

**Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Ausbildung
einer Aortenklappensklerose im Tiermodell
der LDL-Rezeptor-knockout-Maus**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.**

**an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig**

eingereicht von: Saskia Jacob / 25.10.1985 / Merseburg/Saale

**angefertigt am: Herzzentrum der Universität Leipzig,
Klinik für Innere Medizin/Kardiologie**

Betreuer: PD Dr. rer. nat. habil. Volker Adams

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 15.12.2015

Bibliographische Beschreibung:

Jacob, Saskia

Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Ausbildung einer Aortenklappensklerose im Tiermodell der LDL-Rezeptor-knockout-Maus

Universität Leipzig, Dissertation

S.95¹, 131 Lit.², 20 Abb., 6 Tab.

Referat:

Die kalzifizierende Aortenklappenstenose stellt ein großes und wachsendes gesundheitliches Problem ohne bisherige Alternative zu kostspieligen invasiven Behandlungen in der westlichen Gesellschaft dar. Die Aortenklappensklerose, als frühes Stadium der Erkrankung teilt Risikofaktoren sowie pathophysiologische Mechanismen mit der Arteriosklerose. Nach bisherigem Kenntnisstand kann mit körperlichem Training der Entwicklung und Progression einer Arteriosklerose vorgebeugt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Ausbildung einer Aortenklappensklerose im Sinne einer Primärprävention zu zeigen. Dabei sollten der Einfluss der Trainingsintensität und die involvierte Mechanismen aufgedeckt werden. Auf Grundlage des LDL-Rezeptor-knockout-Mausmodells wurden 4 Wochen alte Mäuse für 16 Wochen trainiert, um anschließend molekulare Mechanismen durch histologische, serumbiochemische, immunhistochemische und molekularbiologische Analysen zu untersuchen und den Effekt körperlicher Aktivität als primärpräventive Maßnahme für die Ausbildung einer Aortenklappensklerose darzulegen.

¹ Seitenzahl insgesamt

² Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben

Inhaltsverzeichnis

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>5</u>
<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>6</u>
<u>Abkürzungen</u>	<u>7</u>
<u>1. Einleitung</u>	<u>10</u>
<u>1.1 Aufbau der Aortenklappe</u>	<u>10</u>
<u>1.2 Die Aortenklappensklerose</u>	<u>13</u>
<u>1.3 Pathogenese</u>	<u>15</u>
<u>1.3.1 Endotheliale Dysfunktion</u>	<u>16</u>
<u>1.3.2 Inflammation</u>	<u>16</u>
<u>1.3.3 Lipoproteinablagerungen</u>	<u>17</u>
<u>1.3.4 Oxidativer Stress</u>	<u>18</u>
<u>1.3.5 Renin-Angiotensin-System</u>	<u>18</u>
<u>1.3.6 Kalzifizierung</u>	<u>18</u>
<u>1.4 Evaluation der Aortenklappensklerose</u>	<u>19</u>
<u>1.5 Tiermodell</u>	<u>21</u>
<u>1.6 Körperliche Aktivität</u>	<u>22</u>
<u>1.7 Fragestellung</u>	<u>22</u>
<u>2. Material und Methoden</u>	<u>24</u>
<u>2.1 Material</u>	<u>24</u>
<u>2.1.1 Versuchstiere</u>	<u>24</u>

<u>2.1.2 Tiernahrung</u>	<u>24</u>
<u>2.1.3 Trainingsgerät</u>	<u>24</u>
<u>2.1.4 Chemikalien und Lösungen</u>	<u>24</u>
<u>2.1.5 Pharmaka</u>	<u>25</u>
<u>2.1.6 Antikörper und Assay-Kits</u>	<u>25</u>
<u>2.1.7 Material für molekularbiologische Methoden</u>	<u>26</u>
<u>2.1.8 Geräte, Instrumente und Gebrauchswaren</u>	<u>26</u>
<u>2.1.9 Software</u>	<u>27</u>
<u>2.2 Methoden</u>	<u>27</u>
<u>2.2.1 Studiendesign</u>	<u>27</u>
<u>2.2.2 Mausmodell und Haltungsbedingungen</u>	<u>29</u>
<u>2.2.3 Trainingsprotokoll</u>	<u>30</u>
<u>2.2.4 Echokardiographie</u>	<u>30</u>
<u>2.2.5 Gewebeentnahme und Fixation</u>	<u>30</u>
<u>2.2.6 Biochemische Blutanalyse</u>	<u>32</u>
<u>2.2.6.1 Serumgewinnung</u>	<u>32</u>
<u>2.2.6.2 Kolorimetrische Messung der Cholesterinkonzentration</u>	<u>32</u>
<u>2.2.6.3 ELISA für Fetuin-A-Konzentration</u>	<u>32</u>
<u>2.2.7 Histologische Methoden</u>	<u>33</u>
<u>2.2.7.1 Paraffinschnitte</u>	<u>33</u>
<u>2.2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung</u>	<u>34</u>
<u>2.2.7.3 von Kossa-Färbung</u>	<u>35</u>

<u>2.2.7.4 Picrosiriusrot-Färbung</u>	<u>35</u>
<u>2.2.7.5 Gefrierschnitte</u>	<u>36</u>
<u>2.2.7.6 Dihydroethidium-Färbung</u>	<u>37</u>
<u>2.2.8 Histologische Evaluation</u>	<u>37</u>
<u>2.2.8.1 Evaluation der Aortenklappentaschendurchmesser</u>	<u>37</u>
<u>2.2.8.2 Evaluation der histologischen Färbungen</u>	<u>37</u>
<u>2.2.9 Immunhistochemische Methoden</u>	<u>38</u>
<u>2.2.10 Immunhistochemische Evaluation</u>	<u>40</u>
<u>2.2.11 Molekularbiologische Methoden</u>	<u>41</u>
<u>2.2.11.1 RNA-Isolation</u>	<u>41</u>
<u>2.2.11.2 Reverse Transkription</u>	<u>41</u>
<u>2.2.11.3 Real-Time-quantitative-Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR)</u>	<u>42</u>
<u>2.2.12 Statistische Methoden</u>	<u>45</u>
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>47</u>
<u>3.1 Aortenklappenverdickung und Aortenklappendurchflussgeschwindigkeit</u>	<u>47</u>
<u>3.2 Endothelintegrität</u>	<u>50</u>
<u>3.3 Makrophagenakkumulation, Klappenfibrose und Proosteogenese</u>	<u>52</u>
<u>3.4 Kalzifizierung</u>	<u>57</u>
<u>3.5 Myeloperoxidase und oxidativer Sress</u>	<u>58</u>
<u>3.6 Lipidmetabolismus</u>	<u>60</u>
<u>4. Diskussion</u>	<u>61</u>
<u>4.1 Effekte der Trainingsintensität auf die Aortenklappensklerose</u>	<u>61</u>

<u>4.2 Effekte von regelmäßiger Aktivität auf die Endothelzellintegrität</u>	<u>63</u>
<u>4.3 Effekte von körperlicher Aktivität auf Inflammation, Ablagerung oxidiertes Lipide und oxidativem Stress</u>	<u>64</u>
<u>4.4 Effekte von körperlicher Aktivität auf den osteogenen Signalweg</u>	<u>65</u>
<u>4.5 Effekte von Trainingsintensität auf den Lipidmetabolismus</u>	<u>68</u>
<u>4.6 Studieneinschränkungen</u>	<u>69</u>
<u>5. Zusammenfassung der Arbeit</u>	<u>71</u>
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	<u>73</u>
<u>7. Selbstständigkeitserklärung</u>	<u>90</u>
<u>8. Curriculum vitae</u>	<u>91</u>
<u>9. Publikationen</u>	<u>93</u>
<u>10. Danksagung</u>	<u>94</u>

Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1 Phänotypen der interstitiellen Klappenzenen</u>	<u>12</u>
<u>Abb. 2 Aortenklappe</u>	<u>14</u>
<u>Abb. 3 Überblick über histopathologische Mechanismen zur Entstehung einer Aortenklappenstenose</u>	<u>16</u>
<u>Abb. 4 Zusammenhang zwischen Aortenklappenanatomie und echokardiographisch gemessener Durchflusssgeschwindigkeiten durch die Aortenklappe</u>	<u>21</u>
<u>Abb. 5 Trainingsgerät für die Tiere inklusive Steuereinheit</u>	<u>24</u>
<u>Abb. 6 Studiendesign</u>	<u>28</u>
<u>Abb. 7 Methodenübersicht</u>	<u>29</u>
<u>Abb. 8 Schema der immunhistochemischen Nachweismethode</u>	<u>40</u>
<u>Abb. 9 Beispiel einer RTQ-PCR mit dem Light Cyclcr</u>	<u>43</u>
<u>Abb. 10 Beispiel einer Schmelzkurvenanalyse im Light Cyclcr</u>	<u>45</u>
<u>Abb. 11 Ergebnisse der AK-Verdickung</u>	<u>48</u>
<u>Abb. 12 Ergebnisse der AK-Durchflusssgeschwindigkeit</u>	<u>49</u>
<u>Abb. 13 Ergebnisse der Endothelintegrität</u>	<u>51</u>
<u>Abb. 14 Ergebnisse der Immunfärbungen für Makrophagenakkumulation, Klappenfibrose und Proosteogenese</u>	<u>53</u>
<u>Abb. 15 Ergebnisse der quantitativen Analysen für Makrophagenakkumulation, Klappenfibrose und Proosteogenese</u>	<u>54</u>
<u>Abb. 16 Ergebnisse der Kollagenablagerung</u>	<u>55</u>
<u>Abb. 17 Ergebnisse der Mineralisation</u>	<u>56</u>
<u>Abb. 18 Ergebnisse der Kalzifizierung</u>	<u>58</u>
<u>Abb. 19 Ergebnisse zum oxidativen Stress</u>	<u>59</u>
<u>Abb. 20 Arbeitsmodell</u>	<u>67</u>

Tabellenverzeichnis

<u>Tab. 1 Stadien der Paraffinierung mit Inkubationszeiten und Temperaturen im Einbettautomaten</u>	<u>33</u>
<u>Tab. 2 Einteilung der immunhistochemischen Färbungen in Grad 0 bis 5 nach dem Anteil der positiv gefärbten Zellen in Schnitten der Aortenklappe</u>	<u>38</u>
<u>Tab. 3 Übersicht für die in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper mit Verdünnung und Zielantigen</u>	<u>39</u>
<u>Tab. 4 Komponenten für die Reverse Transkription</u>	<u>42</u>
<u>Tab. 5 Komponenten für die RTQ-PCR</u>	<u>44</u>
<u>Tab. 6 Für die RT-Q-PCR verwendete Primer mit Produktlänge bei entsprechender Temperatur für das Annealing</u>	<u>44</u>

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AK	Aortenklappe
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
arb	arbitrary
AS	Aortenklappenstenose
AT-1	Angiotensin II Typ 1
aVICs	aktivierte interstitielle Klappenzenellen
α SMA	alpha smooth muscle actin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNS
°C	Grad Celsius
Chol	Cholesterin-Gruppe
Chol+Gelegentlich	gelegentliche Trainingsgruppe mit Cholesterindiät
Chol+Regelmäßig	regelmäßige Trainingsgruppe mit Cholesterindiät
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DHE	Dihydroethidium
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGFR ^{Wa2/Wa2}	homozygot für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor im Bereich Wa2
ELISA	enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
ET-1	Endothelin-1
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
et al.	et alia
G	Gauge
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA-DR	human leucocyt antigen-DR
HOCl	Hypochlorige Säure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph
HRP	Merrettichperoxidase
IE	Internationale Einheit
IHC	Immunhistochemie
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
Kontrolle	Kontroll-Gruppe
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR $^{-/-}$	Low Density Lipoprotein-Rezeptor-defizient
Lp a	Lipoprotein a
Mac3	Membranglykoprotein Typ I
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
min	Minuten
min/d	Minuten pro Tag
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ mol/l	Mikromol pro Liter
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
m/s	Meter pro Sekunde
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat

NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
obVICs	osteoblastische interstitielle Klappenzellen
OCT	optimal cutting temperature compound
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
ox-LDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pVICs	interstitielle Progenitorklappenzellen
qVICs	ruhende interstitielle Klappenzellen
RANK	Rezeptor Aktivator von NF- κ B
RANKL	Rezeptor Aktivator von NF- κ B Ligand
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure
RTQ-PCR	Real Time quantitative Polymerase -Kettenreaktion
Runx-2	runt-related transcription factor 2
SF	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TIMPs	Gewebehemmer der Matrixmetalloproteinasen
TGF- β	Tumor-Growth-Faktor-beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VECM	extrazelulläre Matrix
VECs	endotheliale Klappenzellen
Vgl.	Vergleich
VICs	interstitielle Klappenzellen
vs.	versus

1. Einleitung

Das Feld der Herzklappenerkrankungen, allen voran die Aortenklappenstenose, ist Gegenstand intensiver Forschung da sie den am Menschen am häufigsten beobachteten Klappenfehler darstellt (Moura et al. 2007a, Rajamannan et al. 2004, Goldberg et al. 2007). Die Aortenklappensklerose stellt ein frühes Stadium bei der Entstehung einer Aortenklappenstenose dar. Bis zum heutigen Tage existiert keine effektive Therapie, welche die Entstehung einer Aortenklappensklerose verhindern kann (Otto et al. 2008, Bonow et al. 2008). Zahlreiche Arbeiten (Otto et al. 2008, O'Brien et al. 2006, Rajamannan et al. 2011b) postulieren die notwendige Untersuchung und Aufklärung der pathologischen Abläufe und molekularen Mechanismen der Erkrankung, die für die Behandlung und Prävention unabdingbar sind. Die Entstehung einer Aortenklappensklerose und deren Progression zu einer Aortenklappenstenose zu verhindern, bevor es zur Ausbildung schwerwiegender Klappenkalzifizierungen und damit verbundener nachteiliger Krankheitsfolgen kommt, bietet dabei einen bedeutenden therapeutischen Ansatzpunkt (Helske et al. 2009, Miller et al. 2009, Rosenhek et al. 2000, O'Brien et al. 2006).

1.1 Aufbau der Aortenklappe

Die Aortenklappe ist eine Taschenklappe aus drei etwa gleich großen halbmondförmigen „Taschen“. Sie ist zusammengesetzt aus endothelialen Klappenzellen (valvular endothel cells = VECs), interstitiellen Klappenzellen (valvular interstitial cells = VICs) und extrazellulärer Matrix (valvular extracellular matrix = VECM). Extrazelluläre Matrix besteht aus Kollagen, Elastin und amorpher extrazellulärer Matrix (vornehmlich Glykosaminoglykane) (Rajamannan et al. 2011b). Nach Liu und Mitarbeitern (2007) lassen sich 3 Schichten der Aortenklappe unterscheiden: Die Fibrosa, die eine dichte Kollagenschicht besitzt. Die Spongiosa als zentrale Schicht, die aus lose verbundenem Gewebe besteht, dass überwiegend von Glykosaminoglykanen gebildet wird. Die dritte Schicht, die als Ventricularis bezeichnet wird, ist reich an Elastin.

Die VICs lassen sich in allen 3 Schichten nachweisen und sorgen für die strukturelle, physiologische Integrität in Form von Reparatur und Remodeling (Lester et al. 1988a, 1988b, Mulholland et al. 1996). Sie synthetisieren VECM und exprimieren matrixabbauende Enzyme, wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sowie deren Inhibitoren (TIMPs) (Liu et al. 2007, Rajamannan et al. 2011b). Liu und Kollegen

(2007) postulieren weiterhin die Unterscheidung von 5 Phänotypen in der VIC-Familie: die embryonalen Progenitor-endotheliale/mesenchymale- Zellen, ruhende VICs, aktivierte VICs, Progenitor-VICs und osteoblastische VICs. Sie haben die Fähigkeit ihre Funktion den mechanischen und chemischen Umgebungsbedingungen der Klappenhämostase, Adaptionsprozessen und pathologischen Umständen entsprechend durch Veränderung ihres Phänotypes anzupassen. Embryonale Progenitor-endotheliale/mesenchymale-Zellen durchlaufen in der fetalen Entwicklung eine endothelial-mesenchymale Transformation und entwickeln sich zu ruhenden und/oder aktivierten VICs des normalen Klappengewebes. Progenitor-VICs (pVICs), die entweder aus dem Knochenmark stammen, als zirkulierende Zellen einwandern oder bereits als ortsansässige Zellen im Klappengewebe vorhanden sind, stellen eine weitere Quelle für ruhende und aktivierte VICs dar. Ruhende VICs (qVICs) sind für den Erhalt der physiologischen Klappenstruktur verantwortlich. Sie haben die Charakteristika von ruhenden Fibroblasten ohne synthetische oder destruktive Aktivität der extrazellulären Matrix. Wohingegen aktivierte VICs (aVICs) die Aufgabe der ständig notwendigen Reparaturprozesse der VECM während des physiologisch, funktionellen Remodelings im Klappengewebe übernehmen. Osteoblastische VICs (ob VICs) gehen entweder aus ruhenden VICs oder wahrscheinlich auch aus Progenitor-VICs hervor und werden angeschuldigt für Kalzifizierung, Chondrogenese und Osteogenese in Herzklappen verantwortlich zu sein. *Abb.1* nach Liu et al. (2007) verdeutlicht die genannten Zusammenhänge.

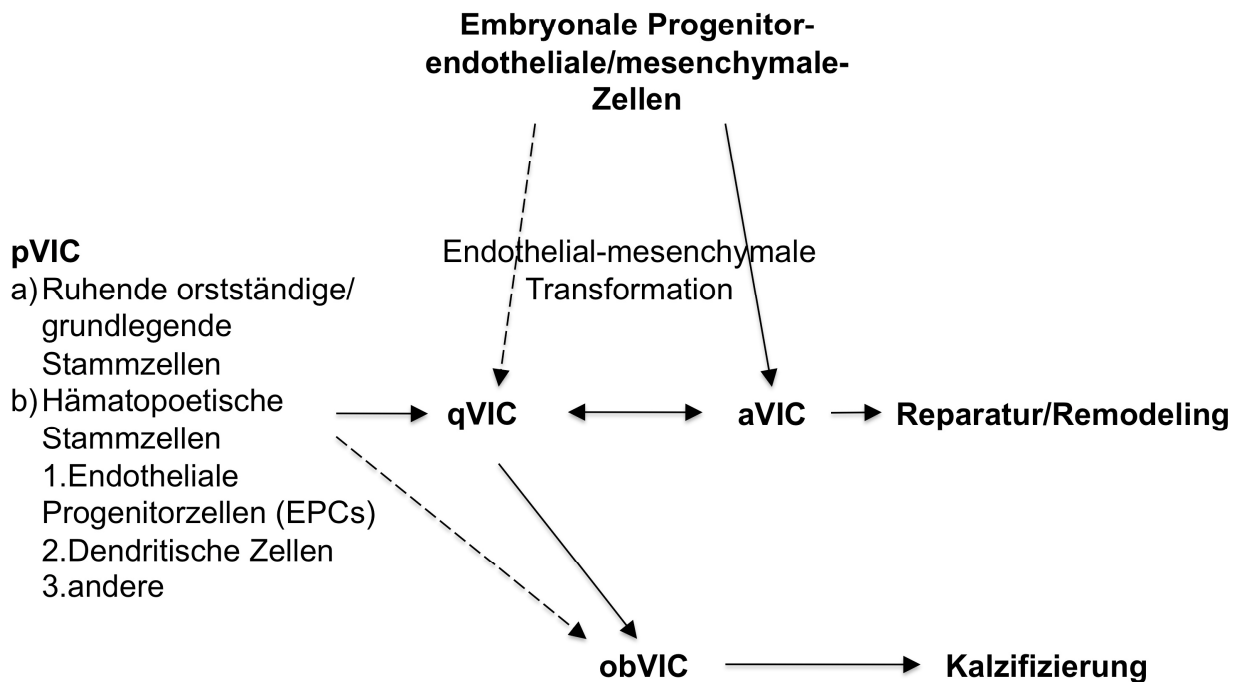


Abb. 1 Phänotypen der interstitiellen Klappenzellen Nach Liu et al. 2007 lassen sich 5 Phänotypen der interstitiellen Klappenzellen, hier als VIC (= valve interstitial cell) abgekürzt, unterscheiden. Die embryonalen Progenitor-endotheliale/mesenchymale-Zellen durchlaufen eine endothelial-mesenchymale Transformation in ruhende interstitielle Klappenzellen (qVIC = quiescent VIC) oder aktivierte interstitielle Klappenzellen (aVIC = activated VIC). Durch abnormalen hämodynamischen/mechanischen Stress oder pathologische Verletzungen kommt es zur Umwandlung von ruhenden in aktivierte VICs, die für Reparatur und Remodeling verantwortlich gemacht werden. Interstitielle Progenitorzellen (pVIC = stem cell derived progenitor VIC), die aus dem Knochenmark stammen, lassen sich einteilen in a) ruhende orstständige/grundlegende Stammzellen und b) hämatopoetische Stammzellen zu denen wiederum 1. Endotheliale Progenitorzellen, 2. Dendritische Zellen und 3. andere gehören. Unter Bedingungen die eine Klappenkalzifizierung induzieren, wie die Präsenz von osteogenetischen und chondrogenetischen Faktoren, können sich qVICs durch osteoblastische Differenzierung in osteoblastische interstitielle Klappenzellen (obVIC = osteoblastic VIC) differenzieren. Sie sind aktiv an den Kalzifizierungsprozessen beteiligt. Eine Differenzierung der osteoblastischen VIC aus der Gruppe der Progenitorzellen ist ebenfalls möglich.

Rajamannan und Mitarbeiter (2011b) beschreiben die VEC als Zellen, die mit VICs zur Aufrechterhaltung der Integrität des Klappengewebes sowie im Falle potentiell vermittelter Erkrankungen interagieren. VEC der aortalen Seite unterscheiden sich im Transkriptionsprofil von VEC, die sich auf der Herzkammer zugewandten Seite befinden. Ein Umstand, der mit der typischen Lokalisation der frühen pathologischen Aortenklappenkalzifizierung, die vornehmlich auf der aortalen Seite und erst in zweiter Linie auf der Seite der Kammer vorzufinden ist, zusammenhängen könnte (Simmons et al. 2005).

1.2 Die Aortenklappensklerose

Zahlreiche Studien definieren die Aortenklappensklerose als erste erkennbare makroskopische Veränderung des Klappengewebes, zu der fokale Klappenverdickung und Kalzifizierung bei normaler Klappenfunktion gehören (O'Brien et al. 2006, Bonow et al. 2008, Freemann et al. 2009, Rajamannan et al. 2011b). Kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes, wird diese als Aortenklappenstenose definiert. Der Begriff der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung vereint dabei alle Prozesse von initial biologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene bis zum Endstadium der Kalzifizierung, die für die Obstruktion verantwortlich gemacht wird (Rajamannan et al. 2011b). Jahrzehnte wurde die Erkrankung als passiver Prozess angesehen, der altersbedingt zu degenerativen Veränderungen und Kalziumakkumulation führt. Heute wird die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung als aktiver Prozess betrachtet, der nicht ausschließlich als senil oder degenerativ angesehen werden kann (Otto et al. 2008, Freeman et al. 2009, Rajamannan et al. 2011b). *Abb. 2* zeigt eine native Aortenklappe und eine Aortenklappenstenose.

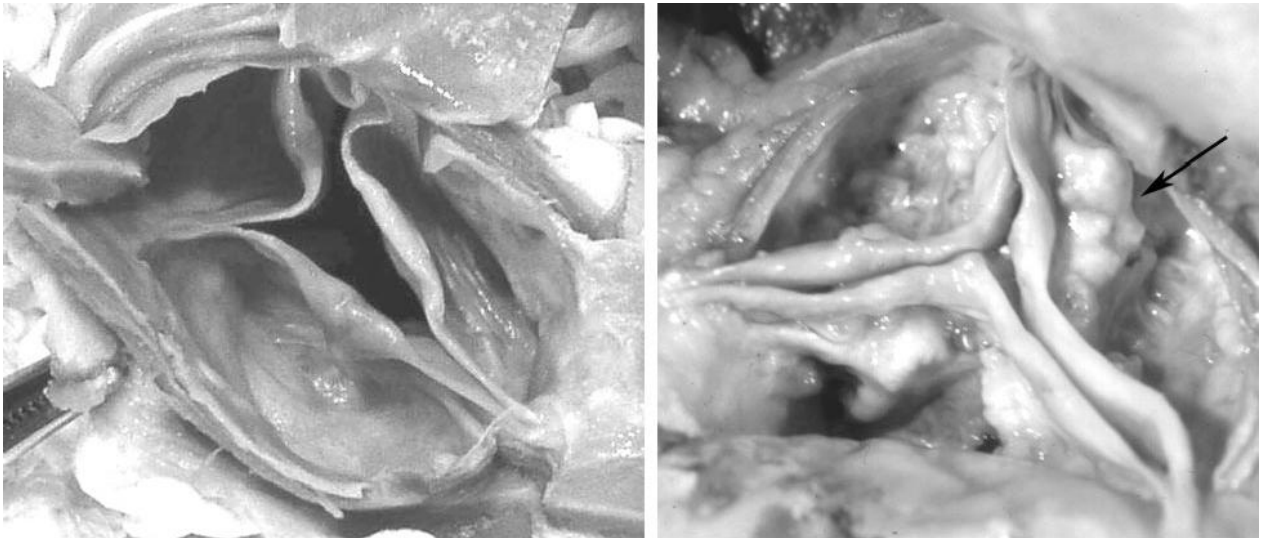


Abb. 2 Aortenklappe Links ist eine native Aortenklappe und rechts eine Aortenklappenstenose dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet ein durch Sklerose und Kalzifizierung verändertes Areal der Stenose.

Aus epidemiologischer Sicht stellt die Aortenklappensklerose eine häufige Erkrankung dar, von der 25% der über 65- bis 74-Jährigen und 48% der über 84-Jährigen Menschen betroffen sind (Lindroos et al. 1993, Stewart et al. 1997, Otto et al. 1999, Beckmann et al. 2010).

