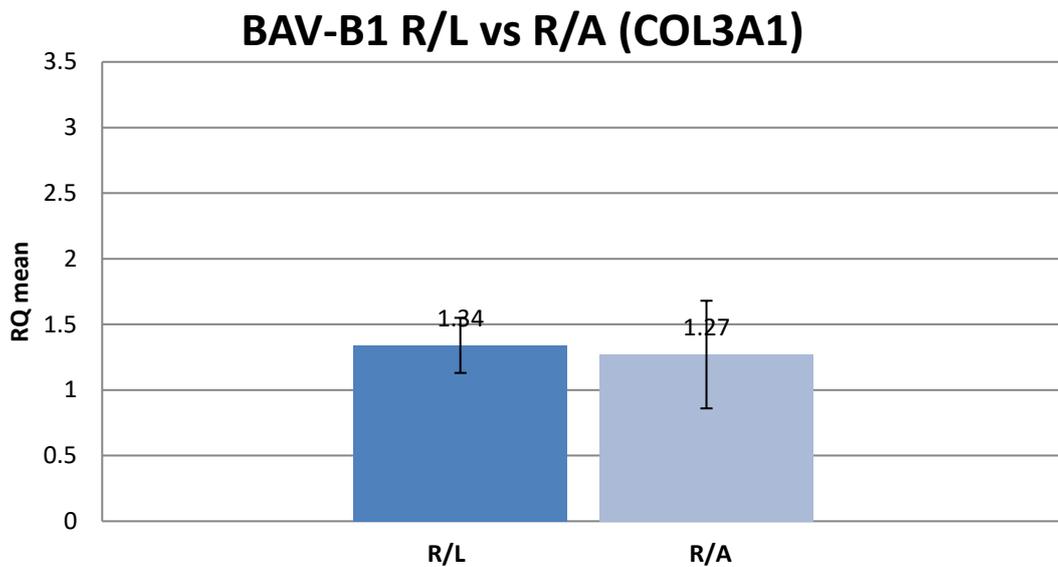


Abbildung 93: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B1

B2 BAV R/L: M=1,54; SE=0,28;BAV R/A: M=0,93; SE=0,15; p=0,31).

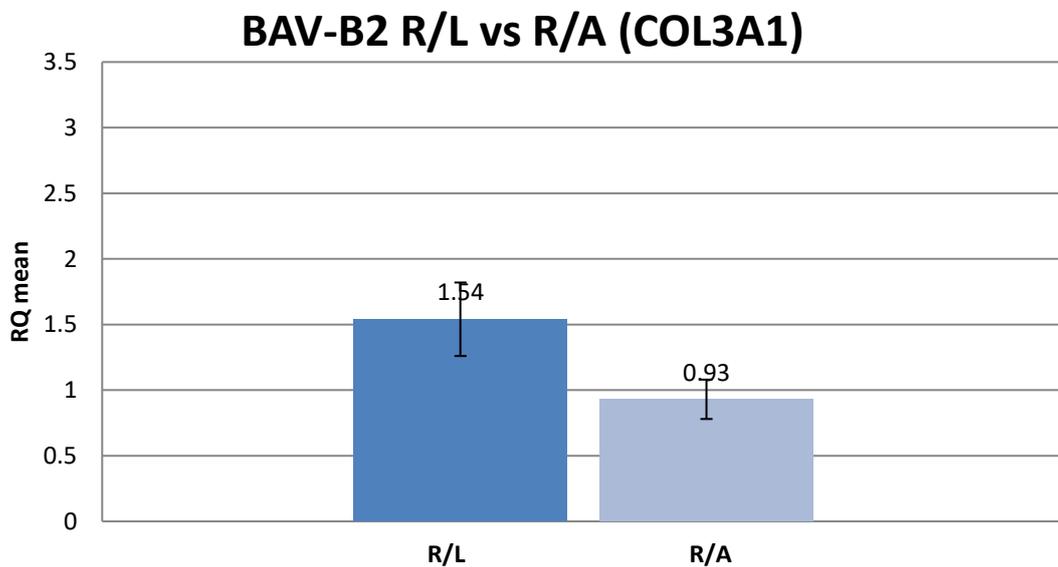


Abbildung 94: COL3A1-Genexpression bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und R/L-Fusion und R/A-Fusion in Lokalisation B2

Auch der NPar Test/Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede (A1 R/L vs R/A p=0,70 asymp.Sig. (2-tailed); A2 p=0,36 ;B1 p=0,90; B2 p=0,10).

## 5. Diskussion

Die hohe Vergesellschaftung einer unicuspiden oder bicuspiden Aortenklappe mit einer Dilatation der Aorta ascendens und dem damit verbundenen Risiko einer letalen Dissektion stellen eine hohe klinische Relevanz dar. Molekulare Signalkaskaden, die in etwa 60 % der Patienten mit angeborenem Aortenklappenvitium zur Dilatation der Aorta ascendens führen [1, 19, 21, 22], sind bis dato ungeklärt und daher von großem klinischem Interesse. Abweichende Protein- sowie RNA-Expressionsanalysen in der Aortenwand könnten Ansatzpunkte für präventive Medikamente sein, die den Progress der Aortendilatation und der damit vergesellschafteten Aortendissektion senken.

Beispielhaft ist das Medikament Losartan. Ein Angiotensin II-Rezeptor-Typ1-Antagonist (AT1-Antagonist), welcher beim Marfan-Syndrom zum Einsatz kommt. So zeigte die randomisierte kontrollierte COMPARE (Cozaar in Marfan Patients Reduces Aortic Enlargement) Studie, in welcher 233 Patienten mit Marfan-Syndrom einer Therapie mit Losartan oder mit Placebo behandelt wurden, eine signifikant niedrigere Erweiterungsrate der Aortenwurzel bei Patienten mit Losartan als in der Kontrollgruppe ohne Medikament [146]. Ebenso ist bei Patienten nach Aortenwurzelersatz und Losartan eine signifikant geringere postoperative Zunahme des Aortenbogen-Durchmessers als Patienten der Kontrollgruppe [70].

Bei Mäusen mit heterozygoter FBN1-Mutation unter Behandlung mit Losartan sind signifikant niedrigere Erweiterungen der Aorta als bei Tieren aus der Placebo-Kontrollgruppe zu konstatieren [72]. Vermutet wird - als molekularer Mechanismus - ein Zusammenhang zum TGF- $\beta$ -Signalweg. So zeigten Cohn et al., dass Losartan die Aktivität von Thrombospondin-1 reduziert, welches durch Angiotensin II hochreguliert wird [31]. Thrombospondin-1 aktiviert TGF- $\beta$  [196], das in der Pathogenese der syndromalen thorakalen Aortenaneurysmen eine Schlüsselfunktion zu spielen scheint [110, 129].

Erste Versuche den Einfluss des TGF- $\beta$ -Signalwegs schematisch darzustellen, skizzierten Henn et al. in Abbildung 95. Zusätzlich zum TGF- $\beta$ -Signalweg werden dort die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) sowie der NOTCH-Signalweg hervorgehoben.

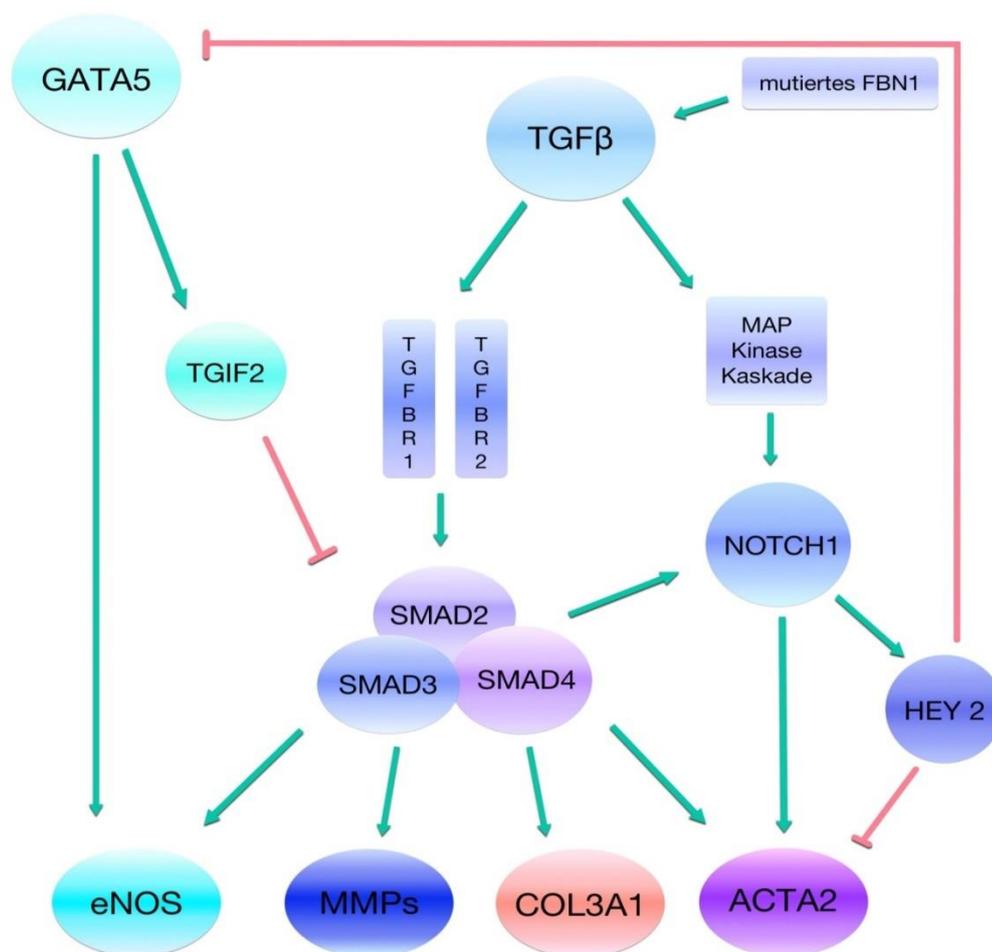


Abbildung 95: Schema TGF- $\beta$ -Signalwegs

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, TGFBR2 = transforming growth factor beta Rezeptor 2, TGIF2 = transforming growth factor-beta-induced factor 2 [76]

Henn et al postulieren dort in einem kanonischen Signalweg, dass die bei mutiertem FBN1 vorliegenden Fibrillin-1-Bruchstücke dazu führen [83], dass TGF- $\beta$  vermehrt in seiner freien Form vorliegt [24] und somit vermehrte Bindung von TGF- $\beta$  an seine Rezeptoren (TGFBR1 und TGFBR2) entstehen. 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 [97, 188]. Zu den Genen, deren Transkription durch die SMAD-Proteine gefördert wird,

zählen unter anderem eNOS [161], MMPs [144], COL3A1 [182], Jagged-1 [99] und ACTA2 [139].

