

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Abteilung Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
und Sektion Nephrologie
an der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Micha Löbermann



**Charakterisierung von Entzündungs-, Fibrosierungs- und
Kalzifikationsprozessen an explantierten Herzschrittmachersonden
unter Berücksichtigung patientenabhängiger Faktoren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Arian Baume

geb. am 21.02.1996 in Rostock

Rostock, 2021

Dekan: **Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger**

Dekan und Wissenschaftlicher Vorstand, Universitätsmedizin Rostock

Gutachter: **Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger**

Abteilung Tropenmedizin und Infektionskrankheiten und Sektion Nephrologie,
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Pascal M. Dohmen

Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie,
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Bernhard Rauch

Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie,
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2022

Für Brigitte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Herzrhythmusstörungen	8
1.2 Probleme in der Herzschrittmachertherapie	9
1.2.1 Sonden-Gewebe-Interaktionen	11
1.2.2 Sondenextraktion und nebenwirkungsarme Schrittmachertherapie	14
2 Problemstellung und Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Materialien	17
3.1.1 Patientenkollektiv	17
3.1.2 Patientenproben	17
3.1.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	18
3.1.4 <i>TaqMan</i> [™] Gene Expression Assays der Genexpressionsanalyse	21
3.1.5 Antikörper der Western Blot-Analyse	21
3.2 Methoden	22
3.2.1 Genexpressionsanalyse	22
3.2.1.1 RNA-Isolation der Herzgewebeproben	23
3.2.1.2 RNA-Isolation der Referenz- <i>in-vitro</i> -Herzzellen	25
3.2.1.3 cDNA-Synthese	26
3.2.1.4 Real-Time-PCR	26
3.2.2 Immundetektion der Proteine	27
3.2.2.1 Dot-Blot	28
3.2.2.2 Proteinextraktion	31
3.2.2.3 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.2.2.4 Western Blot	33
3.2.2.5 Auswertung Western Blot-Analysen	35
3.2.3 Matching der Analysedaten durch Heat Maps	35
3.2.4 Auswahl verwendeter Biomarker	36
4 Ergebnisse	38
4.1 Patientenkollektiv	38
4.2 Genexpressionsanalyse	42

4.2.1	Endothelaktivierungsmarker.....	42
4.2.2	Entzündungsmarker	43
4.2.3	Fibrosemarker	45
4.2.4	Kalzifizierungsmarker	46
4.3	Proteinanalyse.....	48
4.3.1	Entzündungsmarker	48
4.3.2	Fibrosierungsmarker	49
4.3.3	Kalzifizierungsmarker	49
4.4	Matching von Patientendaten, Genexpressions- und Proteinanalyse.....	50
5	Diskussion	54
6	Zusammenfassung	65
7	Thesen	67
8	Literaturverzeichnis	69
9	Anhang	78
10	Danksagung	100
11	Eidesstattliche Erklärung	101
12	Lebenslauf	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Implantationshäufigkeit von Herzschrittmachern in Europa	7
Abbildung 1.2:	Entwicklung der Anzahl implantierter Herzschrittmacher zw. 2006-2017	7
Abbildung 1.3:	Bradykarde und tachykarde Herzrhythmusstörungen	8
Abbildung 1.4:	Die häufigsten Indikationen zur Herzschrittmachertherapie im Jahr 2017	9
Abbildung 1.5:	Fibrose und Einkapselungen von Schrittmacherelektroden	11
Abbildung 1.6:	Paraffinschnitte thrombofibrinotischer Sondeneinkapselungen	12
Abbildung 1.7:	DSA Schrittmachersonden-induzierter Stenosen beider <i>Vv. subclaviae</i>	13
Abbildung 1.8:	Schematische Darstellung der Sondenextraktion	14
Abbildung 3.1:	Prinzip der <i>TaqMan</i> [™] -PCR	23
Abbildung 3.2:	Mittels Fluoreszenz-Detektor visualisierter erster Dot-Blot	29
Abbildung 3.3:	Mittels Fluoreszenz-Detektor visualisierter zweiter Dot-Blot	30
Abbildung 3.4:	Absorptionsmaximum von Coomassie®-Brillantblau G 250	32
Abbildung 3.5:	Schematischer Aufbau der Blotting-Apparatur	34
Abbildung 3.6:	Western Blot-Entwicklung und Protein-Banden-Detektion	34
Abbildung 4.1:	Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs	38
Abbildung 4.2:	Einteilung des Patientenkollektivs in fünf Altersklassen	38
Abbildung 4.3:	Body-Mass-Index (kg/m ²) des Patientenkollektivs	39
Abbildung 4.4:	Sondenliegezeit der Patienten-Herzschrittmacher	39
Abbildung 4.5:	Indikationen der Sondenextraktionen des Patientenkollektivs	40
Abbildung 4.6:	Erregerspezies infektionsbedingter Sondenextraktionen	40
Abbildung 4.7:	Häufigste Komorbiditäten des Patientenkollektivs	41
Abbildung 4.8:	RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Endothelaktivierung	43
Abbildung 4.9:	RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Entzündung	44
Abbildung 4.10:	RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Fibrose	46
Abbildung 4.11:	RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Kalzifikation	47
Abbildung 4.12:	Western Blot-Analyse	48
Abbildung 4.13:	Heat Map visualisierter Genexpressionsmuster	50
Abbildung 4.14:	Matching von Patientendaten und Genexpressionsanalyse	51
Abbildung 9.1:	Transendotheliale Leukozytenmigration	80
Abbildung 9.2:	Cyclooxygenasevermittelte Prostaglandinsynthese	83
Abbildung 9.3:	Signaltransduktion und regulatorische Funktionen von TNF- α	87
Abbildung 9.4:	Grundstruktur der Gelatinasen A und B	90
Abbildung 9.5:	TGF- β -Signalweg bei Gewebefibrose	91
Abbildung 9.6:	Signaltransduktion und Funktionen von BMP-2	94
Abbildung 9.7:	Schematische Darstellung der Sondenextraktion	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Liste der verwendeten Geräte	18
Tabelle 3.2	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 3.3	Liste der verwendeten Laborgerätschaften	19
Tabelle 3.4	Liste der verwendeten Chemikalien	20
Tabelle 3.5	Liste der verwendeten Software	20
Tabelle 3.6	Liste der verwendeten <i>TaqMan</i> [™] Gene Expression Assays	21
Tabelle 3.7	Liste der verwendeten primären Antikörper	21
Tabelle 3.8	Liste der verwendeten sekundären Antikörper	21
Tabelle 3.9	RNA-Gehalt der Herzproben aus den Jahren 2018 und 2019	25
Tabelle 3.10	Beladungsschema des ersten Dot-Blots	29
Tabelle 3.11	Beladungsschema des zweiten Dot-Blots	30
Tabelle 3.12	Proteinextraktion	31
Tabelle 3.13	Auswahl und Funktion verwendeter Biomarker	36
Tabelle 5.1	WHO-Definition des metabolischen Syndroms	62

Abkürzungsverzeichnis

AAI	Atrium-Atrium-Inhibierung
ACTA-2	α -smooth muscle actin, α -SMA
ALP	alkaline phosphatase
ANXA-2	Annexin II
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BMP-2	bone morphogenic protein 2
CD36	Thrombozytenglykoprotein 4
COX-2	Cyclooxygenase II
CRP	C-reaktives Protein
CRT	cardiac resynchronization therapy
DDD	Dual-Dual-Inhibierung u. -Triggerung
ECM	extracellular matrix
EDN-1	Endothelin-1
ELANE	Elastase 2, Neutrophilen-/Leukozyten-Elastase
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDL	high density lipoprotein
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1, CD54
ICAM-3	intracellular adhesion molecule 3, CD50
ICD	implantable cardioverter-defibrillator
IL-1b	Interleukin 1b
IL-6	Interleukin-6
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kDa	Kilodalton
LDL	low density lipoprotein
MCP	membrane cofactor protein, CD46
MGP	Matrix-Gla-Protein
MMP-2	Matrix-Metalloprotease 2
MPO	Myeloperoxidase
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
oxLDL	oxidierte low-density Lipoproteine
oxPL	oxidierte Phospholipide

PAK-1	p21-activated kinase 1
PAMPS	pathogen-associated molecular patterns
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAC-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SELE	Selektin E, CD62
SPP-1	secreted phosphoprotein 1
TFB-1	general transcription factor 2H subunit 1
TGF- β	transforming growth factor beta
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinases 1
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
VAT	Ventrikel-Atrium-Triggerung
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, CD106
VVI	Ventrikel-Ventrikel-Inhibierung

A.	<i>Arteria</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
u.a.	unter anderem
V.	<i>Vena</i>
Vv.	<i>Venae</i>
v.a.	vor allem
Z.n.	Zustand nach
zw.	zwischen

1 Einleitung

Jährlich werden weltweit ca. eine Million Herzschrittmacher implantiert, davon allein etwa 77.000 in Deutschland. Damit ist die Bundesrepublik Spitzenreiter in Europa; kein anderes Land implantiert mehr Schrittmacher pro eine Million Einwohner (vgl. Abb. 1.1) [1]. Die Anzahl der Neuimplantationen steigt dabei stetig: Waren es 2006 noch 66.059 Neuimplantationen, so wurden 2017 bereits 77.283 Schrittmacher in Deutschland implantiert (vgl. Abb. 1.2) [2–5].

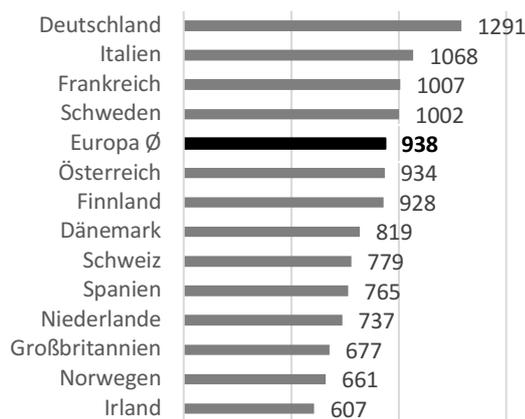


Abb. 1.1: Durchschnittliche Implantationshäufigkeit von Schrittmachern in Europa im Jahr 2011 pro 1 Million Einwohner. Eingeschlossen sind sowohl Neuimplantationen als auch Austausch-Operationen. Modifiziert nach Brignole *et al.* [1].

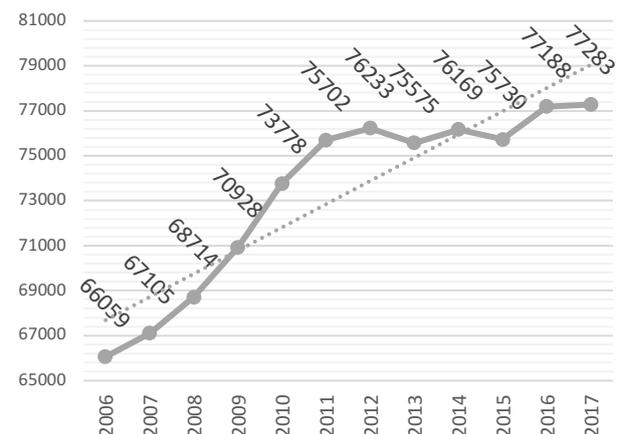


Abb. 1.2: Entwicklung der Anzahl implantierter Herzschrittmacher im Zeitraum von 2006-2017. Eigene Darstellung. Daten aus Markewitz *et al.* [2–5].

Insbesondere die demografisch alternde Gesellschaft sowie sozialökonomische Veränderungen innerhalb der Industrienationen bedingen eine immer größer werdende Nachfrage nach implantierbaren elektrischen Herzgeräten, wie Herzschrittmacher (Peacemaker, PM), Geräte zur kardialen Resynchronisation (CRT) und implantierbare Kardioverter-Defibrillatoren (ICD) [6]. Die Weiterentwicklung der Geräte bzgl. individueller, diagnostischer und therapeutischer Stimulationsmöglichkeiten ermöglicht eine immer breitere Indikationsstellung. Zusammen mit der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung sowie eine – durch u.a. angeborene Herzfehler bedingte – frühzeitige Implantation von Herzgeräten, erfordert dies eine enge Zusammenarbeit zwischen medizinischer und biotechnologischer Forschung, um langlebige, wartungsfreie Systeme zu entwickeln [6].

1.1 Herzrhythmusstörungen

Herzrhythmusstörungen bezeichnen einen Symptomkomplex unterschiedlicher kardialer Erkrankungen, bei denen – durch eine veränderte Erregungsbildung oder -ausbreitung – die Abläufe der normalen Herzaktionen gestört sind. Ursächlich unterschieden werden Herzrhythmusstörungen dabei in gestörte Herzfrequenzen (bradykard/ tachykard) und/oder unregelmäßige Herzschläge (Arrhythmie) sowie entsprechend ihrem Entstehungsort in supraventrikulär (Ursprung im Herzvorhof) und ventrikulär (Ursprung in der Herzkammer). Maßgeblich beteiligt an der Entstehung kardialer Rhythmusstörungen sind dabei Pathologien in der Erregungsphysiologie von Sinus- und Atrioventrikularknoten (AV-Knoten). Der Sinusknoten ist im *Sulcus terminalis* des rechten Herzvorhofs nahe der Einmündung der *V. cava superior* lokalisiert und fungiert als das primäre Schrittmacherzentrum des Herzens. Die generierte Eigenfrequenz von 60-80 Schlägen pro Minute wird vom Sinus-Knoten entlang des Vorhofmyokards über den AV-Knoten in das Kammermyokard übergeleitet. Der AV-Knoten ist das sekundäre Schrittmacherzentrum mit einer Eigenfrequenz von 40 - 50 Schlägen pro Minute und verzögert die Erregungsübertragung zwischen Herzvorhof und -ventrikel um ca. 60 - 120 ms. Dies ermöglicht eine zeitlich versetzte Kontraktion zwischen Vorhof- und Ventrikelmyokard. Nach Überleitung in das His-Bündel (*Funiculus atrioventricularis*; Fortsetzung des AV-Knotens) breitet sich die Erregung entlang der Tawara-Schenkel (*Crus dextrum et sinistrum*) und deren Endästen (Purkinje-Fasern) bis zur Herzspitze aus, wodurch eine ganzheitliche Ventrikelkontraktion ermöglicht wird. Diese Reizbildung und -weiterleitung im Herzen kann idiopathisch, aber auch im Rahmen verschiedener kardialer und extrakardialer Erkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit (KHK), Herzinsuffizienz, Myokarditis, Hypertonie oder Lungenembolie, gestört sein. Typische Rhythmusstörungen, die dabei in Erscheinung treten, sind neben Extrasystolen und Sinusarrhythmien auch atrioventrikuläre Blockaden, Vorhof- und Kammerflimmern/-flattern (vgl. Abb. 1.3).

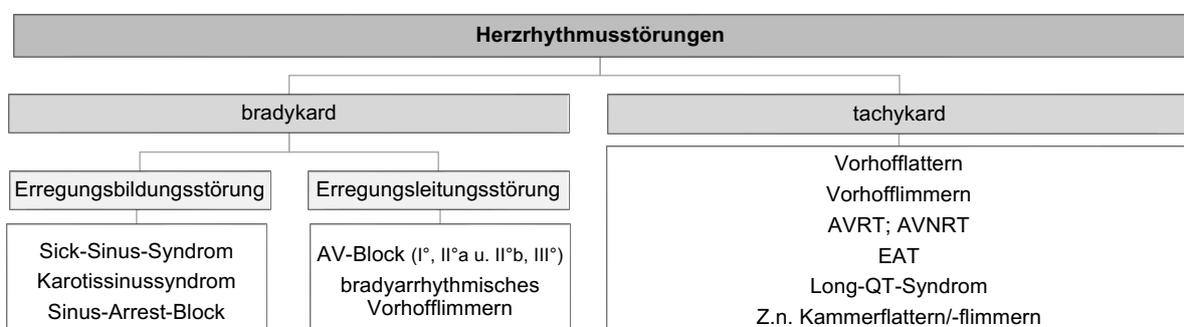


Abb. 1.3: Bradykarde und tachykarde Herzrhythmusstörungen als Indikationen für die Schrittmacherimplantation. AVRT (atrioventrikuläre Reentrytachykardie), AVNRT (AV-Knoten-Reentrytachykardie); EAT (ektope atriale Tachykardien). Abbildung modifiziert nach Sommer *et al.* [7].