Risikofaktoren für die Entwicklung einer Aortenklappensklerose sind: hohes Alter, männliches Geschlecht, erhöhte LDL-Serumspiegel, erhöhte Lipoprotein-(a)-Serumspiegel, Rauchen, Adipositas, Bluthochdruck und Diabetes (Messika-Zeitoun et al. 2007, Freeman RV et al. 2005, Stewart et al. 2007). Zahlreiche Studien (Stewart et al. 1997, Aronow et al. 1987, Mohler et al. 1991, Lindroos et al. 1994, Boon et al. 1997, Peltier et al. 2003) belegen, dass die gleichen Risikofaktoren ebenso der Arteriosklerose zugeschrieben werden können, ein Faktor der weiterhin für gemeinsame Krankheitsprozesse spricht. Doch obwohl diese Risikofaktoren auch der Arteriosklerose zugeschrieben werden können, haben 50% der Patienten mit einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose keine klinisch relevante Arteriosklerose (Qian J et al. 2010, Mazzone A. et al. 2007).

Die Aortenklappensklerose verläuft klinisch asymptomatisch. Die Klappenhämodynamik liegt in physiologischen Bereichen (Durchflussgeschwindigkeit $<2,5\text{m/s}$). Trotz dessen ist der Krankheitsprozess mit erhöhten Morbiditäten und Mortalitäten verbunden (Freeman et al. 2005). Laut der Cardiovascular Health Study ist die Aortenklappensklerose, ohne eine zuvor bestehende koronare

Herzerkrankung, mit einem um 40% erhöhten Risiko für Myokardinfarkte und einem um 50% erhöhten Risiko für den Tod aus kardiovaskulärer Ursache verbunden (Otto et al. 1999). Nach Studienlage entwickelt sich aus einer Aortenklappensklerose zu 16% eine Aortenklappenstenose, die zu 10,5% leichtgradig einzustufen sind mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 2-3 m/s, zu 3% eine mäßige Stenose mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 3-4 m/s und zu 2,5% eine schwere Stenose mit Durchflussgeschwindigkeiten von >4 m/s (Cosmi et al. 2002). Hat sich eine hämodynamisch relevante Aortenklappenstenose ausgebildet, bleibt als einzige effektive Therapie das chirurgische Vorgehen durch Klappenersatz als Methode der Wahl oder die Aortenvalvuloplastie und der perkutane Klappenersatz, die speziellen Indikationen vorbehalten sind (Cowell et al. 2004, O'Brien et al. 2006, Otto et al. 2008, Bonow et al. 2008).

1.3 Pathogenese

Es existieren zahlreiche Belege (O'Brien et al. 2006, Agmon et al. 2001, Aikawa et al. 2009, Freeman et al. 2009, Pellika et al. 2005, Mohler et al. 2004, Parolari et al. 2009, Laufs et al. 2005) für gemeinsame Mechanismen und Prozesse in der Pathogenese der Arteriosklerose und der Aortenklappensklerose bzw. der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung. Zu diesen gemeinsamen pathogenetischen Aspekten gehören: endotheliale Dysfunktion, Inflammation, Lipoproteinablagerungen, oxidativer Stress, die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und die Kalzifizierung (Otto et al. 1994, Olsson et al. 1994a, 1999, O'Brien et al. 1996, 2005, Wallby et al. 2002). *Abb. 3* gibt einen Überblick über die histopathologischen Abläufe nach Otto et al. (2008), die folgend einzeln erläutert werden.

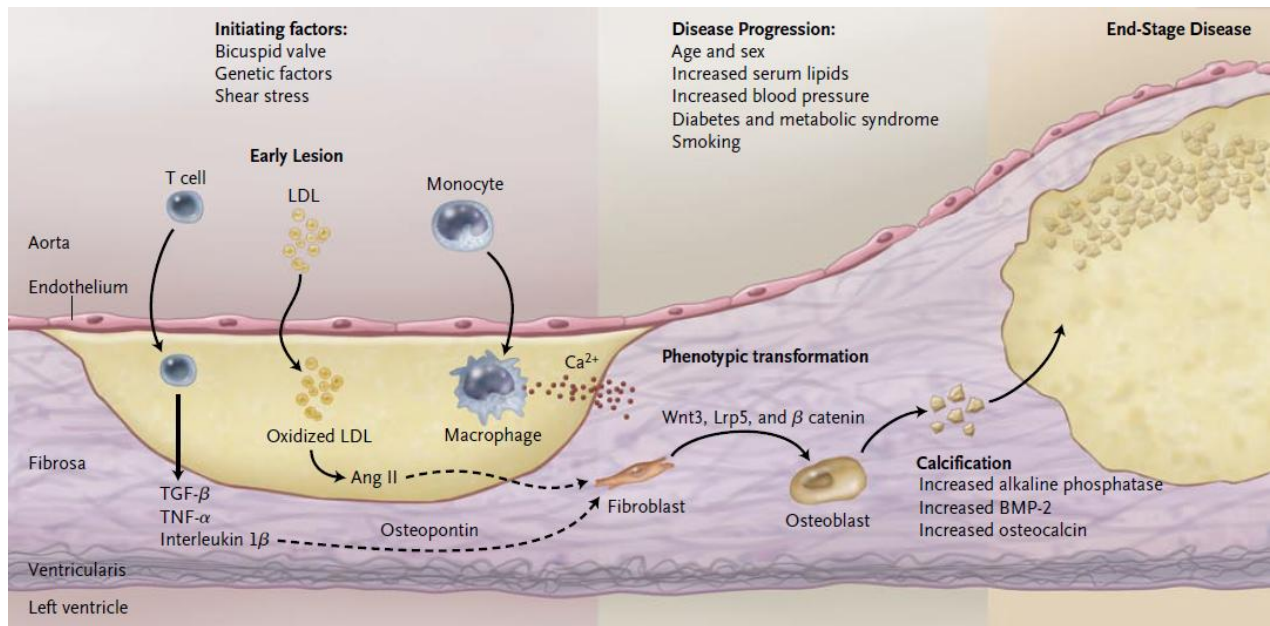


Abb. 3 Überblick über histopathologische Mechanismen zur Entstehung einer Aortenklappenstenose; entnommen aus Otto et al. (2008)

1.3.1 Endotheliale Dysfunktion

Nach Mohler et al. (2004) und Freeman et al. (2005) ist, analog zur Arteriosklerose eine Zerstörung des Endothels ein frühes Ereignis in der Pathogenese der Aortenklappenstenose. Die Manifestation der endothelialen Dysfunktion reduziert die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin, die beide für die Modulation inflammatorischer Prozesse in Gefäßen bekannt sind (Tedgui et al. 2001). Die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid ist einerseits stark mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert, andererseits korreliert sie invers mit einer erhöhten Anzahl von reaktiven Sauerstoffspezies (Miller et al. 2010).

1.3.2 Inflammation

Makrophagen und T-Lymphozyten, die für chronische Inflammation typischen Zellen, die Effektormoleküle Interleukin (IL)-2, Class II human leukocyte antigen (HLA-DR) sowie Mastzellen und die proinflammatorische Zytokine IL-1 β , Tumor-Growth-Faktor (TGF)- β , Tumornekrosefaktor (TNF)- α können als Ausdruck von Inflammation in stenosierten Aortenklappen nachgewiesen werden (Olssen et al. 1994a, 1994b, Otto et al. 1994, Helske et al. 2004, Kaden et al. 2005). Weiterhin sind eine Reihe von Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die zum Abbau der VECM fähig sind und deren natürliche Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMPs) in Läsionen der Aortenklappe vorzufinden (Kaden et al. 2003, 2005, Edep et al. 2000,

Soini et al. 2001). Auch bei der Arteriosklerose spielen MMPs eine wichtige Rolle in der Regulation der Gefäßkalzifizierung, dem Abbau extrazellulärer Matrix und anschließend auch bei der Plaqueinstabilität, die zur Plaqueruptur und kardiovaskulären Ereignissen führt (Galis et al. 1994, 1995, Nikkari et al. 1995).

Unter dem Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren wie abnormer Blutflussrheologie, kommt eine Kaskade von Prozessen in Gang, die sich vor allem an der aortalen Seite der Aortenklappe abspielt (O'Brien et al. 2006). Zum einen werden Entzündungszellen wie Monozyten rekrutiert, die aufgrund der Expression von Adhäsionsmolekülen wie vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) auf den Endothelzellen, in den subendothelialen Raum der Aortenklappe einwandern können und sich zu Makrophagen differenzieren (Ghaisas et al. 2000).

Zum anderen sind aktivierte T-Lymphozyten subendothelial anzutreffen und unterhalten das Entzündungsgeschehen durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie TGF- β 1 und IL-1 β , welche die lokale Produktion von MMPs erhöhen und damit zur Formation extrazellulärer Matrix, Remodeling und Kalzifizierung führen (Jian et al. 2003, Kaden et al. 2003).

1.3.3 Lipoproteinablagerungen

Die atherogenen Plasmalipoproteine Low Density Lipoprotein (LDL) und Lipoprotein a (Lp a), die unter anderem bei der Arteriosklerose zur Plaqueentstehung beitragen, sind ebenso in Läsionen der Aortenklappe anzutreffen (Walton et al. 1970, O'Brien et al. 1996, Olsson et al. 1999). Sie werden analog zur Arteriosklerose an Proteoglykane der extrazellulären Matrix wie Biglycan und Decorin gebunden und oxidativ modifiziert (O'Brien et al. 1998, 1995b, Olsson et al. 1999). Wie schon durch die Pathogenese der Arteriosklerose bekannt, werden auch bei der Aortenklappensklerose oxidativ modifizierte LDLs durch Makrophagen aufgenommen und zu Schaumzellen umgewandelt (Olsson et al. 1999). Zusätzlich verursachen die oxidierten LDLs im Klappengewebe die Stimulation arteriosklerotischer Prozesse wie erhöhte Inflammation, Expression der MMPs und Kalzifizierung (Otto et al. 1994, Olsson et al. 1999, Steinberg et al. 2002, Mohler et al. 1999).

1.3.4 Oxidativer Stress

Nach Rajamannan et al. (2011b) kommt es ähnlich zur Arteriosklerose in Gegenwart von kardiovaskulären Risikofaktoren zu Anomalien im oxidativen Stress. Diese Veränderungen zeigen sich in abnormen Funktionen der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase. Daraus resultiert, dass Stickstoffmonoxid unter dem physiologischen Spiegel im Aortenklappenendothel vorliegt (Rajamannan et al. 2005, 2011a). Weiterhin kommt es in kalzifizierten Klappen zur Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase bei der anstatt Stickstoffmonoxid, reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid, gebildet werden (Miller et al. 2008, Rajamannan et al. 2005). Die Spiegel von Superoxid und Wasserstoffperoxid sind in kalzifizierten Klappen deutlich erhöht (Miller et al. 2008, Weiss et al. 2006).

1.3.5 Renin-Angiotensin-System

Studien belegen die Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems, im speziellen des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE), des Angiotensins II und des Angiotensin-II-Typ-1-(AT1)-Rezeptors, an der Pathogenese der Aortenklappensklerose (O'Brien et al. 2002, Helske et al. 2004). ACE ist mit LDL co-lokalisiert und enzymatisch aktiv (O'Brien et al. 2002). Es ist in der Lage Angiotensin II zu bilden, welches AT-1-Rezeptor-abhängige und läsionsfördernde Effekte besitzt. Zu diesen Effekten gehören Inflammation, Makrophagen- und Cholesterinakkumulation, Beeinflussung der Fibrinolyse, erhöhter oxidativer Stress und die Stimulation der Fibroblastenexpression (O'Brien et al. 2002, Tiede et al. 2003, Ahmed et al. 2003).

1.3.6 Kalzifizierung

Bei der Aortenklappensklerose sind nach Freeman et al. (2005) mikroskopische Areale von Kalzifizierung co-lokalisiert zu Arealen mit Lipoproteinablagerung und inflammatorischer Zellinfiltration. Die Kalzifizierung ist ein aktiv regulierter Prozess und größtenteils verantwortlich für die hämodynamische Progression zu einer Aortenklappenstenose (Rajamannan et al. 2011b).

Eine Reihe von Proteinen wie Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) 2 und 4, Osteopontin, Rezeptor Aktivator von NF- κ B (RANK), Rezeptor Aktivator von NF- κ B Ligand (RANKL), Osteoprotegerin (OPG) sowie Alkalische Phosphatase (ALP) konnten in kalzifizierten Klappen nachgewiesen werden (O'Brien et al. 1995a, Mohler et al. 1997, 2001, Kaden et al. 2004).

Nach Miller et al. (2010) ist die Aktivierung einer proosteogenen Signalkaskade ein zentraler Punkt der Kalzifizierung. Dazu gehört unter anderem der BMP-Signalweg, der durch erhöhte Level von Phospho-Smad 1/5/8 in stenosierten Klappen nachgewiesen werden konnte (Wirrig et al. 2011). Der Mechanismus, der zu einem erhöhten BMP führt ist nicht klar. Jedoch verweisen Studien auf den nicht laminären Fluss auf der aortalen Seite der Klappe als Schlüsselinitiator der BMP 2- und 4-Sekretion des Endothels (Sucosky et al. 2009, Ni et al. 2010, Csiszar et al. 2008). Das BMP 2 ist sowohl in der Lage den Transkriptionsfaktor Msx2 hochzuregulieren als auch den Wnt3/Lrp5/ β catenin- und Runx2/Cbfa1-Signalweg zu aktivieren (Wozney et al. 1998, Shao et al. 2005). Als Folge kommt es zur phänotypischen Transformation von Fibroblasten zu Osteoblasten. Diese Transformation sowie erhöhte Spiegel von ALP, BMP 2 und Osteocalcin führen zur Kalzifizierung (Vgl. *Abb. 3* nach Otto et al. 2008).

Osteopontin (OPN) als Marker für Knochen-Remodeling stellt einen wichtigen Inhibitor der Klappenkalzifizierung dar (Steitz et al. 2002). Es wird von Osteoblasten und infiltrierten Makrophagen sowohl in Läsionen der Aortenklappe als auch in denen der Arteriosklerose ausgeschüttet (Giachelli et al. 1993, O'Brien et al. 1995a).

Nach Miller et al. (2010) beeinflussen die erhöhte RANK-Aktivität bzw. RANKL-Level die kardiovaskuläre Kalzifizierung, durch Effekte auf die zirkulierenden Zellen und die, in der Klappe ansässigen Zellen. RANKL stellt den natürlichen Liganden für RANK dar und ist in kalzifizierten arteriosklerotischen Läsionen in der Lage Monozyten zu rekrutieren sowie eine Differenzierung von Osteoklasten zu veranlassen (Byon et al. 2011).

Osteoprotegerin (OPG) als downreguliertes Protein in Läsionen der Aortenklappe, verhindert die Mineralresorption im Knochengewebe. Ebenso ist es ein löslicher Rezeptor, der als kompetitiver Hemmer von RANK an RANKL bindet und die RANK-RANKL-Interaktion inhibiert (Kaden et al. 2004). Studien an Blutgefäßen lassen spekulieren, dass OPG auch in Aortenklappen die Kalzifizierung inhibiert (Bennett et al. 2006, Morony et al. 2008).

1.4 Evaluation der Aortenklappensklerose

Miller et al. (2010) fasst 3 Methoden zur Beurteilung der Aortenklappenfunktion in Mäusen zusammen, die nach der klinischen Beurteilung als bildgebende Verfahren zur Verfügung stehen. Als erstes sei dabei die Echokardiographie genannt, die als

nicht-invasives und einfach zugängliches Verfahren die Möglichkeit bietet, die Mäuse unter minimaler Sedierung zu untersuchen. Dadurch lassen sich physiologische Störungen vermeiden, die durch allgemeine Anästhetika entstehen. Mit Hilfe des continuous- und pulse-wave Dopplers ist es möglich Blutflussgeschwindigkeiten, transvalvuläre Druckgradienten und Klappenöffnungsflächen zu bestimmen. Die Methode ermöglicht eine Einteilung der Aortenklappenfunktion in „normal“, „sklerotisch“ und „stenotisch“ vorzunehmen (Tanaka et al. 2005, Drolet et al. 2006, Barrick et al. 2009). Die hohe räumliche und zeitliche Auflösung im M-Mode Verfahren erlaubt eine quantitative Beurteilung der Aortenklappenfunktion, die gut mit den invasiven hämodynamischen Messungen korreliert (Miller et al. 2009, 2010, Weiss et al. 2006). Nachteilig an diesem Verfahren ist nach Miller et al. (2010), dass sich das Signal des Dopplers nicht immer in einer Linie, parallel zum Blutfluss, ausrichten lässt. Deshalb kann es zur Unterschätzung des Klappengradienten kommen. Insbesondere können Faktoren wie eine reduzierte linksventrikuläre Kontraktion zur Unterschätzung einer Aortenklappenstenose führen (Bonow et al. 2008). Außerdem können Alterationen am Klappengewebe Regurgitationen verursachen, die zu größeren Schlagvolumen und ventrikulären Vorlast führen. Dadurch entstehen steigende Gradienten auch ohne das Vorhandensein einer Klappenstenose (Tanaka et al. 2005). Hieraus wird ersichtlich, weshalb dieses Verfahren nicht allein als Beweis für das Bestehen einer Aortenklappenstenose genutzt werden sollte (Miller et al. 2010).

Als weitere Verfahren seien die Magnetresonanztomographie und invasive hämodynamischen Techniken genannt.

Die Aortenklappe einer erwachsenen C57BL/6-Maus hat einen systolischen Durchmesser von ungefähr 1,2 mm (Weiss et al. 2006). Die Aortenklappenstenose wird in Schweregrade nach der Klappenöffnungsfläche, der maximalen transvalvulären Flussgeschwindigkeit und dem systolischen Druckgradienten klassifiziert (Bonow et al. 2008). Eine erwachsene Maus der C57BL/6-Abstammung hat einen systolischen Aortenklappendurchmesser von ungefähr 1,2 mm, eine Klappenöffnungsfläche von 0,8-1,3 mm² und ein wenig höher (ca. 1,6 mm²), wenn zur Messung Dopplermethoden angewandt werden (Weiss et al. 2006, Barrick et al. 2009). Die normale systolische transvalvuläre Spitzenflussgeschwindigkeit einer Maus liegt bei <1,5 m/s (Barrick et al. 2009, Tanaka et al. 2005, Hinton et al. 2008). Der normale transvalvuläre Druckgradient einer Maus ist bei <10 mmHg anzusiedeln

(Barrick et al. 2009, Weiss et al. 2006). Eine Reduktion des systolischen Aortenklappenumfangs um $>50\%$ entspricht einer Reduktion der Klappenöffnungsfläche um $>75\%$ und einem transvalvuläre Druckgradienten von >50 mmHg mit hämodynamischer Relevanz (Bonow et al. 2008). Die Folgen einer hämodynamisch relevanten Aortenklappenstenose sind eine linksventrikuläre Hypertrophie sowie die eingeschränkte systolische Funktion des Herzens (Barrick et al. 2009, Weiss et al. 2006). Die korrelierenden Änderungen zwischen Aortenklappenanatomie und Doppler-Durchflussgeschwindigkeiten, abhängig vom Schweregrad der Erkrankung sind in *Abb. 4* dargestellt.

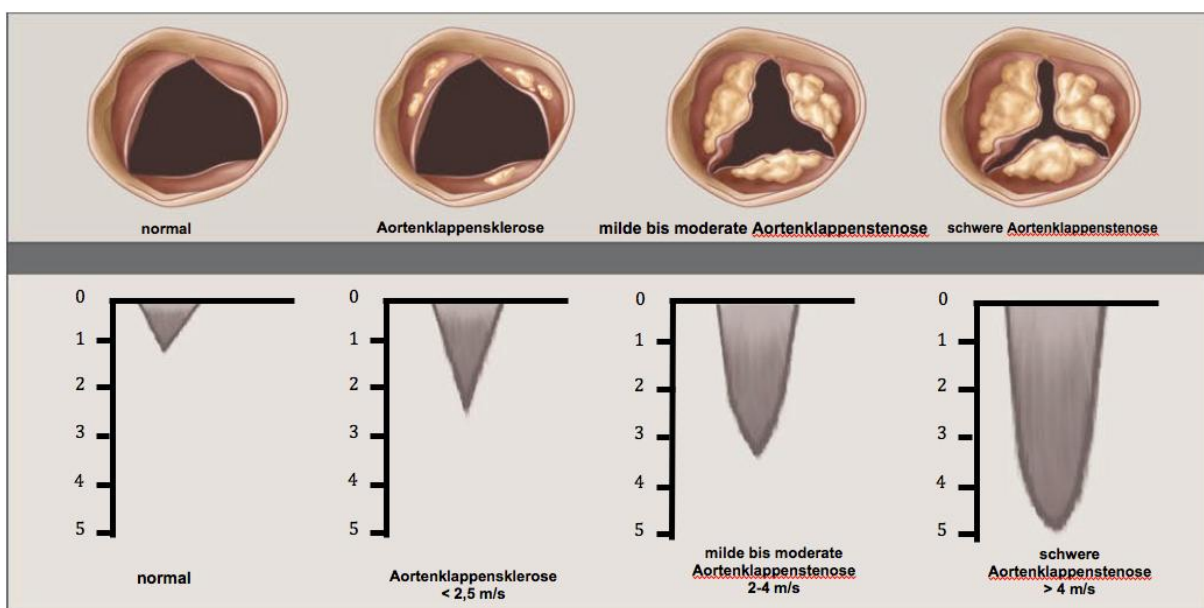


Abb. 4 Zusammenhang zwischen Aortenklappenanatomie und echokardiographisch gemessener Durchflussgeschwindigkeit durch die Aortenklappe

1.5 Tiermodell

Bis heute sind zwei experimentelle Modelle identifiziert, die stets in der Lage sind eine Aortenklappensklerose und hämodynamisch signifikante kalzifizierende Aortenklappenerkrankung hervorzurufen. Das sind auf der einen Seite das Modell der EGFR^{Wa2/Wa2}-Maus und auf der anderen Seite die Apolipoprotein B-100-Maus und die LDL-Rezeptor-knockout-(LDLR^{-/-})-Maus (Barrick et al. 2009, Miller et al. 2009, 2010).

1.6 Körperliche Aktivität

Körperliche Inaktivität stellt einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar (Hakim et al. 1998, Manson et al. 2002). Dagegen verbessert körperliches Training das Körpergewicht, den Blutdruck, die Insulinsensitivität sowie hämostatische und inflammatorische Variablen (Stewart et al. 2002, Wannamethee et al. 2002), die bekanntlich zur Entwicklung der Aortenklappensklerose beitragen (Messika-Zeitoun et al. 2007, Freeman et al. 2005, Stewart et al. 2007). In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass regelmäßiges körperliches Training die Entwicklung der Arteriosklerose verzögert und deren Progression verhindert (Hambrecht et al. 1993, 2003, Laufs et al. 2005). Thompson et al. (2003) konnten sogar zeigen, dass körperliches Training zur Prävention und Behandlung arteriosklerotisch bedingter kardiovaskulärer Erkrankungen geeignet ist. Weiterhin konnte belegt werden, dass körperliche Aktivität in der Lage ist die Störung der endothelialen Funktion zu verhindern und damit die arterielle Kalzifizierung zu reduzieren (Park et al. 2008).

1.7 Fragestellung

Wie schon durch Otto et al. (2008) postuliert ist es unerlässlich neue potentielle therapeutische Ansätze für die Behandlung von kalzifizierenden Aortenklappenerkrankungen aufzuzeigen. Dafür ist es notwendig die pathologischen Zusammenhänge zu verstehen, da diese die Grundlagen hierfür bieten. Der Umstand, dass eine Hypercholesterinämie ursächlich für Klappenkalzifizierung und Obstruktion ist, wurde als ein Ansatz zur therapeutischen Intervention gesehen. Die Assoziation von erhöhten Serumlipidspiegeln bei der kalzifizierenden Aortenstenose, Lipidakkumulationen im Klappengewebe und dem erhöhten Risiko für arteriosklerotische Endstadien führten zur Annahme, dass eine lipidsenkende Therapie die Erkrankung verlangsamen oder ihr vorbeugen kann. Deshalb versuchten zahlreiche Studien die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung medikamentös unter dem Einsatz von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Hemmern (Statinen) zu beeinflussen. Diese Statine konnten weder eine Regression der Erkrankung erzielen noch das Outcome signifikant verbessern (Cowell et al. 2005, Moura et al. 2007b, Rossebo et al. 2008, Chan et al. 2010).

Zahlreiche Studien belegen gemeinsame Mechanismen, Risikofaktoren wie z.B. körperliche Inaktivität sowie histopathologische Merkmale zwischen der Arteriosklerose und der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (O'Brien et al.

2006, Agmon et al. 2001, Aikawa et al. 2009, Freeman et al. 2005, Pellika et al. 2005, Mohler et al. 2004, Parolari et al. 2009, Laufs et al. 2005). Bereits gezeigt wurde, dass regelmäßige körperliche Aktivität in der Lage ist, die Progression arteriosklerotischer und kardiovaskulärer Erkrankungen durch Modulation der endothelialen Funktion und des oxidativen Stresses, zu verhindern (Laufs et al. 2005, Hambrecht et al. 1993, Hambrecht et al. 2003, Adams et al. 2005).