Zusätzlich aktiviert TGF- $\beta$  weitere intrazelluläre Signalkaskaden, darunter auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAP-Kinase-Kaskade) [188], die durch die Induktion des NOTCH-Liganden Jagged-1 [193, 194] 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), der wiederum die Transkription von ACTA2 hemmt [175]. Studien an Zellkulturen haben gezeigt, dass HEY2 mit den Proteinen der GATA-Familie interagieren und damit auch deren transkriptionelle Aktivität hemmen kann [37].

Elefteriades et al. demonstrierten in Tiermodellen, dass GATA5 die Transkription von eNOS aktiviert [100] 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 [117].

Bei Patienten mit unicuspid angelegter Aortenklappe geht man von einer abweichenden molekulargenetischen Pathophysiologie aus, da Patienten mit unicuspiden Aortenklappen eine Aortendissektion früher erleiden als Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und das Risiko, diese Komplikation zu entwickeln, bei Vorliegen einer unicuspiden Aortenklappe im Vergleich zur bicuspiden Aortenklappe etwa doppelt so hoch ist [102].

Unsere Zielstrukturen in der hier vorgelegten Studie sind zum einen die Expression von Genen des TGF - Signalweges (FBN1, TGFBR1) und zum anderen der eNOS – Signalwege in der Aortenwand von Patienten mit unicuspiden, bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen mit und ohne Aneurysma der Aorta ascendens sowie von Genen, die in Zusammenhang mit familiären thorakalen Aortenaneurysmen (COL3A1) stehen.

## 5.1. eNOS/GATA5

Der Zusammenhang von eNOS und der Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe beruht auf Beobachtungen an eNOS-Knockout Mäusen, welche eine erhöhte Inzidenz von bicuspiden Aortenklappen haben [103]. Desweiteren traten bei ApoE-Knockout-Mäusen, die eine atherogene Ernährung erhielten, bei zusätzlichem Knockout von eNOS abdominale Aortenaneurysmen und Dissektionen auf [98]. Auch bei Menschen mit bicuspiden Aortenklappen konnte ein Zusammenhang zwischen dem eNOS-Proteingehalt in der Aortenwand und der Dilatation der Aorta ascendens nachgewiesen werden [2]. Diese Daten lassen eine gemeinsame genetische Basis von kongenitalen Aortenklappenanomalien und vaskulärer Aortenerkrankung vermuten.

Da eNOS einen Einfluss auf die Pathogenese der bicuspiden Aortenklappe auszuüben 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 hoch-konservierter Transkriptionsfaktoren dar, von denen GATA5 die Entwicklung der Endokardkissen und des kardialen Ausflusstraktes reguliert [54, 93, 100]. 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 [100]. 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 [135].

Angiotensin-II und oxidativer Stress sind an der Entstehung von Aortenaneurysmen beteiligt, ein Phänomen, das durch die Deletion oder Entkopplung der endothelialen Stickoxidsynthase (eNOS) verstärkt wird [184].

In der hier vorgelegten Studie wurden die Genexpression von GATA5 und eNOS in der Aorta ascendens von Patienten mit unicuspiden, bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen mit oder ohne begleitende Aortendilatation untersucht.

So zeigte sich zunächst bei tricuspid angelegten Aortenklappen ohne begleitende Dilatation kein Unterschied in der eNOS- und GATA5-Genexpression in den Lokalisationen A1 und A2.

Die Genexpression von eNOS tendiert bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zur höheren Expression als bei Patienten mit bicuspiden oder tricuspiden Aortenklappen.

Analog hatten Patienten mit bicuspiden Aortenklappen eine Tendenz zur erhöhten eNOS-Genexpression im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen.

Bei GATA5 zeigte sich lediglich eine Tendenz zur erhöhten Genexpression bei Patienten mit TAV gegenüber Patienten mit UAV oder BAV.

Die zuvor von Henn et al. aufgestellte Hypothese, dass die erhöhte eNOS-Expression in der Aortenwand bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen damit Folge einer erhöhten GATA5-Expression ist, konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen. Nichtsdestotrotz könnte dennoch eine erhöhte GATA5- und eNOS-Aktivität in der Aortenwand dieser Patienten eine Rolle in der Pathogenese der frühzeitigen Entwicklung von Aortenaneurysmen bei Vorliegen einer unicuspiden oder bicuspiden Aortenklappe spielen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten posttranskriptionale Modifikationen sein, welche zu einer Hoch- oder Runterregulierung des jeweiligen Proteins führt.

Hingegen findet sich in den lokalisationsabhängigen Analysen bei Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation eine signifikant niedrigere eNOS-Genexpression in Position A1 im Vergleich zu A2. Auch bei der Position B1 ist eine signifikant niedrigere eNOS-Genexpression als bei B2 festzustellen. Insgesamt bietet die konkave Seite eine signifikant höhere eNOS-Genexpression als die konvexe Seite. Hope et al zeigten mittels 4DMRT ein abweichendes Flussprofil in der Aorta ascendens bei Patienten mit TAV und dilatierter Aorta gegenüber Patienten mit TAV und normaler Aorta, jedoch ohne einen exzentrisch gerichteten Jet gegen die konkave oder konvexe Aortenwand [79]. Somit lassen sich die unterschiedlichen Expressionsmuster nicht auf die unterschiedlichen Scherspannungen in der Aortenwand zurückführen.

Bei GATA5 zeigt sich hier lediglich in A1 eine signifikant erhöhte Expression gegenüber A2.

Bei Patienten mit bicuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation gibt es lokalisationsabhängig keine Unterschiede weder in der eNOS- noch in der GATA5-

Genexpression. Dies stützt erneut die Hypothese, dass die Aortendilatation auf erhöhten Scherspannungen in der Aortenwand basiert, da Hope et al. in diesem Patientenkollektiv einen erhöhten turbulenten Fluss in der Konvexität der Aorta ascendens nachwies [79].

Bei Patienten mit unicuspid angelegten Aortenklappen und Aortendilatation sind in den Lokalisationen A1 und A2 keine Unterschiede in der Genexpression zu konstatieren. In den Positionen B1 und B2 gibt es einen Trend zur höheren Expression in B1.

Bei Patienten mit unicuspid angelegten Aortenklappen und dilatierter Aorta ist die GATA5-Genexpression in Position A1 signifikant höher als in A2. Die Positionen B1 und B2 verbleiben ohne signifikanten Unterschied.

Differenziert man nur nach dilatierter Aorta oder nicht dilatierter Aorta unabhängig von der Aortenklappenmorphologie zeigen sich keine Unterschiede in der NOS3-Genexpression.

Bei der GATA5-Genexpression gibt es bei Differenzierung in dilatierte und nicht dilatierte Aorten keine Unterschiede. Nach weiterer Aufsplitterung in TAVND und TAVD zeigt sich eine signifikant höhere Expression in der dilatierten Gruppe. Wie es zu einer erhöhten Expression von GATA5 in der Aortenwand bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Dilatation kommt, ist bislang vollkommen unklar.

Bei BAVND und BAVD zeichnet sich ein Trend zur höheren GATA5-Expression in der nicht dilatierten Gruppe ab. Bei der Gruppe mit unicuspiden Klappe gibt es keine Unterschiede.

Die weitere Gliederung der bicuspid angelegten Aortenklappe nach Fusionstypen gab bei der eNOS-Genexpression keine signifikanten Unterschiede. In der GATA5-Genexpression ließ sich ein Trend der höheren Genexpression in der Position A2 bei R/A-Fusion im Vergleich zur R/L-Fusion ablesen.

Das Vorliegen von konstitutionellen GATA5-Mutationen wurde in einer kleinen Kohorte von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen ausgeschlossen [58] 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 [101]. 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 persistierendem Truncus arteriosus nachgewiesen haben [93, 99, 186, 191]. 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.

Die Genexpression von eNOS zeigt in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden und unicuspiden Aortenklappen einen Trend zur höheren Expression als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [52]. Aicher et al. zeigten auf Proteinebene eine niedrigere eNOS-Protein-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und normalen Aortendurchmesser [2]. Die Ursache dieser Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Ebene ist bis dato nur bruchstückhaft erforscht und unklar. Einfluss auf die eNOS-Expression spielen neben GATA5 auch die posttranskriptionelle Regulation und weitere Proteine wie z.B. TGF- $\beta$  [166]. Zudem ist belegt, dass erhöhte Scherkräfte die eNOS-Expression ebenfalls beeinflussen [148]. Die durch ein exzentrisches Flussprofil bedingten 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, 123]. Paradox zeigt sich in unserer Studie die Konkavität mit einer erhöhten eNOS Genexpression, was hingegen die genetische Hypothese verstärkt. Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren wie GATA5 könnten einen Einfluss auf den eNOS-Proteingehalt in der Aortenwand von Patienten mit Aortenklappenanomalien haben und damit Ursache für abweichende Ergebnisse der vorliegenden Protein- und mRNA-Studien sein.

## 5.2. FBN1/TGF-beta Rezeptor 1

Bei den schon bekannten syndromalen Erkrankungen wie dem Loeys-Dietz-Syndrom, welches durch Mutationen im TGF $\beta$ R1 oder TGF $\beta$ R2 verursacht wird, oder dem Marfan Syndrom, als Folge von Mutationen von FBN1 verursacht wird, gehen diese regelmäßig mit Aortenaneurysmen einher [16, 40, 108, 109].