Zu den häufigsten Indikationen für die Anlage eines Herzschrittmachers zählt neben dem AV-Block und Sick-Sinus-Syndrom (SSS) auch das Vorhofflimmern (vgl. Abb. 1.4) [3].

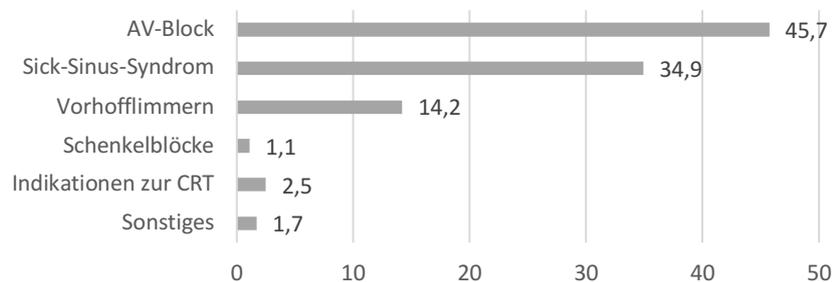


Abb. 1.4: Die häufigsten Indikationen zur Herzschrittmachertherapie im Jahr 2017.
Angaben in Prozent. Nach Markewitz *et al.* [4]

Die Therapie der Herzrhythmusstörungen besteht in erster Linie aus der Behandlung der Grunderkrankungen, Allgemeinmaßnahmen (Vagusreizung/Valsalva-Manöver) sowie einer evtl. Notfalltherapie mit Defibrillation (Kammerflimmern) oder Kardioversion (Vorhofflimmern). Neben diesen Basismaßnahmen kommt der medikamentösen Therapie mit Antiarrhythmika eine umfassende Bedeutung zu. In fortgeschrittenen Stadien ist die medikamentöse Therapie allein oftmals nicht ausreichend. In diesem Fall können die Therapieoptionen um die Anlage eines Herzschrittmachers erweitert werden. Sie ermöglichen mittels Elektrostimulation des Myokards die Therapie bradykarder und tachykarder Rhythmusstörungen sowie die Resynchronisation zwischen rechtem und linkem Ventrikel.

Die Implantation der Schrittmacherelektroden erfolgt üblicherweise unter kardiologischer, bei Risikopatienten auch unter herzchirurgischer Intervention in Lokalanästhesie. Der Sondendraht des Herzschrittmachers wird dazu entweder in die *V. cephalica* (Ø 37,2 % in den Jahren 2015 - 2017) oder *V. subclavia* (Ø 61,0 % in den Jahren 2015 - 2017) [4] eingeführt und über die *V. cava superior* in den rechten Herzventrikel vorgeschoben. Hierbei kann zwischen einem Einkammer- (lediglich eine Elektrode im rechten Herzventrikel platziert; VVI, AAI), einem Zweikammer- (zusätzliche Elektrode im rechten Herzvorhof; DDD, VAT) und einem Dreikammersystem (zusätzliche Elektrode im linken Herzventrikel) unterschieden werden.

1.2 Probleme in der Herzschrittmachertherapie

Trotz verschiedener Sondenisolationmaterialien und Fixierungsmechanismen sowie der sich stetig weiterentwickelnden technischen Innovationen auf dem Gebiet der Schrittmachertechnologie steigt mit der zunehmenden Anzahl an Implantationen auch die jährliche Anzahl notwendiger Wiederholungseingriffe und Systemwechsel [8]. Nach ca. zehn

Jahren ist eine Explantation der Implantate bei 20,0 – 30,0 % der Patienten notwendig [9, 6, 10]. Verschiedene Studien konnten dabei zeigen, dass erhebliche Unterschiede in der Langlebigkeit zwischen den elektrischen Herzsystemen bestehen. Basierend auf den Jahresberichten der Hersteller für Herzschrittmacher wurde in der Bradykardietherapie eine mittlere Funktionsfähigkeit von 99,0 % nach zehn Jahren und 97,0 % nach 15 Jahren ermittelt [6]. Im Gegensatz dazu liegt die 5-Jahres-Funktionsfähigkeit bei der Verwendung von Kardioverter-Defibrillatoren (ICD) bei nur 85,0 – 98,0 % bzw. 60,0 – 72,0 % nach acht Jahren [9]. Ab einer Sondenliegedauer von zehn Jahren steigt die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfunktion um jährlich ca. 20,0 % an [9]. Insbesondere bei jungen Patienten mit angeborenen Herzfehlern zeigt sich, bedingt durch eine erhöhte mechanische Belastung der Elektroden im wachsenden Organismus sowie der höheren körperlichen Aktivität im Vergleich zu älteren Patienten, eine hohe Ausfallrate der Elektroden [11–13]. In der Vielzahl der Fälle waren Sondenfehlfunktionen, Verwachsungen und thromboembolische Ereignisse nach Stilllegung von Sonden ursächlich für die Entnahme implantierter Systeme [6]. In ca. 53,0 % der Fälle konnten bakterielle Infektionen, darunter Gerätetascheninfektionen und -abszesse, Endokarditiden, oberflächliche Inzisionsinfektionen sowie okkulte grampositive Bakteriämien, als Ursache identifiziert werden [14–16].

Technisch bedingte Sondenfehlfunktionen entstehen häufig durch Defekte der Sondenisolation. Durch Hydrolyse, Metallionen-katalysierte Oxidation (MIO) und *environmental stress cracking* (ESC) unterliegt die Isolation abrasiven Einflüssen und Degradationsmechanismen, welche zusammen mit starken mechanischen Belastungen im venösen Milieu eine Fehlfunktion der Sonde verursachen können [17, 18]. Zusätzliche Verwachsungen mit dem menschlichen Gewebe bedingen im zeitlichen Verlauf die Thrombenbildung, Fibrosierung sowie Kalzifikation am Sonden-Gewebe-Übergang [19]. Neben der Entstehung akuter Gefäßverschlüsse birgt dies die Gefahr faseriger Gefäßadhäsionen bzw. „nahezu vollständigen Einkapselungen in eine durch die Elektroden erzeugte neointimale Gewebetasche“ [6] (vgl. Abb. 1.5 und 1.6). Diese Mechanismen erschweren die Extraktion zum Teil erheblich, sodass ein einfacher Systemwechsel nicht mehr möglich ist [20, 21]. Aus diesem Grund wird eine Vielzahl an funktionslosen Sonden (41,3 % im Jahr 2013) in den venösen Gefäßen belassen und erst beim Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen entfernt, während neue Sonden im gleichen Gefäß platziert werden [2].

Die operative Sondenentfernung stellt oftmals ein riskantes Extraktionsverfahren dar, welches in ca. 1,7 % der Fälle mit schwerwiegenden perioperativen Komplikationen und einer Letalität von 0,5 % einhergeht [15]. Basierend auf diesen Daten empfehlen unabhängige Fachgesellschaften eine Sondenextraktion ausschließlich in eigens darauf spezialisierten

Herzzentren unter herzchirurgischer Intervention und ausreichend geschultem Personal [15, 22]. So ist das Risiko für letale Komplikationen in Zentren mit geringer Operationshäufigkeit bei Sondenextraktion nahezu doppelt so hoch wie in spezialisierten Fachkliniken [15].



Abb. 1.5: Fibrose und Einkapselungen von Schrittmacherelektroden bei Formaldehyd-Ethanol-fixierten Körperspenden. (A) Geringgradige Fibrosierung der Sondenverankerung (Pfeil) im Trabekelwerk des rechten Ventrikels. **(B)** *V. subclavia* mit eingekapseltem Elektrodenkabel. **(C)** Eingekapselte Sondenverankerung im rechten Ventrikel mit Adhäsion der Herztrabekel (Pfeilspitze) am fibrotischen Gewebe. Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch das Institut für Anatomie der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Aus Keiler *et al.* [6].

1.2.1 Sonden-Gewebe-Interaktionen

Die Implantation elektrischer Herzschrittmachersonden birgt, basierend auf verschiedenen Fremdkörperreaktionen des menschlichen Körpers, eine Reihe peri- und postoperativer Komplikationen. Neben dem erhöhten Risiko für schwerwiegende perioperative Blutungsereignisse durch z.B. die Penetration sondenführender venöser Gefäße gehören dazu v.a. thromboembolische Ereignisse. Als Reaktion auf den intravasalen Fremdkörper induziert der Organismus initial eine Thrombusbildung entlang der Elektrodensonde [23]. Elektrodenanteile, die im direkten Kontakt mit dem Gefäßendothel oder Endokard stehen, werden bereits nach kürzester Zeit von einem dünnen Fibrosemantel überdeckt und schlauchförmig eingekapselt (vgl. Abb. 1.5) [23, 22]. Besonders betroffene Gefäßbereiche sind die venöse Eintrittsstelle, die *V. subclavia* und *V. cava superior* sowie der Bereich der Elektrodenverankerung im Myokard, in welchem auch Verwachsungen zwischen Papillarmuskeln, *Chordae tendineae* und Schrittmacherelektroden nachgewiesen werden konnten [6]. Die Adhäsionsstellen, welche auch Verwachsungen zwischen mehreren Elektrodenkabeln begünstigen, bilden im zeitlichen Verlauf insbesondere bei jungen Patienten und Patienten mit chronischem Nierenversagen zunehmend mehr fibrotisch-kollagenes

Bindegewebe mit progressiven Kalzifizierungsherden (vgl. Abb. 1.6) [23, 6]. In Hinblick auf eine erforderliche Laser- oder elektrochirurgisch gestützte Dissektion stellt die Mineralisierung von endothelialelem Gewebe durch Calciumphosphatsalze eine erhebliche Behinderung der operativen Interventionsmöglichkeiten dar [6].

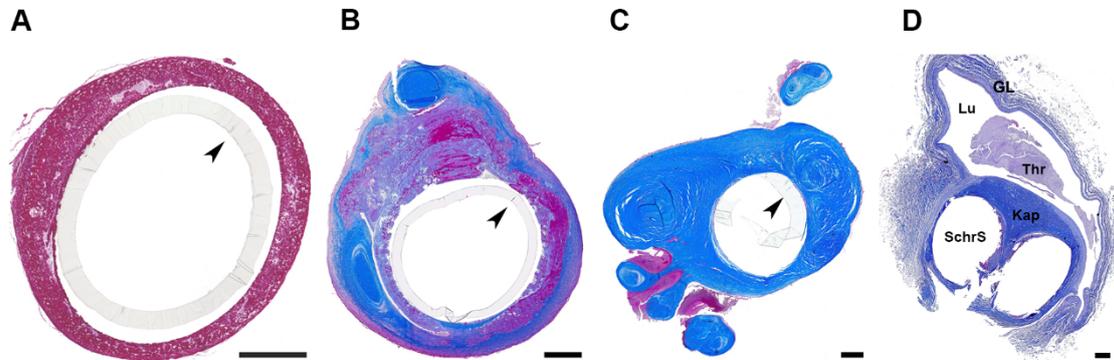


Abb. 1.6: Mit Azan-Trichrom gefärbte Paraffinschnitte unterschiedlicher Stadien thrombofibrotischer Sondeneinkapselungen. Die Pfeilspitzen deuten auf die hinterbliebene äußere Schicht der Sondenisolation nach Extraktion. Maßstabsbalken: 500 μ m. **(A)** Thrombotische Einkapselung im rechten Ventrikel (RV) nach 28 Monaten Liegezeit. **(B)** Thrombotisch-kollagenes Gewebe auf Höhe der Trikuspidalklappe nach 15 Monaten Liegezeit. **(C)** Dicht gepacktes kollagenes Bindegewebe im RV nach 61 Monaten Liegezeit. **(D)** Querschnitt durch die *V. subclavia*. Zu erkennen ist ein deutlich eingengtes Gefäßlumen (Lu), welches durch eine – die Lumen der extrahierten Schrittmachersonden (SchrS) umhüllende – fibrotisch-kollagene Gewebekapsel (Kap) und einen der Gewebekapsel aufgelagerten Thrombus (Thr) bedingt ist. Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch das Institut für Anatomie der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. (A)-(C) aus Keiler *et al.*, 2020 [24]. (D) aus Keiler *et al.*, 2017 [6].

Neuere Studien unterscheiden zwischen zwei Formen der fibrotischen Einkapselung. Neben der primären orthogonalen Verwachsung der Sondenelektrode wird auch ein sekundäres Wachstum entlang der Sonden-Längsachse ohne direkten Endothelkontakt beobachtet [6]. Die zugrundeliegenden Kausalitäten sind dabei nicht bekannt. Vermutet wird, dass die Einkapselung mechanisch durch anhaltenden Druck und Reibung sowie verursachte Endothelverletzungen, während der Sondenimplantation, ausgeht [6]. Dabei kommt es nach Aktivierung verschiedener Entzündungsreaktionen zum profibrotischen Umbau des Endothelabschnittes und nachfolgend u.a. zur - durch Myofibroblasten induzierten - neointimalen Neubildung um die Elektrode [6]. Zusätzlich stellen Herzschrittmachersonden einen Strömungswiderstand im venösen Gefäß dar, durch welche es zu turbulenten Strömungen im Gefäß kommt. Durch die entstehenden Verwirbelungen nimmt der Reibungswiderstand im Gefäß zu und die Flussgeschwindigkeit, entsprechend dem Ohm'schen Gesetz, umgekehrt proportional ab. Folgen sind neben einer auch als Sludge-Phänomen oder Geldrollenbildung bezeichneten reversiblen Erythrozytenaggregation auch die Entstehung von Thromben [25].

Trotz der Verringerung des Gefäßdurchmessers durch die fibrotische Gewebsproliferation und den diffusen neointimalen Einkapselungen des Sondenmaterials sind diese in der Mehrzahl der Fälle nicht ursächlich für die entstehenden venösen Obstruktionen [6]. Keiler *et al.* gehen in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2017 davon aus, dass diese durch entstehende Thromben bedingt sind [6]. Thrombotische Obstruktionen werden häufig erst spät klinisch manifest. Typische Symptome eines thrombotischen Venenverschlusses, wie Schwellungen oder Schmerzen, treten durch die Ausbildung von Gefäßkollateralen nur selten auf (vgl. Abb. 1.7) [6]. Bei 24,7 % aller implantierten Herzschrittmacher und Kardioverter-Defibrillatoren tritt ein Verschluss der *V. subclavia* oder *V. brachiocephalica* auf [26]. Bei diesem – auch als Paget-von-Schroetter-Syndrom bezeichneten – Venenverschluss besteht die Gefahr einer durch gelöstes Thrombenmaterial induzierten Lungenembolie [27]. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Einflussfaktoren für die Entstehung von thromboembolischen Ereignissen untersucht. Entgegen weit verbreiteter Meinungen hat das Sondenisolationsmaterial (Silikon, Polyurethan), der Zugangsweg über *V. subclavia* oder *V. brachiocephalica* sowie das Alter und Geschlecht des Patienten keinen Einfluss auf die Entstehung thrombotischer Komplikationen [6]. Systemische Infektionen und Mehrfachimplantationen wiederum erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Thrombusentstehung [6].