Die genannten Sachverhalte verdeutlichen, dass Prävention einen außerordentlich wichtigen Ansatzpunkt in der Therapie einer Aortenklappensklerose darstellt. Hieraus ergibt sich die Frage, ob körperliches Training ebenfalls in der Lage ist eine Aortenklappensklerose vor der Ausbildung makroskopisch erkennbarer Veränderung des Klappengewebes wie fokale Klappenverdickung und Kalzifizierung, durch regelmäßige körperliche Aktivität zu verhindern. Ziel dieser Arbeit war es deshalb den Einfluss von körperlicher Aktivität im Sinne einer Primärprävention auf die Aortenklappensklerose zu untersuchen und potentielle molekulare Mechanismen zu eruieren. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden

- Hat erhöhte körperliche Aktivität einen Einfluss auf die Entstehung einer Aortenklappensklerose, gemessen an der histologischen Verdickung der Aortenklappe?
- Gibt es eine Abhängigkeit von der Trainingsintensität?
- Welche molekularen Mechanismen sind potentiell für den protektiven Effekt des körperlichen Trainings verantwortlich?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Alle LDL-Rezeptor-knockout-(LDLR^{-/-})-Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 wurden freundlicherweise vom Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik durch Herrn Prof. J. Thiery und Herrn Prof. D. Teupser zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Tiernahrung

Standardmausfutter

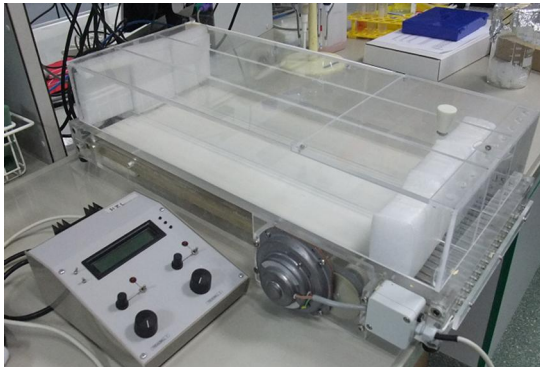
Medizinisch-Experimentelles
Zentrum der Medizinischen
Fakultät Leipzig

0,15% Cholesterin-Diät (Western Type Diet)

Altromin, Lage

2.1.3 Trainingsgerät

Das Laufband wurde von der „Norwegian University of Science and Technology (NTNU)“ in Trondheim, Norwegen angefertigt (Abb. 5). Es bestand aus 3 durch Plexiglas abgetrennten Abteilen zum Laufen. Zur Vermeidung von Verletzungen der



Tiere wurden Styroporwürfel zugeschnitten und jeweils an Anfang und Ende des Bandes eingesetzt. Damit konnten Lücken zwischen der Plexiglasverkleidung und dem Laufband geschlossen werden, in die die Tiere sonst hätten hineingeraten können. Die Geschwindigkeit war stufenlos regelbar.

Abb. 5 Trainingsgerät für die Tiere inklusive Steuereinheit

2.1.4 Chemikalien und Lösungen

Aldehydfuchsin

Sigma, Deisenhofen

Alzianblau

Sigma, Deisenhofen

Antibody Diluent

Dako, Hamburg

BSA Albumin Fraktion V

Roth, Karlsruhe

DAB Chromogen

Dako, Hamburg

DHE

Invitrogen, Darmstadt

Entelan	Roth, Karlsruhe
Eosin G	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Hämälau nach Mayer	Merck, Darmstadt
HCl	Roth, Karlsruhe
Kandabalsam	Roth, Karlsruhe
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Kodan Tinktur forte	Schüle&Mayr, Norderstedt
Natriumthiosulfat-Lösung	Roth, Karlsruhe
OCT Compound	Sakura, Niederlande
Paraffin	Roth, Karlsruhe
PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
137mM NaCl	Roth, Karlsruhe
2,7mM KCl	Roth, Karlsruhe
8,1 mM Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
1,76 mM KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Silbernitratlösung 5%ig	Sigma, Deisenhofen
Sonogel	Sonogel Vertriebs-GmbH, Bad Camberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.5 Pharmaka

Heparin-Na 25.000 IE	Ratiopharm, Ulm
Ketaminhydrochlorid	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Midazolamhydrochlorid	Ratiopharm, Ulm
Xylazinhydrochlorid	Bayer HealthCare, Leverkusen

2.1.6 Antikörper und Assay-Kits

CSA II Biotin-free Tyramide Signal Amplification System (Code K1497)	Dako, Hamburg
CSA II Rabbit Link (Goat Anti-Rabbit-HRP)	Dako, Hamburg

EnzymChrom Cholesterol Assay Kit (ECCH-100)	Bioassay Systems, USA
Goat Anti-Rat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, USA
Monoclonal Anti-actin, α -smooth muscle 1A4	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ELISA-Kit für murines Fetuin-A	R&D Systems, Wiesbaden
Rabbit Polyclonal Anti-Mouse NOS-3	Santa Cruz Biotechnology, USA
Rabbit Polyclonal Anti-Alkaline-Phosphatase	Abcam, Großbritannien
Rabbit Polyclonal Anti-HOCl-ox-LDL	Calbiochem, Darmstadt
Rabbit Polyclonal Anti-Osteopontin	Acris Antibodies, Herford
Rabbit Polyclonal Anti-Osteoprotegerin	Abbiotec, USA
Rat Monoclonal Antibody Against Mouse Mac3	BD Biosciences, USA

2.1.7 Material für molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation:

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
-----------------	----------------

Reverse Transkription:

Sensiscript RT Kit	Qiagen, Hilden
--------------------	----------------

RTQ-PCR:

dNTP	Roth, Karlsruhe
------	-----------------

Primer-Mix	Tib Molbiol, Berlin
------------	---------------------

MgCl ₂	Invitrogen, Darmstadt
-------------------	-----------------------

HPLC-Wasser	Roth, Karlsruhe
-------------	-----------------

Nicht-acetyliertes BSA	Sigma, Deisenhofen
------------------------	--------------------

Random Hexamers	Invitrogen, Darmstadt
-----------------	-----------------------

SYBR-Green	Invitrogen, Darmstadt
------------	-----------------------

Taq-Polymerase Platinum Taq	Invitrogen, Darmstadt
-----------------------------	-----------------------

2.1.8 Geräte, Instrumente und Gebrauchswaren

Aesculap FM 2 Pinzette	B.Braun, Melsungen
------------------------	--------------------

Aesculap FM 10 Schere	B.Braun, Melsungen
-----------------------	--------------------

Aesculap 0C022-R Pinzette	B.Braun, Melsungen
---------------------------	--------------------

Axioplan-2-Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
---------------------------------	-------------------

Axio Kamera MRC5	Zeiss, Oberkochen
------------------	-------------------

Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
-----------------------	-------------------

Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik, München
--------------------------------------	---------------------------

BD Plastipak 1ml Spritzen	BD, USA
BD 30G Eclipse Injektionsnadel	BD, USA
BioRad iQ5 Multicolor Real-Time PCR DS	BioRad Laboratories, USA
Einbettautomat Tissue-Tek VIP	Sakura, Niederlande
Irisschere BC 060R	B.Braun, Melsungen
Kühlplatte COP 30	Medite, Burgdorf
Lambda Scan 200 Spektrometer	MWG-Biotech, Ebersberg
Light Cycler	Roche Diagnostics Inc., Mannheim
Light Cycler-Kapillaren	Roche, Grenzach-Wyhlen
Microm HM 500 OM	MICROM International, Walldorf
Microm Mikrotom	MICROM International, Walldorf
Micotome Knives Low Profile	C.L. Sturkey Inc., USA
Menzel-Gläser Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Ultraschalleinheit Sonos 5500	Agilent, Böblingen

2.1.9 Software

Analysis 3.0	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster
Axio Vision Vs 40V 4.6.3.0	Zeiss, Jena
GraphPad InStat Version 3.01	GraphPad Software, USA
GraphPad Prism Version 3.00	GraphPad Software, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Wie aus *Abb. 6* ersichtlich wird, wurden die LDLR^{-/-}-Mäuse in 4 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe stellte die Kontroll-Gruppe dar, welche über die 4. Lebenswoche hinaus das Standardmausfutter erhielt und einen bewegungsarmen Lebensstil führte. Die zweite Gruppe erfuhr im Alter von 4 Wochen einen Diätwechsel von Standardmausfutter auf die 0,15%-ige Cholesterin-Diät und führte wie auch schon die Kontroll-Gruppe einen bewegungsarmen Lebensstil. Auch die dritte Gruppe erhielt ab der 4. Woche die Cholesterin-Diät, begann jedoch gleichzeitig mit einem regelmäßigen körperlichen Training fünfmal in der Woche für 60 Minuten auf dem

Laufband (Regelmäßige Trainingsgruppe). Die vierte Gruppe erhielt ebenfalls die Cholesterin-Diät und trainierte ab dem Alter von 4 Wochen einmal pro Woche für 60 Minuten auf dem Laufband (Gelegentliche Trainingsgruppe).

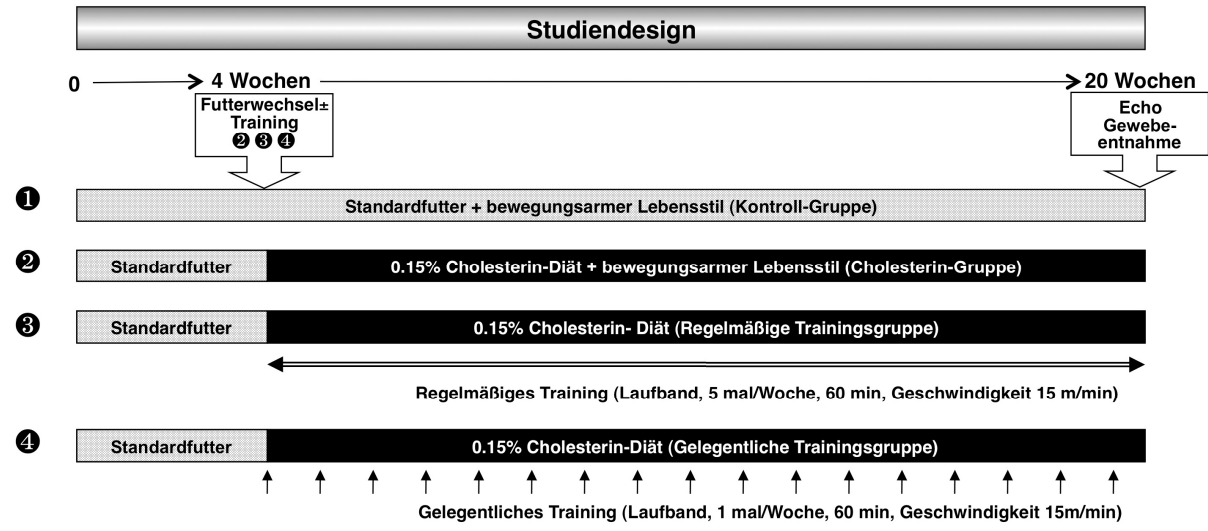


Abb. 6: Studiendesign

Die mit 1 markierte Gruppe zeigt die Kontroll-Gruppe, die mit 2 markierte Gruppe die Cholesterin-Gruppe, die mit 3 markierte Gruppe die Regelmäßige Trainingsgruppe, die mit 4 markierte Gruppe die Gelegentliche Trainingsgruppe. Dargestellt ist außerdem der Studienzeitraum, in dem nach 4 Wochen ein Futterwechsel in den Gruppen 2,3, und 4 und der Beginn des Trainings in den Gruppen 3 und 4 stattfand. In der 20. Lebenswoche wurden Echokardiographien angefertigt und das Gewebe für weitere Untersuchungen entnommen.

Nach Abschluss eines 16-wöchigen Trainingsintervalls der beiden Trainingsgruppen und dem bewegungsarmen Lebensstil der Kontroll- und Cholesterin-Gruppe wurden im Alter von 20 Wochen Echokardiographien zur Bestimmung der Aortenklappendurchflussgeschwindigkeiten und der Ventrikelgröße durchgeführt. Während der darauf folgenden Gewebeentnahme wurde Serum für die biochemischen Blutanalysen der Cholesterin- und Fetuin-A-Konzentration gewonnen. Anschließend wurde von einem Teil der Tiere aus der Kontroll-Gruppe, der Cholesterin-Gruppe und der regelmäßigen Trainingsgruppe das präparierte Herz in Formalin fixiert, um anschließend Paraffinschnitte herzustellen. An diesen Schnitten wurden eine HE-Färbungen der Aortenklappe, von Kossa- und Picrosiriusrot-Färbungen sowie die immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt. Der andere Teil wurde für Gefrierschnitte genutzt, aus denen RTQ-PCR und DHE-Färbungen angefertigt wurden. Aus den präparierten Mäuseherzen der

gelegentlichen Trainingsgruppe wurden nur Paraffinschnitte angefertigt für die bereits genannten Färbungen und immunhistochemischen Methoden. Durch die *Abb. 7* soll ein Überblick über die in dieser Arbeit angewandten Methoden und Untersuchungen gegeben werden.

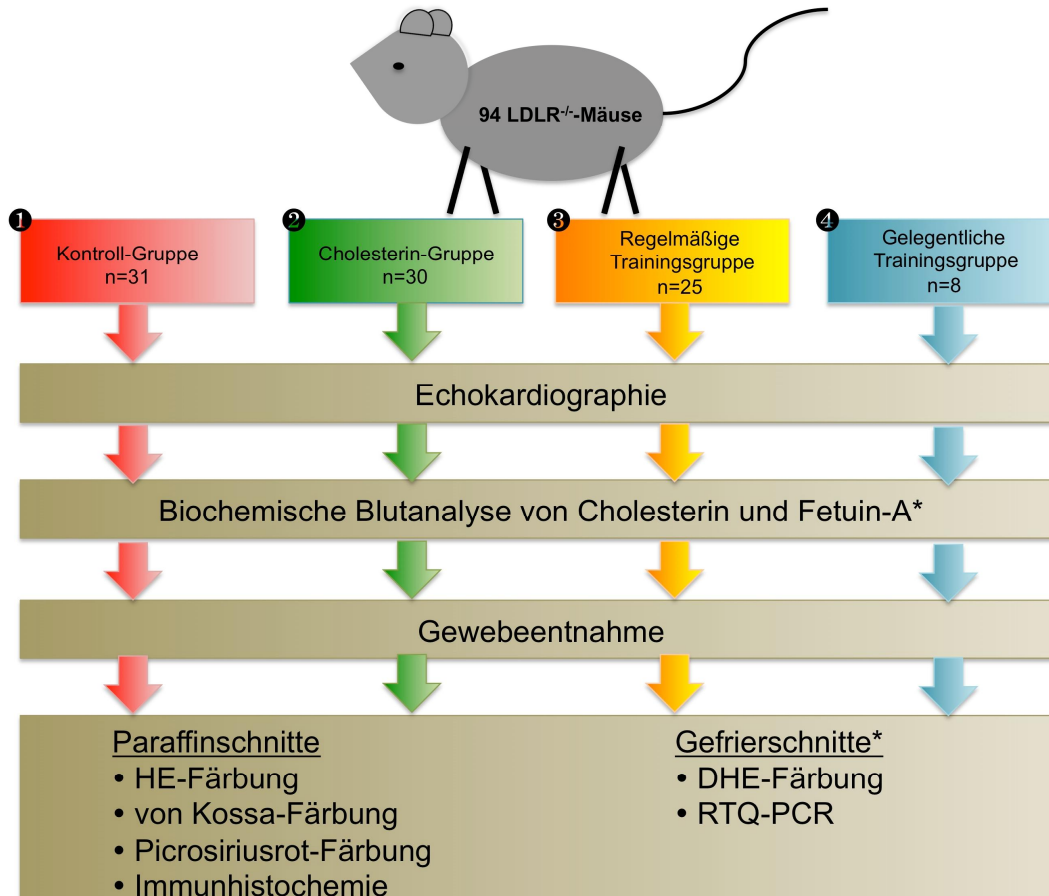


Abb. 7: Methodenübersicht

*Methoden die in Gruppe 4 nicht durchgeführt wurden.

2.2.2 Mausmodell und Haltungsbedingungen

Die Studie wurde an C57BL/6-Mäusen beider Geschlechter mit ausgeschaltetem LDL-Rezeptor nach den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Die Tiere wurden im Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Leipzig unter pathogenfreien Umgebungsbedingungen, in einem Raum mit einem 7 Uhr / 19 Uhr hell/dunkel Rhythmus, untergebracht. Sie lebten, abgesehen von der Dauer des Trainings, in einem Käfig, getrennt nach Wurf und Geschlecht und ihnen stand rund um die Uhr das jeweilige Futter und Leitungswasser zur Verfügung. Diese Verfahren und Haltungsbedingungen wurden durch die Landesdirektion Leipzig des Freistaates Sachsen im Tierversuchsantrag (TVV 26/07) geprüft und genehmigt.

2.2.3 Trainingsprotokoll

Die Mäuse der beiden Trainingsgruppen wurden eine Woche vor Trainingsbeginn langsam durch kurzes Lauftraining auf dem Laufband an das sich anschließende Training vorbereitet. Sie begannen mit 10 Minuten für drei Tage und anschließend mit 15 Minuten für zwei Tage jeweils bei einer Geschwindigkeit von 15 m/min. Das regelmäßige Training fand fünfmal die Woche, für jeweils eine Stunde pro Tag, über 16 Wochen statt. Das gelegentliche Training fand einmal in der Woche, für eine Stunde pro Tag, über 16 Wochen statt. Ein Trainingstag bestand aus 60 Minuten Laufen mit einer Geschwindigkeit von 15 m/min gegen eine 5° Steigung des Laufbandes. Jeweils in 15-minütigen Intervallen fand eine zweiminütige Pause statt in der das Laufband ruhte.

2.2.4 Echokardiographie

In der 20. Lebenswoche der LDLR^{-/-}-Mäuse wurden Echokardiographien zur Bestimmung der Durchflussgeschwindigkeiten an der Aortenklappe und zur Bestimmung der Ventrikelgröße angefertigt. Zur Sedierung wurde den Mäusen 0,15 mg Midazolam intraperitoneal verabreicht. Mit Hilfe von Pflasterstreifen wurden die Mäuse an den Extremitäten auf einer festen Unterlage in Rückenlage fixiert. Zur verbesserten Schallübertragung wurde der Thorax in dem betreffenden Areal rasiert und mit einem Ultraschallgel versehen. Es wurde das Sonos 5500 Echokardiogramm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit einem 12 MHz-Phased-Array-Schallkopf für die Untersuchungen verwendet. Die Untersuchungen wurden von einem erfahrenen Untersucher, Herrn Dr. Y.. Matsumoto, durchgeführt und dokumentiert.

2.2.5 Gewebeentnahme und Fixation

Nach Abschluss der Echokardiographie verabreichte man den Mäusen 5 mg Ketaminhydrochlorid sowie 0,25 mg Xylazinhydrochlorid intraperitoneal zur Narkotisierung. Mittels Pflasterstreifen wurden die Mäuse in Rückenlage fixiert und die Narkosetiefe durch Test auf externe Reaktionen überprüft. Das restliche Fell wurde mittels Einwegrasierer entfernt und anschließend unter Zuhilfenahme von Octenisept alle Fellreste beseitigt und eine Desinfektion durchgeführt. Zur Entnahme der Herzens wurde als erstes eine mediane Längslaparatomie mit anschließend verlängerter Thorakotomie mittels Präparierschere durchgeführt. Für eine bessere

Übersicht sorgten zwei an den Schnitträndern angebrachte Pinzetten. Anschließend kam ein Operationsmikroskop, mit der Möglichkeit zur 24-fachen Vergrößerung für die genaue Darstellung des Herzens zur Anwendung. Es wurden 25 IE/0,05 ml Heparin apikal in die linke Herzkammer injiziert, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern. Dann wurde der rechte Vorhof inzidiert, um ca. 300 µl venöses Blut zu erhalten. Dreimal jeweils 3x1 ml PBS-Lösung wurde von apikal in die linke Kammer injiziert für die Beseitigung der restlichen Blutbestandteile von der Aortenklappe. Anschließend mussten, für die Darstellung der Aorta ascendens, mediastinales Fett und Thymusanteile beseitigt werden. Für die Anfertigung der folgenden Schnitte war es wichtig eine zur Aortenklappenebene parallele Ausrichtung auszuwählen. Dafür wurde die Aorta ascendens möglichst proximal abgesetzt, um später eine optimale Aufsicht auf die Aortenklappe zu erhalten und so unter Sicht die Klappe ausrichten zu können.

Das Herz wurde durch Abpräparation aller restlicher Strukturen, wie Venae cavae, Truncus pulmonalis, Pulmonalvenen und des Perikardes aus dem Thorax entnommen und in einer mit PBS gefüllten Petrischale weiter bearbeitet. Es fand eine nochmalige Spülung zur Beseitigung noch vorhandener Blutbestandteile statt.

Für die Paraffinschnitte wurden die Herzen für eine Dauer von 24 Stunden in 4% neutral gepufferter Formaldehydlösung stabilisiert. Anschließend wurde mittels Skalpell ein Querschnitt durch die Kammerebene so gewählt, dass er parallel zur Aortenklappenebene verläuft und der Absetzungsrand den gleichen Abstand zur Aortenklappenebene besitzt, wie der Absetzungsrand oberhalb der Aortenklappenebene durch die Aorta ascendens.

Die Herzen, die für die Gefrierschnitte vorgesehen waren, wurden unter Zuhilfenahme von Zellstoff trocken getupft und anschließend zur genauen Ausrichtung in 24-facher Vergrößerung mikroskopiert. Die linke Kammer wurde unterhalb der Aortenklappe ebenfalls wie die Aorta ascendens quer abgesetzt, um eine bessere Sicht für die spätere Ausrichtung zu erhalten. Dabei war es wichtig auch diesen Querschnitt parallel zur Klappenebene zu wählen. Das nun erhaltene Präparat der Aortenklappe wurde so ausgerichtet, dass die Klappenebene parallel zur Präparatoberfläche mittig im Präparat steht und so eine optimale Ansicht von oben auf das zukünftige Präparat erfolgen kann. Zudem sind damit zur Klappenebene parallele Schnitte möglich.

Die Entnahmevorgänge wurden von einem erfahrenen Präparator, Dr. Y. Matsumoto, durchgeführt. Die fertig zugeschnittenen Präparate wurden in einer mit OCT gefüllten Einbettwanne ausgerichtet und unter Beseitigung aller Lufteinschlüsse mit flüssigem Stickstoff abgekühlt. Zur dauerhaften Kühlung wurden die erhaltenen Präparate bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.6 Biochemische Blutanalyse

2.2.6.1 Serumgewinnung

Venöses Blut, welches durch Heparin-Natrium ungerinnbar gemacht wurde, wurde wie unter Punkt 2.2.5 *Gewebeentnahme und Fixation* beschrieben, gewonnen. Anschließend wurde durch Zentrifugation das Blutserum hergestellt. Dieses wurde ebenfalls unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff abgekühlt und bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.2.6.2 Kolorimetrische Messung der Cholesterinkonzentration

Für die Bestimmung der Cholesterinkonzentration in dem gewonnenen Serum wurde eine kolorimetrische Messung angewandt. Cholesterin liegt im Blut zur Mehrzahl als Cholesterolester vor, ein Fakt den sich das verwendete EnzymChrom™ Cholesterol Assay Kit (ECCH-100, Bioassay Systems, Hayward, USA) zu Nutze macht. Es beruht auf der Hydrolyse von Cholesterolestern durch Cholesterolesterase zu freiem Cholesterol. Das Enzym Cholesterol-Dehydrogenase katalysiert nun die Umwandlung vom entstandenen Cholesterol zu Cholest-4-ene-3-one, wodurch zusätzlich NAD zu NADH reduziert wird. Das entstandene NADH wird durch quantitative kolorimetrische Messung bei einer Absorption von $\lambda=570$ nm mittels Mehrkanalspektrometer gemessen und ist direkt proportional zur Cholesterinkonzentration. Durchgeführt wurde die Messung wie vom Hersteller vorgeschrieben.

2.2.6.3 ELISA für Fetuin-A-Konzentration

Zur Bestimmung der Fetuin-A-Konzentration wurde das gewonnene Serum mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Kit für murines Fetuin-A der Firma R&D Systems untersucht. Dabei handelt es sich um ein Sandwich-ELISA bei dem wie von Luttmann et al. (1999) die folgenden schematischen Schritte durchlaufen werden. Auf einer mit Fängerantikörper beschichteten Mikrotiterplatte

werden die Serumproben aufgetragen. Das gewünschte Antigen wird von den Fängerantikörpern gebunden und restliches Material in einem Waschschrift beseitigt. Anschließend wird ein enzymgekoppelter Detektionsantikörper hinzugegeben, welcher das Antigen an einem anderen Epitop bindet. Als Enzym wird dabei in der vorliegenden Arbeit Peroxidase genutzt, welche nach Zugabe eines Substrates (Tetramethylbenzidin) einen Farbumschlag entwickelt, der photometrisch gemessen werden kann und proportional zur Menge des Antigens ist. Bei der Durchführung richteten sich die Arbeitsschritte nach Angaben des Herstellers.

2.2.7 Histologische Methoden

2.2.7.1 Paraffinschnitte

Nach der Gewebeentnahme, der Fixation in 4% Formaldehydlösung und mikroskopischer Begutachtung für einen aussagekräftigen Zuschnitt sowie deren Ausrichtung, wurden die Aortenklappenpräparate in Einbettkassetten eines Einbettautomaten (Tissue-Tek VIP, Sakura, Japan) gelegt, der automatisch den Vorgang der Einparaffinierung mittels flüssigem Paraffin übernahm. In *Tab. 1* sind der Ablauf mit zugehörigen Inkubationszeiten und Temperaturen veranschaulicht.

Stadium	Medium	Inkubationszeit [h]	Temperatur
1	Ethanol 50%ig	01:00	35 °C
2	Ethanol 70%ig	01:00	35 °C
3	Ethanol 80%ig	01:00	35 °C
4	Ethanol 96%ig	01:00	35 °C
5	Ethanol 96%ig	01:00	35 °C
6	Ethanol 100%ig	01:00	35 °C
7	Ethanol 100%ig	01:00	35 °C
8	Xylol 100%ig	00:30	35 °C
9	Xylol 100%ig	00:30	35 °C
10	Paraffin	00:30	60°C
11	Paraffin	00:30	60°C
12	Paraffin	01:00	60°C
13	Paraffin	01:00	60°C

Tab. 1: Stadien der Paraffinierung mit Inkubationszeiten und Temperaturen im Einbettautomat

Anschließend wurde der erhaltene Paraffinblock in ein Mikrotom eingespannt und in 4 µm dicke Serienschnitte geteilt. Daraus wird ersichtlich, weshalb die vorherige mikroskopische Ausrichtung von so enormer Bedeutung war. Da nur alle 3 Taschen der Aortenklappe sichtbar werden, wenn genau parallel zur Klappenebene ausgerichtet wurde. Anschließend wurden die Schnitte in eine auf 55°C beheizten, mit Wasser gefüllten Wanne gelegt und gestreckt. Die so gewonnenen Schnitte konnten nun unter mikroskopischer Sicht mittels eines Pinsels auf einen Glasobjektträger aufgetragen und ausgerichtet werden. Danach wurden sie auf einem Wärmebänkchen getrocknet und waren anschließend lagerungsfähig. Um sie zugänglich für die folgenden Färbemethoden und immunhistochemischen Untersuchungen zu machen, mussten sie entparaffiniert und rehydriert werden. Die Entparaffinierung erfolgte in drei separaten Xylollösungen für jeweils 10 Minuten. Die anschließende Rehydrierung wurde durch eine absteigende Alkoholreihe (100%-, 95%-, 70%-, 50%-Ethanol) jeweilig für 5-10 Minuten erreicht. Zum Abschluss wurden sie für 2 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die anschließende morphologische Beurteilung der Aortentaschendicke wurden die Paraffinschnitte wie unter Punkt *2.2.7.1 Paraffinschnitte* beschrieben, der Entparaffinierung und Rehydrierung unterzogen und mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dafür waren nacheinander die folgenden Schritte notwendig:

- Färben in Hämalaun nach Mayer für 10 Minuten
- Bläuen in warmen Leitungswasser für 10 Minuten
- Kurz Spülen in 0,1%ige HCl-Lösung
- Färben in 0,25%igen wässrigen Eosin G für 5 Minuten
- Spülen mit Aqua dest.
- Waschen in aufsteigender Alkoholreihe (70%-, 95%-, 100%-Ethanol)
- 3 mal: Spülen in separater Xylollösung für 3 Minuten
- Eindecken mit Entelan

Das Ergebnis der Färbung sind durch Hämatoxylin blaugefärbte Zellkerne und durch Gegenfärbung mit Eosin rotgefärbtes Zytoplasma. Zur Vermeidung von Farbunterschieden wurden alle Schnitte in einem Versuchsdurchlauf angefertigt.