Jedoch auch ohne Nachweis syndromaler Veränderungen in den Signalwegen dieser Gene findet sich eine Häufung von Aortenaneurysmen bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen [192]. Z. B. zeigten Pepe et al. nach Ausschluss des Marfan Syndroms durch die Gent-Kriterien bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe und Aneurysma eine Mutation im FBN1-Gen [140]. Auch Le Maire et al. beschrieben solche nicht-syndromalen BAV Aneurysmen und konnten zudem erstmalig einen spezifischen Genlocus (a ~250-kbp) in FBN1 nachweisen, welcher in direkter Verbindung mit thorakalen Aneurysmen und Dissektionen steht [104]. Desweiteren sah man einen verminderten Fibrillin-1-Proteingehalt in der Aorta ascendens und im Truncus pulmonalis von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit normalen Aortenklappen [52]. Dass die TGF $\beta$ R-1-Expression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit normal angelegter Aortenklappen vermindert ist, sah man in einer Studie von Forte et al.. Eine exakte molekulargenetische Signalkaskade, welche zur Entstehung von Aortenaneurysmen führt, konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Yang et al. beschrieben in einem Mausmodell bei Verlust von TGF $\beta$ R1 das Auftreten von Aortenaneurysmen. Hier zeigte sich zudem nach Deletion von TGF $\beta$ R1 eine Hochregulation der Angiotensin Converting Enzyme. Eine Blockade des AngII type I Rezeptor (AT1R) verhinderte hier das Auftreten von Aneurysmen [190].

In unserer Studie schlossen wir Patienten mit Marfan- oder Loeys-Dietz-Syndrom aus, um herauszufinden, ob es unabhängig vom Auftreten dieser Syndrome einen Unterschied in der Genexpression von FBN1 und TGF $\beta$ R1 in der Aorta ascendens bei Patienten mit bicuspiden oder unicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen gibt. Henn et al. publizierten eine signifikant niedrigere FBN1-Genexpression in der Aortenwand von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen unabhängig von dem Durchmesser der Aorta ascendens [77]. Einen Unterschied im Fibrillin1-Proteingehalt zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen zeigte auch Fedak et al. [52]. Theoretisch wäre eine Subpopulation von Patienten mit bicuspiden Aortenklappen mit konstitutioneller FBN1-Mutation, die eine reduzierte FBN1-

Expression und damit reduzierte Fibrillin1-Proteingehalt haben, als Ursache der Aneurysmen diskussions- würdig.

In der hier vorgelegten Studie wurde die Genexpression von FBN1 und TGF $\beta$ R1 in der Aorta ascendens von Patienten mit unicuspiden, bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen mit oder ohne begleitende Aortendilatation untersucht.

So zeigten sich zunächst bei tricuspid angelegten Aortenklappen ohne begleitende Dilatation keine Unterschiede in der FBN1- und TGF $\beta$ R1-Genexpression in den Lokalisationen A1 und A2.

Bei Patienten mit unicuspiden oder tricuspiden Aortenklappen ist unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation eine signifikant höhere FBN1-Genexpression in ihrer Aortenwand im Gegensatz zu Patienten mit bicuspiden Aortenklappen zu belegen. Zwischen Patienten mit unicuspid angelegter Aortenklappe und Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe findet sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression.

Die Analyseergebnisse zu TGF $\beta$ R1 bieten keinen Unterschied in der Genexpression bei Patienten mit tricuspid-, bicuspid- und unicuspid angelegter Aortenklappe.

Ebenso zeigt sich in den lokalisationsabhängigen Analysen bei Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation kein signifikanter Unterschied der TGF $\beta$ R1-Genexpression in Position A1 im Vergleich zu A2. Auch die Position B1 zeigt im Vergleich zu B2 keinen Unterschied in der TGF $\beta$ R1-Genexpression.

Bei Patienten mit bicuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation gibt es lokalisationsabhängig eine signifikant höhere TGF $\beta$ R1-Genexpression in der Lokalisation A2 im Vergleich zu A1. Ebenso lässt sich hier in B2 ein Trend zur erhöhten TGF $\beta$ R1-Genexpression im Vergleich zur Lokalisation B1 ablesen.

Bei Patienten mit unicuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation zeigen sich, wie bei der bicuspid angelegten Aortenklappe, in A2 eine signifikant höhere TGF $\beta$ R1-Genexpression als in der Lokalisation A1. Desweiteren zeichnet sich auch hier in der Position B2 ein Trend zur erhöhten TGF $\beta$ R1-Genexpression im Vergleich zur Lokalisation B1 ab.

Weiterhin ergibt sich in den lokalisationsabhängigen Analysen bei Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation eine signifikant erhöhte FBN1-Genexpression in Lokalisation A2 im Vergleich zu A1. Die Position B1 zeigt im Vergleich zu B2 keinen Unterschied in der FBN1-Genexpression.

Bei Patienten mit bicuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation gibt es lokalisationsabhängig eine signifikant höhere FBN1-Genexpression in der Lokalisation A2 im Vergleich zu A1 zu erkennen. Die Lokalisationen B1 und B2 zeigen keine unterschiedliche Genexpression.

Bei Patienten mit unicuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation zeigen sich, wie bei der bicuspid angelegten Aortenklappe, in A2 eine signifikant höhere FBN1-Genexpression als in der Lokalisation A1. Lokalisation B1 zeigt eine signifikant höhere Genexpression im Vergleich zur Lokalisation B2.

Differenziert man nur nach dilatierter Aorta oder nicht dilatierter Aorta, bestehen ebenso wie bei den Subgruppen mit unicuspid, bicuspid oder tricuspid angelegter Aortenklappe keine signifikanten Unterschiede in der FBN1-Genexpression.

Hingegen ist die TGF $\beta$ 1-Genexpression bei Patienten mit nicht dilatierter Aorta signifikant höher als bei Patienten mit dilatierter Aorta. Splittet man diese Gruppe weiter auf, zeigt sich bei Patienten mit unicuspid angelegter Aortenklappe kein Unterschied in der Genexpression. Patienten mit bicuspid angelegter Aortenklappe weisen allerdings eine signifikant erhöhte TGF $\beta$ 1-Genexpression in Relation zur Patientengruppe mit nicht dilatierter Aorta auf. Auch bei Patienten mit tricuspid angelegter Aorta zeigt sich in der Gruppe mit nicht dilatierter Aorta ein Trend zur erhöhten Genexpression.

Die weitere Gliederung der bicuspid angelegten Aortenklappe nach Fusionstypen erbrachte bei der FBN1-Genexpression in den Lokalisationen A1, B1 und B2 keine signifikanten Unterschiede. Bei den Lokalisationen A2 lässt sich eine signifikant höhere Genexpression in R/L-fusionierten Aorten- im Vergleich zu R/A-fusionierten Aortenklappen feststellen.

Hierzu beschrieb Schaefer et al. und Della Corte et al., dass RL-Fusionstypen eine Dilatation im Sinus entwickeln und RA-Fusionstypen vor allem im Bereich der tubulären Aorta ascendens [37, 163]. Ursprung dieser unterschiedlichen Dilatationstypen könnte

ein unterschiedlich ausgerichteter Jet in der Aorta ascendens bei Patienten mit verschiedenen Fusionsmustern der bicuspiden Aortenklappe sein [79].

Die weitere Gliederung der bicuspid angelegten Aortenklappe nach Fusionstypen bei TGF $\beta$ R1 ergab bei den Lokalisationen A1, A2, B1 und B2 keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression.

Lindsay et al. zeigten, dass Mutationen in den TGF- $\beta$  -Rezeptor-Genen nicht zu einer niedrigeren Aktivität des nachgeschalteten Signalweges führen, sondern im Gegenteil mit einer Hochregulation der TGF- $\beta$  1-Isoform in der Aortenwand von Loeys-Dietz-Patienten einhergeht [106]. Dietz betrachtete dies als eine kompensatorische Hochregulation des Liganden im Falle eines mutierten TGF- $\beta$  -Rezeptor-Gens und somit als Ursache der Aneurysmen [61–63].

Unsere Studie konnte diese Beobachtung unterstützen. Wir sahen bei Patienten mit dilatierter Aorta eine signifikant niedrigere TGF $\beta$ R1 Genexpression im Vergleich zu Patienten mit normaler Aorta. Auch Forte et al. beschrieben bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappe eine niedrigere TGFBR1-Expression als bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen, wohingegen die Expression von TGF- $\beta$  erhöht war [59].

### 5.3. COL3A1

Abgesehen von den schon bekannten syndromalen Kollagensynthesestörungen, die mit einem Aortenaneurysma einhergehen (Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV) [8], können ähnliche Kollagensynthesestörungen zur Pathogenese von Aortenaneurysmen beitragen. Wagsäter et al. zeigten bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen und Aneurysmen eine signifikant höhere COL3A1-Expression in der Aorta ascendens im Vergleich zu Patienten mit normalen Durchmessern der Aorta ascendens und bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen und Aneurysma eine signifikant niedrigere COL3A1-Expression im Vergleich zu Patienten mit tricuspiden Aortenklappen [185]. Auch in der Veröffentlichung von Henn et al. zeigten Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe und Aneurysma ebenfalls einen Trend zu einer höheren COL3A1-Expression im Vergleich zu Patienten ohne Dilatation der Aorta ascendens [77].

Wie auch Henn et al. konnten auch wir zwischen Patienten mit bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen keinen signifikanten Unterschied in der COL3A1-Expression nachweisen [77].

Die Beobachtung von Henn et al., dass es beim Vergleich der Fusionstypen der bicuspiden Aortenklappe einen Trend zur höheren COL3A1-Genexpression bei Patienten mit einer Fusion der rechts- und linkskoronaren Tasche gab, lässt sich auch in unserer Studie belegen. Dies deutet auf eine unterschiedliche Entität der Aortenaneurysmen bei Patienten mit unterschiedlichen Fusionstypen. Fernandez et al. beschrieben bereits, dass es bei Patienten mit RL-Fusion in der Embryogenese zu einer abweichenden Septierung im proximalen Teil des Ausflusstraktes kommt, wahrscheinlich bedingt durch eine verzerrte Migration der Neuralleistenzellen und dass bei Patienten mit RN-Fusion die Ursache bereits vor Septierung des Ausflusstraktes zu suchen ist, a.e. bedingt durch eine Dysregulation der NO-bedingten Epithelial-mesenchymalen Transition [55].

In der hier vorgelegten Studie wurde die Genexpression von COL3A1 in der Aorta ascendens von Patienten mit unicuspiden, bicuspiden und tricuspiden Aortenklappen mit oder ohne begleitende Aortendilatation untersucht.

So zeigten sich zunächst bei tricuspid angelegten Aortenklappen ohne begleitende Dilatation keine Unterschiede in der COL3A1-Genexpression in den Lokalisationen A1 und A2.