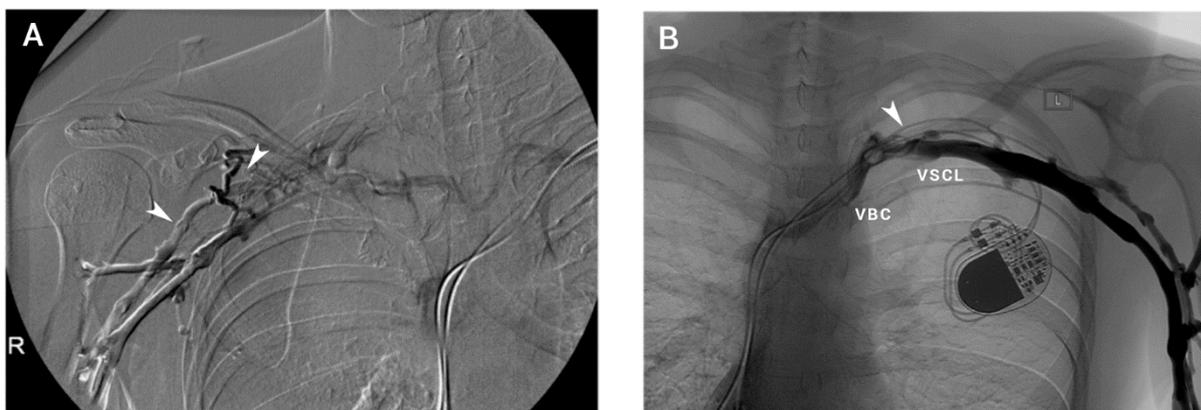


Abb. 1.7: Digitale Subtraktionsangiografie bei Schrittmachersonden-induzierten Stenosen beider *Vv. subclaviae* nach Sondenextraktion und Neuimplantation auf der kontralateralen Seite. (A) Rechte *V. subclavia* mit zahlreichen Kollateralen (Pfeilspitzen) nach Extraktion zweier Schrittmachersonden aufgrund eines Sondendefekts. (B) Linke *V. subclavia* nach Neuimplantation eines Herzschrittmachers. Neben einer langstreckigen Stenose (Pfeilspitze) der *V. subclavia* (VSCL) und angrenzenden *V. brachiocephalica* (VBC) sind thrombotische Veränderungen des Gefäßbaumes zu erkennen. Tiefe Venenthrombosen der Arm- und Schulterregion bergen, wie Thrombosen der unteren Extremitäten, die Gefahr einer lebensgefährlichen Lungenembolie. Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch das Institut für Anatomie der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Aus Keiler *et al.* [6].

1.2.2 Sondenextraktion und nebenwirkungsarme Schrittmachertherapie

Fibrotische Verwachsungen des Sondenmaterials sowie ggf. zusätzlich vorliegende Thromben machen eine Extraktion des Sondenkabels durch Zug an diesem nahezu unmöglich. Im Laufe der vergangenen Jahre wurden unter diesem Gesichtspunkt eine Reihe neuer operativer Techniken entwickelt, um eine gewebeschonende Extraktion zu ermöglichen. Neben röhrenförmigen laser- (CVX-300[®] Excimer Laser, Spectranetics[®]) oder elektrochirurgisch (PERFECTA[®] Electrosurgical Dissection Sheath, COOK[®] Medical) gestützten Extraktionssheaths, welche durch photochemische und -thermische Reaktionen molekulare Bindungen aufbrechen und fibrotisches Gewebe destruieren [16, 28], haben sich dabei auch Lead-Locking-Devices (Spectranetics[®]) und Locking-Stylets (Liberator[®] Beacon[®], COOK[®] Medical) zur Prävention eventueller Sondenbrüche etabliert. Durch Einbringung in das Sondenkabel und Vorschub zu dessen Spitze ermöglichen diese eine Kontrolle der Zugfestigkeit und maximieren die ausgeübte Extraktionskraft auf die Sondenspitze (vgl. Abb. 1.8) [16, 22]. Neuere biotechnologische Entwicklungen zielen auf die Prävention fibrotischer Läsionen ab, um den Vorgang pathologischer Sondeneinwachsungen zu verlangsamen oder gar zu verhindern. Neben speziellen Isolationsmaterialien, wie mit Schmierstoffen (Fast-Pass[™], St. Jude Medical[™]), Organosiloxan-Monomeren (SILGLIDE[®], Applied Membrane Technology) oder Fluorpolymeren beschichtete Sonden [6, 29], spielen dabei auch strukturierte Texturen des Isolationsmaterials eine entscheidende Rolle [30]. Aktive Elektrodenverankerungen (Attain StarFix[™], Medtronic) zur Verhinderung von Sonden-dislokationen [6], Glucocorticoid- (Dexamethasonacetat) [31] und/oder mTOR-Inhibitor-freisetzende (Sirolimus) [6] Drug-Eluting-Systeme sowie vollständig implantierbare, sondenfremde Herzschrittmacher (Nanostim[™] Leadless Pacemaker-System, St. Jude Medical[™]) [32] sind darüber hinaus weitere Strategien zur nebenwirkungsarmen Schrittmachertherapie.

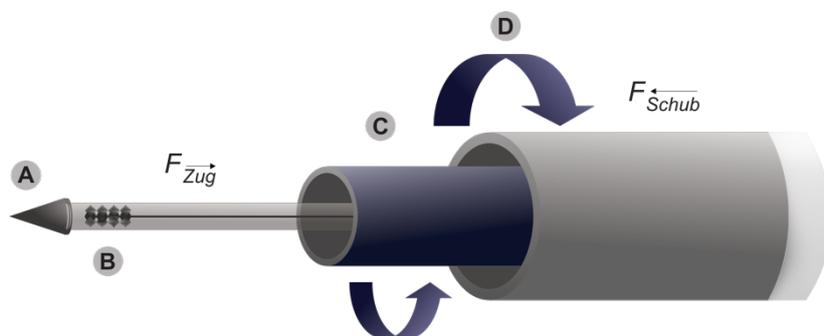


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Sondenextraktion. Lead-Locking-Devices (Spectranetics[®]) oder Locking-Stylets (Liberator[®] Beacon[®], COOK[®] Medical) (B) werden in die Sonde eingebracht und bis zur Sondenspitze (A) vorgeschoben. Durch das „Locking“ werden die Stylets in der Sonde verankert und reduzieren die auf die Sonde wirkende Zugspannung. Komplikationen wie Sondenbrüche können so verhindert werden. Ist eine Extraktion des Sondenkabels durch einfachen Zug (F_{Zug} (Zugkraft)) nicht möglich, werden Teflon- oder Polypropylen-Extraktionssheaths (C) entlang des Sondenkabels vorgeschoben (F_{Schub} (Schubkraft)). Aufgebaut aus zwei ineinander liegenden, gegensätzlich rotierenden Schläuchen (D), ermöglicht der innere den Vorschub des Systems, während der äußere Schlauch das fibrotische Gewebe durchbricht und weitet [22]. Eigene Darstellung.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Herzschrittmachertherapie ist eine der effektivsten Therapieoptionen bei der Behandlung schwerwiegender Herzrhythmusstörungen. Insbesondere technologische Innovationen, optimierte Isolationsmaterialien und medikamentenfreisetzende Elektrodenverankerungen ermöglichen eine immer breitere Indikationsstellung. Mit der Zahl der implantierten Schrittmachersonden steigt auch die Zahl sondenassoziierter Komplikationen. Neben perioperativen Komplikationen und Infektionsereignissen stehen dabei v.a. Verwachsungen mit dem menschlichen Gewebe im Vordergrund. Im Laufe der jahrelangen Liegezeit von Herzschrittmacherelektroden und Defibrillatoren kommt es häufig zur Thrombus-Endothelialisierung sowie kalzifizierenden Verwachsungen der Elektrodenkabel mit der Wand beherbergender Blutgefäße. Diese erschweren die Extraktion z.T. erheblich, sodass ein einfacher Systemwechsel in vielen Fällen nicht mehr möglich ist. Funktionslose Sonden werden aus diesem Grund häufig nicht entfernt und als stillgelegte Elektrodenkabel in der Vene belassen, während neue in derselben platziert werden. So ist es nicht ungewöhnlich mehr als drei Elektrodenkabel in einer Vene vorzufinden [23].

Für die Durchführung der vorliegenden Arbeit bedeutet das, dass die Sondenextraktion ein sehr seltenes Ereignis darstellt. Die Besonderheit der vorliegenden Analysen besteht also in der Seltenheit des Probenmaterials. Dennoch konnten in der Projektlaufzeit 14 Patientenproben (komplette Herzschrittmachersonden und Biopsie) aus den Jahren 2018 und 2019 mit dem Ziel gewonnen werden, für die Adhäsion relevante Risikoparameter sowie die dahinterstehende Biochemie (gesundheitliche Vorbelastung der Patienten) auszuloten. Im Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen besteht der Unterschied dieser Arbeit in der molekularbiologischen und biochemischen Analyse aktiver Entzündungs- und Gewebsumformungsprozesse an perioperativ entnommenen Systemen. Vergleichbare Studien haben diese Untersuchungen bisher nur an Schrittmachersystemen verstorbener Körperspender durchgeführt. Molekularbiologische und biochemische Analysen zur Beschreibung eines aktiven Entzündungsgeschehens sind an verstorbenen Organismen allerdings nicht möglich. Eine Entnahme der Systeme an lebenden Patienten aus Forschungszwecken ist darüber hinaus ethisch nicht vertretbar. Systementnahmen bzw. Biopsien an diesen stellen aufgrund der strengen medizinischen Extraktionsindikation ein entsprechend seltenes Ereignis dar.

Durch eine intensive Zusammenarbeit mit dem Team des Herzzentrums der Universitätsmedizin Rostock konnten frische Proben direkt postoperativ entgegengenommen und aufgearbeitet werden. Ziel der Untersuchungen sollte es sein, Biomarker für drei unterschiedliche physiologische Ereignisse (Entzündung, Fibrosierung und Kalzifizierung) zu identifizieren und deren Aktivierungen im klinischen Zusammenhang mit Entzündungen und Verwachsungen von Herzschrittmachersonden bzw. Risikofaktoren der Patienten zu betrachten.

In diesem Zusammenhang sollen in der vorliegenden Arbeit nachfolgende Fragestellungen systematisch bearbeitet werden:

1. Welche spezifischen Biomarker können bei der Genexpressionsanalyse der Herzgewebeproben hinsichtlich der Entzündungs-, Fibrosierungs- und Kalzifizierungsereignisse identifiziert werden?
2. Können Proteine in den Gewebeproben detektiert werden, für die diese Gene codieren?
3. Gibt es einen Trend, welche patientenabhängigen Faktoren das Entzündungsgeschehen bzw. Einwachsen und Kalzifizieren der Sonden begünstigen?
4. Welche klinische Relevanz besitzen die ausgewählten Biomarker an Patienten mit Herzschrittmachersondenextraktion?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Patientenkollektiv

Zur Charakterisierung des Patientenkollektivs wurden retrospektiv die bis zum Entnahmedatum der Herzschrittmachersonden bestehenden Patientenakten analysiert. Dabei wurden die Akten insbesondere hinsichtlich der Geschlechts- und Altersverteilung, aus Körpergröße und -gewicht ermitteltem Body-Mass-Index, Sondenliegezeit, Indikationen zur Im- und Explantation der Sonden, Erregerspektrum sowie bestehender Komorbiditäten und Prodromi kardialer und infektiöser Erkrankungen in der Analyse betrachtet. Die Daten wurden unter Verwendung von Microsoft Excel® 365 tabellarisch aufgearbeitet, ermittelte Parameter statistisch mittels GraphPad Prism 5 ausgewertet und mit Hilfe von Microsoft PowerPoint® 365 und Adobe Photoshop Lightroom 5 im Ergebnisteil unter Kapitel 4.1 visualisiert.

3.1.2 Patientenproben

Die für die nachfolgenden Analysen verwendeten Gewebeproben wurden, mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Dohmen, Klinikdirektor der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, bei der herzoperativen Extraktion von Herzschrittmachersonden in den Jahren 2018 und 2019 gewonnen. Die Entnahme und pathophysiologische Analyse kardialer und herznaher vaskulärer Gewebe wurde von der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Universität Rostock genehmigt (vgl. Stellungnahme der Ethikkommission vom 07.03.2018; Az.: A 2018-0037).

Nach der Extraktion wurden die Gewebestücke gekühlt transportiert und binnen einer Stunde mit flüssigem Stickstoff anteilig isoliert sowie in Invitrogen™ TRIzol™ Reagenz zur RNA-Isolation kryokonserviert. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Für die Genexpressionsanalyse wurden bei den Proben 17 und 19 aus dem Jahr 2018 jeweils Gewebeproben unterschiedlicher Lokalisationen entnommen (gekennzeichnet mit 17a/17b bzw. 19a/19b) und separat analysiert. Aufgrund der geringen Probenvolumina wurden in der Western Blot-Analyse jeweils nur die Proben 17a und 19a analysiert.

3.1.3 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Nachfolgend genannte Geräte (vgl. Tab. 3.1), Verbrauchsmaterialien (vgl. Tab. 3.2), Laborgerätschaften (vgl. Tab. 3.3), Chemikalien (vgl. Tab. 3.4; 3.6; 3.7; 3.8) und Software (vgl. Tab. 3.5) dienen der Durchführung der unter Kapitel 3.2 genannten Methoden.

Tab. 3.1: Liste der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Modell	Hersteller	Sitz
Präzisionswaage	Quintix® 224-1CEU	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG	Göttingen
Pipetten	Research 0,1-2,5 µL	Eppendorf AG	Hamburg
	0,5-10 µL	Eppendorf AG	Hamburg
	10-100 µL	Eppendorf AG	Hamburg
	20-200 µL	Eppendorf AG	Hamburg
	100-1000 µL	Eppendorf AG	Hamburg
Spektrometer	Titertek Berthold Colibri Spectrometer	Berthold Detection Systems GmbH	Pforzheim
Zentrifugen	miniSpin plus	Eppendorf AG	Hamburg
	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific™	Rockford, IL
Plattenzentrifuge	PerfectSpin P	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen
Vibrationsschüttler	IK® MS 3 digital	Thermo Fisher Scientific™ Fischer Scientific GmbH	Schwerte
	IKA® VORTEX 4 basic	Thermo Fisher Scientific™ Fischer Scientific GmbH	Schwerte
	Grant-bio PS-3D Sunflower Mini-Shaker	Grant Instruments™	Cambridge
Magnetrührer	Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG	Schwabach
Thermo-Mischgerät	ThermoMixer® comfort	Eppendorf AG	Hamburg
Hochgeschwindigkeits-Homogenisierer	FastPrep-24™ 5G	MP Biomedicals™	Eschwege
Thermocycler	Mastercycler™ vapo.protect 5332	Eppendorf AG	Hamburg
Real-Time-PCR-System	Mastercycler™ personal	Eppendorf AG	Hamburg
	QuantStudio 3	applied biosystems™ Thermo Fisher Scientific™	Schwerte
		Fischer Scientific GmbH	
Elektrophorese Netzgerät	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen
Blotting Apparatur Western Blot Transfer System	Mini PROTEAN® TetraCell	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen
	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen
Fluoreszenz Detektor	ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen
Laborautoklav Gefrierschränke	Systec DX-45	Systec GmbH	Linden
	Heraeus HERAfreeze™ -86° C ; TSX40086V	Thermo Fisher Scientific™	Asheville, NC
Kühlschrank	Liebherr Arbeitstemperatur: 7 °C	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH	Ochsenhausen
Flockeneisbereiter biologischer Sicherheitsschrank	AF 80 AS 230/50/1	Scotsman Europe-Frimont S.p.A.	Pogliano, IT
	Heraeus HERAsafe® HS12	Thermo Fisher Scientific™	Asheville, NC

Tab. 3.2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Modell	Hersteller	Sitz
Lyse-Röhrchen	Lysing Matrix D 2 ml Tube RNAse-DNAse-free	MP Biomedicals™	Irvine, CA
Falcon	15 ml/50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen BD Falcon T-75; 250 ml, 70 cm ² ; No. 353136	Greiner Bio-One GmbH BD Biosciences	Fricken- hausen Bedford, MA
Flächen- Desinfektionsmittel	Bacillo® AF 1000 ml	Hartmann BODE Chemie GmbH	Hamburg
Händedesinfektions- mittel	AHD 2000	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH	Berlin
Waschlotion	SALINA 1L	Dr. Schumacher GmbH	Malsfeld
Einmalschutz- handschuhe	Peha-soft® nitril fino/white REF 942208	Paul Hartmann AG	Heidenheim
Pipettenspitzen	ART Filtered Sterile Pipette Tips 10 µl ART Non-Filtered Pipette Tips 10 µl / 20 µl CELLSTAR® 25 ml Serological Pipette	Thermo Fisher Scientific™ Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA Waltham, MA
Reaktionsmikro- titerplatte	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	applied biosystems™ Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA
optische Klebefolie	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	applied biosystems™ Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA
Wischtücher	KIMTECH Science® Präzisionswischtücher, 1-lagig, 11x21 cm	Kimberly-Clark Professional™ Kimberley-Clark GmbH	Koblenz
Reaktionsröhrchen	PCR Tube 0,5 ml Safe-Lock Tubes 1,5 ml Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG Eppendorf AG Eppendorf AG	Hamburg Hamburg Hamburg
Vernichtungsbeutel	Spezial-Vernichtungsbeutel 100 Stk. (200 x 300 x 0,05 mm) Art. Nr. 09.302.0020	nerbe plus GmbH	Winsen/Luhe
Permanentmarker	STAEDTLER permanent Lumocolor schwarz/blau F	STAEDTLER Mars GmbH & Co. KG	Nürnberg

Tab. 3.3: Liste der verwendeten Laborgerätschaften.