2.2.7.3 Von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung wurde in dieser Arbeit zur Darstellung von Mineralisationen genutzt. Sie ist in der Lage kalkhaltige Bereiche braunschwarz und Kerne entsprechend der Gegenfärbung rot zu färben. Kalzium in den Karbonaten und Phosphaten wird gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber durch den Einfluss von Tageslicht reduziert werden.

Paraffinschnitte wurden wie bereits unter Punkt 2.2.7.1 *Paraffinschnitte* beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Im Anschluss wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Hydratisierung mit Aqua dest.
- Färben in 5% wässriger Silbernitratlösung für 10-20 Minuten im Sonnenlicht
- Spülen mit Aqua dest.
- Fixieren in 5% Natriumthiosulfatlösung für 2 Minuten
- Spülen mit Aqua dest.
- Gegenfärben der Kerne mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat für 3 Minuten
- Spülen mit Aqua dest.
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70%-, 95%-, 100% Ethanol)
- 2 mal: Spülen in separater Xylollösung für 3 Minuten
- Eindecken in Kanadabalsam

Als Negativkontrolle wurden Schnitte 30 Minuten vor der von Kossa-Färbung mit 10%iger Ameisensäure behandelt, welche eine Auswaschung der kalkhaltigen Areale zur Folge hatte. Es wurden alle Schnitte in einem Versuchsdurchlauf angefertigt, um Unterschiede in Farbintensitäten zu vermeiden.

2.2.7.4 Picrosiriusrot-Färbung

Die Picrosiriusrot-Färbung wurde zur Darstellung von Kollagen für die Beurteilung von Fibrosierungen der Aortenklappen genutzt. Unter dieser Färbemethode stellen sich Kollagenfasern Typ I rot bis gelb, elastische Fasern violett und Kerne braun dar. Die dafür vorgesehenen Paraffinschnitte wurden wie unter Punkt 2.2.7.1 *Paraffinschnitte* zuvor entparaffiniert, rehydriert und anschließend folgenden Schritten unterzogen:

- Quellen mit Leitungswasser für 10 Minuten
- 10 mal: kurz Spülen in 3% Essigsäure
- Färben mit 1% Alzianblau-Lösung für 30 Minuten
- Spülen mit Leitungswasser für 3 Minuten
- 10 mal: kurz Spülen mit 70% Ethanol
- Einwirken in Aldehydfuchsin für 45 Minuten
- 3 mal: kurz Spülen mit 70% Ethanol
- Spülen mit Leitungswasser für 3 Minuten
- Färben mit Weigerts Hämatoxylin für 10 Minuten
- Spülen mit Leitungswasser für 3 Minuten
- Färben mit 0,1% Picosiriusrot für 30 Minuten
- Kurz Waschen mit 0,01% HCl
- 2 mal: Dehydrieren mit 96% Ethanol für 5 Minuten
- 2 mal: Dehydrieren mit 100% Ethanol für 5 Minuten
- 2 mal: Waschen mit Xylollösung für 5 Minuten
- Eindecken mit Entelan

Um Unterschieden in der Farbtintensität vorzubeugen wurden alle Färbungen in einem Versuchsdurchlauf angefertigt.

2.2.7.5 Gefrierschnitte

Die in OCT eingebetteten Aortenklappenpräparate wurden durch ein Kryomikrotom bei einer Temperatur von -20°C in eine Schichtdicke von $30\ \mu\text{m}$ geschnitten. Vorher war es notwendig die zuvor bei -80°C im Gefrierschrank gelagerten Präparate auf die Betriebstemperatur des Kryomikrotoms von -20°C zu erwärmen, um Risse durch die zu hohe Festigkeit der Präparate zu vermeiden. Die Herstellung der Gefrierschnitte fand unter mikroskopischer Kontrolle (Vergrößerung 100fach) nach jedem Schneidevorgang statt, um die gewünschten Schnittebenen, in denen alle 3 Taschen der Klappe sichtbar wurden zu identifizieren. Nur diese fanden Verwendung für die nachfolgenden Untersuchungen. Anschließend wurden die Schnitte wieder bei -80°C im Gefrierschrank gelagert bis sie zur Verwendung aufgetaut werden konnten.

2.2.7.6 Dihydroethidium-Färbung

Wie in Weiss et al. (2006) beschrieben, dient die DHE-Färbung zur Darstellung von reaktiven Sauerstoffspezies und ist somit ein Monitor für oxidativen Stress. Durch Superoxidanionen wird DHE zu Oxyethidium umgewandelt, welches rot fluoresziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden kann. Als Grundlage wurden aufgetaute Gefrierschnitte, in denen die 3 Taschen der Aortenklappe sichtbar waren, verwendet. Die Schnitte wurden bei 37°C mit DHE (10 µmol/l) und PBS in Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie fluoreszenzmikroskopisch betrachtet und fotografiert.

2.2.8 Histologische Evaluation

2.2.8.1 Evaluation der Aortenklappentaschendurchmesser

Für die Quantifizierung der Durchmesser der Aortenklappentaschen wurde ein computerassistiertes Bildanalyseverfahren Analysis 3.0 der Firma Olympus Soft Imaging Solutions GmbH verwendet. Grundlage bildeten wie durch Aikawa E et al. (2007) beschrieben, die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte, die unter mikroskopischer Vergrößerung fotografiert und so der Software zugänglich gemacht wurden. Dabei wurden diejenigen Schnitte selektiert auf denen alle 3 Taschen der Aortenklappe angeschnitten waren. Für die Ermittlung des Durchmessers wurde aus 5 in gleichem Abstand verteilten Messungen ein Durchschnittswert für jede der 3 Taschen einer Aortenklappe gemittelt. Um am Ende einen Messwert für jede Aortenklappe zu erhalten, wurde aus den 3 erhaltenen Werten ebenfalls der Durchschnitt errechnet.

2.2.8.2 Evaluation der histologischen Färbungen

Zur Quantifizierung der von Kossa-, Picosiriusrot- und DHE-Färbungen wurde ein wie durch Göser et al. (2005) beschriebenes, in *Tab. 2* dargestelltes Graduierungssystem verwendet. Dabei erfolgte die Einteilung nach dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Zellen in die Grade 0 bis 5 lichtmikroskopisch durch zwei unabhängige Untersucher. Für die Darstellung der Ergebnisse in Diagrammen wurden diese Grade einem pathologischen Score gleichgesetzt.

Graduierung	Anteil positiv gefärbter Zellen
Grad 0	keine
Grad 1	≤ 5%
Grad 2	6% - 10%
Grad 3	11% - 30%
Grad 4	31% - 50%
Grad 5	> 50%

Tab. 2: Einteilung der immunhistochemischen Färbungen in Grad 0 bis 5 nach dem Anteil der positiv gefärbten Zellen in Schnitten der Aortenklappe

2.2.9 Immunhistochemische Methoden

Die Immunhistochemie beruht auf der Darstellung von Gewebebestandteilen mit Hilfe von Antikörpern. Dem Prinzip liegt eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu Grunde. Das Antigen stellt einen spezifischen Gewebebestandteil dar, der sichtbar gemacht werden soll. In den folgenden Untersuchungen wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie angewandt, bei der ein Primärantikörper spezifisch an den zu visualisierenden Bestandteil im Gewebe bindet. Die Untersuchung umfasste als Bestandteile des Aortenklappengewebes die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), Mac3, α -smooth-muscle-actin (α SMA), Alkalische Phosphatase (ALP), oxidierte Low Density Lipoproteine (ox-LDL), Osteopontin (OPN) und Osteoprotegerin (OPG). Dafür wurden die aus der *Tab. 3* hervorgehenden Primärantikörper in angegebener Verdünnung mit Antibody Diluent with Background Reducing Component mit dem Klappengewebe in der vom Hersteller angegebenen Weise inkubiert.

Primärantikörper	Verdünnung	Zielantigen
rabbit polyclonal anti-mouse NOS-3 antibody	1:20 000	eNOS
rat monoclonal antibody against mouse Mac3	1:5000	Mac3
α -smooth muscle actin 1A4	1:850	alphaSMA
rabbit polyclonal antibody against alkaline phosphatase	1:150	ALP
rabbit polyclonal anti-HOCl-ox-LDL	1:3000	ox-LDL
rabbit polyclonal anti-osteopontin	1:1000	OPN
rabbit polyclonal anti-osteoprotegerin	1:500	OPG

Tab. 3: Übersicht für die in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper mit Verdünnung und Zielantigen

An die Primärantikörper wurden anschließend enzymgekoppelte Sekundärantikörper gebunden, die im Falle eines primären Mausantikörpers zusammen mit den restlichen Reagenzien aus einem CSA II Biotin-free Tyramide Signal Amplication System (Code K1497) der Firma DakoCytomation stammten oder im Falle eines anderen Primärantikörpers, separat von einem Hersteller angefordert wurden. Die Sekundärantikörper waren Merretichperoxidase-(HRP)-gekoppelt. Als Sekundärantikörper wurden abhängig vom Primärantikörper Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper bei primärem Kaninchen-Antikörper, Ziegen-Anti-Ratten-Antikörper bei primärem Ratten-Antikörper und die Anti-Maus-Antikörper des genannten CSA II-Systems im Falle des primären α -smooth muscle actin 1A4 genutzt. Anschließend konnte mit Hilfe der Merretichperoxidase als Katalysator Fluoreszein-Tyramid oxidiert werden, dass die Ausfällung auf die Probe in naher Umgebung zum nachzuweisenden Antigen zur Folge hatte. Ein peroxidasegebundener Anti-Fluoreszein-Antikörper diente zum Nachweis des ausgefällten Fluoreszeins. Als Chromogensubstrat nutzte man Diaminobenzidin, welches nach Umsetzung durch die Peroxidase zu einem lichtmikroskopisch nachweisbaren braunem Produkt reagierte.

Für die angewandte Methode wurden Paraffinschnitte, wie unter Punkt 2.2.7.1 *Paraffinschnitte* beschrieben, zuvor einer Entparaffinierung und Rehydrierung unterzogen. Der schematische Ablauf ist in *Abb. 8* verdeutlicht und wurde nach Vorgaben des Herstellers ausgeführt.

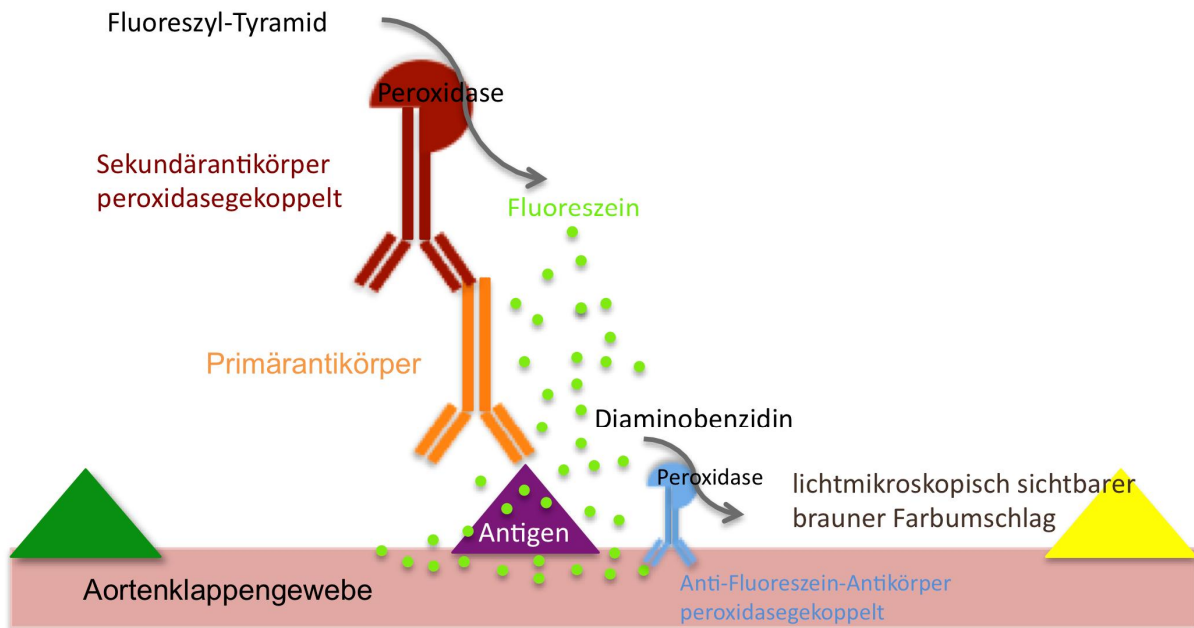


Abb. 8: Schema der immunhistochemischen Nachweismethode

An das nachzuweisende Antigen bindet ein spezifischer Primärantikörper, der durch einen peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper spezifisch gebunden wird. Nach Zugabe von Fluoreszyl-Tyramid lagert sich das durch die Peroxidase entstandene Fluoreszein in der Antigenumgebung ab. Dieses abgelagerte Fluoreszein wird durch einen peroxidasegekoppelten Anti-Fluoreszein-Antikörper gebunden und nach Zugabe von Diaminobenzidin entsteht hieraus ein lichtmikroskopisch nachweisbares braunes Produkt.

2.2.10 Immunhistochemische Evaluation

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase als Marker für Endothelzellen wurde für die Darstellung der Endothelintegrität quantifiziert. Dafür wurden wie schon durch Arishiro et al. (2007) beschrieben, mit Hilfe des computerassistierten Bildanalyseverfahrens Analysis 3.0 (Olympus Soft Imaging Solutions) die eNOS-positiven Bereiche der Aortenklappenoberfläche ausgemessen und als Ratio in Prozent gegen den Gesamtumfang der Aortenklappenoberfläche aufgetragen. Zur Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen für Mac3, α -SMA, ALP, ox-LDL, OPN, OPG der Aortenklappenschnitte, wurde ebenfalls das unter Punkt 2.2.8.2 *Evaluation der histologischen Färbungen* vorgestellte Modell nach Göser et al. (2005) verwendet (Vergleich Tab. 2).

2.2.11 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden Untersuchungen wurden zur Analyse der Genexpression angefertigt. Sie dienen dem quantitativen Nachweis auf molekularer Ebene. Dafür musste als erstes messengerRNA aus den Aortenklappentaschen gewonnen werden. Aus der messengerRNA musste anschließend durch Reverse Transkription, die komplementäre DNA für die folgende Real-Time-quantitative-Polymerasekettenreaktion gebildet werden, da die DNA-Polymerase in diesem Verfahren nur DNA als Template nutzen kann.

2.2.11.1 RNA-Isolation

Zur Gewinnung von RNA wurden Gefrierschnitte der Aortenklappen genutzt. Die für unsere Untersuchungen interessante messengerRNA macht von der gewonnenen Gesamt-RNA, bestehend aus messengerRNA, transportRNA, smallRNA und diversen anderen RNA-Molekülen, ca. 2% aus. Das ist für die RTQ-PCR ausreichend. Um möglichst repräsentatives Klappenmaterial zu nutzen, sind nur diejenigen Schnitte ausgewählt worden, in denen alle 3 Taschen der Klappe angeschnitten waren. Es kam nur das Gewebe der Taschen, ohne das restliche umgebende Gewebe zur Anwendung. Dafür wurden die Taschen mikroskopisch mit einer 30 G Kanüle vom übrigen Gewebe befreit. Anschließend wurde die RNA, mit Hilfe eines RNA Isolationskits der Firma Qiagen, isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

2.2.11.2 Reverse Transkription

Für die Synthese der komplementären DNA aus der gewonnenen RNA wurde ein Sensiscript RT Kit der Firma Qiagen genutzt. Die *Tab. 4* zeigt den Ansatz für die Probe des Taschengewebes einer Aortenklappe. Zur Vermeidung von Pipettierungenauigkeiten wurde für alle Proben ein Master Mix hergestellt und am Ende die RNA hinzugefügt. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

Komponenten	Volumen
Master Mix	
10x Puffer RT	2,0 µl
dNTP Mix (5 mM jedes dNTP)	2,0 µl
Random Primer Hexanucleotid (1:30)	2,0 µl
Rnase Inhibitor (10 Einheiten/µl)	1,0 µl
Sensiscript Reverse Transkriptase	1,0 µl
Rnase-freies Wasser	variabel
Template RNA	variabel
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 4: Komponenten für die Reverse Transkription

2.2.11.3 Real-Time-quantitative-Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR)

Zur Quantifizierung der gewonnenen komplementären DNA kam die Real-Time-quantitative-Polymerasekettenreaktion zur Anwendung. Bei diesem Verfahren werden wie von Mülhardt (2009) beschrieben, keine absoluten Mengen gemessen, sondern die Kinetik der PCR-Reaktion genutzt. Das verwendete SYBR Green System der Firma Invitrogen (Darmstadt) dient dabei als DNA-Farbstoff, der an die DNA bindet und die Fluoreszenz entsprechend der Vermehrungszyklen ansteigt. In den frühen PCR-Zyklen findet eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Dabei laufen wie bei jeder PCR in mehreren Zyklen nacheinander immer wieder folgende Schritte ab:

- Denaturierung: bei 95° kommt es zur Zerlegung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen
- Annealing: Temperatursenkung auf die für die jeweiligen Primer optimale Temperatur zum Hybridisieren an die DNA
- Elongation: Erhitzen auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, die nun die Zweitstrangsynthese übernimmt

Dieses exponentielle Wachstum ist durch Störgrößen wie unter anderem der begrenzten Anzahl von Primern, Nukleotiden, der begrenzten Haltbarkeit der Polymerase und Nukleotide, durch anhaltend hohe Temperaturen sowie der

Hemmung der Reaktion durch anfallende Reaktionsprodukte begrenzt und geht in ein lineares Wachstum über, bis es letztendlich zum Stillstand kommt. Die Zykluszahl wird gegen die Fluoreszenz aufgetragen. Es wird eine Fluoreszenz gewählt, bei der alle Kurven der zu analysierenden Gene im exponentiellen Anstieg sind. Parallel zu den gewünschten Genen wurde die ubiquitär vorkommende 18S rRNA, die durch die Interventionen nicht beeinflusst wurde, als Housekeeping-Gen gefahren. Dadurch war es möglich, die Genexpression der messengerRNA für α -SMA, BMP-2, Runx-2 und ALP in Relation zur Expression von 18S-rRNA zu betrachten und die Ergebnisse in dimensionslosen Einheiten, sogenannten „arbitrary units“ untereinander quantitativ vergleichbar zu gestalten. Genutzt wurde für dieses Verfahren ein IQ5-Cycler der Firma BioRad. Die Durchführung richtete sich nach Angaben des Herstellers. In *Abb. 9* wird dieser Sachverhalt anschaulich gemacht.

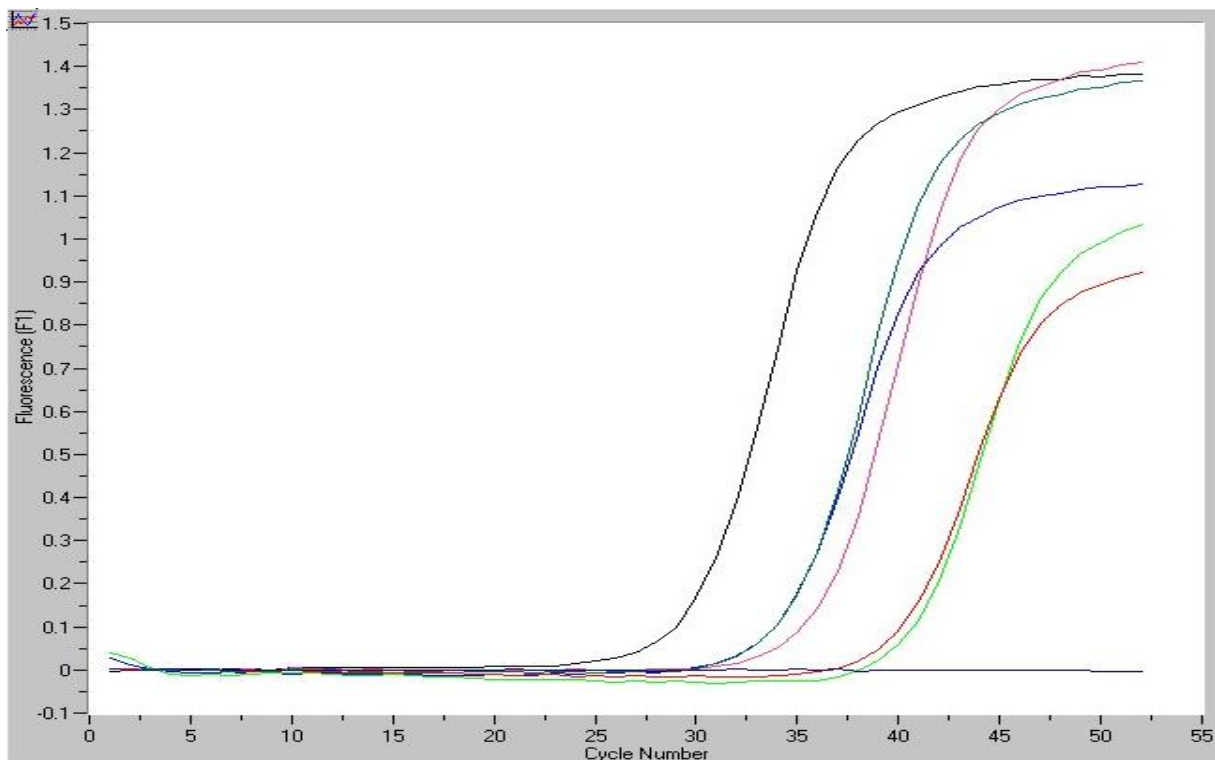


Abb. 9: Beispiel einer RTQ-PCR mit dem Light Cycler

Jede Probe gelangt nach einer gewissen Anzahl an PCR-Zyklen in eine Phase mit exponentiellem Anstieg, aus der der Punkt mit dem maximalen Anstieg (Tangente) ermittelt wird. Dies geschieht ebenfalls für das Housekeeping-Gen und kann so mit selbigem in ein Verhältnis gesetzt werden.

Komponenten des Versuchsansatzes können *Tab. 5* entnommen werden. Zur Vermeidung von Pipettierungenauigkeiten wurde ein Master Mix für alle Proben angefertigt.

Komponenten	Volumen
Master Mix	
10x PCR-Puffer	2,0 µl
dNTP(10 mM)	0,4 µl
Primer- Mix (je 5 µM sense-, antisense- Primer)	0,4 µl
SYBR- Gold (1x; Stammlösung:10.000x)	4,0 µl
nicht- acetyliertes BSA (5 mg/ml)	0,5 µl
MgCl ₂	1,0 µl
Taq- Polymerase	0,2 µl
nukleasefreies hochreines Wasser(HPLC-Wasser)	10,5 µl
cDNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Tab. 5: Komponenten für die RTQ-PCR

Für das Annealing wurden die in Tab. 6 dargestellten Primer bei entsprechendem Temperaturoptimum verwendet.

Gen	Primersequenz (sense/antisense 5'-3')	Produktlänge	Temperatur
18S rRNA	5'-ATACAGGACTCTTTCGAGGCC-3' 5'-CGGGACACTCAGCTAAGAGCAT-3'	255 bp	61°C
α-SMA	5'-CTGACAGAGGCACCACTGAA-3' 5'-ATCTCACGCTCGGCAGTAGT-3'	310 bp	56°C
BMP-2	5'-CTCGTCACTGGGGACAGAACTT-3' 5'-ACCCGCTGTCTTCTAGTGTTGC-3'	413 bp	60°C
RUNX-2	5'-CTTCACAAATCCTCCCCAAGTG-3' 5'-TCAGAGGTGGCAGTGTCATCAT-3'	434 bp	67°C
ALP	5'-GCCCTCTCCAAGACATATA-3' 5'-CCATGATCACGTGGATATCC-3'	372 bp	58°C

Tab. 6: Für die RTQ-PCR verwendete Primer mit Produktlänge bei entsprechender Temperatur für das Annealing.

Zum Ende der RTQ-PCR findet eine Schmelzkurvenanalyse statt, für welche die Temperatur im Light Cycler langsam auf 95°C erhöht wird. Dieses Verfahren erlaubt den Rückschluss, dass auch nur das spezifisch gewünschte Template amplifiziert wurde und macht somit eine Aussage über die Reinheit der PCR möglich. Die *Abb. 10* zeigt beispielhaft eine solche Schmelzkurvenanalyse im Light Cycler.