Patienten mit unicuspiden Aortenklappen zeigten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation eine signifikant höhere COL3A1-Genexpression in ihrer Aortenwand als bei Patienten mit tricuspiden oder bicuspiden Aortenklappen. Patienten mit bicuspiden Aortenklappen boten unabhängig vom Vorliegen einer Aortendilatation keinen Unterschied in ihrer COL3A1-Genexpression in ihrer Aortenwand als Patienten mit tricuspiden Aortenklappen.

Hingegen besteht in den lokalisationsabhängigen Analysen bei Patienten mit tricuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation eine signifikant niedrigere COL3A1-Genexpression in Position A1 im Vergleich zu A2. Die Position B1 zeigt im Vergleich zu B2 keinen Unterschied in der COL3A1-Genexpression.

Bei Patienten mit bicuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation gibt es lokalisationsabhängig einen Unterschied in der Genexpression. So zeigt sich hier in A2 eine Tendenz zur höheren Genexpression im Vergleich zur Lokalisation A1. Dies bestätigt die bereits durch Cotrufo et al. gemachten Beobachtungen, dass es in der Konvexität zu einer Herunterregulierung der COL3A1-Genexpression kommt und somit a. e. als Resultat von erhöhten Scherspannungen zu bewerten ist [33, 115]. Bei den Lokalisationen B1 und B2 gibt es keine Unterschiede in der Genexpression.

Bei Patienten mit unicuspid, bicuspid und tricuspid angelegter Aortenklappe und Aortendilatation lässt sich in der Lokalisation A2 ein signifikant höhere Genexpression als in der Lokalisation A1 nachweisen, jedoch kein Unterschied in den Lokalisationen B1 und B2.

Differenziert man nur nach dilatierter Aorta oder nicht dilatierter Aorta findet sich eine Tendenz zur erhöhten COL3A1-Genexpression in der nicht dilatierten Aorta. Splittet man diese Gruppe weiter auf, zeigt sich bei Patienten mit unicuspid angelegter Aortenklappe ein Trend zur erhöhten Genexpression in der nicht dilatierten Aorta, nicht jedoch bei Patienten mit bicuspid und tricuspid angelegten.

Die weitere Aufgliederung der bicuspid angelegten Aortenklappe nach Fusionstypen ergab bei der COL3A1-Genexpression in den Lokalisationen A1 und B1 keine signifikanten Unterschiede. Jedoch tendieren die Lokalisationen A2 und B2 zur höheren Genexpression in R/L-fusionierten Aorten im Vergleich zu R/A-fusionierten Aortenklappen. Dies bestätigt die o.g. Hypothese von Fernandez bzgl. der Entitäten [55].

## 6. Fazit

Die hier vorgelegte Studie untersuchte die Genexpression in der Aortenwand von Patienten mit tricuspiden, bicuspiden und unicuspiden Aortenklappen in verschiedenen Lokalisationen der Aorta mit und ohne Aneurysma der Aorta ascendens. Die Genexpressionsmuster in den vier untersuchten Lokalisationen in der Aortenwand von Patienten mit unterschiedlichen Aortenklappenanomalien und in ihrer Beziehung zur Dilatation der Aorta ascendens unterscheiden sich. Dies bekräftigt die Hypothese, dass spezifische Genmutationen bereits in der Embryogenese von kardialen Anomalien als auch in der Entwicklung der mit ihnen assoziierten Aortenaneurysmen ausschlaggebend sind.

Die These einer rein hämodynamisch induzierten Aneurysmaentwicklung in Folge von Aortenklappenvitien konnten wir in unserer Studie nicht belegen. Bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen, bei denen das hämodynamische Flussprofil vorwiegend mit Ausrichtung gegen die konvexe Seite der Aorta ascendens gerichtet ist, was mit erhöhten Scherkräften und damit Hochregulierung der eNOS-Genexpression einhergehen müsste, ist in unserer Studie kein signifikanter Unterschied in der eNOS-Genexpression nachzuweisen. Zudem zeigt sich bei Patienten mit tricuspiden Aortenklappen, welche kein exzentrisches Flussprofil haben, eine Hochregulierung der eNOS-Genexpression in der Konkavität.

Eine Korrelation der GATA5- Expression mit der eNOS-Expression, wie wir in einer früheren Studie beobachtet haben [77], konnten wir in der hier vorgelegten Studie nicht nachweisen. Mögliche Ursache hierfür sind ko- und posttranskriptionale Modifikationen.

Eine unterschiedliche COL3A1-Genexpression weist auf eine unterschiedliche Degeneration der Aortenwand aufgrund fibrotischer Veränderungen hin [185]. Zum einen konnten Chen YJ et al. durch mechanische Dehnung von Fibroblasten eine reduzierte COL3A1-Genexpression nachweisen [25]. Dies korreliert in unserem Patientenkollektiv mit Patienten mit bicuspiden Aortenklappe und Aortendilatation. Auch Hope et al. wiesen bereits mittels 4DMRT erhöhte Flussprofile in diesen Lokalisation nach [79]. Diese Beobachtungen sprechen für eine hämodynamische Genese der Aneurysmen. Jedoch würde dies nicht die regionalen Genexpressionsunterschiede der Patienten mit unicuspiden oder tricuspiden Aortenklappen erklären. Hier könnte man einen Zusammenhang der COL3A1-Genexpression in der Aortenwand, welche durch die Aktivität des TGF- $\beta$ -Signalweges beeinflusst wird, als Ursache postulieren [90, 182]. Abbildung 95

Desweiteren bestätigte sich in unseren Resultaten die bereits durch Fernandez et al. publizierte Beobachtung, dass es bei unterschiedlichen Fusionstypen unterschiedliche COL3A1-Genexpressionen gibt und es somit naheliegt, dass diese eigenständige Entitäten der Aneurysmen darstellen.

In dieser Studie konnten wir die Beobachtungen von Lindsay et al., dass Mutationen in den TGF- $\beta$  -Rezeptor-Genen nicht zu einer niedrigeren Aktivität des nachgeschalteten Signalweges führen, sondern im Gegenteil mit einer Hochregulation der TGF- $\beta$  1-Isoform in der Aortenwand einhergehen bekräftigen [106]. Dies untermauert auch die von Dietz aufgestellte Hypothese, dass es zur kompensatorischen Hochregulation des Liganden im Falle eines mutierten TGF- $\beta$  -Rezeptor-Gens kommt und somit als möglicher Pathomechanismus in der Genese von Aneurysmen gilt [63, 109, 110]. So kam es bei Patienten mit dilatierter Aorta zu einer signifikant niedrigeren TGF $\beta$ R1-Genexpression im Vergleich zu Patienten mit normaler Aorta.

Desweiteren bestätigte sich in der hier vorgelegten Studie die Beobachtungen von Forte et al., dass es bei Patienten mit BAV eine Herunterregulierung von FBN1 gibt, welches den weiteren TGF $\beta$ -Signalweg modifiziert und somit in einer Degeneration der Aortenwand führt.

Unsere Daten legen nahe, dass intrinsische Veränderungen der Proteine und ihre Regulation über die mRNA zur Entwicklung von Aortenaneurysmen und Dissektionen beitragen. Zudem weisen die unterschiedlichen Genexpressionsmuster der unterschiedlichen Klappenanomalien auch auf abweichende Pathomechanismen und Entitäten hin.

Hierfür spricht auch, dass es bei einem möglichen therapeutischen Ansatz durch Blockade des AngII type I Rezeptor (AT1R), nur bei einer Subpopulation (Marfan-Patienten) zu einem Ansprechen des Medikaments kommt [72].

Vieles von dem, was wir über die Ätiologie von thorakalen Aortenaneurysmen und Aortendissektion in Verbindung mit BAV beobachtet haben, basiert auf zwei konkurrierenden oder wahrscheinlicher komplementären, ätiologischen Hypothesen von erhöhter Wandspannung und pathologischen strukturellen oder funktionellen Defiziten der Aortenwand.

In der letzten Dekade häufen sich zunehmend Indizien für eine entitätsspezifische BAV-bezogene Aortopathie. Jedoch werden immer noch viele Annahmen zur

Pathogenese von Aortopathien abgeleitet, die in Verbindung mit TAV beobachtet werden. Das dortige Untersuchungsgut stammt ausschließlich aus im Endstadium befindlichem Krankheitsgewebe, weil Gewebe selten im Frühstadium dieser Erkrankung mit noch kleineren Aortendimensionen einer Untersuchung zur Verfügung steht. Das ist verständlich, verwehrt aber den Einblick in die Anfänge der Pathomechanismen, die spezifisch für BAV und Aortopathie sein könnten.

Bei genauer Differenzierung einer möglichen genetischen Hypothese lassen sich 4 verschiedenen Mechanismen aufstellen.

Diese umfassen

- (i) ein oder mehrere verantwortliche Gene für Klappenanomalien, die auch mechanistisch für Aneurysmen zuständig sind (Pleiotropie);
- (ii) die unabhängigen Expressionen von einem oder mehreren Genen nach einem makromorphologischen Phänotyp wie BAV (polygene Beeinflussung), während andere Gene das Aneurysma verursachen;
- (iii) zwei oder mehr Gene, die mechanistisch interagieren, um einen einzelnen Phänotyp zu produzieren (Epistase) und
- (iv) genetische Varianten, die mit hämodynamischen Faktoren interagieren und zur Erzeugung von Aneurysmen führen [192].

Bisher gibt es keinen zirkulierenden Biomarker, der prospektiv Informationen für Aortenaneurysma oder Dissektion liefern kann. Es gibt auch keine vernünftige und sichere Methode für die physikalische Biopsie der Aorta ascendens. Ein pragmatischer Ansatz, um einem Ereignis in den nächsten 10 bis 60 Jahren durch gezielte medikamentöse oder andere Therapien für eine Hochrisikokohorte vorzubeugen, könnte die Bewertung genetischer Marker (1. Strukturproteine der glatten Gefäßmuskultur wie Actin, Myosin und Fibrillin, 2. Regulations- und Strukturproteine der Extrazellulärmatrix wie Kollagen, Elastin und Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitor und 3. Liganden und Rezeptoren des TGF $\beta$  Signalweg sein) sowie die konventionelle und molekulare Bildgebung umfassen.