Bezeichnung	Modell	Hersteller	Sitz
Messzylinder	Mischzylinder Duran® Kl. A, 500:5 ml Mischzylinder Duran® Kl. A, 1000:20 ml Silberbrand ETERNA Kl. B, 2000:50 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG BRAND GMBH + Co. KG	Eberstadt Eberstadt Wertheim
Bechergläser	SIMAX 150 ml	-	Tschechien
Erlenmeyerkolben	Schott Duran 500 ml	DWK Life Sciences GmbH	Mainz
Magnetrührstäbchen	-	unbekannt	-
Röhrchenständer	S-Monovette®-Rack D17 Nalgene® cryogenetic vials rack Cryoblock Rack Tube/Cuvette Racks	SARSTEDT AG & Co. KG Fischer Scientific GmbH Eppendorf AG Eppendorf AG	Nümbrecht Schwerte Hamburg Hamburg
Schere	-	B. Braun Melsungen AG	Tuttlingen
Pinzetten	-	Aesculap AG	-
Tablett	-	unbekannt	-

Tab. 3.4: Liste der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung		Hersteller	Sitz
Gibco™ PBS ph 7.4 (1x) 500 ml	REF 10010-015 LOT 2104339	Fischer Scientific GmbH	Schwerte
RNeasy® Plus Mini Kit (250)	REF 74136 LOT 160049811	QIAGEN GmbH	Hilden
RNeasy® Micro Kit (50)	REF 74004 LOT 166030849	QIAGEN GmbH	Hilden
QIAzol Lysis Reagent 200 ml	Cat. #79306	QIAGEN GmbH	Hilden
T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent 500 ml	REF 78510 LOT UD283196	Thermo Fisher Scientific™	Rockford, IL
Mini-PROTEAN®TGX Stain-free™ 4-20 %, 15-well comb	Cat. #456-8096	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
10x Tris/Glycerine/SDS (TGS) Buffer 1 L	Cat. #161-0732	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
10x Tris/Glycerine/SDS (TGS) Buffer 5 L	Cat. #161-0772	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
4x Laemmli Sample Buffer 10 ml	Cat. #161-0747	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
Precision Plus Protein™ Unstained Standards 1000 µL	Cat. #161-0363	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
Unstained Protein Molecular Weight Marker 2 x 1 ml	#26610 LOT 00635572	Thermo Fisher Scientific™	Rockford, IL
10x TBS (tris buffered saline) 1 L	Cat. #170-6435	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate)	Cat. #170-6531 Batch 64276369	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
Bovine Serum Albumin, lyophilized powder, ≥ 96 %	A2153-50G LOT SLCB1974	SIGMA-ALDRICH, Co.	St. Louis, MO
RNase-Free Water	LOT 163049865 REF 129112 Cat. #1704156	QIAGEN GmbH	Hilden
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack; Mini format 0,2 µm PVDF Protein Assay Dye Reagent Concentrate 450 ml	Cat. #500-0006	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
Transfermembran ROTI®NC 0.2 µm, 200 mm x 3 m Rolle	HP41.1 Charge: 027642328 Cat. #78430	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Cat. #78430	Thermo Fisher Scientific™	Rockford, IL
Endothelial Cell Growth Medium 500ml	Cat. #C-22010 LOT 458M052	PromoCell GmbH	Heidelberg
Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC) 500.000 cryopreserved cells	Cat. #C-12221	PromoCell GmbH	Heidelberg
Gibco™ Trypsin-EDTA (0,25 %)	Art. 11560626	Fischer Scientific GmbH	Schwerte
TaqMan™ Fast Advanced Mastermix	Art. 4444557	applied biosystems™ Thermo Fisher Scientific™	Waltham, MA

Tab. 3.5: Liste der verwendeten Software.

Bezeichnung	Version	Firma	Sitz
QuantStudio™ Design & Analysis Software	1.4.3	applied biosystems™ Thermo Fisher Scientific™	Pleasanton, CA
GraphPad Prism 5	5.04	GraphPad Software, Inc.	San Diego, CA
ImageLab™	6.0.1 build 34	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, CA
Origin 2018b 64Bit	b9.5.5.409	OriginLab Corporation	Northampton, MA
Affinity Designer	1.9	Serif (Europe) Ltd.	Nottingham, UK
Adobe Photoshop Lightroom 5	5.7	Adobe Inc.	San José, CA
Microsoft® Word 365 MSO	16.0.12730.20144	Microsoft Corporation	Redmond, WA
Microsoft® Excel® 365 MSO	16.0.12730.20144	Microsoft Corporation	Redmond, WA

3.1.4 TaqMan™ Gene Expression Assays der Genepressionsanalyse

Tab. 3.6: Liste der verwendeten TaqMan™ Gene Expression Assays.

TaqMan™ Gene Expression Assays		Firma	Sitz
Rack ID: W02851821, 1765056; 6926088_1, W02699745		applied biosystems™	Pleasanton, CA
Order ID: 85154705; 6923776; 85164870; 84850718		Thermo Fisher Scientific™	
Bezeichnung		LOT-Nr.	
Hs00426835_g1 ACTA2	250 µl 20X Mix	1767090	
Hs00743063_s1 ANXA2	250 µl 20X Mix	1580696	
Hs00154192_m1 BMP2	250 µl 20X Mix	1774363	
Hs00234140_m1 CCL2	250 µl 20X Mix	1787723	
Hs00236952_m1 ELANE PN4351370	750 µl 20X Mix	P200320-000C07	
Hs00174961_m1 EDN1	250 µl 20X Mix	1723240	
Hs00357041_m1 CRP	250 µl 20X Mix	1745448	
Hs99999905_m1 GAPDH	250 µl 20X Mix	1740876	
Hs00164932_m1 ICAM1 PN4351370	750 µl 20X Mix	P200320-000B12	
Hs00913466_g1 ICAM3	250 µl 20X Mix	1531191	
Hs01555410_m1 IL1B	250 µl 20X Mix	1791787	
Hs00174131_m1 IL6	250 µl 20X Mix	1842702	
Hs00165162_m1 MPO	250 µl 20X Mix	1842026	
Hs01548727_m1 MMP2	250 µl 20X Mix	1766061	
Hs00179899_m1 MGP	250 µl 20X Mix	1454171	
Hs00153133_m1 PTGS2	250 µl 20X Mix	1766245	
Hs00998133_m1 TGFB1	250 µl 20X Mix	1764008	
Hs00171558_m1 TIMP1	250 µl 20X Mix	1673786	
Hs00174128_m1 TNF	250 µl 20X Mix	1791441	
Hs01003372_m1 VCAM1	250 µl 20X Mix	1791787	

3.1.5 Antikörper der Western Blot-Analyse

Tab. 3.7: Liste der verwendeten primären Antikörper.

Bezeichnung	Spezies	MG [kDa]	Verdünnung	Produkt-Nr.	Hersteller
Anti-ACTA2	Kaninchen	42	1:1000	STJ29391	St John's Laboratory Ltd, UK
Anti-CD36	Kaninchen	53	1:5000	ABIN2783229	antibodies-online GmbH, Aachen
Anti-Fetuin-A	Kaninchen	59	1:2000	RD181036100	BioVendor GmbH, Kassel
Anti-MKI67	Kaninchen	319/359	1:2000	STJ24560	St John's Laboratory Ltd, UK
Anti-MMP9	Kaninchen	92	1:800	ABIN2777743	antibodies-online GmbH, Aachen
Anti-Osteopontin	Kaninchen	41-75	1:1000	PAA899Ra06	Cloud-Clone Corp., TX, USA
Anti-p38	Kaninchen	46	1:1000	ABIN3186259	antibodies-online GmbH, Aachen
Anti-PAK1	Kaninchen	60	1:1000	STJ24888	St John's Laboratory Ltd, UK
Anti-β-Aktin	Kaninchen	43	1:1000	ABIN1742508	antibodies-online GmbH, Aachen

Tab. 3.8: Liste der verwendeten sekundären Antikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Produkt-Nr.	Hersteller
Goat Anti-Rabbit IgG, 80 µl StarBright™ Blue 700	1:2500	12004159	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA

3.2 Methoden

Während der Durchführung der unter Punkt 4.3 genannten Analyseverfahren wurden durchgängig Einweghandschuhe getragen. Vor und nach jedem Arbeitsschritt wurde die gesamte Arbeitsfläche gründlich gereinigt und mit BacilloI® AF (Hartmann) Flächendesinfektionsmittel desinfiziert. Zur Probenaufbereitung kamen ausschließlich Einweginstrumente bzw. sterilisiertes Instrumentarium zur Verwendung. Eine Kontamination der Proben kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

3.2.1 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse ist ein molekularbiologisches Verfahren, welches eine qualitative und quantitative Gen-Analyse ermöglicht. Möglich wird dies durch die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dazu unterscheidet man die klassische Endpoint-PCR, wie z.B. bei der reversen Transkriptase, und die quantitative PCR (qPCR).

Bei der konventionellen PCR, bei der die Reaktion vollständig und gesättigt abläuft, ist durch den Vergleich der initial bestehenden Matrizen¹-Menge und der am Endpoint der PCR vorliegenden Amplimer²-Menge keine quantitative Beurteilung der Genexpression möglich [33]. Folglich lässt sich der Zeitpunkt, an dem die Reaktion in die gesättigte Phase übergeht, nicht bestimmen. Im Gegensatz dazu ermöglicht es die qPCR, „die Menge gebildeter Amplimere während der exponentiellen Phase“ [33] in Echtzeit („Real-Time“) zu bestimmen und so quantitative Aussagen zur Genexpression zu tätigen.

Die Durchführung der Genexpressionsanalyse erfolgt in drei Schritten. Nachdem die Gesamt-RNA aus Gewebeproben isoliert (vgl. Kapitel 3.2.1.1) und anschließend durch das Enzym Reverse Transkriptase und eingesetzten Random-Primern in komplementäre cDNA umgeschrieben wurde (vgl. Kapitel 3.2.1.3), dient die einzelsträngige cDNA als Matrize für die Durchführung der Real-Time-PCR [34]. In der qPCR wird dem PCR-Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff beigefügt, welcher in die doppelsträngige DNA interkaliert und dessen Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der gebildeten Amplimere zunimmt [33]. Um die Detektion jeder – also auch unspezifisch synthetisierter – doppelsträngiger DNA zu verhindern, wurde die qPCR in Form der *TaqMan*[™]-PCR modifiziert. Dabei werden neben einer *TaqMan*[™]-Sonde auch zwei konventionelle Primer verwendet, welche die Bildung des Amplimers initiieren und die Sonde zur spezifischen Bindung an eine Template-DNA-Sequenz einbetten.

¹ Matrize: auch Template; Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält

² Amplimer: DNA-Fragment, welches durch Amplifikation bei der PCR entsteht

Die Funktionsweise der Sonde beruht auf dem Prinzip des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET), welches die Energieübertragung zwischen einem am 5'-Ende der *TaqMan*[™]-Sonde enthaltenen Fluoreszenz-Chromophors (6-Carboxyfluorescein (6-FAM)) und einem am 3'-Ende verankerten Quencher¹ vermittelt [33]. Der Quencher unterdrückt durch seine räumliche Nähe das Fluoreszenzsignal des Fluorophors. Während des PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. Durch die *Taq*-Polymerase, die neben ihrer Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, wird das 5'-Ende mit dem Fluoreszenz-Chromophor im Verlauf der PCR-Zyklen abgespalten und distanziert sich räumlich vom Quencher. Der FRET wird hierdurch unterbunden und eine Messung des proportional zur gebildeten Amplimer-Menge emittierten Fluoreszenzsignals wird möglich (vgl. Abb. 3.1) [33]. Der am 3'-Ende der Sonde angelagerte Minor Groove Binder (MGB) bewirkt durch Verstärkung der Van-der-Waals-Kräfte eine Erhöhung der Schmelztemperatur. Diese Stabilisierung des Sonden-DNA-Konjugats reduziert die Anzahl entstehender Basenfehlpaarungen und erhöht die Spezifität in Bezug auf den zu quantifizierenden DNA-Abschnitt [35].

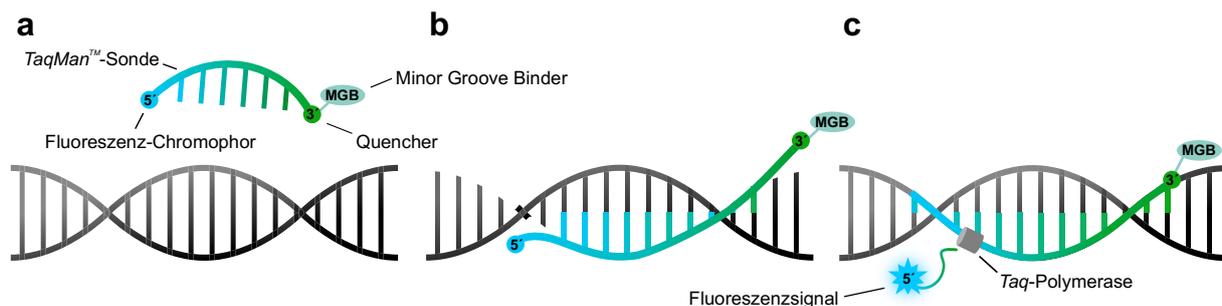


Abb. 3.1: Prinzip der *TaqMan*[™]-PCR. (a) Die *TaqMan*[™]-Sonde besitzt an ihrem 5'-Ende ein Fluoreszenz-Chromophor und am 3'-Ende einen Quencher sowie einen Minor Groove Binder (MGB). (b) Während der PCR-Zyklen hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. (c) Die *Taq*-Polymerase spaltet das Fluorophor am 5'-Ende ab, das Fluoreszenzsignal wird proportional zur synthetisierten Amplimer-Menge emittiert. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Jähnichen *et al.* [36, 37].

3.2.1.1 RNA-Isolation der Herzgewebeproben

Die in QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) gebetteten Gewebeproben wurden zur Probenaufbereitung nach Datum sortiert und jeweils erst unmittelbar vor der Aufarbeitung der Kühlkette entnommen. Nach kurzzeitigem Antauen der Proben wurden diese mittels steriler Federschere und Skalpell in kleine Stücke geschnitten und mithilfe der Quintix[®] Präzisionswaage (Sartorius) zu maximal 30 mg abgewogen. Nach Überführung in 2 ml MP Biomedicals[™] Lysematrix D Tubes und Zugabe von 600 µl RLT Puffer (QIAGEN RNeasy[®] Plus Mini Kit) wurden die Proben im FastPrep-24[™] 5G Instrument (MP Biomedicals[™]) bei Anwendung des manuellen Programms mit 6,0 m/s und einer Laufzeit von 30 s homogenisiert.

¹ Quencher: vermittelt durch die Aufnahme von Lichtenergie, welche von anderen Molekülen emittiert wird, den Effekt der Fluoreszenzminderung

Durch den denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffer und den in den Tubes enthaltenen Keramik-Beads lysierten und homogenisierten die Gewebeproben während der Zentrifugation. Das im RLT Puffer enthaltene Guanidinisothiocyanat unterstützt dabei die Bindung von RNA an die Siliziumdioxidmembran [38]. Die lysierten Proben wurden anschließend für ca. 10 min auf Eis gelagert, um ein Absetzen des entstandenen Schaumüberstandes zu erreichen. Nach der Zentrifugation bei 10.000 x g für 3 min in der Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge (Thermo Fisher Scientific™) konnte der Überstand für die weitere Verwendung gesichert werden.

Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN) verwendet. Das durch Homogenisierung der Gewebeproben gewonnene Zelllysate wurde auf die gDNA-Eliminator-Membran (2 ml-Tube) überführt und bei 8000 x g für 30 s im Eppendorf® miniSpin plus zentrifugiert. Die gDNA-Eliminator-Membran filterte auf diese Weise die genomische DNA aus dem Lysat. Der Durchfluss wurde anschließend mit 600 µl Ethanol (70 %) versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das zugesetzte Ethanol erhöhte dabei die Bindungsfähigkeit der RNA auf der Membran und maximierte somit die Ausbeute an Gesamt-RNA [39]. Vom entstandenen Reagenz wurden 700 µl abpipettiert und auf eine RNA-Spin-Membran (2 ml Tube) übertragen. Der durch das Zentrifugieren (15 s bei 8000 x g) entstandene Durchfluss wurde verworfen. 700 µl des RW1-Waschpuffers wurden auf die Membran übertragen. Der RW1-Puffer enthielt neben einem Guanidinsalz u.a. Ethanol, um Moleküle wie Kohlenhydrate, Proteine und Fettsäuren, welche nicht spezifisch an die Siliziumdioxidmembran binden, auszuwaschen [40]. Erneut wurde die Membran bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im nachfolgenden Schritt wurden 500 µl RPE Puffer (QIAGEN) auf die Membran gegeben. Die Funktion des leichten Waschpuffers bestand darin, Salzreste der zuvor verwendeten Puffer auszuspülen. Nach Zentrifugation für 15 s bei 8000 x g wurde der Schritt wiederholt und anschließend erneut bei 8000 x g und zwei Minuten zentrifugiert. Um die Membran weiter zu trocknen, wurde zum Abschluss der RNA-Extraktion die Membran ein weiteres Mal bei 8000 x g für eine Minute zentrifugiert. Auf die getrocknete Membran wurde in einem 1,5 ml Sammeltube 30 µl RNase-freies Wasser pipettiert. Bei Zentrifugation für eine Minute bei 8000 x g konnte so die RNA aus der Membran ausgespült werden. Für jede RNA-Probe wurde nachfolgend mittels des Colibri Microvolume Spektrometers der RNA-Gehalt fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen (vgl. Tab. 3.9). Als Referenzprobe diente die Blank-Messung des RNase-freien Wassers. Die Konzentrationsbestimmung folgt dem Lambert-Beer-Gesetz [41] und wird nach folgender Formel berechnet:

$$C \text{ [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \epsilon. \quad (1)$$

C = Konzentration; **A260** = Absorptionsmaximum; ϵ = Extinktionskoeffizient (= 40 für RNA)

Tab. 3.9: RNA-Gehalt der Herzproben aus den Jahren 2018 und 2019.

Jahr	Proben-Nr.	RNA-Gehalt in ng/ μ l	Jahr	Proben-Nr.	RNA-Gehalt in ng/ μ l
2018	6	33,06	2019	5	5,84
	13	43,24		9	2,82
	17a	13,06		11	2,37
	17b	7,96		12	2,84
	19a	6,82		19	2,07
	19b	1,77		22	4,97
		23		17,97	
		24		0,93	
		33		0,77	
		37		13,18	

3.2.1.2 RNA-Isolation der Referenz-*in-vitro*-Herzzellen

Als Referenzprobe für die Genexpressionsanalyse dienten aus gesunden humanen Koronararterien gewonnene, kryokonservierte Endothelzellen (HCAEC; PromoCell®). In Vorbereitung der RNA-Isolation wurden diese Zelllinien inkubiert und Zellkulturen angezüchtet. Die Zellkultivierung erfolgte im HERAsafe® HS12 (Heraeus) Sicherheitsschrank mit HEPA-gefiltertem laminarem Luftstrom. Dieser wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und der Luftstrom zehn Minuten vor Beginn der Arbeiten eingeschaltet. Ein von außen mit 70 % Ethanol gereinigter T-75-Kolben (BD Biosciences) wurde nachfolgend für zwei Stunden bei 37 °C und mit 5 % CO₂ angefeuchteter Luft inkubiert und anschließend das Transportmedium durch 15 ml Endothelial Cell Growth Medium (ECGM; PromoCell®) ersetzt. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation unter o.g. Bedingungen. Die in flüssigem Stickstoff gelagerte und erst unmittelbar vor Verwendung der Kühlkette entnommene HCAEC-Durchstechflasche wurde im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 70 % Ethanol im sterilen Sicherheitsschrank desinfiziert. Die Zelllösung wurde durch fünfmaliges Resuspendieren mit einer Pipette durchmischt und anschließend 1 ml der Zellsuspension (ca. 1x10⁶ Zellen) in den T-75-Kolben überführt. Nach Inokulation über vierundzwanzig Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ angefeuchteter Luft im biologischen Sicherheitsschrank (Heraeus) folgte ein Austausch des Zellwachstumsmediums alle zwei Tage. Ab einer Zell-Konfluenz von 60 % wurde das Volumen des Zellwachstumsmediums verdoppelt. Nach sieben Tagen wurden das ECGM entfernt und die Zellen in Gibco™ Phosphat-gepufferter Salzlösung (Thermo Fisher Scientific™) gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurden diese für fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung in fünf Milliliter Gibco™ 1x Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific™) behandelt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von zehn Milliliter ECGM gestoppt und die Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt. Nach Zentrifugation bei 1300 U/min für fünf Minuten und 4 °C konnte das Zell-Pellet (3x10⁵ Zellen) in 350 μ l RLT-Puffer und 1 % β -Mercaptoethanol gesammelt und bei -80 °C eingefroren werden.

Für die nachfolgende RNA-Isolation wurde das RNeasy® Micro Kit (QIAGEN) verwendet und der Zellsuspension nach Auftauen 350 μ l 70 % Ethanol hinzugegeben. Die Probenlösung

wurde auf die RNeasy MinElute Trennsäule überführt, für fünfzehn Sekunden bei 10.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Zentrifugation wurde nach Zugabe des Waschpuffers RW1 wiederholt. Zur Herstellung der DNase I Inkubationslösung wurden 10 µl DNase I Stammlösung und 70 µl RDD-Puffer homogenisiert und auf die Trennsäule überführt. Nach Inkubation für 15 min bei RT wurde die Membran erneut mittels RW1-Puffer und Zentrifugation gewaschen und anschließend 500 µl RPE-Puffer durch die Trennsäule zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl 80 % Ethanol wurde die Membran zweimal für jeweils zwei und fünf Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. In einem letzten Schritt konnte die Trennsäule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA nach Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser als Durchfluss gesichert werden.

3.2.1.3 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der RNA in einzelsträngige cDNA wurden das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) verwendet und die benötigten Konzentrationsverhältnisse zwischen den Reagenzien mithilfe einer Excel®-Tabelle (Microsoft Office) berechnet. Dabei wurde für jede Probe sowie eine zusätzliche Wasserprobe stets ein Doppelansatz berechnet, um eventuell auftretende Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. Der für die Ansätze verwendete Master Mix bestand jeweils aus 2 µl 10-fach RT-Puffer, 0,8 µl 25-fach dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10-fach RT-Random-Primer, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase und 4,2 µl Nuklease-freiem Wasser. Aufgrund des geringen RNA-Gehaltes der Gewebeproben konnte auf eine Verdünnung mittels RNase-freiem Wasser verzichtet und jeweils 20 µl der RNA-Proben mit 20 µl des Master Mix auf dem IKA™ MS 3 Basic Vortexer (Thermo Fischer Scientific™) gemischt werden. Die Proben wurden anschließend für 135 min im Eppendorf® Mastercycler Personal inkubiert. Der Thermocycler ermöglichte es, durch verschiedene Zyklen die Probenansätze auf die erforderliche Temperatur zu erhitzen, um die Schritte der Denaturierung, des Annealings und der DNA-Synthese durchzuführen. Ein vollautomatischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion wurde so gewährleistet [42]. Dabei stagnierte das Programm für zehn Minuten bei 25 °C, 120 min bei 37 °C und fünf Minuten bei 85 °C. Anschließend kühlte das Gerät auf 4 °C ab; die Proben konnten so für einige Stunden gekühlt im Gerät aufbewahrt werden.

3.2.1.4 Real-Time-PCR

Vor Beginn der Arbeiten wurden die cDNA-Proben mit jeweils 160 µl RNase-freiem Wasser vierfach verdünnt und auf Eis gebettet. Die Real-Time-PCR-Analysen erfolgten in MicroAmp™ Optical 96-Well Reaktionsplatten (Applied Biosystems™). Für jedes zu analysierende Gen wurde dabei ein Gesamtreagenz pro Well, bestehend aus 5 µl *TaqMan*™

Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems™), 2,5 µl RNase-freiem Wasser und 0,5 µl TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems™), angesetzt und zusammen mit jeweils 2 µl cDNA in die Wells pipettiert. Nach Abdichtung der Well-Platten mit optischer Klebefolie (Applied Biosystems™) und Zentrifugation in der PerfectSpin P Plattenzentrifuge (PEQLAB) wurde die cDNA mittels Quant Studio 3 (Thermo Fisher Scientific™) bei Durchführung der qPCR amplifiziert. Die Quantifizierung der cDNA basierte auf der Cycle Threshold (CT)-Methode. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität logarithmisch gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen und der CT-Wert am Schnittpunkt von exponentiellem Amplifikationssignal und Schwellenwertlinie (emittiertes Fluoreszenzsignal übersteigt Hintergrundfluoreszenz) bestimmt [43]. Um einen Vergleich des Amplifikationssignals zwischen den verschiedenen Proben zu ermöglichen, wurden die relativen Gehälter der Zielgene (Z) unter Zuhilfenahme des internen Standards Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gegen die Referenzprobe HCAEC (R) mittels der $\Delta\Delta^{CT}$ -Methode nach Pfaffl *et al.* [44] normalisiert und mittels GraphPad Prism 5 visualisiert:

(2)

$$\Delta^{CT} = CT (Z) - CT (R) \quad (3)$$

$$\Delta\Delta^{CT} = \Delta^{CT} (\text{Gen Patientenprobe}) - \Delta^{CT} (\text{Gen HCAEC}) \quad (4)$$

$$\text{Expressionsverhältnis } r = 2^{-(\Delta\Delta^{CT})}$$

3.2.2 Immundetektion der Proteine

Das Western-Blotting wurde erstmals 1979 von W. Neal Burnette [45, 46] und George R. Stark [47] beschrieben und zählt zu den wichtigsten proteinanalytischen Methoden der Gegenwart. Das Verfahren beruht auf der Immundetektion von Proteinen, bei der diese nach elektrophoretischer Auftrennung innerhalb eines Trenngels auf eine mikroporöse Membran übertragen („Blotting“) [48] und mittels Antikörpern detektiert sowie visualisiert werden. Als Grundlage des Western Blots dient die Auftrennung der Proteine nach dem Prinzip der SDS-PAGE-Methode (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Das Proteingemisch wird dazu mit einem SDS-Probenpuffer sowie einem Thiol versetzt, um bei einer Erhitzung des Probengemisches auf 95 °C die Proteine zu denaturieren und bestehende Wasserstoff- und Disulfidbrückenbindungen zu trennen. Hierdurch werden die unterschiedlichen Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine gespalten. Dies ist notwendig, um eine eindimensionale Auftrennung der Proteine zu gewährleisten. Bei Erhitzung des SDS-Proteingemisches „erhalten die Proteine proportional zu ihrer Molekülgröße eine negative Ladung“ [49]; eine Auftrennung der Proteine nach ihrer molaren Masse, unabhängig vom isoelektrischen Punkt, ist so möglich [50, 49]. Nach Befüllen der Geltaschen mit den Probengemischen und Anlage einer elektrischen Spannung werden die Proteine entlang des

elektrischen Feldes so ausschließlich nach ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt [51]; je kleiner diese ist, desto weiter wandern die Proteine im Gel in Richtung der Anode [49]. Nach Abschluss der Elektrophorese werden die Proteine mittels eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) oder Nylon-Membran übertragen [50]. Die geblotteten Proteine stellen so eine exakte Abbildung des Trenngels dar und sind Ausgangspunkt für eine Reihe immunologischer Untersuchungen, bei denen in mehreren aufeinanderfolgenden Waschschrritten gegen die membrangebunden Proteine gerichtete Antikörpersonden eingesetzt werden [48].

3.2.2.1 Dot-Blot

Die Dot-Blot-Technik dient dem Nachweis von Nukleinsäuren oder Proteinen durch Übertragung auf eine Trägermembran [52]. Die nachzuweisenden Lösungen werden dazu punktförmig auf eine Membran pipettiert und unter Zuhilfenahme eines (direkt) oder zweier Antikörper (indirekt) über eine immunchemische Reaktion nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Dot-Blot-Verfahren verwendet, um in Vorbereitung der Proteinanalyse mittels Western Blot die optimalen Konzentrationsverhältnisse zwischen primärem und sekundärem Antikörper zu detektieren. Dabei dient der primäre Antikörper als Linker zwischen den entsprechenden Proteinen und dem mit Farbstoff beladenen sekundären Antikörper.

Zur Durchführung des Dot-Blots wurde eine Herzgewebe-Proteinlösung ausgewählt (vgl. Proteinextraktion, Kapitel 3.2.2.2) und bei 7 °C im Kühlschrank aufgetaut. 180 µl Proteinlösung wurden unter Zugabe von 60 µl 4x Laemmli Sample Buffer (10 % β-Mercaptoethanol; Bio-Rad) bei 95 °C denaturiert. Jeweils 2 µl Probengemisch wurden punktförmig gemäß den in den Tabellen 3.10 und 3.11 aufgeführten Pipettierschemata auf die Transfermembran ROTI[®]NC (Roth) aufgetragen, bei RT getrocknet und anschließend für 30 min in TBST-Waschpuffer (tris buffered saline buffer + Tween 20) auf dem Orbitalschüttler (Grant Instruments) gewaschen. Der TBST-Waschpuffer wurde aus 100 ml 10x TBS Puffer, 900 ml destilliertem Wasser und 500 µl Polysorbat 20 (Tween[®] 20) hergestellt. Im Anschluss daran wurden die Membranen für eine Stunde bei RT in einer Lösung aus TBS-Puffer und Casein auf dem Orbitalschüttler geschwenkt. Die Milchpulverlösung bewirkte dabei eine Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran [52]. Die Membran wurde danach fünfmal für jeweils drei Minuten im TBST-Waschpuffer gewaschen und bei RT getrocknet. Jeweils 2 µl der primären Antikörper wurden gemäß den in den Tabellen 3.10 und 3.11 aufgeführten Beladungsschemata auf die Membran aufgetragen und erneut fünfmal für je 3 min im TBST-Waschpuffer gewaschen. Nach einem weiteren Trocknungsschritt bei RT wurde der sekundäre Antikörper zu jeweils 2 µl aufgetragen und fünfmal für 3 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Die Membranen wurden im feuchten

Zustand auf die Fotoplatte des Fluoreszenz-Detektors aufgebracht und im *stain free* Blot-Modus bei 320 nm UV-A-Strahlung visualisiert (s. Abb. 3.2 u. 3.3).

Tab. 3.10: Beladungsschema des ersten Dot-Blots zur Bestimmung der optimalen Konzentrationsverhältnisse zw. primären und sekundärem Antikörper bei Durchführung des Western Blots. Die Felder wurden jeweils mit 2 µl Proteinlösung sowie 2 µl primären und sekundärem Antikörper zum Immunfluoreszenznachweis der Proteinkonzentrationen beladen. Markiert wurden die nach Visualisierung bestimmten optimalen Konzentrationsverhältnisse (vgl. Abb. 3.2). Reihe 1: α-Actin 2 (ACTA-2), Reihe 2: β-Aktin; Reihe 3: Thrombozytenglykoprotein 4 / cluster of differentiation 36 (CD36), Reihe 4: Fetuin-A (AHSG), Reihe 5: marker of proliferation Ki-67 (MKI-67).