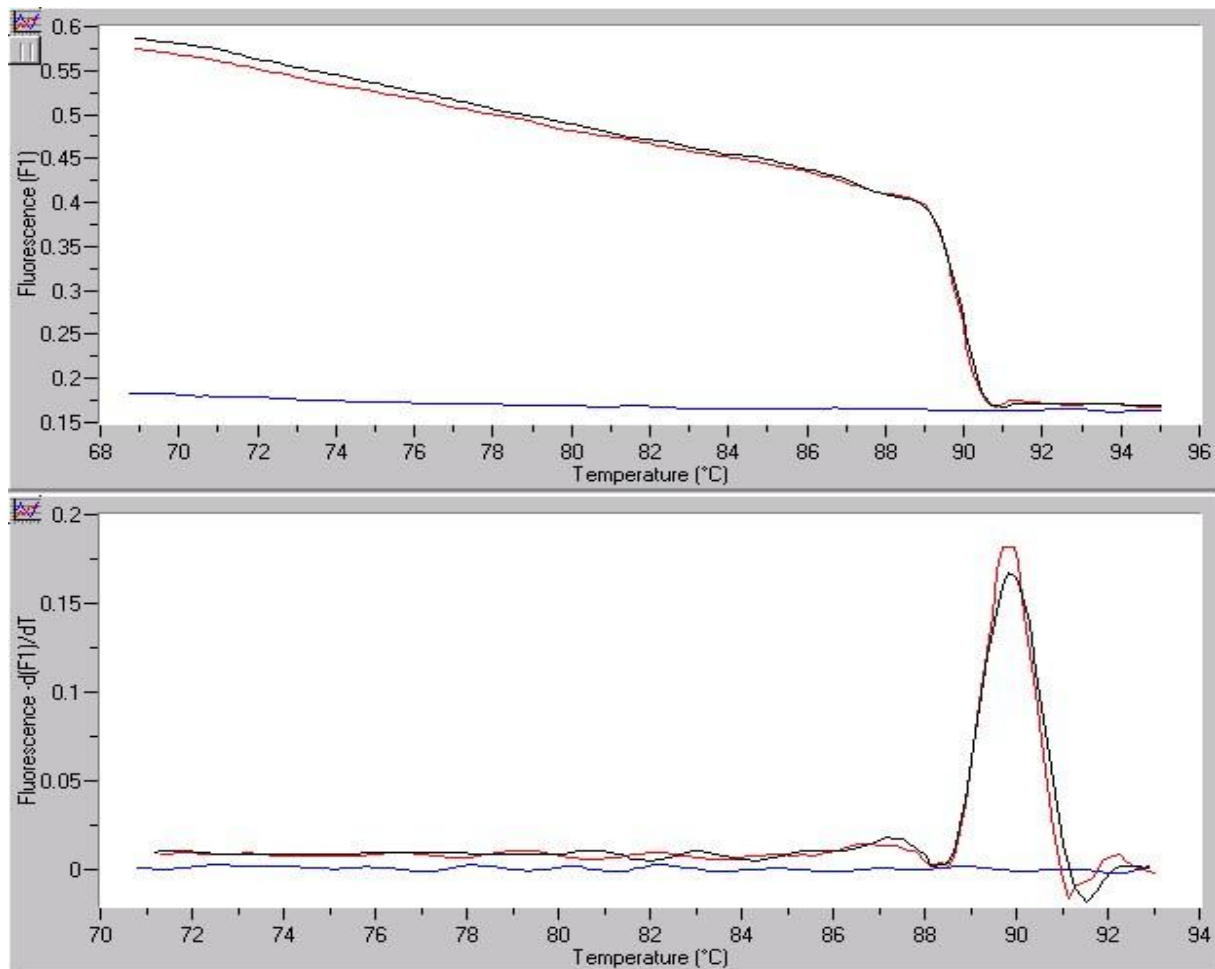


Abb. 10: Beispiel einer Schmelzkurvenanalyse im Light Cycler Es ist zu erkennen, dass sowohl die schwarze als auch die rote Kurve einen gemeinsamen Schmelzpunkt haben. Dies erlaubt den Rückschluss, dass es sich um die gleichen Amplifikationsprodukte handelt und die eingesetzten Primer spezifisch gebunden haben. Die blaue Kurve demonstriert die Negativkontrolle, die keine cDNA enthält.

2.2.12 Statistische Methoden

Die Messwerte und Ergebnisse wurden stets als Mittelwert (MW) und dessen Standardfehler (SF) in der Form $MW \pm SF$ angegeben. Für die statistischen Auswertungen, die zwei Gruppen betrafen, wurde der Student's t-Test angewandt.

Im Falle von Daten, die mehr als zwei Gruppen betrafen, wurde die ANOVA-Analyse (analysis of variance) verwendet. Für nicht-normverteilte Ergebnisse kam der Kruskal-Wallis nicht-parametrische Test zur Anwendung. Die systolische Aortenklappendurchflussgeschwindigkeit wurde anhand eines gepaarten t-Tests ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Aortenklappenverdickung und Aortenklappendurchflussgeschwindigkeit

Es wurde untersucht, ob es unter cholesterinreicher Ernährung in LDLR^{-/-}-Mäusen zu einer AK-Verdickung sowie zu einer Zunahme der Durchflussgeschwindigkeit kommt. Weiterhin sollte analysiert werden, ob regelmäßiges und gelegentliches Training einen präventiven Effekt auf die Entwicklung einer AK-Verdickung und die erhöhte Durchflussgeschwindigkeit haben.

Die in *Abb. 11* hierzu erstellten, in Hämatoxylin-Eosin gefärbten AK-Schnitte und dazugehörigen quantitativen Analysen visualisieren, dass LDLR^{-/-}-Mäuse, die mit einer Cholesterin-Diät (Cholesterin-Gruppe=Chol) gefüttert wurden, signifikant (ca. 60%) dickere Aortenklappen zeigen, als Mäuse, die einer normalen Diät (Kontroll-Gruppe=Kontrolle) unterzogen wurden (Taschendicke: Chol 50,14±3,35 µm; Kontrolle 31,27±2,96 µm; p<0,001 Chol vs. Kontrolle). Im Gegensatz dazu war die Taschendicke in der Gruppe mit regelmäßigem Training (Chol+Regelmäßig) im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe signifikant reduziert (Taschendicke: Regelmäßig 30,36±1,22 µm; p<0,001 Chol vs. Chol+Regelmäßig). Der Vergleich der Kontroll-Gruppe mit der regelmäßigen Trainingsgruppe zeigt keinen signifikanten Unterschied in der AK-Verdickung (p=0,776 Kontrolle vs. Chol+Regelmäßig). Die Untersuchung der Taschendicke der Tiere, die gelegentlich trainiert wurden (Chol+Gelegentlich), zeigte keine signifikante Veränderung der Taschendicke im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe (Taschendicke: Chol+Gelegentlich 48,85±3,18 µm; p<0,758 Chol vs. Chol+Gelegentlich).

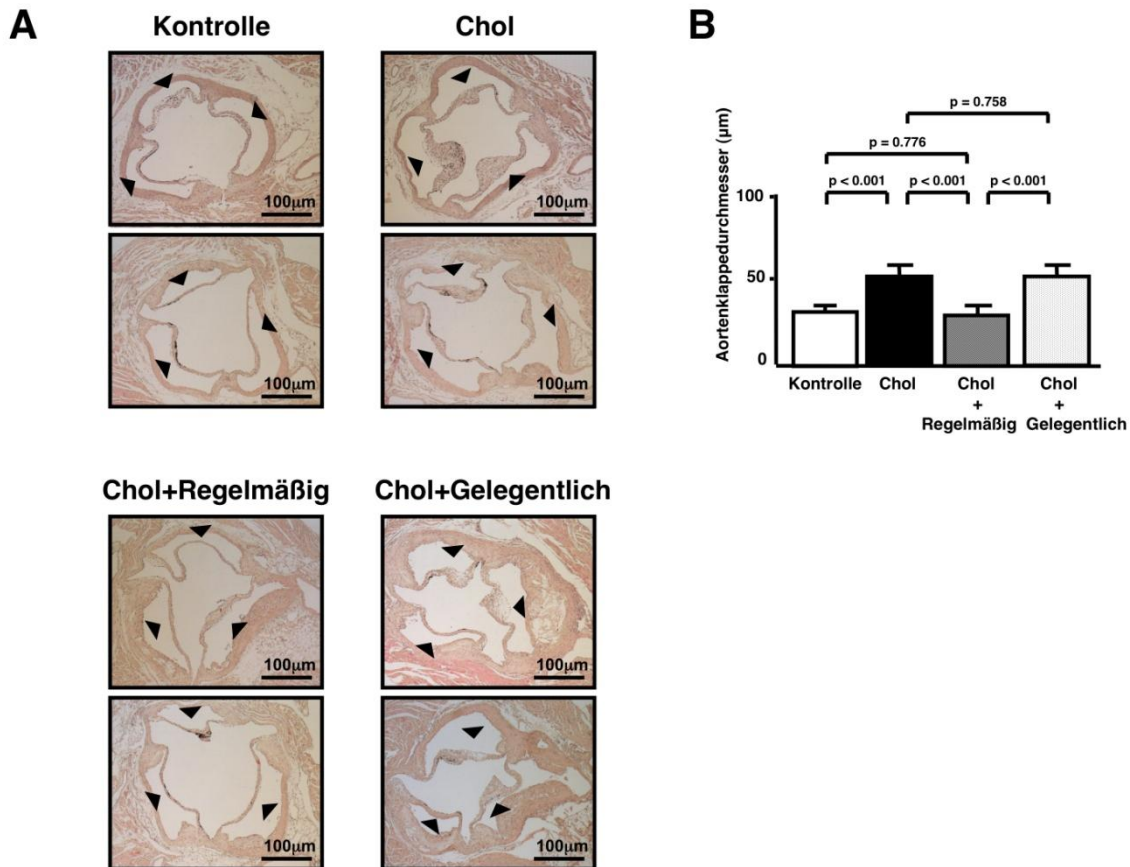


Abb. 11 Ergebnisse der AK-Verdickung

A zeigt trikuspidale AK von LDLR^{-/-}-Mäusen in Hämatoxylin-Eosin Färbung. Die Pfeilspitzen markieren die einzelnen Taschen jeder AK. Man kann sehen, dass sich die Taschen der Kontroll-Gruppe (hier als Kontrolle bezeichnet) dünner darstellen als die der Cholesterin-Gruppe (hier als Chol bezeichnet). Dahingegen sind die Taschen der Gruppe, welche die Cholesterin-Diät erhielten, aber zusätzlich regelmäßig trainierte (Chol+Regelmäßig) wieder offensichtlich dünn, vergleichbar mit der Taschendicke der Kontrolle. Die Gruppe mit Cholesterin-Diät, aber nur gelegentlichen Training (Chol+Gelegentlich) zeigte dagegen verdickte Taschen, vergleichbar mit denen der Cholesterin-Gruppe. **B** demonstriert die gleichen Umstände in einer quantitativen Analyse der Gesamtschichtdicke der AK in µm an 8 Tieren jeder Gruppe. Das Diagramm veranschaulicht, dass durch regelmäßiges Training, die Taschendicke im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe signifikant reduziert werden konnte und mit dem Niveau der Kontrolle verglichen werden kann, da hier kein signifikanter Unterschied mehr nachgewiesen werden konnte. Dagegen blieben die Schichtdicken bei gelegentlichem Training auf dem Niveau der Tiere, die ausschließlich die Cholesterin-Diät erhielten, ebenfalls gezeigt durch fehlende Signifikanz.

Mit Hilfe von Echokardiographien wurden die Durchflussgeschwindigkeiten der AK jeder Gruppe bestimmt (Abb. 12). Es zeigte sich, dass eine Cholesterin-Diät zu einem signifikantem (ca. 40%) Anstieg der AK-Durchflussgeschwindigkeit verglichen

mit der Kontrolle führt (AK-Durchflussgeschwindigkeit: Kontrolle $0,96 \pm 0,03$ m/s, Chol $1,36 \pm 0,06$ m/s; $p < 0,0001$ Kontrolle vs. Chol). In der Gruppe mit regelmäßigem Training wurden signifikant reduzierte Durchflussgeschwindigkeiten im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe gemessen (AK-Durchflussgeschwindigkeit: Chol+Regelmäßig $0,99 \pm 0,04$ m/s; $p < 0,0001$ Chol vs. Chol+Regelmäßig). Es zeigte sich in der Gruppe mit regelmäßigem Training kein signifikanter Unterschied der Durchflussgeschwindigkeiten verglichen mit der Kontrolle ($p = 0,57$ Kontrolle vs. Chol+Regelmäßig). Dadurch konnte gezeigt werden, dass regelmäßiges Training in der Lage ist, den durch Cholesterin-Diät induzierten Anstieg der AK-Durchflussgeschwindigkeit zu verhindern, wohingegen dies durch gelegentliches Training nicht gezeigt werden konnte (AK-Durchflussgeschwindigkeit: Chol+Gelegentlich $1,23 \pm 0,04$ m/s; $p = 0,21$ Chol vs. Chol+Gelegentlich).

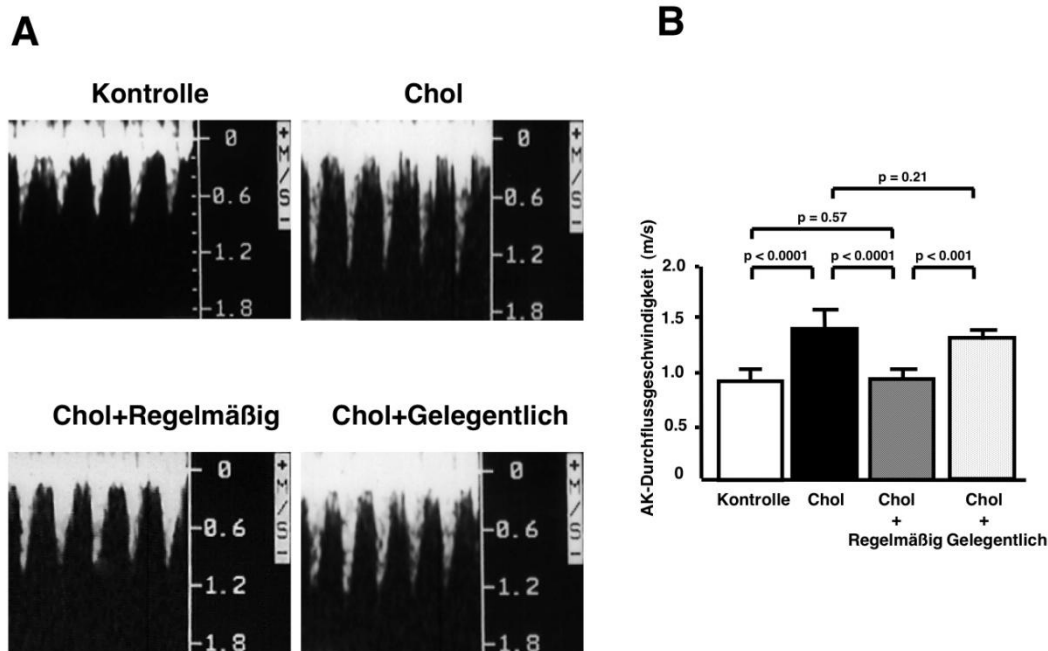


Abb. 12 Ergebnisse der AK-Durchflussgeschwindigkeit

A zeigt den Vergleich von Beispielen, die mit kontinuierlicher Doppler-Echokardiographie gemessenen maximalen Durchflussgeschwindigkeiten der AK zwischen Kontroll-Gruppe (hier bezeichnet als Kontrolle), Cholesterin-Gruppe (Chol), und den Gruppen mit Cholesterin-Diät und entweder regelmäßigem (Chol+Regelmäßig) oder gelegentlichem Training (Chol+Gelegentlich). **B** veranschaulicht die quantitativen Analysen der maximalen AK-Durchflussgeschwindigkeit über den

Studienzeitraum an 8 Tieren jeder Gruppe. Es ist zu sehen, dass die Flussgeschwindigkeiten der Cholesterin-Gruppe deutlich erhöht sind verglichen mit der Kontrolle. Durch regelmäßiges Training lässt sich, im Gegensatz zu gelegentlichen Training eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit verhindern.

Abschließend lässt sich eine positive Korrelation zwischen AK-Verdickung und AK-Durchflussgeschwindigkeit feststellen ($r=0,69$, $P<0,0001$).

3.2 Endothelintegrität

Für die Darstellung der Endothelintegrität wurde die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) als Marker für Endothelzellen genutzt. Mit den folgenden Untersuchungen sollte der Zusammenhang von cholesterinreicher Ernährung sowohl mit als auch ohne körperliches Training und der einschichtigen Oberflächenbedeckung der AK durch Endothelzellen an LDLR^{-/-}-Mäusen dargestellt werden. Zusätzlich sollte gezeigt werden, dass durch regelmäßiges körperliches Training die Fähigkeit erworben wird die Endothelintegrität zu schützen.

In *Abb. 13* werden die Zusammenhänge deutlich, dass die Aortenklappe der Tiere, die zur Kontrolle gehörten zu $95,7\pm 1,0\%$ mit einer Endothelzellschicht auf ihrer Oberfläche bedeckt waren. Eine Cholesterin-Diät, unter bewegungsarmen Umständen über 16 Wochen, führt zu einer signifikanten Reduktion des AK-Endothels (Chol $73,7\pm 2,2\%$; $p<0,0001$ Kontrolle vs. Chol). Regelmäßiges körperliches Training hingegen war in der Lage die durch Cholesterin-Diät induzierte Zerstörung der AK-Endothelintegrität signifikant zu unterdrücken und mehr Endothel auf der Oberfläche der AK zu präsentieren (Chol+Regelmäßig $95,8\pm 2,3\%$; $p<0,0001$, Chol vs. Chol+Regelmäßig).

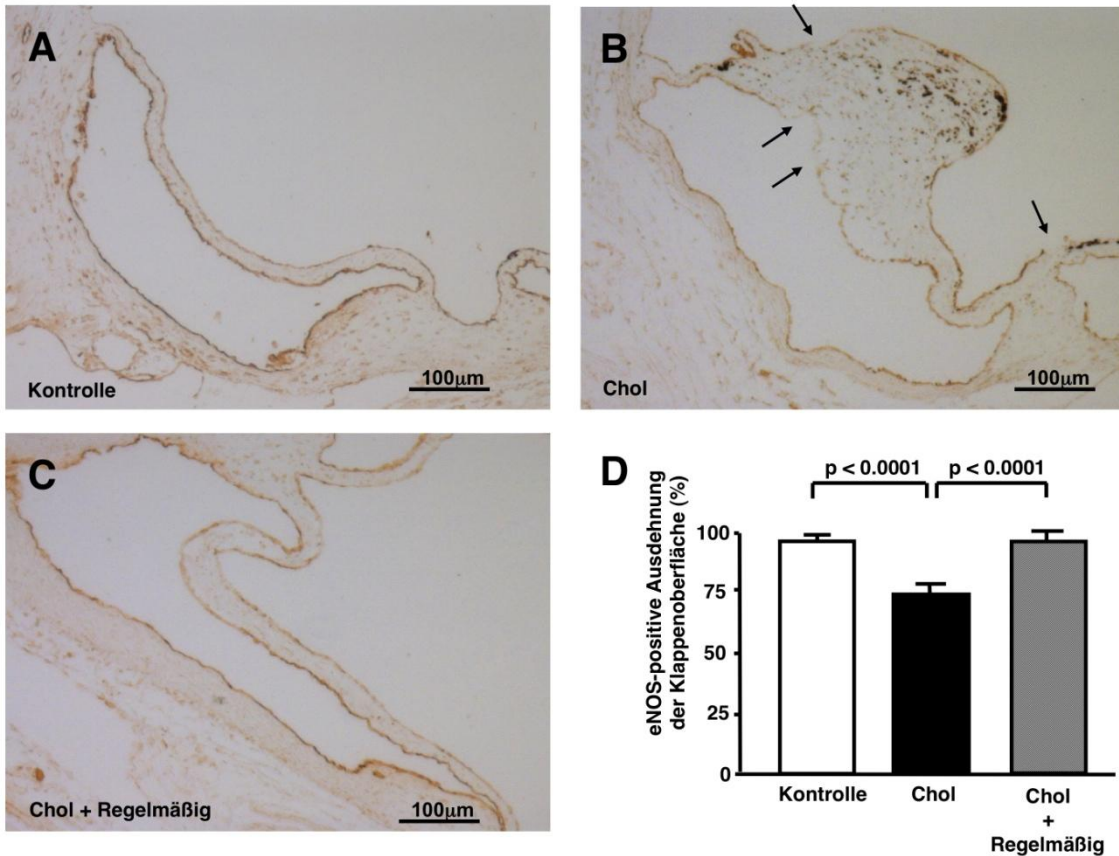


Abb. 13 Ergebnisse der Endothelintegrität

A-C zeigen Immunfärbungen für endotheliale Stickstoffmonoxid-synthase (eNOS), als Marker für Endothelzellen. **A** repräsentiert dabei die Kontroll-Gruppe (Kontrolle) mit normaler Diät. Man kann einen Schnitt durch die AK erkennen, deren Oberfläche gleichmäßig von eNOS-immungefärbten Endothelzellen bedeckt ist (dunklerer Rand um Taschenklappen herum). **B** stellt dabei einen Schnitt durch die AK einer Maus der Cholesterin-Gruppe (Chol) dar. Die Pfeile kennzeichnen Bereiche in denen die eNOS-Immunfärbung und somit das Endothel zerstört ist. In **C** ist ein AK-Schnitt, der Gruppe mit Cholesterin-Diät und regelmäßigem Training (Chol+Regelmäßig) dargestellt. Hier sieht man eine mit A vergleichbare, gleichmäßig umrandete eNOS-positive Endothelzellschicht ohne zerstörte Areale. **D** demonstriert die zugehörige quantitative Analyse der eNOS-positiven Ausdehnung in 8 Tieren der 3 Gruppen, Kontroll-Gruppe, Cholesterin-Gruppe und der Gruppe mit regelmäßigem Training. Es lässt sich quantitativ zeigen, dass die Kontrolle eine nahezu vollständige Oberflächenverkleidung der AK mit Endothel besitzt. In der Cholesterin-Gruppe zeigten sich hingegen signifikant niedrigere und damit zerstörte Endothelareale auf der AK-Oberfläche. Die Gruppe mit regelmäßigem Training hat signifikant höhere Anteile an Endothel auf der Oberfläche der AK im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe vorzuweisen.

3.3 Makrophagenakkumulation, Klappenfibrose und Proosteogenese

Ziel der Immunfärbungen und dazugehöriger quantitativer Analysen war darzulegen, dass eine Cholesterin-Diät eine vermehrte Makrophageninfiltration, Klappenfibrose und Proosteogenese hervorruft, welche sich durch regelmäßiges körperliches Training reduzieren lassen. Hierfür wurde Mac3, als Marker für Makrophagen, alpha-smooth muscle actin (α -SMA) sowohl Marker für glatte Muskelzellen von Gefäßen als auch den Myofibroblasten ähnliche Zellen und Alkalische Phosphatase (ALP) als funktionell phänotypischer Marker der Osteoblasten, genutzt.

In *Abb. 14* ist zu sehen, dass LDLR^{-/-}-Mäuse, die eine normale Diät erhielten und unter bewegungsarmen Umständen lebten (Kontrolle), dünne AK-Taschen mit kleinen, wenn überhaupt wenigen Makrophageninfiltrationen aufwiesen. In dieser Kontrolle waren ebenfalls nur spärlich α -SMA-positive Myofibroblasten und ALP-positive Osteoblasten vorhanden. Mäuse mit einer Cholesterin-Diät, die unter bewegungsarmen Umständen lebten (Chol) zeigten jedoch signifikant höhere Makrophagenakkumulationen, im Vergleich zur Kontrolle (Mac3: $p < 0,001$ Kontrolle vs. Chol). Weiterhin sind in der Cholesterin-Gruppe auch signifikant höhere α -SMA-positive Myofibroblasten und ALP-positive Osteoblasten in den AK nachgewiesen wurden (α -SMA, ALP: $p < 0,001$ Kontrolle vs. Chol). Dem Gegenüber zeigten die Mäuse der Gruppe, die eine Cholesterin-Diät erhielten und regelmäßig trainierten (Chol+Regelmäßig), signifikant geringere Makrophagenakkumulationen als durch Cholesterin-Diät hervorgerufen werden konnte (Mac3: $p < 0,001$ Chol vs. Regelmäßig). Auch die α -SMA-positiven Myofibroblasten und ALP-positiven Osteoblasten wurden durch regelmäßiges Training signifikant reduziert im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe (α -SMA, ALP: $p < 0,001$ Chol+Regelmäßig vs. Chol).