## 7. Anhang

### MUSTERBLATT

31.01.2013; Simon Gauer

### RT-PCR

Probe	C (ng/ µl)
100 A2a	144,72

<u>Komponente</u>	<u>1 x Ansatz (µl)</u>	<u>14 x Ansatz (µl)</u>
Nuclease free water	0 -3,2*2Berechnung	0- 44,8
10x RT Buffer	2,0	28,0
10 RTRandom Primer	2,0	28,0
25x dnTPMix 100mM	0,8	33,6
RNase Inhibitor	1,0	14,0
MultiscribeRT	1,0	14,0
Total per Reaktion	6,8-10,0	95,2-140,0

Proben#	H <sub>2</sub> O [µl]	RNA µl	MM µl	EV µl
100 A2a	0	13,2 (13,82)	6,8	20,0
100 A2a	0	13,2 (13,82)	6,8	20,0
100 A2a	0	13,2 (13,82)	6,8	20,0
100 A2a LW	10,0	0,0	10,0	20,0

## 8. Publikationen

1. Henn, Dominic; Perttunen, Hilja; Gauer, Simon; Schmied, Wolfram; Porras, Carlos; Such, Miguel; Schäfers, Hans-Joachim (2014): GATA5 and endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. In: The Annals of thoracic surgery 97 (6), S. 2019– 2025. DOI 10.1016/j.athoracsur.2014.02.050.
2. Shunsuke Matsushima, Irem Karlova, Simon Gauer, Shunsuke Miyahara & Hans-Joachim Schäfers (2019): Geometry of cusp and root determines aortic valve function. In: Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery ISSN 0970-9134 Indian J Thorac Cardiovasc Surg DOI 10.1007/s12055-019-00813-2

### Geplante Publikation

1. Simon Gauer, Dominic Henn, Catherine Kollmann, Doris Bandner-Risch, Wolfram Schmied, Hans-Joachim Schäfers: Congenital aortic valve disease and ascending aortic dilatation: Genetic or hemodynamic pathogenesis

## 9. 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.

Bei meinen Mitdoktoranden Hilja Perttunen und Dominic Henn möchte ich mich ganz herzlich für die exzellente Zusammenarbeit im Labor bedanken.

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

## 11. Literaturverzeichnis

- [1] Aicher D, Bewarder M, Kindermann M, Abdul-Khalique H, Schäfers H-J (2013) Aortic valve function after bicuspidization of the unicuspid aortic valve. *The Annals of thoracic surgery* 95:1545–1550.
- [2] Aicher D, Urbich C, Zeiher A, Dimmeler S, Schäfers H-J (2007) Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease. *The Annals of thoracic surgery* 83:1290–1294.
- [3] Armstrong EJ, Bischoff J (2004) Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circulation Research* 95:459–470.
- [4] Arrington CB, Sower CT, Chuckwuk N, Stevens J, Leppert MF, Yetman AT, Bowles NE (2008) Absence of TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with bicuspid aortic valve and aortic dilation. *The American journal of cardiology* 102:629–631.
- [5] Ayad RF, Grayburn PA, Ko JM, Filardo G, Roberts WC (2011) Accuracy of two-dimensional echocardiography in determining aortic valve structure in patients 50 years of age having aortic valve replacement for aortic stenosis. *The American journal of cardiology* 108:1589–1599.
- [6] Barker AJ, Markl M, Bürk J, Lorenz R, Bock J, Bauer S et al. (2012) Bicuspid aortic valve is associated with altered wall shear stress in the ascending aorta. *Circulation. Cardiovascular imaging* 5:457–466.
- [7] Bauer M, Siniawski H, Pasic M, Schaumann B, Hetzer R (2006) Different hemodynamic stress of the ascending aorta wall in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *Journal of cardiac surgery* 21:218–220.
- [8] Beighton P, Paepe AD, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ (1998) Ehlers-Danlos syndromes. Revised nosology, Villefranche, 1997. *American journal of medical genetics* 77:31–37.
- [9] Bertoli-Avella AM, Gillis E, Morisaki H, Verhagen JM, Graaf BM de, van de Beek G et al. (2015) Mutations in a TGF- $\beta$  ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *Journal of the American College of Cardiology* 65:1324–1336.
- [10] Biner S, Rafique AM, Ray I, Cuk O, Siegel RJ, Tolstrup K (2009) Aortopathy is prevalent in relatives of bicuspid aortic valve patients. *Journal of the American College of Cardiology* 53:2288–2295.
- [11] Black BL (2007) Transcriptional pathways in second heart field development. *Seminars in cell & developmental biology* 18:67–76.

- [12] Bobik A (2006) Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:1712–1720.
- [13] Borger MA, David TE (2005) Management of the valve and ascending aorta in adults with bicuspid aortic valve disease. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* 17:143–147.
- [14] Borger MA, Preston M, Ivanov J, Fedak, Paul W M, Davierwala P, Armstrong S, David TE (2004) Should the ascending aorta be replaced more frequently in patients with bicuspid aortic valve disease? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 128:677–683.
- [15] Briggs LE, Kakarla J, Wessels A (2012) The pathogenesis of atrial and atrioventricular septal defects with special emphasis on the role of the dorsal mesenchymal protrusion. *Differentiation; research in biological diversity* 84:117–130.
- [16] Brownstein AJ, Kostiuik V, Ziganshin BA, Zafar MA, Kuivaniemi H, Body SC et al. (2018) Genes Associated with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. 2018 Update and Clinical Implications. *Aorta (Stamford, Conn.)* 6:13–20.
- [17] Bruneau BG (2002) Transcriptional Regulation of Vertebrate Cardiac Morphogenesis. *Circulation Research* 90:509–519.
- [18] Buchner S, Hülsmann M, Poschenrieder F, Hamer OW, Fellner C, Kobuch R et al. (2010) Variable phenotypes of bicuspid aortic valve disease: classification by cardiovascular magnetic resonance. *Heart (British Cardiac Society)* 96:1233–1240.
- [19] Butany J, Vaideeswar P, Dixit V, Lad V, Vegas A, David TE (2009) Ascending aortic aneurysms in unicommissural aortic valve disease. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 18:11–18.
- [20] Carro A, Teixido-Tura G, Evangelista A (2012) Aortic Dilatation in Bicuspid Aortic Valve Disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 65:977–981.
- [21] Cecconi M, Manfrin M, Moraca A, Zanolli R, Colonna PL, Bettuzzi MG et al. (2005) Aortic dimensions in patients with bicuspid aortic valve without significant valve dysfunction. *The American journal of cardiology* 95:292–294.
- [22] Cecconi M, Nistri S, Quarti A, Manfrin M, Colonna PL, Molini E, Perna GP (2006) Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md.)* 7:11–20.
- [23] Chang, Alex C Y, Fu Y, Garside VC, Niessen K, Chang L, Fuller M et al. (2011) Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal

through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase. *Developmental cell* 21:288–300.

[24] Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA, Kielty CM (2007) Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *The Journal of cell biology* 176:355–367.

[25] Chen Y-J, Jeng J-H, Chang H-H, Huang M-Y, Tsai F-F, Yao C-CJ (2013) Differential regulation of collagen, lysyl oxidase and MMP-2 in human periodontal ligament cells by low- and high-level mechanical stretching. *Journal of periodontal research* 48:466–474.

[26] Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 1::581–585.

[27] Choudhary B, Ito Y, Makita T, Sasaki T, Chai Y, Sucov HM (2006) Cardiovascular malformations with normal smooth muscle differentiation in neural crest-specific type II TGFbeta receptor (Tgfr2) mutant mice. *Developmental biology* 289:420–429.

[28] Clark KL, Yutzey KE, Benson DW (2006) Transcription factors and congenital heart defects. *Annual review of physiology* 68:97–121.

[29] Claudio F. Russo, MD, Simone Mazzetti, MD, Andrea Garatti, MD, Elena Ribera, MD, Angela Milazzo, MD, Giuseppe Bruschi, Marco Lanfranconi, MD, Tiziano Colombo, MD, and Ettore Vitali, MD Aortic Complications After Bicuspid Aortic Valve Replacement: Long-Term Results.

[30] Clementi M, Notari L, Borghi A, Tenconi R (1996) Familial congenital bicuspid aortic valve. A disorder of uncertain inheritance. *American journal of medical genetics* 62:336–338.

[31] Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT et al. (2007) Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nature medicine* 13:204–210.

[32] Collins MJ, Butany J, Borger MA, Strauss BH, David TE (2008) Implications of a congenitally abnormal valve: a study of 1025 consecutively excised aortic valves. *Journal of clinical pathology* 61:530–536.

[33] Cotrufo M, Della Corte A, Santo LS de, Quarto C, Feo M de, Romano G et al. (2005) Different patterns of extracellular matrix protein expression in the convexity and the concavity of the dilated aorta with bicuspid aortic valve. Preliminary results. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 130:504–511.

- [34] Davies RR, Kaple RK, Mandapati D, Gallo A, Botta DM, Elefteriades JA, Coady MA (2007) Natural history of ascending aortic aneurysms in the setting of an unreplaced bicuspid aortic valve. *The Annals of thoracic surgery* 83:1338–1344.
- [35] Dekker RJ, van Thienen, Johannes V., Rohlena J, de Jager, Saskia C., Elderkamp YW, Seppen J et al. (2005) Endothelial KLF2 Links Local Arterial Shear Stress Levels to the Expression of Vascular Tone-Regulating Genes. *The American Journal of Pathology* 167:609–618.
- [36] Della Corte A, Bancone C (2012) Multiple aortopathy phenotypes with bicuspid aortic valve: the importance of terminology and definition criteria. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 41:1404; author reply 1405.
- [37] Della Corte A, Bancone C, Dialetto G, Covino FE, Manduca S, D'Oria V et al. (2014) Towards an individualized approach to bicuspid aortopathy. Different valve types have unique determinants of aortic dilatation. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 45:e118-24; discussion e124.
- [38] Della Corte A, Bancone C, Quarto C, Dialetto G, Covino FE, Scardone M et al. (2007) Predictors of ascending aortic dilatation with bicuspid aortic valve: a wide spectrum of disease expression. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 31:397-404; discussion 404-5.
- [39] Dietz Harry C. *New Therapeutic Approaches to Mendelian Disorders.*
- [40] 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* 1991:337–339.
- [41] Doyle AJ, Doyle JJ, Bessling SL, Maragh S, Lindsay ME, Schepers D et al. (2012) Mutations in the TGF- $\beta$  repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nature genetics* 44:1249–1254.
- [42] Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T (2006) The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annual review of pharmacology and toxicology* 46:235–276.
- [43] Dursun M, Yilmaz S, Sayin OA, Ugurlucan M, Ucar A, Yekeler E, Tunaci A (2007) Combination of unicuspid aortic valve, aortic coarctation, and aberrant right subclavian artery in a child: MR imaging and CTA findings. *Cardiovascular and interventional radiology* 30:547–549.