Blot 1		Konzentrationen sekundärer Antikörper								
		1:2500	1:3500	1:5000	1:2500	1:3500	1:5000	1:2500	1:3500	1:5000
Konz. prim. Antikörper	ACTA-2	1:500	1:500	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000
	β-Aktin	1:500	1:500	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000
	CD36	1:1000	1:1000	1:1000	1:3000	1:3000	1:3000	1:5000	1:5000	1:5000
	Fetuin-A	1:500	1:500	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000
	MKI-67	1:500	1:500	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000

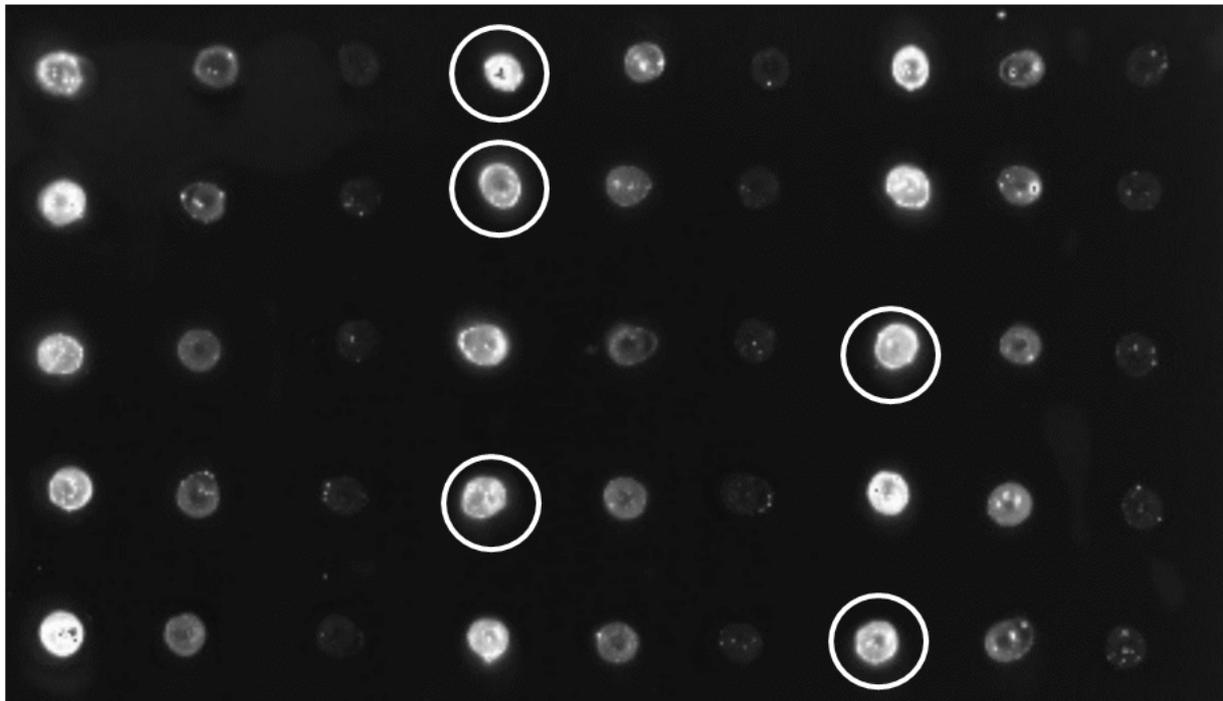


Abb. 3.2: Mittels Fluoreszenz-Detektor visualisierter erster Dot-Blot. Dot-Blot pipettiert nach in Tab. 3.10 aufgeführtem Beladungsschema. Ausgewählt wurden die optimal dargestellten Dots. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Dots eine ausreichende Intensität zeigten, jedoch nicht überladen waren. Bei den ausgewählten Dots lagen die primären Antikörper in folgenden Konzentrationen vor: ACTA-2 (1:1000), β-Aktin (1:1000), CD36 (1:5000), Fetuin-A (1:1000), MKI-67 (1:2000). Die Konzentration des sekundären Antikörpers lag bei den ausgewählten Blots einheitlich bei 1:2500.

Tab. 3.11: Beladungsschema des zweiten Dot-Blots zur Bestimmung der optimalen Konzentrationsverhältnisse zw. primären und sekundären Antikörper bei Durchführung des Western Blots. Die Felder wurden jeweils mit 2 µl Proteinlösung sowie 2 µl primären und sekundären Antikörper zum Immunfluoreszenznachweis der Proteinkonzentrationen beladen. Markiert wurden die nach Visualisierung bestimmten optimalen Konzentrationsverhältnisse (vgl. Abb. 3.3). Reihe 1: Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), Reihe 2: Osteopontin, Reihe 3: p21 activated kinase 1 (PAK-1), Reihe 4: p38.

Blot 2		Konzentrationen sekundärer Antikörper								
		1:2500	1:3500	1:5000	1:2500	1:3500	1:5000	1:2500	1:3500	1:5000
Konz. prim. Antikörper	MMP-9	1:500	1:500	1:500	1:800	1:800	1:800	1:1000	1:1000	1:1000
	Osteopontin	1:500	1:500	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000
	PAK-1	1:500	1:500	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000
	p38	1:500	1:500	1:500	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000

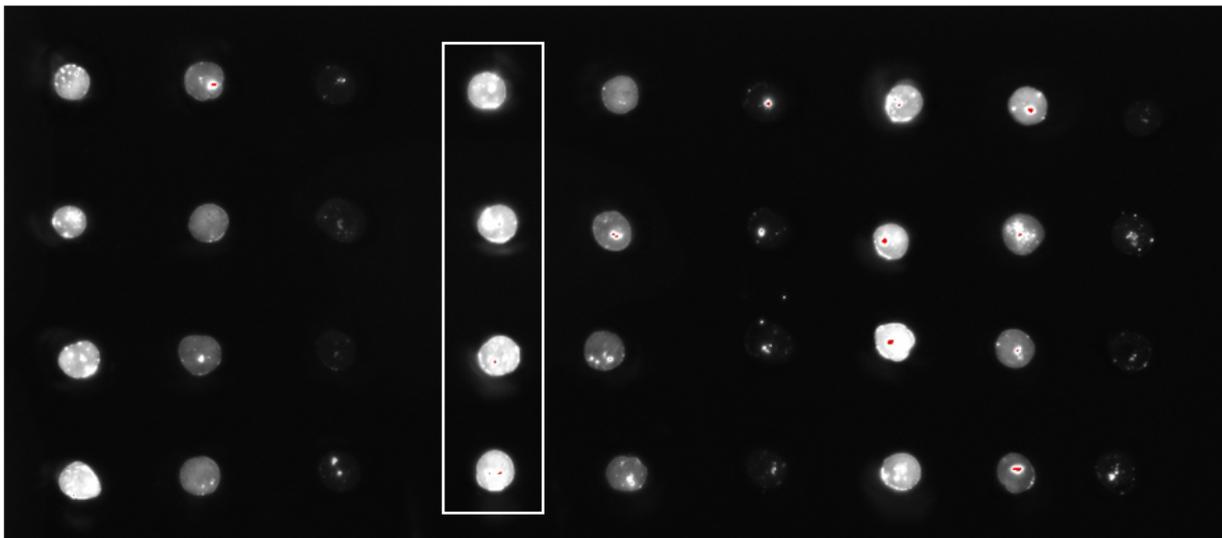


Abb. 3.3: Mittels Fluoreszenz-Detektor visualisierter zweiter Dot-Blot. Dot-Blot, pipettiert nach in Tab. 3.11 aufgeführtem Beladungsschema. Ausgewählt wurden die optimal dargestellten Dots. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Dots eine ausreichende Intensität zeigten, jedoch nicht überladen waren. Bei den ausgewählten Dots lagen die primären Antikörper in folgenden Konzentrationen vor: MMP-9 (1:800), Osteopontin (1:1000), PAK-1 (1:1000), p38 (1:1000). Die Konzentration des sekundären Antikörpers lag bei den ausgewählten Blots einheitlich bei 1:2500.

3.2.2.2 Proteinextraktion

In Vorbereitung der Proteinanalysen der zu untersuchenden Herzwegewebebeobproben erfolgten zwei Testdurchläufe der Proteinextraktion und des anschließenden Western Blots mithilfe eines Testherzwegewebes. Zur Bestimmung der optimalen Probenmenge im Rahmen der Proteinextraktion wurden aus der Testprobe drei unterschiedlich große Gewebestücke präpariert. Für die Gesamtproteinextraktion aus der Gewebeprobe wurde T-PER™ Extraktions-Reagenz (Thermo Fisher Scientific™) in einem Ausgangsverhältnis von 1:20 (Gewebe:T-PER™) verwendet. Höher konzentrierte Proteinextraktionen konnten durch ein reduziertes Reagenzvolumen erreicht werden. Tabelle 3.12 dokumentiert die verwendeten Probenmengen.

Tab. 3.12: Proteinextraktion. Aus der Testherzwegewebebeobprobe wurden drei Gewebestücke präpariert und zu verschiedenen Gewichten abgewogen. Um unterschiedlich konzentrierte Proteinextraktion zu gewinnen, wurde mit verschiedenen Verdünnungen gearbeitet.

Gewebe- stück	Probengewicht in mg	Volumen T- PER™ Extraktions- Reagenz in µl	Proteinkonzentration in µg/ml	Verhältnis
				<i>Probenmasse</i> <i>Volumen Extraktionsreagenz</i>
1	45	800	759	1:17,8
2	40	500	1015	1:12,5
3	37,5	300	1266	1:8

Die drei verschiedenen Probengemische wurden nachfolgend mittels FastPrep-24™ 5G Instrument (MP Biomedicals™) bei 6,0 m/s und einer Laufzeit von 40 s homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 10.000 x g konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Im weiteren Ablauf wurden 0,5 ml Eppendorf® Lichtschutz Safe-Lock Tubes mit 100 µl Bradford-Reagenz-Lösung befüllt und jeweils 10 µl Probenlösung hinzugefügt. Als Blindprobe diente ein Ansatz aus 100 µl Bradford-Reagenz-Lösung und 10 µl RNase-freiem Wasser. Die Probenansätze wurden für 5 min bei RT lichtgeschützt inkubiert und anschließend mit dem IKA® VORTEX 4 basic (Thermo Fisher Scientific™) gemischt.

Die Proteinbestimmung nach Bradford dient der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Proteinen [53]. Die Bradford-Reagenz-Lösung basiert auf dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie®-Brillantblau G 250 (CBBG), welche in saurem Milieu quantitativ Komplexe mit den Proteinen bildet. Dadurch wird die anionische Sulfonat-Form stabilisiert und das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschoben (vgl. Abb. 3.4) [53].



Abb. 3.4: Abhängigkeit des Absorptionsmaximums vom pH-Wert von Coomassie®-Brillantblau G 250.

Die Kalibrierkurve wurde mithilfe eines Bio-Rad Protein Assays angefertigt. Als Standard diente dazu lyophilisiertes bovine serum albumine (BSA), welches mit 20 ml deionisiertem Wasser zu einer klaren homogenen Lösung verarbeitet wurde. Aus dieser Stammlösung wurden fünf Verdünnungen hergestellt, welche Konzentrationen zwischen 0,05 – 0,5 mg/ml enthielten. Im nachfolgenden wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, d.h. jede Standardverdünnung wurde dreimal vermessen und der jeweilig ermittelte Mittelwert der Absorption zur Erstellung der Kalibriergraden genutzt. Die Reaktionslösung Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad), bestehend aus Coomassie®-Brillantblau G250, Phosphorsäure und Methanol, wurde entsprechend den Herstellerangaben 1:4 mit deionisiertem Wasser verdünnt und partikelfrei filtriert. Jeweils 10 μl der Standardverdünnungen und 200 μl der verdünnten Reaktionslösung wurden in separate Wells pipettiert. Dieser Ansatz wurde für fünf Minuten bei RT inkubiert und anschließend im Titertek Berthold Colibri Spectrometer (Berthold Detection Systems) nach Kalibrierung der Blindprobe als Referenz bei 595 nm vermessen. Dazu wurden bei jeder Messung 2 μl Probenlösung auf den Sensor pipettiert und das Gerät nach jeder Nutzung mittels KIMTECH Science® Präzisionswischtücher (Kimberly-Clark) gereinigt. Nach Durchführung von Gelelektrophorese (vgl. 3.2.2.3) und Western Blot-Analyse (vgl. 3.2.2.4) wurden die Protein-Banden hinsichtlich Signalintensität, Sättigung und Beladung untereinander verglichen und so ein optimales Verhältnis von 1:15,6 zwischen Gewebeprobenmasse und T-PER™-Extraktionsreagenz für die Durchführung der nachfolgenden Proteinanalysen festgelegt. Auf Grundlage des bestimmten Konzentrationsverhältnisses wurden die Herzgewebeproben freipräpariert, zu jeweils ca. 45 mg abgewogen sowie die jeweils benötigten Volumina der T-PER™-Extraktionsreagenz berechnet. Aus diesen wurde unter Zugabe von Halt™ Protease-Inhibitor (Thermo Fisher Scientific™) (Verhältnis 1:100) eine Analysenlösung angesetzt. Die Herzgewebeproben wurden zusammen mit den berechneten T-PER™-Protease-Volumina nachfolgend in Lyse-Röhrchen überführt, im FastPrep-24™ 5G Instrument (MP Biomedicals™) bei 6,0 m/s und einer Laufzeit von 40 s homogenisiert und anschließend die Proteinkonzentration der Lösungen gemessen. Aufgrund des geringen Probenmaterials konnte für die Patientenprobe 22 keine Proteinanalyse durchgeführt werden.

3.2.2.3 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gelelektrophorese wurden in die Mini PROTEAN® TetraCell (Bio-Rad) eingebrachte Mini-PROTEAN® Tetra Cell Gele (Bio-Rad) verwendet. Unter keimarmen Kautelen wurden die Gele einzeln der Verpackung entnommen, unter Entfernung des Durchlaufschutzstreifens in die Blotting Apparatur eingebracht und mittels der Apparatur-Klammern fixiert. Nach Spülung der Reaktionskammer mit Tris-Glycerin-SDS-Puffer (TGS) konnten der Fixier-Kamm aus den Geltaschen entfernt und die Taschenwände mittels einer sterilen Kanüle aufgerichtet werden, um ein späteres Vermischen und Verunreinigen der Proteinlösungen zu verhindern und ein gleichmäßiges Beladen der Taschen zu ermöglichen. Um darüber hinaus herstellungsbedingte Verunreinigungen innerhalb der Taschenräumen zu beseitigen, wurden diese mehrmals mittels einer Pipette mit TGS-Puffer gespült. Die Proteinlösungen wurden im Eppendorf® Thermomixer Comfort für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Nach Abkühlung wurden jeweils 12 µl Probenlösungen und 4 µl 4x Laemmli-Puffer (mit 10 % β-Mercaptoethanol) mit Hilfe des IKA® VORTEX 4 basic (Thermo Fisher Scientific™) gemischt und zu 15 µl in die Geltaschen pipettiert. Die erste Bande wurde dabei jeweils mit dem – nach *Sectio caesarea* aus der *V. umbilicalis* gewonnenem – Proteingemisch beladen und diente während der Proteinanalyse als Referenzprobe. Die Blotting-Apparatur wurde anschließend verschlossen und das PowerPac™ Basic-Netzgerät (Bio-Rad) bei einer Spannung von 200 V in Betrieb genommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Stromstärke nicht unter 60 mA abfällt, um ein gleichmäßiges Fortlaufen der Proteinbanden zu gewährleisten. Abhängig vom Fortschreiten der Laufmittelfront, die durch das im 4x Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau sichtbar wird und die Wanderung kleinster Proteine (< 10 kDa) im elektrischen Feld widerspiegelt [54], wurde das Netzgerät nach 25-30 min abgeschaltet. Zur Kontrolle der erfolgreichen Gelelektrophorese wurden die Gele im Anschluss der Apparatur entnommen, die Kunststoffverkleidung der Gele vorsichtig aufgebrochen und unter ausreichender Anfeuchtung im ChemiDoc™ MP Imaging System Fluoreszenz-Detektor (Bio-Rad) im *stain free* Gel-Modus visualisiert.