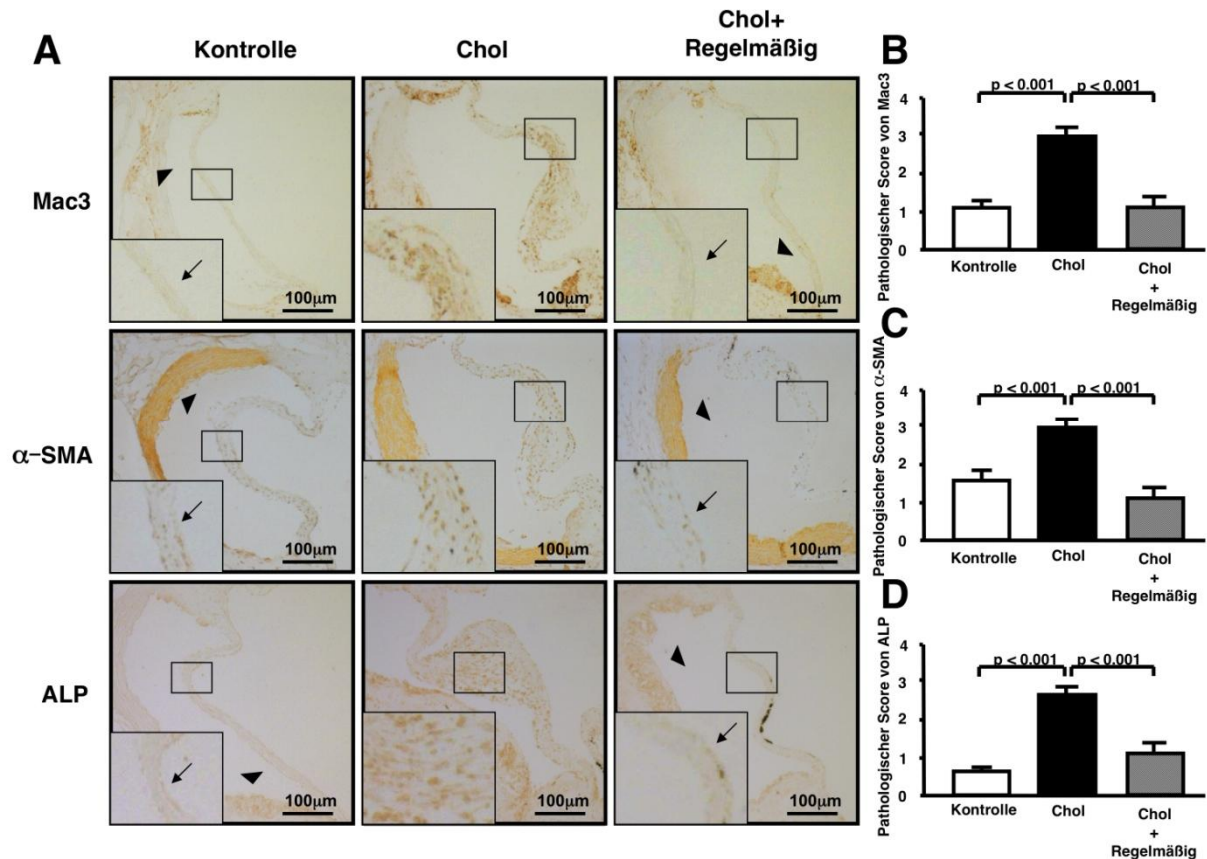


Abb. 14 Ergebnisse der Immunfärbungen für Makrophagenakkumulation, Klappenfibrose und Proosteogenese

A zeigt Immunfärbungen für Makrophagen (Mac3), für glatte Muskelzellen der Gefäße, den Myofibroblasten ähnlichen Zellen der AK (α -SMA) und für den funktioniell phänotypischen Marker der Osteoblasten (ALP). Untersucht wurden jeweils für die Kontroll-Gruppe (Kontrolle), die Cholesterin-Gruppe (Chol) und die regelmäßige Trainingsgruppe (Chol+Regelmäßiges Training). Zu sehen ist eine vermehrte Anreicherung des jeweiligen Markers in der Chol im Vergleich zur Kontrolle. In der Cholesterin-Gruppe, die regelmäßig trainierte waren die Marker im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe unter bewegungsarmen Umständen wieder niedriger, vergleichbar mit dem Niveau der Kontrolle. Die Pfeile markieren Bereiche des AK-Gewebes in denen eine schwache Immunfärbung sichtbar wird. Die Pfeilspitzen zeigen Bereiche mit offensichtlicher, positiver Immunfärbung in der glatten Muskelzellschicht der Klappen sowie arteriosklerotische Areale des Aortensinus in den Mac3- und ALP-Färbungen. **B**, **C** und **D** verdeutlichen diese Zusammenhänge graphisch in semiquantitativen Analysen für jeweils 8 Tiere der 3 Gruppen für die 3 Marker Mac3, α -SMA und ALP. Die Diagramme veranschaulichen, dass die Ergebnisse jeweils signifikant im Vergleich zwischen Kontroll-Gruppe und Cholesterin-Gruppe sowie Cholesterin-Gruppe und regelmäßiger Trainingsgruppe sind.

Zur Unterstützung dieser immunhistologischen Ergebnisse wurden quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktionen-Analysen durchgeführt, die in *Abb. 15* dargestellt sind. Untersucht wurden die α -SMA-Expression als Marker für

glatte Muskelzellen und Myofibroblasten ähnliche Zellen, die BMP-2-Expression als Mediator der Kalzifizierung, die Runx-2-Expression, ein proosteogenetischer Schlüsseltranskriptionsfaktor sowie die ALP-Expression, als Osteoblastenmarker der AK an 8 Tieren der Kontroll-Gruppe (Kontrolle), der Cholesterin-Gruppe (Chol) und der Gruppe mit regelmäßigem Training (Chol+Regelmäßig). Die Analysen ergaben, dass die Cholesterin-Gruppe signifikant höhere Werte in der Expression von α -SMA, BMP-2, Runx-2 und der ALP hatte, als die Kontrolle (α -SMA, BMP-2, ALP: $p < 0,05$; Runx-2: $p < 0,01$ Kontrolle vs. Chol). Dagegen ist in der Gruppe, die regelmäßig trainierte, die mRNA-Expression von α -SMA, Runx-2 und ALP im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe signifikant reduziert worden (α -SMA: $p < 0,01$; Runx-2: $p < 0,05$; ALP: $p < 0,01$ Chol vs. Chol+Regelmäßig). Die BMP-2-Expression in der Gruppe mit regelmäßigem Training ist ebenfalls reduziert im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe, jedoch nicht signifikant (BMP-2: $p = 0,06$ Chol+Regelmäßig vs. Chol).

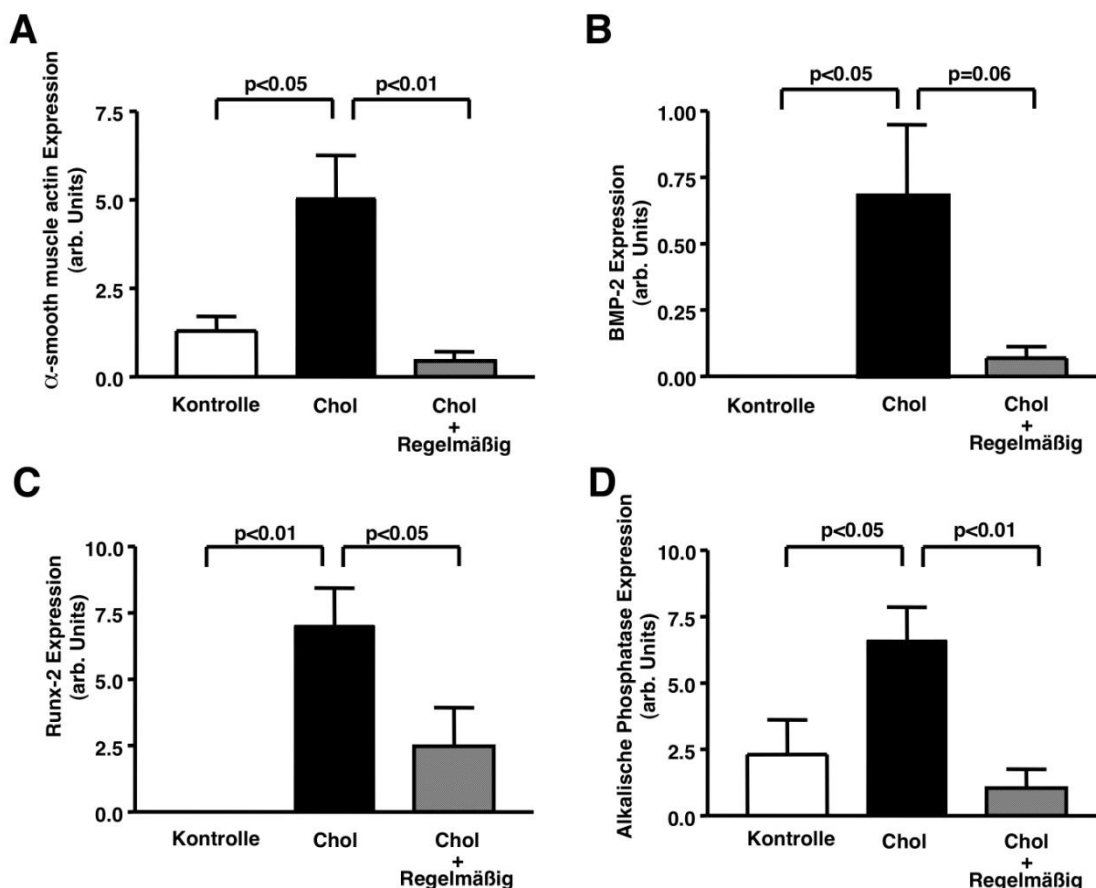


Abb. 15 Ergebnisse der quantitative Analysen für Makrophagenakkumulation, Klappenfibrose und Proosteogenese

Gezeigt sind mRNA-Expression für **A** α -smooth muscle actin (α -SMA); **B** Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) als Mediator der Kalzifizierung; **C** Runx-2 als

proosteogenetischer Transkriptionsfaktor und **D** Alkalische Phosphatase (ALP) der AK-Taschen von jeweils 8 Tieren jeder Gruppe. Es wird deutlich, dass die mRNA-Expression von α -SMA, BMP-2, Runx-2 und ALP in der Cholesterin-Gruppe (Chol) signifikant höher im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Kontrolle) war. In der Gruppe mit Cholesterin-Diät und regelmäßigen Training (Chol+Regelmäßig) konnte für die mRNA-Expression von α -SMA, Runx-2 und ALP eine signifikante Reduzierung der Expression im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe gezeigt werden. Die mRNA-Expression für BMP-2 der Gruppe mit regelmäßigem Training im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe zeigte hingegen keine Signifikanz.

Weiterhin konnte der Zusammenhang zwischen steigender Klappenfibrose und Mineralisation mit verdickten AK in der Cholesterin-Gruppe und deren Reduzierung durch regelmäßiges Training in *Abb. 16* und *17* veranschaulicht werden. In *Abb. 16* ist exemplarisch der inhibierende Effekt auf die Kollagenablagerungen in den AK der Cholesterin-Gruppe mit regelmäßigem Training im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe unter bewegungsarmen Umständen zu sehen.

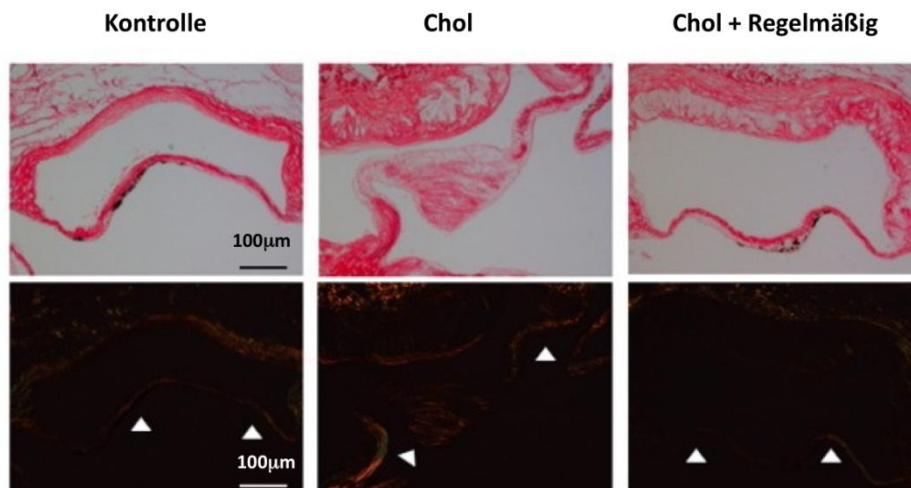


Abb. 16 Ergebnisse der Kollagenablagerung

Dargestellte sind Schnitte der AK in Sirius Red-Färbung ohne (oben) und mit (unten) polarisiertem Licht. Man sieht reichliche Kollagenablagerungen der AK-Tasche in der Cholesterin-Gruppe (mittig: Chol) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (links: Kontrolle). Die AK der Cholesterin-Gruppe mit

regelmäßigem Training (rechts: Chol+Regelmäßig) zeigt wieder deutlich weniger Kollagenablagerungen. Pfeilspitzen markieren Bereiche der AK-Taschen.

Außerdem konnte eine deutliche Mineralisation im Sinne einer Proosteogenese in AK-Taschen bei Mäusen unter Cholesterin-Diät im Vergleich zur Kontroll-Gruppe gezeigt werden (exemplarisch Vergleich in *Abb. 17*). LDLR^{-/-}-Mäuse unter Cholesterin-Diät und regelmäßigem Training zeigten weniger Mineralisationen im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe.

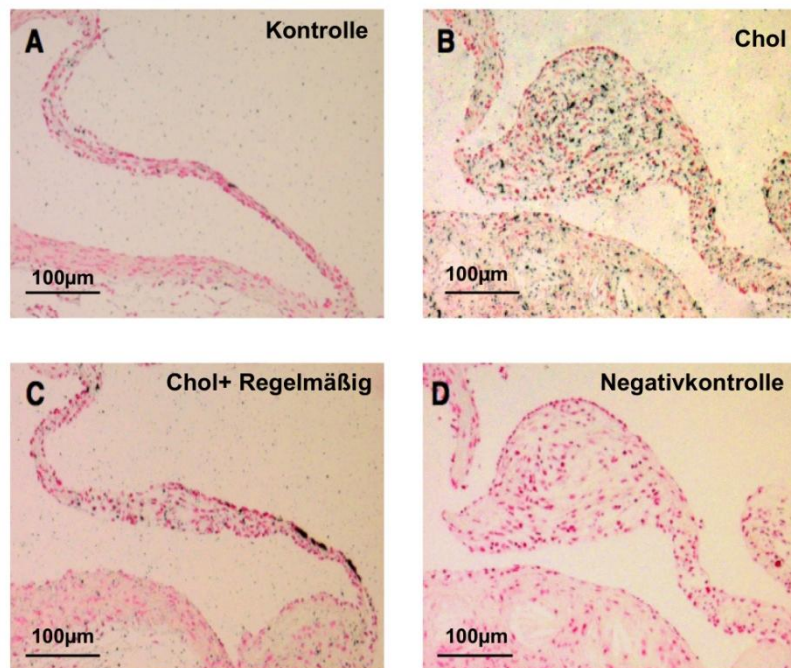


Abb. 17 Ergebnisse der Mineralisation

Gezeigt sind Schnitte der AK von LDLR^{-/-}-Mäusen in von Kossa-Färbung. **A** repräsentiert dabei die Kontroll-Gruppe mit normaler Diät unter bewegungsarmen Umständen. Man kann kaum schwarze Mineralisationsareale erkennen. **B** repräsentiert die Cholesterin-Gruppe. Man sieht fein gesprenkelte Granula von Mineralisationen in einer verdickten Tasche der AK. In **C** ist ein Schnitt aus der Gruppe mit regelmäßigem Training abgebildet. Es sind im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe eine dünnere Tasche und weniger schwarze Mineralisationen zu erkennen. **D** dient als Negativkontrolle und ist eine Weiterführung von B, die durch Eintauchen in 10% Methansäure für 30 Minuten und anschließender von Kossa Färbung, dekalzifiziert wurde.

3.4 Kalzifizierung

Durch die in *Abb. 18* dargestellten Immunfärbungen, der in den Knochenstoffwechsel involvierten Proteine Osteopontin (OPN), Osteoprotegerin (OPG) und quantitative Analysen von Fetuin-A sollte gezeigt werden, dass unter cholesterinreichem Einfluss die Hemmer der Kalzifizierung sinken. Wohingegen diese Hemmer durch regelmäßiges Training gesteigert werden können, so dass als Folge weniger Kalzifizierungen nachzuweisen sind.

OPN, als Marker für das Knochen-Remodeling und als organische Komponente von Knochensubstanz, konnte in allen 3 untersuchten Gruppen nur schwach nachgewiesen werden (Vgl. *Abb. 18 A*). Die Kontroll-Gruppe (Kontrolle) zeigt im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe (Chol) kaum sichtbare positive Bereiche für OPN sowie wenige arteriosklerotische Bereiche. In der Cholesterin-Gruppe waren hingegen deutlich arteriosklerotische Areale nachweisbar. Die Gruppe mit regelmäßigem Training (Chol+Regelmäßig) hatte im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe weniger arteriosklerotische Areale vorzuweisen. OPG, als Steuerungsprotein im Knochen-Remodeling mit seiner Fähigkeit zur Inhibierung von Osteoklasten (über RANKL-Bindung), war in der Immunfärbung deutlich positiv. In der Kontroll-Gruppe war es stärker, in der Cholesterin-Gruppe schwächer nachweisbar. Regelmäßiges körperliches Training führt zur verstärkten Expression von OPG im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe. Im Diagramm in *Abb. 18 B* ist zu erkennen, dass Fetuin-A, als Hemmstoff der Verkalkung, in der Kontroll-Gruppe signifikant höhere Level als in der Cholesterin-Gruppe erreicht (Fetuin-A-Konzentration: Kontrolle $71,2 \pm 14,7$ $\mu\text{g/ml}$, Chol $50,2 \pm 6,5$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0,05$ Kontrolle vs. Chol). In der Gruppe mit regelmäßigem körperlichem Training (Chol+Regelmäßig) war Fetuin-A signifikant höher als in der Cholesterin-Gruppe nachweisbar (Fetuin-A-Konzentration Chol+Regelmäßig $73,9 \pm 10,5$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0,05$ Chol vs. Chol+Regelmäßig).

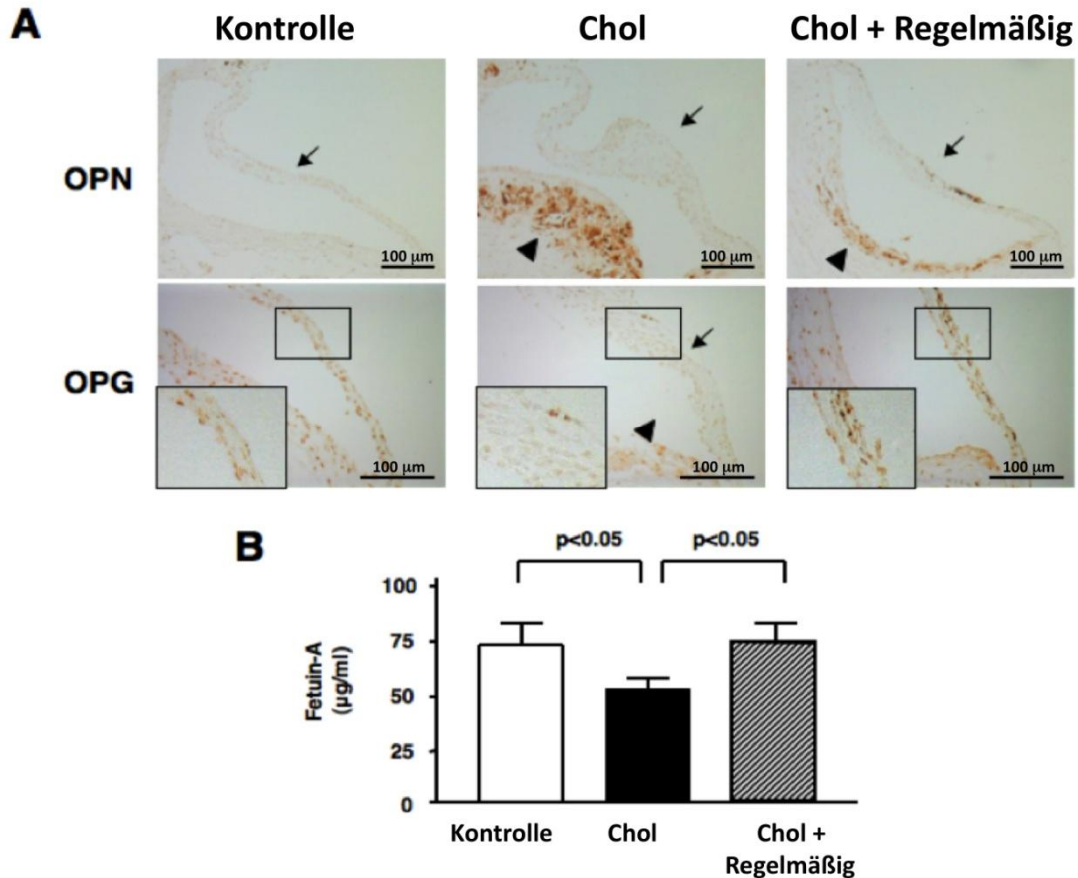


Abb. 18 Ergebnisse der Kalzifizierung

A zeigt Immunfärbungen für Osteopontin (OPN), als Marker für Knochen-Remodeling und Osteoprotegerin (OPG), als Hemmer der Osteoklasten im AK-Gewebe für die Kontroll-Guppe (links: Kontrolle), die Cholesterin-Gruppe (mittig: Chol) und die Gruppe mit regelmäßigem Training (rechts: Chol+Regelmäßig). Die Pfeile deuten auf Bereiche schwacher Färbung. Die Pfeilspitzen zeigen arteriosklerotische Areale mit positiver Färbung. Die Immunfärbung für OPN war in der Kontrolle schwächer positiv als in der Cholesterin-Gruppe. In der Gruppe mit regelmäßigem Training war OPN wieder schwach positiv im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe. Für OPG verhält es sich, als Inhibitor des Knochen-Remodelings folglich genau umgekehrt. In der Kontroll-Gruppe ist die OPG deutlich positiv nachweisbar, wohingegen es in der Cholesterin-Gruppe abgeschwächt erscheint. Die Gruppe mit regelmäßigem Training präsentierte wieder deutlich positiv gefärbte Areale. Im Diagramm **B** ist die Fetuin-A-Konzentration, als Hemmstoff der Verkalkung, in 8 Tieren jeder Gruppe untersucht wurden. Die Kontrolle zeigt im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe signifikant höhere Werte. Ebenso verhielt es sich mit der Gruppe, die regelmäßigem Training unterzogen wurde. In dieser Gruppe waren die Konzentrationen signifikant höher im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe.

3.5 Myeloperoxidase und oxidativer Sress

Durch die in den *Abb. 19* dargestellten Untersuchungen der Myeloperoxidasekonzentration, als enzymatische Quelle oxidativer Produkte sowie

Immunfärbungen für oxidiertes LDL und in situ Detektion der Superoxidproduktion mittels DHE in Rotfluoreszenz, sollte gezeigt werden, dass regelmäßiges körperliches Training die Serumspiegel der Myeloperoxidase (MPO) und den oxidativen Stress in AK der LDLR^{-/-}-Mäuse reduziert.

Die Cholesterin-Gruppe (Chol) zeigte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Kontrolle) eine signifikant höhere MPO-Expression (MPO-Konzentration: Kontrolle 63,1±7,6 ng/ml, Chol 279,0±90,5 ng/ml; $p < 0,05$, Kontrolle vs. Chol). Durch regelmäßiges körperliches Training (Chol+Regelmäßig) konnte die MPO-Expression im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe komplett unterdrückt werden (MPO-Konzentration: Chol+Regelmäßig 44,8±23,2 ng/ml, $p < 0,05$, Chol vs. Chol+Regelmäßig). In den Immunfärbungen sowohl für oxidiertes LDL als auch für die Superoxide (Vgl. *Abb. 19 B*) konnte man erhöhte Expressionen in der Cholesterin-Gruppe im Gegensatz zur Kontrolle feststellen. Durch regelmäßiges Training konnten für beide Parameter auch ein sichtlicher Rückgang erzielt werden.

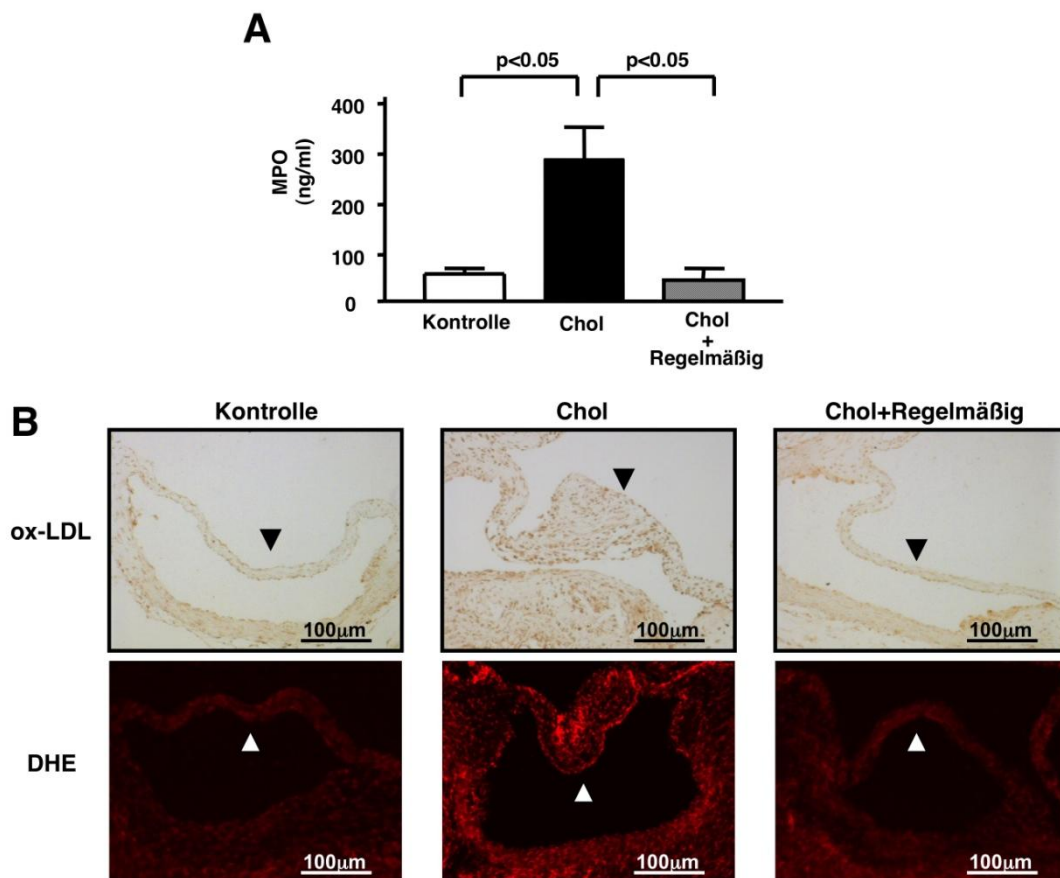


Abb. 19 Ergebnisse zum oxidativen Stress

A zeigt eine quantitative Analyse der Myeloperoxidase (MPO)-Konzentration im Serum in ng/ml für

jeweils die Kontroll- (Kontrolle), Cholesterin-Gruppe (Chol) und die Gruppe mit regelmäßigem Training (Chol+Regelmäßig) bei 6 Wochen alten LDLR^{-/-}-Mäusen. Es ist zu erkennen, dass die Cholesterin-Gruppe signifikant höhere Werte an MPO als die Kontrolle aufweist. Durch regelmäßiges Training konnte wieder ein Rückgang verglichen mit der Cholesterin-Gruppe erreicht werden. **B** zeigt Immunfärbungen für oxidiertes LDL (ox-LDL) und in situ Detektion der Superoxidproduktion mittels Dihydroethidium (DHE) in Rotfluoreszenz. Man kann für beide Färbungen erkennen, dass die Cholesterin-Gruppe im Gegensatz zur Kontrolle eine höhere Expression für sowohl oxidiertes LDL, als auch Superoxide zeigte. Durch körperliches Training konnten jeweils für beide Parameter niedrigere Expressionen nachgewiesen werden. Die Pfeilspitzen kennzeichnen das AK-Gewebe.