- [44] El Accaoui, Ramzi N, Gould ST, Hajj GP, Chu Y, Davis MK, Kraft DC et al. (2014) Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306:H1302-13.
- [45] Entezari P, Schnell S, Mahadevia R, Malaisrie C, McCarthy P, Mendelson M et al. (2014) From unicuspid to quadricuspid: Influence of aortic valve morphology on aortic three-dimensional hemodynamics. *Journal of magnetic resonance imaging : JMIR* 40:1342–1346.
- [46] Etz CD, Homann TM, Silovitz D, Spielvogel D, Bodian CA, Luehr M et al. (2007) Long-term survival after the Bentall procedure in 206 patients with bicuspid aortic valve. *The Annals of thoracic surgery* 84:1186-93; discussion 1193-4.
- [47] Etz CD, Misfeld M, Borger MA, Luehr M, Strottdrees E, Mohr F-W (2012) Current indications for surgical repair in patients with bicuspid aortic valve and ascending aortic ectasia. *Cardiology research and practice* 2012:313879.
- [48] Etz CD, Zoli S, Brenner R, Roder F, Bischoff M, Bodian CA et al. (2010) When to operate on the bicuspid valve patient with a modestly dilated ascending aorta. *The Annals of thoracic surgery* 90:1884-90; discussion 1891-2.
- [49] Falcone MW, Roberts WC, Morrow AG, Perloff JK Congenital Aortic Stenosis Resulting From a Unicommissural Valve.
- [50] Fazel SS, Mallidi HR, Lee RS, Sheehan MP, Liang D, Fleischman D et al. (2008) The aortopathy of bicuspid aortic valve disease has distinctive patterns and usually involves the transverse aortic arch. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 135:901-7, 907.e1-2.
- [51] Fealey ME, Edwards WD, Miller DV, Maleszewski JJ (2012) Unicommissural aortic valves: gross, histological, and immunohistochemical analysis of 52 cases (1978-2008). *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 21:324–333.
- [52] Fedak PWM, de Sa, Mauro P.L, Verma S, Nili N, Kazemian P, Butany J et al. (2003) Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 126:797–805.
- [53] Fedak, P. W. M., Verma S, David TE, Leask RL, Weisel RD, Butany J (2002) Clinical and Pathophysiological Implications of a Bicuspid Aortic Valve. *Circulation* 106:900–904.

- [54] Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee S-P (2002) Development of Heart Failure and Congenital Septal Defects in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 106:873–879.
- [55] Fernández B, Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Such M, Arqué JM, Sans-Coma V (2009) Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *Journal of the American College of Cardiology* 54:2312–2318.
- [56] Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine* 27:126–139.
- [57] Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology letters* 28:1601–1613.
- [58] Foffa I, Ait Alì L, Panesi P, Mariani M, Festa P, Botto N et al. (2013) Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC medical genetics* 14:44.
- [59] Forte A, Della Corte A, Grossi M, Bancone C, Provenzano R, Finicelli M et al. (2013) Early cell changes and TGF $\beta$  pathway alterations in the aortopathy associated with bicuspid aortic valve stenosis. *Clinical science (London, England : 1979)* 124:97–108.
- [60] G. J. Ji,<sup>\*</sup>,<sup>1</sup> B. K. FLEISCHMANN,<sup>\*</sup>,<sup>1</sup> W. BLOCH,<sup>†</sup> M. FEELISCH,<sup>‡</sup> C. ANDRESSEN,<sup>†</sup> † Regulation of the L-type Ca<sub>2</sub><sup>v</sup> channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition.
- [61] Gallo EM, Loch DC, Habashi JP, Calderon JF, Chen Y, Bedja D et al. (2014) Angiotensin II-dependent TGF- $\beta$  signaling contributes to Loeys-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *The Journal of clinical investigation* 124:448–460.
- [62] Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN et al. (2005) Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437:270–274.
- [63] Gillis E, van Laer L, Loeys BL (2013) Genetics of thoracic aortic aneurysm. At the crossroad of transforming growth factor- $\beta$  signaling and vascular smooth muscle cell contractility. *Circulation Research* 113:327–340.
- [64] Girdauskas E, Borger MA, Secknus M-A, Girdauskas G, Kuntze T (2011) Is aortopathy in bicuspid aortic valve disease a congenital defect or a result of abnormal hemodynamics? A critical reappraisal of a one-sided argument. *European journal of*

cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery 39:809–814.

[65] Girdauskas E, Disha K, Raisin HH, Secknus M-A, Borger MA, Kuntze T (2012) Risk of late aortic events after an isolated aortic valve replacement for bicuspid aortic valve stenosis with concomitant ascending aortic dilation. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 42:832-7; discussion 837-8.

[66] Girdauskas E, Rouman M, Disha K, Dubslaff G, Fey B, Misfeld M et al. (2016) The fate of mild-to-moderate proximal aortic dilatation after isolated aortic valve replacement for bicuspid aortic valve stenosis. A magnetic resonance imaging follow-up study†. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 49:e80-6; discussion e86-7.

[67] Gittenberger-de Groot, Adriana C, Winter EM, Bartelings MM, Goumans MJ, DeRuiter MC, Poelmann RE (2012) The arterial and cardiac epicardium in development, disease and repair. *Differentiation; research in biological diversity* 84:41–53.

[68] Gomez D, Al Haj Zen, Ayman, Borges LF, Philippe M, Gutierrez PS, Jondeau G et al. (2009) Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *The Journal of pathology* 218:131–142.

[69] Groenendijk, Bianca C W, Hierck BP, Vrolijk J, Baiker M, Pourquoi, Mathieu J B M, Gittenberger-de Groot, Adriana C, Poelmann RE (2005) Changes in shear stress-related gene expression after experimentally altered venous return in the chicken embryo. *Circulation Research* 96:1291–1298.

[70] Groenink M, den Hartog AW, Franken R, Radonic T, Waard V de, Timmermans J et al. (2013) Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome. A randomized controlled trial. *European heart journal* 34:3491–3500.

[71] Guo D-C, Pannu H, van Tran-Fadulu, Papke CL, Yu RK, Avidan N et al. (2007) Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nature genetics* 39:1488–1493.

[72] Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK et al. (2006) Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science (New York, N.Y.)* 312:117–121.

[73] Hahn RT, Roman MJ, Mogtadek AH, Devereux RB (1992) Association of aortic dilation with regurgitant, stenotic and functionally normal bicuspid aortic valves. *Journal of the American College of Cardiology* 19:283–288.

- [74] Hare JM, Colucci WS (1995) Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Progress in Cardiovascular Diseases* 38:155–166.
- [75] Hector I. Michelena, MD Amber D. Khanna, MD Douglas Mahoney, MS Edit Margaryan, MD Yan Topilsky, MD Rakesh M. Suri, MD, PhD Ben Eidem, MD William D. Edwards, MD Thoralf M. Sundt III, MD Maurice Enriquez-Sarano, MD Incidence of Aortic Complications in Patients With Bicuspid Aortic Valves. *JAMA* September 14, 2011::
- [76] Henn D (2014) Genexpression in der Aorta ascendens bei Patienten mit unicuspiden Aortenklappen. Unter Mitarbeit von Universität des Saarlandes.
- [77] Henn D, Perttunen H, Gauer S, Schmied W, Porras C, Such M, Schäfers H-J (2014) GATA5 and endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. *The Annals of thoracic surgery* 97:2019–2025.
- [78] High FA, Epstein JA (2008) The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nature reviews. Genetics* 9:49–61.
- [79] Hope MD, Hope TA, Meadows AK, Ordovas KG, Urbania TH, Alley MT, Higgins CB (2010) Bicuspid aortic valve: four-dimensional MR evaluation of ascending aortic systolic flow patterns. *Radiology* 255:53–61.
- [80] Huang PL (2009) eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20:295–302.
- [81] Huntington K, Hunter AGW, Chan K-L (1997) A Prospective Study to Assess the Frequency of Familial Clustering of Congenital Bicuspid Aortic Valve. *Journal of the American College of Cardiology* 30:1809–1812.
- [82] Ichiro Shimada, MD, Stephen J. Rooney, FRCS, Domenico Pagano, FRCS, Pier Andrea Farneti, MD, Paul Davies, PhD, Peter J. Guest, FRCR, and Robert S. Bonser, FRCS Prediction of Thoracic Aortic Aneurysm Expansion: Validation of Formulae Describing Growth. *Ann Thorac Surg* 1999;:::1968–70.
- [83] Ikonomidis JS, Ruddy JM, Benton SM, Arroyo J, Brinsa TA, Stroud RE et al. (2012) Aortic dilatation with bicuspid aortic valves: cusp fusion correlates to matrix metalloproteinases and inhibitors. *The Annals of thoracic surgery* 93:457–463.
- [84] Ishigami H, Iwase M, Hyoudo K, Aoyama I, Ito M, Tajima K et al. (2005) A case of unicuspid aortic valve associated with a single coronary artery and ventricular septal defect. *J Med Ultrasonics* 32:65–70.

- [85] Jackson V, Petrini J, Caidahl K, Eriksson MJ, Liska J, Eriksson P, Franco-Cereceda A (2011) Bicuspid aortic valve leaflet morphology in relation to aortic root morphology: a study of 300 patients undergoing open-heart surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 40:e118-24.
- [86] Jaffe M, Sesti C, Washington IM, Du L, Dronadula N, Chin MT et al. (2012) Transforming growth factor- $\beta$  signaling in myogenic cells regulates vascular morphogenesis, differentiation, and matrix synthesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:e1-11.
- [87] JEAN-LUC BALLIGAND\*, RALPH A. KELLY\*, PHILIP A. MARSDEN<sup>†</sup>, THOMAS W. SMITH\*§, AND THOMAS MICHEL\* Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system.
- [88] Jil A. Zugin, James L. Hartley (1995) Ethanol Precipitation of DNA. focus, Bethesda Research Laboratories.
- [89] Kang S-D, Seol S-H, Park B-M, Kim D-K, Kim K-H, Kim D-I et al. (2011) Incidental diagnosis of the unicuspid aortic valve with ascending aortic aneurysm in an asymptomatic adult. *Journal of cardiovascular ultrasound* 19:102–104.
- [90] Katzel EB, Wolenski M, Loiselle AE, Basile P, Flick LM, Langstein HN et al. (2011) Impact of Smad3 loss of function on scarring and adhesion formation during tendon healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29:684–693.
- [91] Kielty CM, Baldock C, Lee D, Rock MJ, Ashworth JL, Shuttleworth CA (2002) Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 357:207–217.
- [92] Kiyota Y, Della Corte A, Montiero Vieira V, Habchi K, Huang C-C, Della Ratta EE et al. (2017) Risk and outcomes of aortic valve endocarditis among patients with bicuspid and tricuspid aortic valves. *Open heart* 4:e000545.
- [93] Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Yamamura E, Joo K et al. (2009) GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:13933–13938.
- [94] Koichiro Niwa MD, Joseph K. Perloff, MD, Sunita M. Bhuta, MD, Hillel Laks MD, Davis C. Drinkwater, MD, John S. Child, MD, Pamela D. Miner, NP Structural Abnor-

malities of Great Arterial Walls in Congenital Heart Disease Light and Electron Microscopic Analyses.