3.2.2.4 Western Blot

Nach Visualisierung der SDS-Gele wurden diese für den Proteintransfer in das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) überführt und direkt auf der im Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (Bio-Rad) enthaltenen PVDF-Membran platziert. Das Gel wurde mit einem angefeuchteten *Whatman*®-Filterpapier abgedeckt und entstandene Luftblasen zwischen Gel und Membran mittels einer Rolle entfernt (vgl. Abb. 3.5). Sowohl Anoden- als auch Kathodenfläche wurde vor dem Blotting flächendeckend mit TGS-Puffer befeuchtet.

Nach Verschluss des Transfer-Systems wurden jeweils zwei Membranen bei 25 V und 2,5 A für sieben Minuten geblottet. Zur Feststellung eventueller Abweichungen vom nativen Gel erfolgte anschließend eine erneute Visualisierung im Fluoreszenz-Detektor.

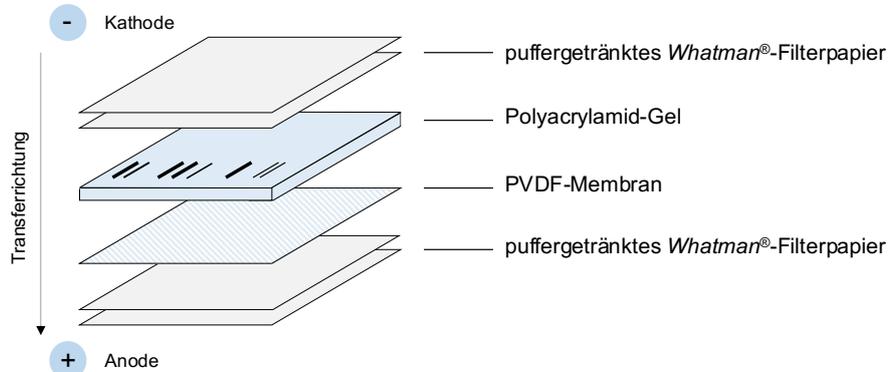


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Blotting-Apparatur. Das Protein-Gel wird apikal der PVDF-Membran platziert. Um einen gleichmäßigen Stromfluss zu gewährleisten, werden die Filterpapiere sowie die Elektrodenflächen großzügig mit TGS-Puffer befeuchtet. Nach Anlage eines elektrischen Feldes werden die Proteine in Richtung Anode auf die Membran geblottet. Eigene Darstellung, angelehnt an Brünnert *et al.* [55, 56].

Die geblottete Membran wurde für eine Stunde im TBST-Waschpuffer (vgl. Kapitel 3.2.2.1) auf dem Orbitalschüttler (Grant-Instruments) gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT im TBS-Puffer (1 % Casein) geblockt. Die Blocking-Lösung sättigte dabei die freien Bindungsstellen der Proteine an der Membranoberfläche – unspezifische Bindungen der Antikörper konnten so reduziert und die Sensitivität der Assays verbessert werden. Um überschüssigen Blocking-Puffer zu entfernen, wurde die Membran für jeweils fünf Minuten fünfmal im TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation der Membranen erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer Lösung aus Blocking-Puffer und primären Antikörper (AK) (vgl. Tab. 3.7) gemäß den Verdünnungen aus den Tabellen 3.10 und 3.11. Am Morgen wurden die Membranen erneut für fünfmal fünf Minuten im TBST-Puffer gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT im Blocking-Puffer mit sekundären AK (vgl. Tab. 3.8) inkubiert sowie sechsmal für fünf Minuten gewaschen. Der mit StarBright™ Blue 700-Fluorophor (Bio-Rad) konjugierte sekundäre AK bindet dabei spezifisch an den primären AK und ermöglichte die anschließende Visualisierung der Proteinbanden im ChemiDoc™ MP Imaging System Fluoreszenz-Detektor (Bio-Rad) im StarBright Blue 700-Modus.

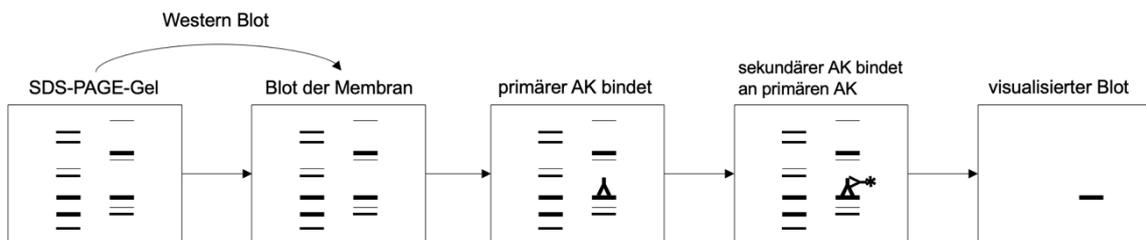


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Western Blot-Entwicklung und Protein-Banden-Detektion. Abbildung modifiziert nach Kurien *et al.* [48].

3.2.2.5 Auswertung Western Blot-Analysen

Die erhobenen Western Blot-Analysen dienten der Verifizierung der erhobenen Genexpressionsdaten (vgl. Kap. 4.2). Die dazu ausgewählten Biomarker wurden wie bei der Genexpressionsanalyse den Kategorien Entzündung, Fibrose und Kalzifikation zugeteilt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch Biomarker eben dieser Kategorien, welche in der Genexpressionsanalyse nicht betrachtet worden sind, validiert (vgl. Abb. 4.12). Aufgrund geringer Probenmengen des Patientengewebes und nicht vorrätigen primären Antikörpern konnte die Genexpression der Entzündung nur durch zusätzliche Entzündungsmarker in der Proteinanalyse validiert werden. Ausgewählt wurden dazu die Marker Thrombozytenglykoprotein 4 (CD36) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK). Aus den Patientenproben 17 und 19 aus dem Jahr 2018 konnten aufgrund der geringen Probenmengen jeweils nur eine Gewebeprobe (17a und 19a) extrahiert und analysiert werden. Da es sich bei dem Probenmaterial allerdings um den jeweils gleichen Patienten mit nahezu identischer Entnahmestelle der Gewebeprobe handelt, sollte dieser Umstand vernachlässigbar sein (bei der Genexpressionsanalyse wurden 17a/17b und 19a/19b noch separat analysiert). Als Referenzprobe wurde eine nach *Sectio caesarea* gewonnene Gewebeprobe der *V. umbilicalis* verwendet. β -Aktin diente als Ladekontrolle der Blot-Banden. Die Western Blot-Proteinanalysen wurden nachfolgend rein visuell anhand des Intensitäts- und Sättigungsgrades ausgewertet. Eine computergestützte Auswertung zur Ermittlung der relativen Proteinmenge erfolgte nicht.

3.2.3 Matching der Analysedaten durch Heat Maps

Um Korrelationen zwischen Patientendaten, Genexpression und Proteinanalyse zu detektieren, wurden die Patientenkollektiv-Merkmale »Alter«, »Geschlecht«, »Body-Mass-Index«, »Sondensliegezeit« und »Extraktionsindikation« entsprechend der relativen Genexpressionen mittels werteabhängiger Farbcodierung in Heat Maps visualisiert und ausgewertet. Die Werte der relativen Genexpression der Patienten wurden dazu mit Hilfe von Microsoft Office Excel[®] 365 normiert. Dabei wurde für jedes betrachtete Gen der jeweils höchste Wert der Genexpression aller Patientenproben ausgewählt und als 100 % („1“) definiert. Alle anderen Genexpressionen eines Gens wurden dazu in Relation gesetzt. Die ermittelten Datensätze konnten anschließend mittels OriginPro[®] 2018 (OriginLab[®]) in einem Wertebereich zwischen „0“ und „1“ für die Erstellung von sechs verschiedenen Heat Maps genutzt werden (vgl. Kap. 4.4). Die so gematchten Datenpaare wurden nachfolgend mit den Ergebnissen der Proteinanalyse (Kap. 4.3) abgeglichen und verifiziert.

3.2.4 Auswahl verwendeter Biomarker

Nachfolgend genannte Biomarker wurden in der Genexpressionsanalyse und Proteinanalyse hinsichtlich ihres Einflusses auf unterschiedliche Steuerungsmechanismen der Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrosierung und Kalzifizierung untersucht. Die Tabelle 3.13 gibt einen kurzen Überblick über die für die jeweiligen Kategorien verwendeten Biomarker. Erläuterungen zum Hintergrund und der Funktion der ausgewählten Biomarkern finden sich im Anhang unter Kapitel 9.1.

Tab. 3.13: Auswahl und Funktion verwendeter Biomarker.

	Gen	Name/Protein	Funktion
Endothelaktivierung	ELANE	neutrophile Elastase / Elastase-2	<ul style="list-style-type: none"> Lyse pathogener Keime [57] Regulation inflammatorischer Prozesse [58]
	ICAM-1 ICAM-3	intracellular adhesion molecule 1 intracellular adhesion molecule 3	<ul style="list-style-type: none"> Oberflächenproteine der Immunglobuline [59] Induktion Leukozytenadhäsion u. -transmigration in den vaskulären subendothelialen Raum bei inflammatorischen Prozessen [59, 60] Einleitung proinflammatorischer Signalwege
	MPO	Myeloperoxidase	<ul style="list-style-type: none"> Wirtsabwehr u. Entzündungsregulation [61] Förderung der Entstehung von Schaumzellen, prothrombotischer Ereignisse u. Expression von Matrix-Metalloproteinasen [62, 63]
	VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	<ul style="list-style-type: none"> Oberflächenprotein der Immunglobuline [64] Regulation der inflammatorischen Gefäßadhäsion u. transendothelialen Migration von Leukozyten, Makrophagen und T-Zellen [65]
Entzündung	COX-2	Cyclooxygenase-2	<ul style="list-style-type: none"> Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese [51] starker Entzündungsmediator
	CD36	cluster of differentiation 36	<ul style="list-style-type: none"> verzögerte Bildung von Schaumzellen u. atherosklerotischen Läsionen durch PPARγ-vermittelte Aufnahme von oxLDL und oxPL in Makrophagen [66, 67]
	IL-1 β	Interleukin-1 β	<ul style="list-style-type: none"> Schlüsselmediator der Entzündung [68, 69]
	IL-6	Interleukin-6	<ul style="list-style-type: none"> Regulation der Akute-Phase-Reaktionen [51, 70, 71] entzündungshemmende u. -fördernde Wirkung [72]
	MCP	membrane cofactor protein	<ul style="list-style-type: none"> Schutz der Wirtszelle vor Angriffen durch das aktivierte Komplementsystem [73, 74] Modulation der inflammatorischen Immunantwort [75]
	p38-MAPK	p38-mitogen-activated proteinkinase	<ul style="list-style-type: none"> Induktion von Entzündungsprozessen, Zelldifferenzierung, Apoptose u. Zellzyklusregulation [76]
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α	<ul style="list-style-type: none"> proinflammatorisches Zytokin Aktivierung Akute-Phase-Proteine [51] Apoptose entzündlich geschädigter Zellen [77] 	

Fortsetzung Tab. 3.13: Auswahl und Funktion verwendeter Biomarker.

Fibrosierung	ACTA-2 α-SMA	Aktin-α2; alpha smooth muscle actin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Exprimierung durch aktivierte Myofibroblasten [78] ▪ Regulation Gefäßmotilität u. -kontraktion [79]
	EDN-1	Endothelin-1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ stärkster humaner Vasokonstriktor [80, 81] ▪ Immunmodulation ▪ Induktor der Herzfibroblastenproliferation u. Extrazellulärmatrix-Synthese u. Inhibition der Kollagenaseaktivität [82]
	MMP-2 MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-2 Matrix-Metalloproteinase-9	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Abbau extrazellulärer Matrix [43]
	TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ endogener Inhibitor von Matrix-Metalloproteinasen ▪ Limitierung d. extrazellulären Matrixumsatzes [83, 84]
	TGF-β1	transforming growth factor beta 1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ profibrotisches Zytokin ▪ Induktion Genese v. extrazellulärer Matrix durch Fibroblasten, Differenzierung von Myofibroblasten [43, 85]
	PAK-1	p21-activated kinase 1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulation des extrazellulären Matrixumsatzes u. Calcium-Homöostase [86]
Kalzifizierung	ANXA-2	Annexin-A2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulation Cholesterinstoffwechsel durch Hemmung der Down-Regulation von LDL-Rezeptoren [87]
	BMP-2	bone morphogenetic protein 2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ osteogene Wirkung [88]
	MGP	Matrix-Gla-Protein	<ul style="list-style-type: none"> ▪ stärkster humaner Inhibitor der Kalzifizierung ▪ Atheroskleroase-Protektion durch Calcium u. Phosphat Bindung u. Komplexbildung mit BMP2 [89] ▪ Abbau Hydroxylapatitkristalle durch Gefäßmakrophagen [89]
	SPP-1	secreted phosphoprotein 1 (→ Osteopontin)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Immunmodulation u. Zelladhäsion mit Förderung der Fibrose u. Inflammation [90] ▪ kalzifizierende Wirkung durch Verstärkung der Entzündung in atherosklerotischen Plaques [91]

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 14 Patienten. Davon waren drei weiblichen und elf männlichen Geschlechts (vgl. Abb. 4.1). Der Altersdurchschnitt lag bei 68 Jahren (SD 12,9) bei einem Median von 69,5 Jahren. Der Altersbereich erstreckte sich dabei von 32 Jahren bis 89 Jahren. Zur Beurteilung der Altersstruktur wurde das Patientenkollektiv in fünf Altersklassen (<50; 50-60; 60-70; 70-80; >80 Jahre) eingeteilt (vgl. Abb. 4.2). Die Mehrheit der Sondenexplantationen (78,6 %) fanden in einem Alter zw. 60-80 Jahren statt.

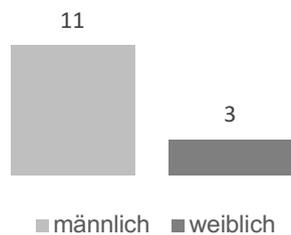


Abb. 4.1: Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs. Anzahl an Personen.

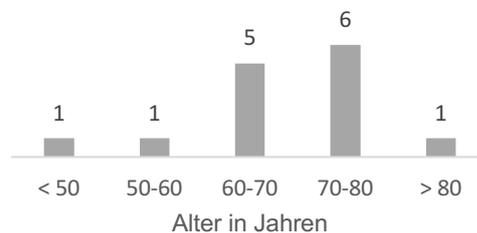


Abb. 4.2: Einteilung des Patientenkollektivs in fünf Altersklassen. Anzahl an Personen je Klasse.

Zur Beurteilung der Adipositas-Grade wurde für jeden Patienten aus Körpergewicht und Körpergröße der Body-Mass-Index (kg/m^2) berechnet und grafisch dargestellt (vgl. Abb. 4.3). Vier Patienten erfüllten nach Adipositas-Klassifikation der World Health Organisation (WHO) das Kriterium der Normalgewichtigkeit ($18,5\text{-}24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$). 64,3 % (9 Patienten) wiesen Grade der Adipositas auf. Dabei lag der Mittelwert des Patientenkollektivs bei $30,6 \text{ kg}/\text{m}^2$ und damit im Bereich des Adipositas Grad I ($30,0\text{-}34,9 \text{ kg}/\text{m}^2$). Bei einem Patienten konnte Adipositas Grad III ($> 40 \text{ kg}/\text{m}^2$) festgestellt werden. Ein Patient erfüllte die Kriterien der Untergewichtigkeit ($< 18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$).