3.6 Lipidmetabolismus

Untersucht werden sollte inwieweit sich die Serum-LDL-Spiegel nach 16 Wochen regelmäßigem und nach gelegentlichem körperlichem Training in LDLR^{-/-}-Mäusen verändern.

Weder durch gelegentliches noch durch regelmäßiges Training, konnte ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontroll- oder Cholesterin-Gruppe auf die Serum-LDL-Spiegel gezeigt werden (Serum-LDL-Spiegel: Kontrolle 859,8±76,6 mg/dl, Chol 1957,8±235,15 mg/dl, Chol+Gelegentlich 2147,9±341,5 mg/dl, Chol+Regelmäßig 1978,3±298,8 mg/dl).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss körperlicher Aktivität auf die Entwicklung einer Aortenklappensklerose am Tiermodell der LDLR^{-/-}-Maus zu untersuchen. Dabei konnten folgende neuen Erkenntnisse zum ersten Mal gewonnen werden:

- regelmäßige körperliche Aktivität beugt der Entwicklung einer Aortenklappensklerose, gemessen an der histologischen Verdickung der Aortenklappe, vor
- der Einfluss körperlicher Aktivität ist von der Trainingsintensität abhängig, da gelegentliche körperliche Aktivität im Vergleich zu regelmäßigem körperlichen Training nicht in der Lage ist, der Entstehung einer Aortenklappensklerose vorzubeugen
- die verminderte Zerstörung der Endothelzellschicht, die reduzierte Akkumulation der Makrophagen und oxidiertes LDL, eine abgeschwächte Klappenfibrose, weniger oxidativer Stress, ein unterdrückter proosteogener Signalweg und erhöhte Inhibitoren der Kalzifizierung in Aortenklappen, sind protektive Faktoren für die Primärprävention der Aortenklappensklerose
- körperliches Training hat keinen Einfluss auf den Lipidmetabolismus im Hinblick auf den Serum-LDL-Spiegel

Die dargelegten neuen Erkenntnisse sind im Folgenden einzeln diskutiert.

4.1 Effekte der Trainingsintensität auf die Aortenklappensklerose

Eine Hypothese in der vorliegenden Arbeit ist, dass regelmäßiges körperliches Training im Gegensatz zum gelegentlichen Training einer Aortenklappensklerose im Sinne der Primärprävention vorbeugen kann. Aikawa et al. (2007) und Drolet et al. (2006) konnten mit ihren Studien bestätigen, dass die Fütterung einer atherogenen Diät signifikante AK-Veränderungen in LDLR^{-/-}-Mäusen und Apolipoprotein E-defizienten Mäusen hervorruft. Nach Otto et al. (2008) ist die direkte Beurteilung von Gewebeveränderungen in AK der ideale Endpunkt für die Bestimmung eines

Therapieeffektes. Aus diesem Grund wurden neben AK-Durchflussgeschwindigkeiten auch histologische Klappenveränderungen zur Evaluation der Aortenklappensklerose in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Nach Fütterung einer cholesterinreichen Nahrung, zeigen LDLR^{-/-}-Mäuse deutlich verdickte Aortenklappentaschen sowie echokardiographisch erhöhte Durchflussgeschwindigkeiten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Durch regelmäßiges körperliches Training können die Durchflussgeschwindigkeiten reduziert werden. Die Aortenklappenveränderungen, der Mäuse mit regelmäßigem Training sind vergleichbar mit der Kontroll-Gruppe und damit mit Mäusen, die physiologische Klappenveränderungen aufweisen.

Im Gegensatz hierzu waren die Ergebnisse bei gelegentlichen körperlichen Training nicht ausreichend für eine Reduktion der Aortenklappenverdickung und Durchflussgeschwindigkeit. Eine Trainingsintensität von einmal pro Woche scheint letztendlich in unserem Mausmodell als nicht ausreichend um den Gewebeprozessen und physiologischen Veränderungen vorbeugend entgegenzuwirken (Vgl. *Abb. 11* und *12*). Echokardiographisch gemessener Hauptgradient und Klappenfläche besitzen eine starke Vorhersagekraft für das klinische Outcome einer Aortenklappenstenose (Otto et al. 1997). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass regelmäßiges körperliches Training in der Lage ist, die AK-Durchflussgeschwindigkeit und das damit verbundene schlechte Outcome zu senken, wohingegen gelegentliches Training als nicht ausreichend erscheint.

In dieser Arbeit wurde der Effekt des körperlichen Trainings im Hinblick auf eine Primärprävention und damit ohne vorher bestehende Veränderungen untersucht. Mit den dargelegten Untersuchungen wird verdeutlicht, dass regelmäßige körperliche Aktivität als Primärprävention, einen effektiven therapeutischen Ansatz zur Vorbeugung einer Aortenklappensklerose bildet. Nach Schlotter et al. (2012) konnte dies für eine präexistente Aortenklappensklerose, im Sinne der Sekundärprävention, nicht belegt werden. Daraus wird ersichtlich, wie schon von Lee et al. (2005), Miller et al. (2009) und Antonini-Canterin et al. (2008) postuliert, dass die Aortenklappensklerose als früher pathologischer Prozess in der Ausbildung einer kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung einen wichtigen Angriffspunkt in der Krankheitsprogression bildet. Weiterhin wird von der American Heart Association nach Thompson et al. (2003) die Empfehlung von körperlicher Aktivität und Training als Prävention für arteriosklerotische und kardiovaskuläre Erkrankungen

ausgesprochen. Körperliche Inaktivität ist mit einem schlechten Outcome für Patienten mit kalzifizierenden Aortenklappenerkrankungen verbunden (Pellika et al. 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erhärten den Verdacht, dass regelmäßige körperliche Aktivität potent genug erscheint, Inzidenz und Mortalität im frühen Stadium der Aortenklappensklerose, der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankungen, zu reduzieren. Gelegentliches körperliches Training in Form von einer Trainingseinheit pro Woche in unserem Modell erscheint hingegen als nicht ausreichend, merkliche Effekte auf die Ausbildung einer Aortenklappensklerose zu haben und damit einer Krankheitsprogression vorzubeugen.

4.2 Effekte von regelmäßiger Aktivität auf die Endothelzellintegrität

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss des regelmäßigen körperlichen Trainings auf die pathophysiologischen Mechanismen für die Entwicklung einer Aortenklappensklerose darzulegen.

Nach Simmons et al. (2009) spielt das Endothel eine kritische Rolle in der Regulation von Klappendynamik, -funktion und der langfristigen Beständigkeit der AK. Endotheliale Dysfunktion oder das Fehlen von Endothelzellen sowie deren Zerstörung resultiert in abnormaler Biomechanik, struktureller Zerstörung und Exazerbation der Erkrankungsprogression. Anhand immunhistochemischer Färbungen durch den Endothelzellmarker endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) konnte durch Rajamannan et al. (2005) und Arishiro et al. (2007) belegt werden, dass es zu einer Zerstörung der Endothelzellschicht am Klappengewebe in der Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung in Kaninchen mit Hypercholesterinämie kommt. Durch Nutzung dieser Färbemethode konnten wir in LDLR^{-/-}-Mäusen nachweisen, dass nach Fütterung einer cholesterinreichen Nahrung eine Zerstörung der Endothelzellschicht hervorgerufen werden kann. Durch regelmäßige körperliche Aktivität kann dieser Zerstörung der Endothelintegrität im Sinne einer Primärprävention vorgebeugt werden.

Nach El-Hamamsy et al. (2009) übt das Klappenendothel seine wichtigen Effekte durch Modulation in Relaxation und Kontraktion der AK mittels verschiedener Mediatoren (z.B. Stickstoffmonoxid und ET-1) aus. Vor allem aber reguliert es die Veränderungen in der Klappensteifigkeit. Zusätzlich ist die Klappenintegrität und

Steifigkeit für die Klappenfunktion und Kalzifizierung verantwortlich, wie Yip et al. (2009) und Schoen et al. (2008) in ihren Arbeiten zeigten.

Nach unseren Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass eine verminderte Endothelintegrität in der von uns untersuchten Cholesterin-Gruppe, zu einer strukturellen und funktionellen Zerstörung der Klappe und damit zu einer Krankheitsprogression führt. Regelmäßiges körperliches Training schützt die Endothelintegrität, womit es ebenfalls potent genug erscheint der Entwicklung eines pathologischen Klappenremodelings vorzubeugen wie die Ergebnisse der AK-Verdickung und AK-Durchflussgeschwindigkeiten in dieser Arbeit zeigen.

4.3 Effekte von körperlicher Aktivität auf Inflammation, Ablagerung oxidierter Lipide und oxidativem Stress

Die Zerstörung der Endothelzellschicht der Aortenklappe leitet nach Aikawa et al. (2007) und Mohler et al. (2001) die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten bzw. Makrophagen ein. Nach Weiss et al. (2006), Libermann et al. (2008) und Miller et al. (2008) sind oxidativer Stress, einschließlich der Bildung lipidbeladener Makrophagen und die Entwicklung von Inflammation entscheidende Mechanismen in der Pathogenese der AS. Diese Arbeit kann die Beobachtungen von Aikawa et al. (2007) hinsichtlich der Induzierung einer AK-Verdickung durch eine cholesterinreiche Diät in LDLR^{-/-}-Mäusen bestätigen. Weiterhin konnte der Zusammenhang der AK-Verdickung mit der Präsenz von makrophagenreichen Läsionen in dieser Arbeit gezeigt werden (Vgl. *Abb. 14*). Zusätzlich wurde wie auch Demer et al. (2001) berichtet, ein beachtlicher Anstieg von oxidiertem LDL, dem vermeintlichem Initiator der Gewebekalzifizierung in verdickten AK von Mäusen (Vgl. *Abb. 19B*) sowie die Assoziation mit infiltrierten Makrophagen nachgewiesen. Durch Mohty et al. (2008) konnte dieser Beweis in menschlichen kalzifizierten AK geführt werden, welcher eine Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse vom Mausmodell auf den Menschen untermauert. Weiterhin zeigten wir erstmals, dass regelmäßiges körperliches Training die Makrophagenakkumulation (Vgl. *Abb. 14B*), oxidiertes LDL sowie die Superoxid-Levels in AK (Vgl. *Abb. 19B*) im Mausmodell deutlich reduziert. Es liegt nahe, dass oxidiertes LDL in AK im engen Zusammenhang mit Inflammation und oxidativen Stress als Initiator der AK-Kalzifizierung steht.

MPO sei aufgrund seiner potenziellen Funktion für die Lipidoxidation als möglich Quelle für oxidativen Stress in AK hervorgehoben (Malle et al. 2007). In dieser Arbeit

wird außerdem gezeigt, dass die MPO Levels in der Cholesterin-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht sind und dass regelmäßiges körperliches Training weiterhin in der Lage ist, die Serumspiegel für MPO im Mausmodell zu unterdrücken (Vgl. *Abb. 19A*). Damit erscheint regelmäßiges Training als ein wichtiges Instrument zur Reduzierung von oxidativen Stress durch Verminderung der MPO-Spiegel und kann wie schon von Richter et al. (2005) und Linke et al. (2005) gezeigt, als Primärprävention von Erkrankungen der Aortenklappe angesehen werden.

Wie zu Beginn dieser Arbeit und durch Otto et al. (2008) postuliert, benötigen wir Therapiemöglichkeiten zur Prävention der Progression einer AS. Hierfür müssen wir neue potenzielle Angriffspunkte bei der Erkrankung der kalzifizierten AK aufzeigen. Die Behandlung des oxidativen Stress in einem frühen Stadium der Erkrankung wie z.B. der Aortenklappensklerose, erscheint nach genauer Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse einen möglichen Angriffspunkt zu bieten, die Progression der Erkrankung zu verlangsamen (Weiss et al. 2006, Miller et al. 2008, Heistad et al. 2009).

4.4 Effekte von körperlicher Aktivität auf den osteogenen Signalweg

Nach bisherigem Kenntnisstand ist wenig über die molekularen Mechanismen der kardiovaskulären Kalzifizierung und dem Einfluss von körperlichem Training auf den osteogenen Signalweg bekannt. Park et al. (2008) berichtet über eine abschwächende Wirkung auf die Progression der endothelialen Dysfunktion und auf die arterielle Kalzifizierung in ovariectomierten Ratten durch Training. Die positive Korrelation von Plasma-Fetuin-A und kardiorespiratorischer Fitness beim Menschen als Einflussfaktor wurde durch Wilund et al. (2007) herausgestellt und der Effekt von Training auf eine reduzierte Koronararterienkalzifizierung gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass regelmäßiges körperliches Training den proosteogenen Signalweg im Mausmodell abschwächen kann.

Die Klappenkalzifizierung ist ein inflammatorischer Prozess und scheint eine Antwort auf eine endotheliale Dysfunktion zu sein, wie Mohler III et al. (2001) darlegten.

Insbesondere oxidativer Stress spielt nach Johnson et al. (2006) eine wichtige Rolle in der Amplifikation prokalzifizierender Genexpression, wobei das BMP-2 und der Runx-2-Transkriptionsfaktor in die molekularen Mechanismus involviert sind, da sie maßgeblich zur AK-Kalzifizierung beitragen. Nach Rajamannan et al. (2003) und

(2005) sowie Johnson et al. (2006) ist der osteoblastische Phänotyp der gemeinsame Endweg der AK-Kalzifizierung durch die Hochregulation osteogener Transkriptionsfaktoren.

Der osteoblastische Phänotyp wird nach Rajamannan et al. (2003) durch gesteigerte Expression von ALP und Runx-2 gemessen, die für die verschiedenen Stufen der Knochenentwicklung charakteristisch sind. Die Ablagerung von kalzifizierendem Material in AK-Erkrankungen wird durch VICs eingeleitet, wie schon 1976 durch die Arbeitsgruppe von Kim beschrieb. Wie in den einleitenden Worten dieser Arbeit angeführt, unterscheiden wir 5 Phänotypen in dieser VIC-Familie, die sich den Umständen entsprechend durch Veränderung ihres Phänotypes an die gegebenen Bedingungen anpassen (Liu et al. 2007). Dabei besteht auch die Möglichkeit der Differenzierung in einen osteoblastischen Phänotyp, der in kalzifizierten AK nach Schoen et al. (2008) nachgewiesen werden konnte. Aubin et al. (2001) beschreibt, dass die osteoblastischen VICs Marker exprimieren, die man von Osteoblasten aus Knochengewebe kennt (z.B. ALP, Osteocalcin und Osteopontin). Wir konnten einen signifikanten Anstieg von Myofibroblasten und des osteoblastischen Phänotypes nach Fütterung von LDLR^{-/-}-Mäusen mit einer cholesterinreichen Ernährung, durch eine gesteigerte mRNA-Expression von α -SMA, ALP, BMP-2 und Runx-2, verglichen zur Kontroll-Gruppe (Vgl. *Abb. 15*) zeigen. Durch regelmäßiges körperliches Training konnten die mRNA-Spiegel für den Myofibroblastenmarker und den proosteogenen Signalweges reduziert werden (Vgl. *Abb. 15*). Die Herunterregulation des osteogenen Schlüsseltranskriptionsfaktors Runx-2 verdeutlicht die Reduktion des osteoblastischen Phänotypes und ist wahrscheinlich Ergebnis von reduziertem oxidativen Stress, wie schon zuvor diskutiert. Die angefertigten von Kossa-Färbungen visualisieren die proosteogenen Verhältnisse in der Cholesterin-Gruppe im Vergleich zur Gruppe mit regelmäßigem körperlichen Training durch vermehrte Mineralisationsareale (Vgl. *Abb. 17*).

Auf der anderen Seite, konnte eine Steigerung der Hemmer der Kalzifizierung als molekularer Mechanismus zur Reduktion der AS in der Gruppe mit regelmäßigem Training im Vergleich zur Cholesterin-Gruppe mit dieser Arbeit herausgestellt werden. Nach Ix et al. (2007) und Koos et al. (2009) ist ein potenzieller Faktor in der Regulierung der AK-Kalzifizierung zirkulierendes Fetuin-A. In unseren Untersuchungen konnten OPG und Fetuin-A, als Hemmer der Kalzifizierung durch eine cholesterinreiche Ernährung im Modell der LDLR^{-/-}-Maus deutlich vermindert

nachgewiesen werden. Wohingegen durch regelmäßiges körperliches Training eine Normalisierung der Spiegel für OPG und Fetuin-A, vergleichbar mit der Kontrollgruppe, erreicht werden konnte (Vgl. *Abb. 18A und B*). Die gesteigerte Hemmung der AK-Mineralisierung durch körperliches Training im Mausmodell, stellt somit einen weiteren molekularen Mechanismus und protektiven Faktor in der Progression einer AS dar.

Die Studie von Rosenhek et al. (2000) zeigte, dass Patienten mit einer mittelgradigen bis schweren Kalzifizierung eine schnellere Krankheitsprogression und schlechtere Prognose der AS haben, als Patienten mit einer leichten Kalzifizierung. Diese Zusammenhänge verdeutlichen die Bedeutsamkeit einer Intervention in frühen Stadien der Erkrankung, noch vor der Entwicklung einer fortgeschrittenen AK-Kalzifizierung. Regelmäßiges körperliches Training bildet deshalb eine effektive Strategie in der Prävention kalzifizierender AK-Erkrankungen. Sie greift als präventive Maßnahme im frühen Stadium der Erkrankung an, bevor es zur Ausbildung einer fortgeschrittenen AK-Kalzifizierung kommen kann (Vgl. *Abb. 20*).

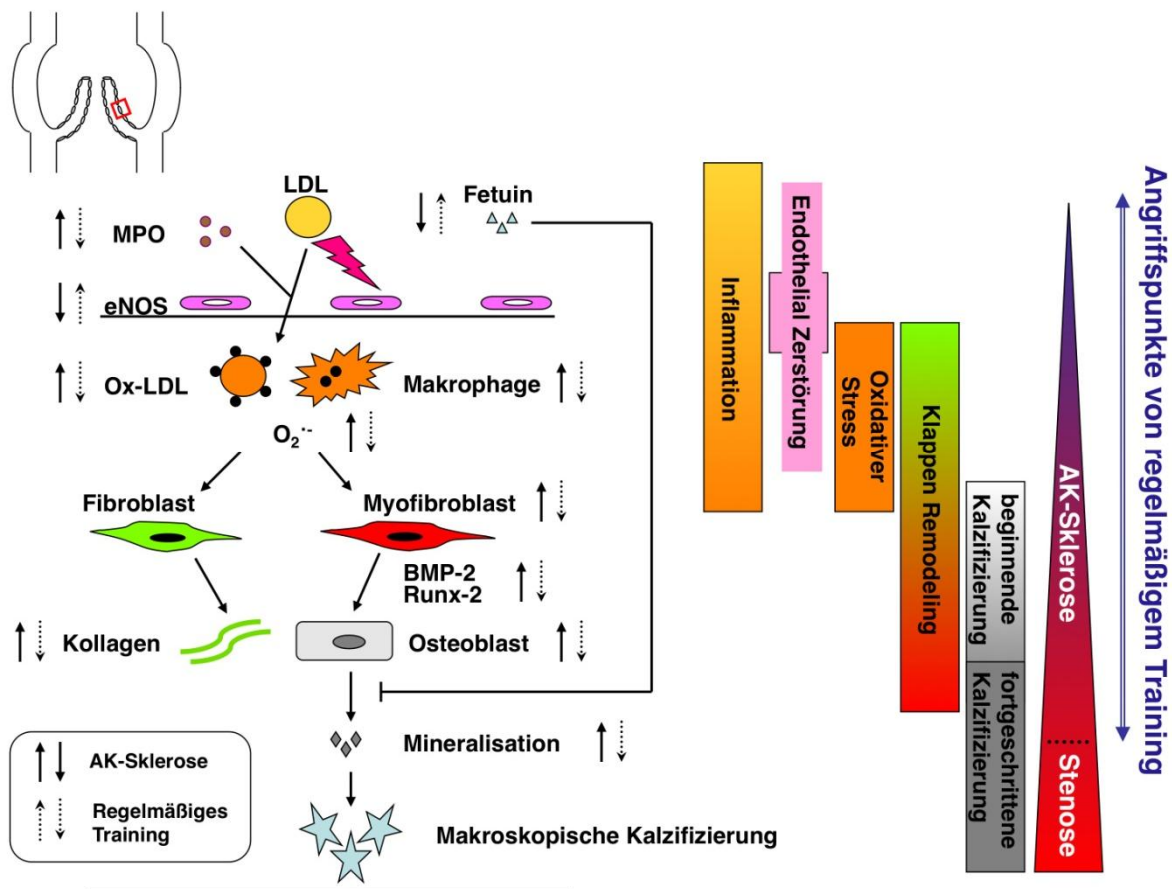


Abb. 20 Arbeitsmodell Es fasst die zahlreichen molekularen Mechanismen in der Entwicklung einer AK-Sklerose/Steinose zusammen und zeigt den Zusammenhang von Inflammation,

Endothelzellzerstörung, oxidativen Stress sowie den gemeinsamen Endweg zu einem osteoblastischen Phänotyp mit der Folge der Kalzifizierung. Die hier dargestellten Abläufe werden durch regelmäßiges körperliches Training beeinflusst und stellen damit Möglichkeiten zukünftiger medizinischer Therapieansätze dar. eNOS= endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, Ox-LDL= oxidiertes LDL, BMP-2= Bone morphogenic Protein 2, Runx-2= runt-related Transkriptionsfaktor-2

4.5 Effekte von Trainingsintensität auf den Lipidmetabolismus

Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer AS, analog zu denen der Arteriosklerose, gehört unter anderem die Hypercholesterinämie (Messika-Zeitoun et al. 2007). Eine Reduktion der Plasma-Cholesterin-Spiegel im Menschen und Mausmodell verzögert die Progression und reduziert die Größe arteriosklerotischer Läsionen, reduziert oxidativen Stress und verbessert die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (Benzuly et al. 1994, Sipahi et al. 2006, Hathaway et al. 2002 und Harrison et al. 1987). Allesamt stellen Prozesse dar, die nach Miller et al. (2009) eine Verbesserung von AK-Erkrankungen erwarten lassen. Die Zusammenhänge legen die Annahme nahe, dass eine Reduktion der Plasmalipide durch Statine die Progression einer AS verzögern könne (Novaro et al. 2001, Shavelle et al. 2002). Aus diesem Sachverhalt heraus wurden prospektive klinische Studien wie die Scottish Aortic Stenosis und Lipid Lowering (SALTIRE)-Studie (Cowell et al. 2005), die Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium (RAAVE)-Studie (Moura et al. 2007) und die Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis (SEAS)-Studie (Rossebo et al. 2008), bezüglich dieser Zusammenhänge initiiert. Sie lieferten alle kontroverse Ergebnisse bezüglich des Effektes der lipidsenkenden Therapie (Miller et al. 2009). Die Ergebnisse der SALTIRE- und SEAS-Studien zeigten nachhaltig, dass Simvastatin (oder eine kombinierte Behandlung mit Simvastatin und Ezetimibe) die Progression einer AS bei Patienten mit grenzwertig hohen Cholesterinspiegeln nicht verzögert. Im Gegensatz hierzu konnte die RAAVE-Studie einen moderaten Benefit von Rosuvastatin auf die Progression einer AS bei Patienten mit schwach erhöhten Lipidwerten im Blut zeigen. Nach Miller et al. (2009) und Helske et al. (2009) ist eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse, die Behandlung in einem zu spätem Stadium der Erkrankung. Die Ergebnisse legen eine effektive Behandlung in einer früheren Phase der Erkrankung wie der Aortenklappensklerose nahe. Diese Hypothese der verzögerten Progression einer AK-Erkrankung durch die Behandlung mit Statinen konnte in einer retrospektiven echokardiographischen Datenbank-Analyse von 1046

Patienten mit AK-Sklerose und einer milden bis moderaten AS belegt werden (Antonini-Canterin et al. 2008).

Die Vermutung liegt daher nahe, dass körperliches Training als primärpräventive Maßnahme mit ihrem Angriffspunkt im frühen Stadium der kalzifizierenden AK-Erkrankung, einen Einfluss auf die Lipidspiegel hat.

Nach den durchgeführten Untersuchungen konnte sich diese Annahme jedoch nicht bestätigen, da weder durch gelegentliches noch durch regelmäßiges körperliches Training ein signifikanter Effekt auf die Serum-LDL-Spiegel nachgewiesen werden konnte.

Ursache für die vorliegenden Ergebnisse könnte der Untersuchungszeitpunkt nach Abschluss des Trainings und im späteren Stadium, bei Vorliegen einer AK-Sklerose sein. Für folgende Untersuchungen könnte es von Interesse sein, die Lipidspiegel über den gesamten Untersuchungszeitraum, während des Trainingszeitraumes zu messen. Es liegt nämlich nahe, dass während der Trainingsperiode und noch im Stadium der Entwicklung einer AK-Sklerose, sehr wohl veränderte Lipidspiegel nachweisbar sind. Auf der anderen Seite werden die vorliegenden Ergebnisse von den so kontroversen Ergebnissen und zum Teil fehlendem Vorteil einer lipidsenkenden Therapie auf die AK-Erkrankungen gestützt.

4.6 Studieneinschränkungen

An dieser Stelle seien die während der Untersuchung aufgetretenen Studieneinschränkungen angeführt.