- [95] Kristin A. Eckert and Thomas A. Kunkel DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction.
- [96] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M (2010) Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif.)* 50:298–301.
- [97] Kubiczikova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S (2012) TGF- $\beta$  - an excellent servant but a bad master. *Journal of translational medicine* 10:183.
- [98] Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R et al. (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104:448–454.
- [99] Kurpinski K, Lam H, Chu J, Wang A, Kim A, Tsay E et al. (2010) Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28:734–742.
- [100] Laforest B, Andelfinger G, Nemer M (2011) Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *The Journal of clinical investigation* 121:2876–2887.
- [101] Laforest B, Nemer M (2011) GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Developmental biology* 358:368–378.
- [102] Larson EW, Edwards WD (1984) Risk factors for aortic dissection: A necropsy study of 161 cases. *The American journal of cardiology* 53:849–855.
- [103] Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ (2000) Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 101:2345–2348.
- [104] LeMaire SA, McDonald M-LN, Guo D-C, Russell L, Miller CC, Johnson RJ et al. (2011) Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21.1. *Nature genetics* 43:996–1000.
- [105] Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM (1997) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochemical and biophysical research communications* 240:419–424.

- [106] Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J et al. (2012) Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nature genetics* 44:922–927.
- [107] Liu Y, Feng Q (2012) NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation; research in biological diversity* 84:54–61.
- [108] Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T et al. (2005) A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nature genetics* 37:275–281.
- [109] Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, Callewaert BL, Backer J de, Devereux RB et al. (2010) The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of medical genetics* 47:476–485.
- [110] Loeys Bart L., Schwarze Ulrike, Holm Tammy, Callewaert Bert L., Thomas George H., Pannu Hariyadarshi, De Backer Julie F., Oswald Gretchen L., Symoens Sofie, Manouvrier Sylvie, Roberts Amy E., Faravelli Francesca, Greco M. Alba, Pyeritz Reed E., Milewicz Dianna M., Coucke Paul J., Cameron Duke E., Braverman Alan C., Byers Peter H., De Paepe Anne M., Dietz Harry C. Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF- $\beta$  Receptor.
- [111] LYGIA PEREIRA\*†, SUI YING LEE\*, BARBARA GAYRAUD\*, KOSTANTINOS ANDRIKOPOULOS\*, STEVEN D. SHAPIRO‡, TRACIE BUNTON§, NANCY JENSEN BIERY¶, HARRY C. DIETZ¶¶, LYNN Y. SAKAI\*\*, AND FRANCESCO RAMIREZ\*††  
Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1.
- [112] Mariucci EM, Lovato L, Rosati M, Palena LM, Bonvicini M, Fattori R (2013) Dilation of peripheral vessels in Marfan syndrome: importance of thoracoabdominal MR angiography. *International journal of cardiology* 167:2928–2931.
- [113] Marjolijn Renard, (MSc)<sup>1,\* ,‡</sup>, Bert Callewaert, (MD, PhD)<sup>1,‡</sup>, Machteld Baetens, (IE)<sup>1</sup>, Laurence Campens, (MD)<sup>1</sup>, Kay MacDermot, (MD)<sup>2</sup>, Jean-Pierre Fryns, (Prof, MD, PhD)<sup>3</sup>, Maryse Bonduelle, (Prof, MD)<sup>4</sup>, Hal Dietz, (Prof, MD)<sup>5,6</sup>, Isabel Mendes Gaspar, (MD)<sup>7</sup>, Diogo Cavaco, (MD)<sup>7</sup>, Eva-Lena Stattin, (MD, PhD)<sup>8</sup>, Constance Schrandt-Stumpel, (MD)<sup>9</sup>, Paul Coucke, (Prof, PhD, IE)<sup>1</sup>, Bart Loeys, (Prof, MD, PhD)<sup>1,10</sup>, Anne De Paepe, (Prof, MD, PhD)<sup>1</sup>, and Julie De Backer, (MD, PhD)<sup>1</sup> Novel MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGF $\beta$  signaling in FTAAD.
- [114] Martin G. Keane, MD, Susan E. Wiegers, MD, Ted Plappert R, Alberto Pochettino MD, Joseph E. Bavaria, MD, Martin G. St. John Sutton, MBBS, FRCP (2000) Bi-

cuspid Aortic Valves Are Associated With Aortic Dilatation Out of Proportion to Coexistent Valvular Lesions. *Circulation* 35–39.

[115] Mathieu P, Bossé Y, Huggins GS, Della Corte A, Pibarot P, Michelena HI et al. (2015) The pathology and pathobiology of bicuspid aortic valve. State of the art and novel research perspectives. *The journal of pathology. Clinical research* 1::195–206.

[116] Mauro de Sa, MDa Yaron Moshkovitz, MDa Jagdish Butany, MDb Tirone E. David, MDa 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* 1999:588–594.

[117] Melhuish TA, Gallo CM, Wotton D (2001) TGIF2 interacts with histone deacetylase 1 and represses transcription. *The Journal of biological chemistry* 276:32109–32114.

[118] Michael T. Gewaltig, Georg Kojda Vasoprotection by nitricoxide :mechanisms and therapeutic potential.

[119] Michelena HI, Desjardins VA, Avierinos J-F, Russo A, Nkomo VT, Sundt TM et al. (2008) Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community. *Circulation* 117:2776–2784.

[120] Milewicz DM, Dietz HC, Miller DC (2005) Treatment of aortic disease in patients with Marfan syndrome. *Circulation* 111:e150-7.

[121] mir Vana Paris Kit mir Vana Paris Kit. Online verfügbar unter [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/fm\\_1556.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/fm_1556.pdf).

[122] Mohamed SA, Misfeld M, Hanke T, Charitos EI, Bullerdiek J, Belge G et al. (2010) Inhibition of caspase-3 differentially affects vascular smooth muscle cell apoptosis in the concave versus convex aortic sites in ascending aneurysms with a bicuspid aortic valve. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 192:145–150.

[123] Mohamed SA, Radtke A, Saraei R, Bullerdiek J, Sorani H, Nimzyk R et al. (2012) Locally different endothelial nitric oxide synthase protein levels in ascending aortic aneurysms of bicuspid and tricuspid aortic valve. *Cardiology research and practice* 2012:165957.

[124] Mohsen Ghadami,<sup>1</sup> Yoshio Makita,<sup>4</sup> Kunihiro Yoshida,<sup>5</sup> Gen Nishimura,<sup>7</sup> Yoshimitsu Fukushima,<sup>6</sup> Keiko Wakui,<sup>6</sup> Shiro Ikegawa,<sup>8</sup> Koki Yamada,<sup>1,2</sup> Shinji Kon-

do,1,3 Norio Niikawa,1 and Hiro-aki Tomita1 Genetic Mapping of the Camurati-Engelmann Disease Locus to Chromosome 19q13.1-q13.3.

- [125] Murdoch J, Lamont, Walker Bryan A., Halpern Barry L., Kuzma Jan W., McKusick Victor A. Life Expectancy and Causes of Death in the Marfan Syndrome.
- [126] Murphy BA, Groban L, Kon ND (2003) Diagnosis of a unicuspid aortic valve using transesophageal echocardiography. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 17:82–83.
- [127] Naito S, Gross T, Disha K, Kodolitsch Y von, Reichenspurner H, Girdauskas E (2017) Late post-AVR progression of bicuspid aortopathy. Link to hemodynamics. *General thoracic and cardiovascular surgery* 65:252–258.
- [128] Nataatmadja M, West M, West J, Summers K, Walker P, Nagata M, Watanabe T (2003) Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation* 108 Suppl 1::II329-34.
- [129] Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B et al. (2003) Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nature genetics* 33:407–411.
- [130] Nikolaos Tzemos, MD Judith Therrien, MD James Yip, MD George Thanassoulis, MD Sonia Tremblay, MD Michal T. Jamorski, BSc Gary D. Webb, MD Samuel C. Siu, MD, SM Outcomes in Adults With Bicuspid Aortic Valves. *JAMA*, September 17, 2008—::
- [131] Nistri S, Porciani MC, Attanasio M, Abbate R, Gensini GF, Pepe G (2012) Association of Marfan syndrome and bicuspid aortic valve: frequency and outcome. *International journal of cardiology* 155:324–325.
- [132] Nistri S, Porciani MC, Attanasio M, Abbate R, Gensini GF, Pepe G (2012) Association of Marfan syndrome and bicuspid aortic valve: frequency and outcome. *International journal of cardiology* 155:324–325.
- [133] Novaro GM, Griffin BP (2004) Congenital Bicuspid Aortic Valve and Rate of Ascending Aortic Dilatation. *The American journal of cardiology* 93:524–525.
- [134] Novaro GM, Mishra M, Griffin BP Incidence and echocardiographic features of congenital unicuspid aortic valve in an adult population. *J Heart Valve Dis* 2003:674–678.

- [135] Padang R, Bagnall RD, Richmond DR, Bannon PG, Semsarian C (2012) Rare non-synonymous variations in the transcriptional activation domains of GATA5 in bicuspid aortic valve disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 53:277–281.
- [136] Padang R, Bannon PG, Jeremy R, Richmond DR, Semsarian C, Vallely M et al. (2013) The genetic and molecular basis of bicuspid aortic valve associated thoracic aortopathy: a link to phenotype heterogeneity. *Annals of cardiothoracic surgery* 2:83–91.
- [137] Paepe A de, Malfait F (2012) The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces. *Clinical genetics* 82:1–11.
- [138] Pannu H, van Fadulu T, Chang J, Lafont A, Hasham SN, Sparks E et al. (2005) Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation* 112:513–520.
- [139] Pannu H, van Tran-Fadulu, Papke CL, Scherer S, Liu Y, Presley C et al. (2007) MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Human molecular genetics* 16:2453–2462.
- [140] Pepe G1, 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.
- [141] Perrucci GL, Rurali E, Gowran A, Pini A, Antona C, Chiesa R et al. (2017) Vascular smooth muscle cells in Marfan syndrome aneurysm. The broken bricks in the aortic wall. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74:267–277.
- [142] Person AD, Klewer SE, Runyan RB (2005) *Cell Biology of Cardiac Cushion Development*. In: Bd. 243: Elsevier (International Review of Cytology)287–335.
- [143] Peter J. Kuhlencordt, MD, Robert Gyurko P, Fred Han BS, Marielle Scherrer-Crosbie MD, Thomas H. Aretz, MD, Roger Hajjar MD et al. Accelerated Atherosclerosis, Aortic Aneurysm Formation, and Ischemic Heart Disease in Apolipoprotein E Endothelial Nitric Oxide Synthase Double-Knockout Mice.
- [144] Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell ME (2006) The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *The Biochemical journal* 393:601–607.
- [145] Rabinow P. (1996) *MAKING PCR A STORY OF BIOTECHNOLOGY*. University of Chicago Press, Chicago.

- [146] Radonic T, Witte P de, Baars, Marieke J H, Zwinderman AH, Mulder, Barbara J M, Groenink M (2010) Losartan therapy in adults with Marfan syndrome: study protocol of the multi-center randomized controlled COMPARE trial. *Trials* 11:3.
- [147] Ramirez F, Dietz HC (2009) Extracellular microfibrils in vertebrate development and disease processes. *The Journal of biological chemistry* 284:14677–14681.
- [148] Ranjan V, Xiao Z, Diamond SL Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. *Am J Physiol.* 1995:H550–5.
- [149] Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q (2005) Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacology & therapeutics* 106:147–162.
- [150] Regeer MV, Versteegh MI, Klautz RJ, Schaliij MJ, Bax JJ, Marsan NA, Delgado V (2016) Effect of Aortic Valve Replacement on Aortic Root Dilatation Rate in Patients With Bicuspid and Tricuspid Aortic Valves. *The Annals of thoracic surgery* 102:1981–1987.
- [151] Roberts WC, Ko JM (2003) 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. *The American journal of cardiology* 92:1057–1065.
- [152] Roberts WC, Ko JM (2005) Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* 111:920–925.
- [153] Roberts WC, Ko JM (2007) Clinical and morphologic features of the congenitally unicuspid aocommissural stenotic and regurgitant aortic valve. *Cardiology* 108:79–81.
- [154] Robicsek F (2003) Aortic media in bicuspid valve disease. *The Annals of thoracic surgery* 76:337–338.
- [155] Roman T. Pachulski, MD, Anthony L. Weinberg, MB, and Kwan-Leung Chan, MD Aortic Aneurysm in Patients with Functionally Stenotic Bicuspid Aortic Valve. *The American journal of cardiology* 1991:781–782.
- [156] Russo CF, Cannata A, Lanfranconi M, Vitali E, Garatti A, Bonacina E (2008) Is aortic wall degeneration related to bicuspid aortic valve anatomy in patients with valvular disease? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 136:937–942.
- [157] S Nistri, M D Sorbo, M Marin, M Palisi, R Scognamiglio, G Thiene Aortic root dilatation in young men with normally functioning bicuspid aortic valves. *Heart* 1999:19–22.

- [158] S. Moncada, R.M.J. Palmer, and E.A. Higgs Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology.
- [159] Saha S, Bastiaenen R, Hayward M, McEwan JR (2007) An undiagnosed bicuspid aortic valve can result in severe left ventricular failure. *BMJ (Clinical research ed.)* 334:420–422.
- [160] Sandra Webb, Nigel A. Brown, Robert H. Anderson Formation of the Atrioventricular Septal Structures in.
- [161] Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, Lowenstein CJ (2002) Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circulation Research* 91:806–813.
- [162] Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK, Byers PH, Otto CM (2007) Usefulness of bicuspid aortic valve phenotype to predict elastic properties of the ascending aorta. *The American journal of cardiology* 99:686–690.
- [163] Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK, Gill E, Prueitt A, Byers PH, Otto CM (2008) The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape. *Heart (British Cardiac Society)* 94:1634–1638.
- [164] Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK, Gill E, Prueitt A, Byers PH, Otto CM (2008) The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape. *Heart (British Cardiac Society)* 94:1634–1638.
- [165] Schäfers H-J, Aicher D, Riodionychewa S, Lindinger A, Rädle-Hurst T, Langer F, Abdul-Khaliq H (2008) Bicuspidization of the unicuspid aortic valve: a new reconstructive approach. *The Annals of thoracic surgery* 85:2012–2018.
- [166] Searles CD (2006) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *American journal of physiology. Cell physiology* 291:C803-16.
- [167] SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A et al. (2004) KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *The Journal of experimental medicine* 199:1305–1315.
- [168] Sessa WC (2004) eNOS at a glance. *Journal of cell science* 117:2427–2429.
- [169] Shinichi Kanno\*, Peter K. M. Kim, Karim Sallam, Jing Lei, Timothy R. Billiar\*, and Larry L. Shears II Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells.

- [170] Siu SC, Silversides CK (2010) Bicuspid aortic valve disease. *Journal of the American College of Cardiology* 55:2789–2800.
- [171] Srivastava D (2006) Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126:1037–1048.
- [172] Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E (2006) Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research* 98:403–411.
- [173] Sunnergren KP, Word RA, Sambrook JF, MacDonald PC, Casey ML (1990) Expression and regulation of endothelin precursor mRNA in avascular human amnion. *Molecular and Cellular Endocrinology* 68:R7-R14.
- [174] Tadros TM, Klein MD, Shapira OM (2009) Ascending aortic dilatation associated with bicuspid aortic valve: pathophysiology, molecular biology, and clinical implications. *Circulation* 119:880–890.
- [175] Tang Y, Urs S, Liaw L (2008) 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. *Circulation Research* 102:661–668.
- [176] Tony C. Lee, BSc, Yidan D. Zhao, MD, PhD, David W. Courtman, PhD, Duncan J. Stewart, MD Abnormal Aortic Valve Development in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase.
- [177] Tracie E. Bunton, Nancy Jensen Biery, Loretha Myers, Barbara Gayraud, Francesco Ramirez, Harry C. Dietz Phenotypic Alteration of Vascular Smooth Muscle Cells Precedes Elastolysis in a Mouse Model of Marfan Syndrome.
- [178] Tran-Fadulu V, Pannu H, Kim DH, Vick GW, Lonsford CM, Lafont AL et al. (2009) Analysis of multigenerational families with thoracic aortic aneurysms and dissections due to TGFBR1 or TGFBR2 mutations. *Journal of medical genetics* 46:607–613.
- [179] Ulrike Bartram MD, Daniël G.M. Molin, MSc, Lambertus J. Wisse, BSc, Azhar Mohamad P, L. Philip Sanford, PhD, Thomas Doetschman P et al. Double-Outlet Right Ventricle and Overriding Tricuspid Valve Reflect Disturbances of Looping, Myocardialization, Endocardial Cushion Differentiation, and Apoptosis in TGFb 2–Knockout Mice.

- [180] Vaughn SP, Broussard S, Hall CR, Scott A, Blanton SH, Milunsky JM, Hecht JT (2000) Confirmation of the mapping of the Camurati-Englemann locus to 19q13. 2 and refinement to a 3.2-cM region. *Genomics* 66:119–121.
- [181] Verma S, Siu SC (2014) Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *The New England journal of medicine* 370:1920–1929.
- [182] Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A (2001) Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter trans-activation approach. *The Journal of biological chemistry* 276:17058–17062.
- [183] W. Bloch, B.K. Fleischmann, D.E. Lorke, C. Andressen, Hops, J. Hescheler, K. Addicks Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis.
- [184] Waeckel L, Badier-Commander C, Damery T, Köhler R, Sansilvestri-Morel P, Simonet S et al. (2015) Vascular dysfunctions in the isolated aorta of double-transgenic hypertensive mice developing aortic aneurysm. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467:1945–1963.
- [185] Wågsäter D, Paloschi V, Hanemaaijer R, Hultenby K, Bank RA, Franco-Cereceda A et al. (2013) Impaired collagen biosynthesis and cross-linking in aorta of patients with bicuspid aortic valve. *Journal of the American Heart Association* 2:e000034.
- [186] Wang J, Luo X-J, Xin Y-F, Liu Y, Liu Z-M, Wang Q et al. (2012) Novel GATA6 mutations associated with congenital ventricular septal defect or tetralogy of fallot. *DNA and cell biology* 31:1610–1617.
- [187] Weigang E, Kari FA, Beyersdorf F, Luehr M, Etz CD, Frydrychowicz A et al. (2008) Flow-sensitive four-dimensional magnetic resonance imaging: flow patterns in ascending aortic aneurysms. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 34:11–16.
- [188] Weiss A, Attisano L (2013) The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 2:47–63.
- [189] Wit A de, Vis K, Jeremy RW (2013) Aortic stiffness in heritable aortopathies: relationship to aneurysm growth rate. *Heart, lung & circulation* 22:3–11.
- [190] Yang P, Schmit BM, Fu C, DeSart K, Oh SP, Berceli SA, Jiang Z (2016) Smooth muscle cell-specific Tgfr1 deficiency promotes aortic aneurysm formation by stimulating multiple signaling events. *Scientific reports* 6:35444.

- [191] Yang Y-Q, Gharibeh L, Li R-G, Xin Y-F, Wang J, Liu Z-M et al. (2013) GATA4 loss-of-function mutations underlie familial tetralogy of fallot. *Human mutation* 34:1662–1671.
- [192] Yassine NM, Shahram JT, Body SC (2017) Pathogenic Mechanisms of Bicuspid Aortic Valve Aortopathy. *Frontiers in physiology* 8:687.
- [193] Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S et al. (2001) Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6686–6691.
- [194] Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Böttinger EP (2004) Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *The EMBO journal* 23:1155–1165.
- [195] Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J et al. (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454:109–113.
- [196] Zhou Y, Poczatek MH, Berecek KH, Murphy-Ullrich JE (2006) Thrombospondin 1 mediates angiotensin II induction of TGF-beta activation by cardiac and renal cells under both high and low glucose conditions. *Biochemical and biophysical research communications* 339:633–641.