Zuerst sei erwähnt, dass die aufgenommenen AK-Durchflussgeschwindigkeiten innerhalb normaler Grenzen lagen. Jedoch war es in einigen Fällen schwer, reproduzierbare apikale Schallfenster mit einem akzeptablen störungsfreien Dopplersignal für exakte Kalkulationen abzuleiten. In dieser Beziehung können potentielle Fehler nicht ganz ausgeschlossen werden. Trotzdem lag die Variabilität der AK-Durchflussgeschwindigkeiten in den vorliegenden Ergebnissen zwischen gleichen und verschiedenen Untersuchern <5%, wodurch eine akzeptable Reproduzierbarkeit erreicht wurde und die Ergebnisse, der mittels Doppler gemessenen Durchflussgeschwindigkeiten als zuverlässig angesehen werden können.

Als zweites ergab sich die schon von Miller et al. (2009) erwähnte Problematik, dass aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von AK-Gewebe der Mäuse, in unserer Studie

auf Western-Blot-Analysen für quantitative Proteinbestimmungen verzichtete werden musste.

An dritter Stelle sei der nicht direkten Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse in den klinischen Kontext Betrachtung geschenkt. Weiterhin gilt es zu evaluieren, welche Dauer und Intensität von körperlichem Training für den Menschen als empfehlenswert angesehen werden kann.

Als Viertes sei auf die Differenzen in der Pathogenese der AK-Erkrankungen zwischen dem hier angewandten Modell der LDLR^{-/-}-Maus und dem Menschen hingewiesen. Die atherogenen Faktoren, wie z.B. Lipide und Rauchen und genetische Faktoren, wie z.B. LDL-Rezeptoren und NOTCH 1, konnten in dem angewandten Mausmodell keine Berücksichtigung finden (Freeman et al. 2005, Garg et al. 2005).

Dennoch konnte die Nutzung dieses Hyperlipidämie gestützten Tiermodells in der Entdeckung neuer therapeutischer Optionen und zum besseren Verständnis der involvierten Mechanismen, maßgeblich beitragen. Für zukünftige klinische Studien könnte es von vermehrtem Interesse sein verschiedene arteriosklerotische wie auch genetische Risikofaktoren, die zur Krankheitsentwicklung beitragen, einzuschließen.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Titel:

Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Ausbildung einer Aortenklappensklerose im Tiermodell der LDL-Rezeptor-knockout-Maus

eingereicht von:

Saskia Jacob

angefertigt am:

Herzzentrum der Universität Leipzig
Klinik für Innere Medizin/ Kardiologie
Strümpelstraße 39
04289 Leipzig

betreut von:

PD Dr. rer. nat. habil. Volker Adams

Monat und Jahr (der Einreichung):

Februar 2015

Regelmäßige körperliche Aktivität verlangsamt die Progression arteriosklerotischer Läsionen, reduziert oxidativen Stress und erhöht die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid. Von diesen Vorgängen erwartet man auch eine Verbesserung des Outcomes bei degenerativen Aortenklappenerkrankungen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Effekt von körperlicher Aktivität im Sinne einer Primärprävention auf die Ausbildung einer Aortenklappensklerose, die ein frühes Stadium in der Entwicklung einer Aortenklappenstenose darstellt, mit ihrem zu Grunde liegendem Pathomechanismus zu untersuchen.

Hierfür wurde das Tiermodell der LDL-Rezeptor-knockout-Maus gewählt, da bereits in Studien die regelhafte Induktion von Aortenklappensklerosen und hämodynamisch relevante Stenosen durch cholesterinreiche Nahrung gezeigt werden konnte.

Für die vorliegende Studie wurden 4 Wochen alte LDL-Rezeptor-knockout-Mäuse in 4 Gruppen randomisiert: Eine Kontroll-Gruppe mit normaler Diät und bewegungsarmen Lebensstil, eine Cholesterin-Gruppe mit cholesterinreicher Ernährung und bewegungsarmen Lebensstil, eine regelmäßige Trainingsgruppe mit cholesterinreicher Ernährung und regelmäßiger körperlicher Aktivität (60 min/d, 5 Tage/Woche) und eine gelegentlichen Trainingsgruppe, mit cholesterinreicher Ernährung und körperlicher Aktivität (60 min/d, 1 Tag/Woche) für jeweils 16 Wochen. In der 20. Woche wurden histologische Untersuchungen vorgenommen, die Verdickungen der Aortenklappen in der Cholesterin-Gruppe verglichen zur Kontroll-Gruppe zeigten. Regelmäßige, jedoch keine gelegentliche körperliche Aktivität reduziert signifikant diese Verdickung der Aortenklappe. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass eine Cholesterin-Diät die Endothelintegrität der Aortenklappe zerstört, wohingegen sie durch regelmäßige körperliche Aktivität geschützt wird. Weiterhin zeigte sich eine Erhöhung der Serum-Myeloperoxidase, der oxidierten Low Density Lipoproteine, der in situ Superoxide, als Marker für oxidativen Stress. Es konnten erhöhte Spiegel für Mac3, als Marker für Makrophagenakkumulation, α -smooth muscle actin, als Marker für Klappenfibrose und der proosteogene Marker Alkalische Phosphatase sowie eine erhöhte Mineralisation in der Cholesterin-Gruppe nachgewiesen werden. Wohingegen die genannten Marker in der Gruppe mit regelmäßiger körperlicher Aktivität erniedrigt nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion ergaben eine erhöhte Expression der messenger-RNA für α -smooth muscle actin, bone morphogenic protein-2, runt-related transcription factor-2 und Alkalische Phosphatase, als Marker für Klappenfibrose und Proosteogenese in der Cholesterin-Gruppe, dagegen waren sie durch regelmäßige körperliche Aktivität erniedrigt. Darüber hinaus erhöht regelmäßige körperliche Aktivität signifikant die Spiegel von zirkulierendem Fetuin-A, als Hemmstoff der Kalzifizierung verglichen zur Cholesterin-Gruppe.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass regelmäßige, jedoch keine gelegentliche körperliche Aktivität einer Aortenklappensklerose im Sinne einer Primärprävention durch eine Anzahl von Mechanismen, wie dem Schutz der Endothelintegrität, der Reduktion von Inflammation und oxidativem Stress sowie der Hemmung des osteogenen Signalweges, vorbeugt.

6. Literaturverzeichnis

- Adams V, Linke A, Krankel N, Erbs S, Gielen S, Mobius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2005; 111:555-562.
- Agmon Y, Khandheria BK, Meissner I, Sicks JR, O'Fallon WM, Wiebers DO, Whisnant JP, Seward JB, Tajik AJ. Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38:827-834.
- Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Andersen GG, Andersson Y, Attramadal T, Attramadal H. Induction of myocardial biglycan in heart failure in rats—an extracellular matrix component targeted by AT(1) receptor antagonism. *Cardiovasc Res*. 2003; 60:557-568.
- Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, Weissleder R. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation*. 2007; 115:377-386.
- Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, Fukuda D, Kohler RH, Shi GP, Jaffer FA, Weissleder R. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation*. 2009; 119:1785-1794.
- Antonini-Canterin F, Hirsu M, Popescu BA, Leiballi E, Piazza R, Pavan D, Gingham C, Nicolosi GL. Stage-related effect of statin treatment on the progression of aortic valve sclerosis and stenosis. *Am J Cardiol*. 2008; 102:738-742.
- Arishiro K., Hoshiga M., Negoro N., Jin D., Takai S., Miyazaki M., Ishihara T., Hanafusa T. Angiotensin receptor-1 blocker inhibits atherosclerotic changes and endothelial disruption of the aortic valve in hypercholesterolemic rabbits. *J Am Cardiol*. 2007; 49:1482-1489.

Aronow WS, Schwartz KS, Koenigsberg M. Correlation of serum lipids, calcium, and phosphorus, diabetes mellitus and history of systemic hypertension with presence or absence of calcified or thickened aortic cusps or root in elderly patients. *Am J Cardiol.* 1987; 59:998-999.

Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Dis.* 2001; 2:81-94.

Barrick CJ, Roberts RB, Rojas M, Rajamannan NM, Suitt CB, O'Brien KD, Smyth SS, Threasgill DW. Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice. *AM J Physiol Herat Circ Physiol.* 2009; 291:H65-75.

Beckmann E, Grau JB, Sainger R, Poggio P, Ferrari G. Insights into the use of biomarkers in calcific aortic valve disease. *J Heart Valve Dis.* 2010;19:441-452.

Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older apoe^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:2117-2124.

Benzuly KH, Padgett RC, Kaul S, Piegors DJ, Armstrong ML, Heistad DD. Functional improvement precedes structural regression of arteriosclerosis. *Circulation.* 1994; 89:1810-1818.

Böhmeke T., Schmidt A. Checkliste Echokardiographie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 2008; 4.Auflage:213-225.

- Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS. 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation*. 2008; 118: 523-661.
- Boon A, Cheriex E, Lodder J, Kessels F. Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart*. 1997; 78:472-472.
- Bratke, K., Luttmann, W., Küpper, M., Myrtek, D. *Der Experimentator: Immunologie* Reihe: Experimentator. Ein Spektrum Akademischer Verlag. 2009; 3. Aufl.:115-309.
- Byon CH, Sun Y, Chen J, Yuan K, Mao X, Heath JM, Anderson PG, Tintut Y, Demer LL, Wang D, Chen Y. Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor κ b ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31:1387-1396.
- Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J. Effect of lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation*. 2010; 121:306-314.
- Cosmi JE, Kort S, Tunick PA, Rosenzweig BP, Freedberg RS, Katz ES, Applebaum RM, Kronzon I. The risk of the development of aortic stenosis in patients with "benign" aortic valve thickening. *Arch Intern Med*. 2002; 162:2345-2347.

- Cowell SJ, Newby DE, Boon NA, Elder AT. Calcific aortic stenosis: same old story? *Age Ageing*. 2004;33:538-544.
- Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2005; 352: 2389-2397.
- Csiszar A, Labinsky N, Jo H, Ballabh P, Ungvari Z. Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295:H569-H577.
- Demer LL. Cholesterol in vascular and valvular calcification. *Circulation*. 2001; 104:1881-1883.
- Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in c57bl/6j mice. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47:850-855.
- Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol*. 2000; 9:281-286.
- El-Hamamsy I, Balachandran K, Yacoub MH, Stevens LM, Sarathchandra P, Taylor PM, Yoganathan AP, Chester AH. Endothelium-dependent regulation of the mechanical properties of aortic valve cusps. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53:1448-1455.
- Flachskampf FA. *Kursbuch der Echokardiographie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 2012; 5.Aufl.:8-30.
- Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005; 111:3316-3326.

- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994 ;94:2493-2503.
- Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrixdegrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ;92:402-406.
- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 2005; 437:270-274.
- Ghaisas NK, Foley JB, O'Briain DS, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:2257-2262.
- Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.*1993; 92:1686-1696.
- Goldberg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50:1205-1213.
- Göser S, Ottl R, Brodner A, Dengler TJ, Torzewski J, Egashira K, Rose NR, Katus HA, Kaya Z. Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy. *Circulation.* 2005 112:3400-3407
- Hakim AA, Petrovitch H, Burchfiel CM, Ross GW, Rodriguez BL, White LR, Yano K, Curb JD, Abbott RD. Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men. *N Engl J Med.* 1998; 338:94-99.

- Hambrecht R, Niebauer J, Marburger C, Grunze M, Kalberer B, Hauer K, Schlierf G, Kubler W, Schuler G. Various intensities of leisure time physical activity in patients with coronary artery disease: effects on cardiorespiratory fitness and progression of coronary atherosclerotic lesions. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 22:468-477.
- Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003; 107:3152-3158.
- Harrison DG, Armstrong ML, Freimann PC, Heistad DD. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1987; 80:1808-1811.
- Hathaway CA, Heistad DD, Piegors DJ, Miller FJ Jr. Regression of atherosclerosis in monkeys reduces vascular superoxide levels. *Circ Res.* 2002; 90:277-283.
- Heistad DD, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009; 73:201-207.
- Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mayranpaa M, Werkkala K, Lommi J, Turto H, Kupari M, Kovanen PT. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44:1859-1866.
- Helske S, Otto CM. Lipid lowering in aortic stenosis: still some light at the end of the tunnel? *Circulation.* 2009; 119:2653-2655.
- Hinton RB Jr, Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Benson DW, Yutzey KE. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294:H2480-H2488.

- Ix JH, Chertow GM, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ketteler M, Whooley MA. Association of fetuin-A with mitral annular calcification and aortic stenosis among persons with coronary heart disease; data from the Heart and Soul Study. *Circulation*. 2007; 115:2533-2539.
- Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER III, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg*. 2003; 75:457-465.
- Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanism and clinical implications. *Circ Res*. 2006; 99:1044-1059.
- Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, Sarikoc A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggrefe M. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2003; 170:205-211.
- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggrefe M. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 36:57-66.
- Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kilic R, Sarikoc A, Pinol R, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggrefe M. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol*. 2005; 14:80-87.
- Kim KM. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc*. 1976; 35:156-162.
- Koos R, Brandenburg V, Mahnken AH, Muhlenbruch G, Stanzel S, Gunther RW, Floege J, Jahnke-Dechent W, Kelm M, Kuhl HP. Association of fetuin-A levels with the progression of aortic valve calcification in non-dialyzed patients. *Eur Heart J*. 2009; 30:2054-2061.

- Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, Bohm M, Nickenig G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:809-814.
- Lester WM, Gotlieb AI: In vitro repair of the wounded porcine mitral valve. *Circ Res* 1988a, 62:833-845.
- Lester W, Rosenthal A, Granton B, Gotlieb AI: Porcine mitral valve interstitial cells in culture. *Lab Invest* 1988b, 59:710-719.
- Lieberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J Jr, Pomerantzeff PM, Laurindo FR. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:463-470.
- Lindroos M, Kupari M, Valvanne J, Strandberg T, Heikkila J, Tilvis R. Factors associated with calcific aortic valve degeneration in the elderly. *Eur Heart J.* 1994; 15:865-870.
- Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Mobius-Winkler S, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation.* 2005; 111:1763-1770.
- Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007; 171:1407-1418.
- Luttmann W, Sengler C, Herzog V, Balkow S, Matthys H, Virchow JC Jr. Differential modulation of interleukin-4 and interleukin-13 secretion of human peripheral blood monocuclear cells. *Immunology letters.* 1999; 69:225-231.
- Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for a new drug development? *Br J Pharmacol.* 2007; 152:838-854.

Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med.* 2002; 347:716-725.

Mazzone A, Venneri L, Berti S. Aortic valve stenosis and coronary artery disease: pathophysiological and clinical links. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2007; 8:983-989.

Messika-Zeitoun D, Bielak LF, Peyser PA, Sheedy PF, Turner ST, Nkomo VT, Breen JF, Maalouf J, Scott C, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. Aortic valve calcification: determinants and progression in the population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:642-648.

Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Pena-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52:843-850.

Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Brooks RM 2nd, Berry CJ, Zimmerman K, Young SG, Heistad DD. Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice. *Circulation.* 2009; 119:2693-2701.

Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Castaneda LE, Brooks RM, Zimmerman K, Heistad DD. Evidence for active regulation of proosteogenic signaling in advanced aortic valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:2482-2486.

Mohler ER, Sheridan MJ, Nichols R, Harvey WP, Waller BF. Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors - a causal relationship? A clinical morphologic study. *Clin Cardiol.* 1991; 14:995-999.

- Mohler ER, III, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:547-552.
- Mohler ER, III, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, Gannon FH. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis.* 1999; 8:254-260.
- Mohler ER III, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 2001; 103:1522-1528.
- Mohler ER. Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol.* 2004; 94:1396-1402.
- Mohty D, Pibarot P, Despres JP, Cote C, Arsenault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:187-193.
- Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, Stolina M, Kostenuik PJ, Demer LL. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation.* 2008; 117:411-420.
- Moura LM, Maganti K, Puthumana JJ, Rocha-Goncalves F, Rajamannan NM. New understanding about calcific aortic stenosis and opportunities for pharmacologic intervention. *Curr Opin Cardiol.* 2007a; 22:572-577.
- Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Goncalves F, Rajamannan NM. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007b; 49: 554-561.

- Mülhardt, C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 2009; 6.Aufl.:109-115.
- Mulholland DL, Gotlieb AI: Cell biology of valvular interstitial cells. *Can J Cardiol* 1996, 12:231-236.
- Ni CW, Qiu H, Rezvan A, Kwon K, Nam D, Son DJ, Visvader JE, Jo H. Discovery of novel mechanosensitive genes in vivo using mouse carotid artery endothelium exposed to disturbed flow. *Blood*. 2010; 116:e66-e73.
- Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*. 1995 ;92:1393-1398.
- Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. *Lancet*. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*. 2006; 368:1005-1011.
- Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation*. 2001; 104:2205-2209.
- O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions [see comments]. *Circulation*. 1995a; 92:2163-2168.
- O'Brien KD, Otto CM, Reichenbach DD, Alpers CE, Wight TN. Regional accumulation of proteoglycans in lesions of "degenerative" valvular aortic stenosis and their relationship to apolipoproteins. *Circulation*. 1995b ;92(suppl I):I-612.

- O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a) and E accumulate in the morphologically early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16:523-532.
- O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation.* 1998; 98:519-527.
- O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, Probstfield JL. Association of Angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation.* 2002; 106:2224-2230.
- O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1721-1728.
- Olsson M, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, Rosenqvist M, Ryden L, Nilsson J. Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol.* 1994a; 23:1162–1170.
- Olsson M, Rosenqvist M, Nilsson J. Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 1994b; 24:1664 –1671.
- Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:1218-1222.
- Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion in "degenerative" valvular aortic stenosis: histological and immunohistochemical studies. *Circulation.* 1994; 90:844-853.

- Otto CM, Burwash IG, Legget ME, Munt BI, Fujioka M, Healy NL, Kraft CD, Miyake-Hill CY, Schwaegler RG. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis, Clinical, Echocardiographic, and Exercise Predictors of outcome. *Circulation*. 1997; 95:2262-2270.
- Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med*. 1999; 341:142-147.
- Otto CM. Calcific aortic stenosis-time to look more closely at the valve. *N Engl J Med*. 2008; 359:1395-1398.
- Park JH, Iemitsu M, Maeda S, Kitajima A, Nosaka T, Omi N. Voluntary running exercise attenuates the progression of endothelial dysfunction and arterial calcification in ovariectomized rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 193:47-55.
- Parolari A, Loardi C, Mussoni L, Cavallotti L, Camera M, Biglioli P, Tremoli E, Alamanni F. Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009; 35:493-504.
- Pellika PA, Sarano ME, Nishimura RA, Malouf JF, Bailey KR, Scott CG, Barnes ME, Tajik AJ. Outcome of 622 adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up. *Circulation*. 2005; 111:3290-3295.
- Peltier M, Trojette F, Sarano ME, Grigioni F, Slama MA, Tribouilloy CM. Relation between cardiovascular risk factors and nonrheumatic severe calcific aortic stenosis among patients with a three-cuspid aortic valve. *Am J Cardiol*. 2003; 91:97-99.
- Qian J, Chen Z, Ge J, Ma J, Chang S, Fan B, Liu X, Ge L. Relationship between aortic valve calcification and the severity of coronary atherosclerotic disease. *J Heart Valve Dis*. 2010; 19:466-470.

Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*. 2003; 107:2181-2184.

Rajamannan NM, Otto CM. Targeted therapy to prevent progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* 2004;110:1180-1182.

Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, Stone NJ, Springett M, Ignatiev KI, McConnell JP, Singh RJ, Bonow RO, Spelsberg TC. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart*. 2005; 91:806-810.

Rajamannan NM. Bicuspid aortic valve disease: the role of oxidative stress in Lrp5 bone formation. *Cardiovasc Pathol*. 2011a; 20:168-176.

Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: a review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011b; 124:1783-1791.

Richter B, Niessner A, Penka M, Grdic M, Steiner S, Strasser B, Ziegler S, Zorn G, Maurer G, Simeon-Rudolf V, Wojta J, Huber K. Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events. *Thromb Haemost*. 2005; 94:1306-1311.

Rossebo AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, Gerds E, Gohlke-Barwolf C, Holme I, Kesaniemi YA, Malbecq W, Nienaber CA, Ray S, Skjaerpe T, Wachtell K, Willenheimer R. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2008; 359:1343-1356.

- Schlotter F, Matsumoto Y, Mangner N, Schuler G, Linke A, Adams V. Regular exercise or changing diet does not influence aortic valve disease progression in LDLR deficient mice. *PLoS ONE*. 2012; 7(5): e37298.
- Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation*. 2008; 118:1864-1880.
- Shavelle DM, Takasu J, Budoff MJ, Mao S, Zhao XQ, O'Brien KD. HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. *Lancet*. 2002; 359:1125-1126.
- Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*. 2005; 96:792-799.
- Simmons CA. Aortic valve mechanics: an emerging role for the endothelium. *J Am Cardiol*. 2009; 53:1456-1458.
- Sipahi I, Nicholls SJ, Tuzcu EM, Nissen SE. Coronary atherosclerosis can regress with very intensive statin therapy. *Cleve Clin J Med*. 2006; 73:937-944.
- Soini Y, Satta J, Maatta M, Autio-Harmanen H. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol*. 2001; 194:225-231.
- Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8:1211-1217.
- Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol*. 2002; 161:2035-2046.

- Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease: Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29: 630-634.
- Stewart KJ. Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *J Am Med Assoc.* 2002; 288:1622-1631.
- Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A, Jo H, Yoganathan AP. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial vcam-1 and icam-1 in a bmp-4- and tgf-beta1-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:254-260.
- Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, Hirata Y, Nagai R. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein e-deficient mice. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46:134-141.
- Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res* 2001; 88:877-887.
- Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation.* 2003; 107:3109-3116.
- Tiede K, Stoter K, Petrik C, Chen WB, Ungefroren H, Kruse ML, Stoll M, Unger T, Fischer JW. Angiotensin II AT(1)-receptor induces biglycan in neonatal cardiac fibroblasts via autocrine release of TGF β in vitro. *Cardiovasc Res.* 2003; 60:538-546.

- Wallby L, Janerot-Sjoberg B, Steffensen T, Broqvist M. T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart*. 2002; 88:348-351.
- Walton KW, Williamson N, Johnson AG. The pathogenesis of atherosclerosis of the mitral and aortic valves. *J Pathol*. 1970; 101:205-220.
- Wannamethee SG, Lowe GD, Whincup PH, Rumley A, Walker M, Lennon L. Physical activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men. *Circulation*. 2002; 105:1785-1790.
- Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2006; 114:2065-2069.
- Wilund KR, Tomayko EJ, Evans EM, Kim K, Ishaque MR, Fernhall B. Physical activity, coronary artery calcium, and bone mineral density in elderly men and women: a preliminary investigation. *Metabolism*. 2008; 57:584-591.
- Yip CY, Chen JH, Zhao R, Simmons CA. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29:936-942.

7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Ort, Datum

Unterschrift

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vor und Zuname: Saskia Jacob
Geburtsdatum/-ort: 25. Oktober 1985, Merseburg/Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Uwe Jacob
Kerstin Jacob

Ausbildung

1992 – 1996 Grundschule Am Krähenberg, Leuna
1996 – 2005 Novalis Gymnasium, Bad Dürrenberg
2005 – 2011 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
2007 1. Abschnitt Ärztliche Prüfung
2011 2. Abschnitt Ärztliche Prüfung

Praktische Erfahrung

2008 Famulatur Universitätsklinikum Leipzig, Kardiologie
2008 Famulatur Klinikum Sankt Georg, Leipzig, Gynäkologie
und Geburtshilfe
2009 Famulatur Allgemeinarzt-Praxis:
Dipl. med. Jutta Schreier, Bad Dürrenberg
2009 Famulatur Universitätsklinikum Jena, Gynäkologie und
Geburtshilfe
2010 Famulatur Rarotonga Hospital, Cook Inseln, Innere
Medizin, Chirurgie
2010 Praktisches Jahr Universitätsklinikum Leipzig,
Gastroenterologie
2010 Praktisches Jahr Herzzentrum Leipzig, Kardiologie und
Intensivmedizin

2010/2011	Praktisches Jahr Universitätsspital Basel, Unfallchirurgie, Orthopädie, Notfallmedizin, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Thoraxchirurgie
2011	Praktisches Jahr Universitätsklinikum Leipzig, Augenheilkunde
seit 2012	Assistenzärztin zur Weiterbildung in Augenheilkunde, Charité Berlin

9. Publikationen

Matsumoto Y, Adams V, Jacob S, Mangner N, Schuler G, Linke A. Regular exercise training prevents aortic valve disease in Low-Density Lipoprotein-Receptor-deficient-mice. *Circulation*. 2010; 121:759-767.

10. Danksagung

Diese Arbeit verdankt ihr Gelingen der Hilfe vieler Mitarbeiter des kardiologischen Forschungslabors des Herzzentrums Leipzig.

Herrn Prof. Dr. med. Gerhard C. Schuler danke ich für das Überlassen der Thematik dieser Arbeit.

Mein Dank gilt im Besonderen Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Volker Adams für die stets geduldige Betreuung, insbesondere die ständige Unterstützung bei der Versuchsplanung und der Erstellung des Manuskripts sowie für seine Fähigkeit, andere für Wissenschaft und Forschung zu begeistern.

Herrn Dr. med. Yasuharu Matsumoto gilt mein außerordentlicher Dank für die stetige hilfreiche Unterstützung bei der Organisation der Versuche und deren Durchführung sowie bei jeglichen Problemen der Auswertung und sonstigen Fragen. Sein ungetrübter Enthusiasmus und seine große Liebe zum Detail hinterließen einen bleibenden Eindruck auf mich.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim Thiery und Herrn Prof. Dr. med. Daniel Teupser vom Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik möchte ich mich für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Versuchstiere recht herzlich bedanken.

Frau Prof. Dr. med. Karla Punkt danke ich für das zur Verfügung stellen des Kryomikrotoms am Institut für Anatomie der Universität Leipzig.

Für die exzellente technische Unterstützung bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Forschungslabors, Frau Claudia Weiß, Frau Tina Fischer, Frau Angela Kricke und Sarah Werner, ohne deren Hilfe vieles schwieriger gewesen wäre.

Meiner lieben Tante und wachsamen Orthografiefiedler Frau Karla Jacob möchte ich für die vielen Stunden der Korrektur danken.

Meinen Freunden Frau Dr. med. Anna-Karina Brigitte Maier und Herrn Daniel Rau möchte ich besonders für die konstruktive Kritik, die guten Zusprüche und anhaltende Motivation danken.

Meinen lieben Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung, ihre Hilfe bei meinen Entscheidungen und ihren Glauben an mich.