Abbildung 4.4 stellt die Sondenliegezeit in Abhängigkeit des Extraktionsgrundes dar. Bei zehn der vierzehn untersuchten Patientenproben (71,4 %) war eine Infektion Ursache der vorzeitigen Sondenextraktion. Unterscheiden ließen sich dabei akute und subakute Entzündungen, also Infektionsgeschehen bis zu einer Dauer von drei bzw. sechs Monaten, die bei drei Patienten vorlagen, während bei sieben Patienten eine primär-chronische Entzündung (Dauer länger als sechs Monate) bestand. Im Durchschnitt hatten die Sonden bei Infektionsereignissen eine Verweildauer von 27 Monaten bzw. 2,3 Jahren. Deutlich längere Liegezeiten konnten bei durch Sondenfehlfunktionen und Isolationsdefekte bedingten Extraktionen festgestellt werden. So wurden bei vier Patienten des Kollektivs (28,6 %) die Schrittmachersonden erst nach einer mittleren Liegedauer von 114 Monaten (9,5 Jahren)

extrahiert. Die Spanne reichte dabei von einer Extraktion nach 4,5 Jahren bis 13,7 Jahren. Aufgrund der zum Teil mehrere Jahre andauernden Verweildauer der Schrittmachersonden, konnte die Liegezeit nicht bei allen Patienten auf den Tag genau bestimmt werden. Bei sechs Patienten wurde die Liegedauer deshalb ausgehend vom 15. des Implantationsmonats berechnet.

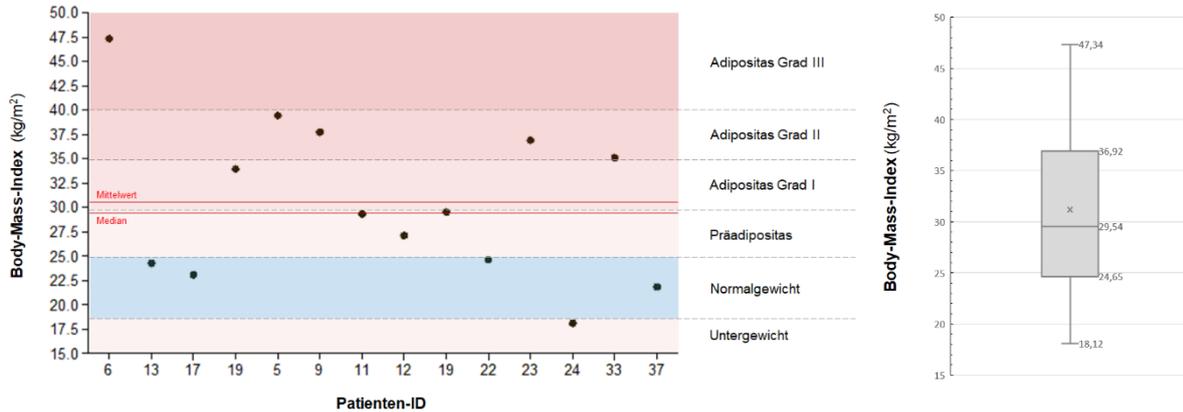


Abb. 4.3: Body-Mass-Index (kg/m²) des Patientenkollektivs ohne Berücksichtigung des Geschlechts. Links: Das Normalgewicht (blau) liegt nach Adipositas-Klassifikation der WHO zwischen 18,5 kg/m² und 24,9 kg/m². Grade der Adipositas und des Untergewichts wurden rötlich markiert. Lediglich vier Patienten des Kollektivs erfüllten die Kriterien der Normalgewichtigkeit. Bei einem Patienten bestand zum Zeitpunkt der Sondenextraktion leichtes Untergewicht. Mit roten Geraden wurden der Mittelwert sowie der Median des Patientenkollektivs dargestellt. Rechts: Body-Mass-Index-Verteilung des Patientenkollektivs. Dargestellt sind neben dem Mini- und Maximum (Whisker) auch das erste und dritte Quartil sowie der Median (29,54 kg/m²) und Mittelwert (x).

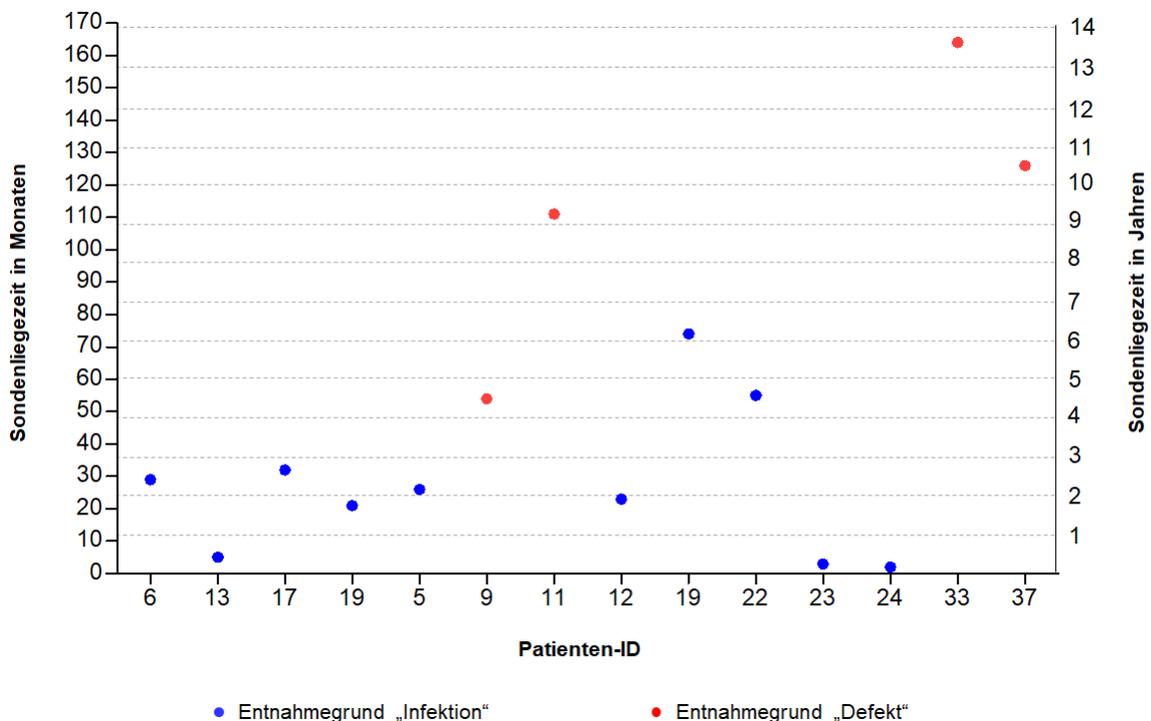


Abb. 4.4: Sondenliegezeit der Patienten-Herzschrmmacher. Sondenextraktionen, die infektiös bedingt waren, wurden blau markiert. Technische Defekte, welche Indikationen zur operativen Sondenentnahme darstellten, wie Elektrodenbruch, Sondenfehlfunktion oder Batterieerschöpfung, wurden rot markiert. Angabe in Monaten (links) und Jahren (rechts).

Die häufigste Ursache der Sondenextraktionen war in dieser Untersuchung die postoperative Gerätetascheninfektion (acht Patienten; 57,1 %). Dabei schreitet die Infektion, ausgehend vom subkutan angelegten Schrittmacheraggregat-Reservoir, retrograd entlang des Sondenkabels fort. Insbesondere die Trikuspidal- und Aortenklappe sind bei übergreifenden Infektionen gefährdet. Im Gegensatz dazu war in nur 7,1 % der Fälle (ein Patient) eine Herzklappenprotheseninfektion ursächlich für eine Sondenextraktion. In 28,6 % der Fälle waren Systemwechsel durch Sondenfehlfunktionen, Isolationsdefekte oder Batterieversagen bedingt (vgl. Abb. 4.4 und 4.5). Bei der Hälfte (14,3 %) der durch Fehlfunktionen erforderlichen Explantationen konnte zusätzlich das Vorliegen einer sterilen Entzündung nachgewiesen werden.

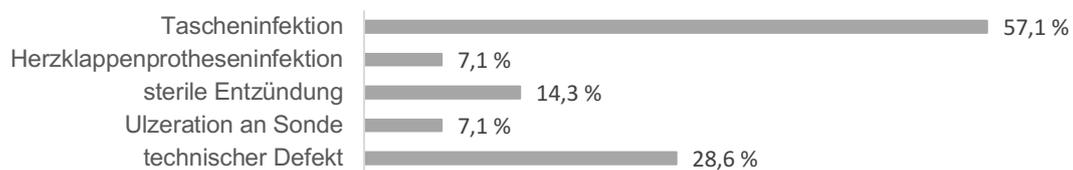


Abb. 4.5: Indikationen der Sondenextraktionen des Patientenkollektivs. Mehrfachindikationen möglich.

Im Rahmen der infektionsbedingten Sondenextraktionen erfolgte bei neun der zehn Patienten postoperativ eine mikrobiologische Begutachtung der Erregerspezies durch Beurteilung der entnommenen Gewebeproben bzw. Analyse angefertigter Blutkulturen (vgl. Abb. 4.6). Bei der Hälfte der Patientenproben konnte eine Besiedlung mit dem grampositiven Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nachgewiesen werden. Dabei wurde keine Unterscheidung in MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*) und MSSA (Methicillin-sensitiver *S. aureus*) vorgenommen. Das Keimspektrum verteilte sich außerdem auf zwei Patienten (20,0 %) mit einer Besiedlung durch *Enterococcus faecalis* (auch *Streptococcus faecalis*), einem im Darm des Menschen ubiquitär vorkommenden grampositiven Bakterium, sowie einen Patienten (10,0 %) mit *Propionibacterium acnes*. Bei einem Patienten (10,0 %) konnte eine kombinierte Infektion durch *Staphylococcus epidermidis* und *Saccharomyces spp.* nachgewiesen werden.

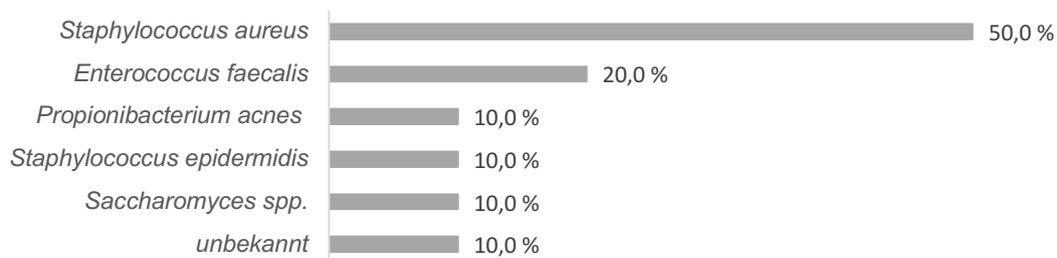


Abb. 4.6: Erregerspezies infektionsbedingter Sondenextraktionen. Mehrfachbesiedlung möglich.

Das Patientenkollektiv wurde hinsichtlich krankheitsrelevanter Prodromi und kardiovaskulärer Komorbiditäten betrachtet (vgl. Abb. 4.7). Auffällig war der hohe Anteil an Patienten mit arterieller Hypertonie – 78,6 % des Kollektivs litten zum Zeitpunkt der Sondenextraktion an der Erkrankung. Die Diagnose ‚Hypertonie‘ wurde – entsprechend der WHO-Definition – ab einem systolischen Blutdruck über 140 mmHg und/oder einem diastolischen Blutdruck über 90 mmHg gestellt. Neben Adipositas (64,3 %) und Dyslipidämien (42,9 %) wiesen jeweils sechs Patienten anamnestisch einen Diabetes mellitus Typ II (42,9 %) sowie eine Herzinsuffizienz (42,9 %) auf. Insgesamt konnte für sechs Patienten nach Definition der WHO die Diagnose ‚metabolisches Syndrom‘ (42,9 %) gestellt werden. Durch den Einfluss auf die Kalzifizierung von fibrotischem Gewebe wurde außerdem das Vorliegen von renalen Erkrankungen betrachtet. Bei 3 Patienten (21,4 %) bestand präoperativ eine chronische Niereninsuffizienz Grad III-V (Stadieneinteilung nach KDIGO anhand glomerulärer Filtrationsrate), während zwei Patienten (14,3 %) ein akutes Nierenversagen aufwiesen.

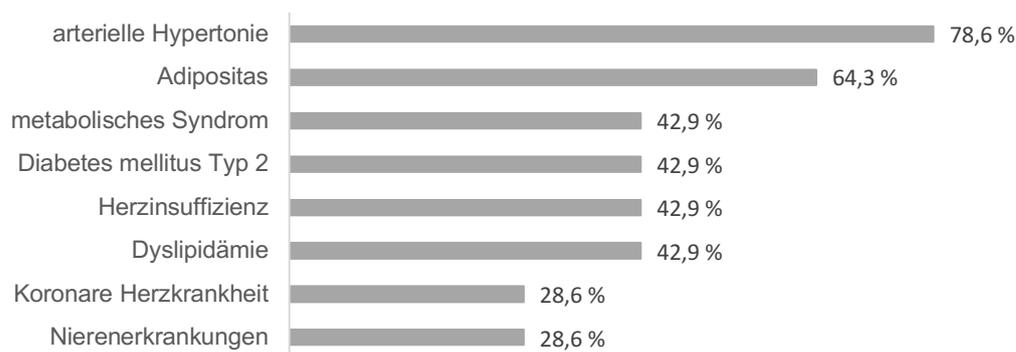


Abb. 4.7: Häufigste Komorbiditäten des Patientenkollektivs. Die Kategorie „Nierenerkrankung“ beinhaltet sowohl das Vorliegen chronischer Niereninsuffizienz als auch Ereignisse des akuten Nierenversagens. Zeitgleiches Vorliegen mehrerer Komorbiditäten möglich.

4.2 Genexpressionsanalyse

Die Gewebeproben des Patientenkollektivs wurden nachfolgend hinsichtlich der Genexpression der für die Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrosierung und Kalzifikation etablierten Biomarkern analysiert. Als native Referenzprobe dienten aus gesunden humanen Koronararterien gewonnene, kryokonservierte Endothelzellen (HCAEC; PromoCell®).

4.2.1 Endothelaktivierungsmarker

Die neutrophile Elastase (ELANE) zeigte als Regulator inflammatorischer Prozesse in fast allen Proben eine erhöhte Genexpression. Insbesondere in den Proben 17a, 9, 12, 22 und 23 waren erhöhte Expressionswerte nachweisbar. Patientenprobe 9 wies im Vergleich zur nativen Referenzprobe eine 23.000-fach, Probe 22 eine 27.700-fach höhere ELANE-Expression auf. In den Proben 24 und 33 waren aufgrund der geringen Probenmenge keine Nachweise möglich.

Die intracellular adhesion molecules 1 und 3 (ICAM-1; ICAM-3) zeigten als Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Endothelzellen, Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, in nahezu allen Patientenproben erhöhte Genexpressionen. Besonders hervor stachen Probe 9 mit einer ca. neunfach erhöhten ICAM-1-Expression und Probe 12 mit einer 132-fach erhöhten ICAM-3-Expression. Probe 5 zeigte im Vergleich zu den HCAEC eine geringere Genexpression. Aufgrund des geringen Probenmaterials konnten in den Proben 24 und 33 keine Genexpressionen nachgewiesen werden.

Die als Peroxidase an der Wirtsabwehr und Entzündungsregulation beteiligte Myeloperoxidase (MPO) zeigte in allen Gewebeproben, außer in den Proben 12, 24 und 33, eine erhöhte Genexpression. Auffällig waren dabei v.a. Probe 11 (103-fache Expression) und Probe 22 (816-fache Expression) im Vergleich zur Referenzprobe.

Als Regulator der inflammatorischen Gefäßadhäsion auf der Oberfläche von Endothelzellen, wies das vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in den Proben 19b, 5, 9, 11, 12, 19, 22 und 37 eine erhöhte Genexpression auf. Probe 12 und 19 zeigten eine mehr als 100-fach erhöhte Expression von VCAM1. In den Proben 13, 17a, 23, 24 und 33 war keine Registrierung der Genexpression möglich. Eine reduzierte Expression im Vergleich zur Referenzprobe fand sich in den Proben 6, 17b und 19a.

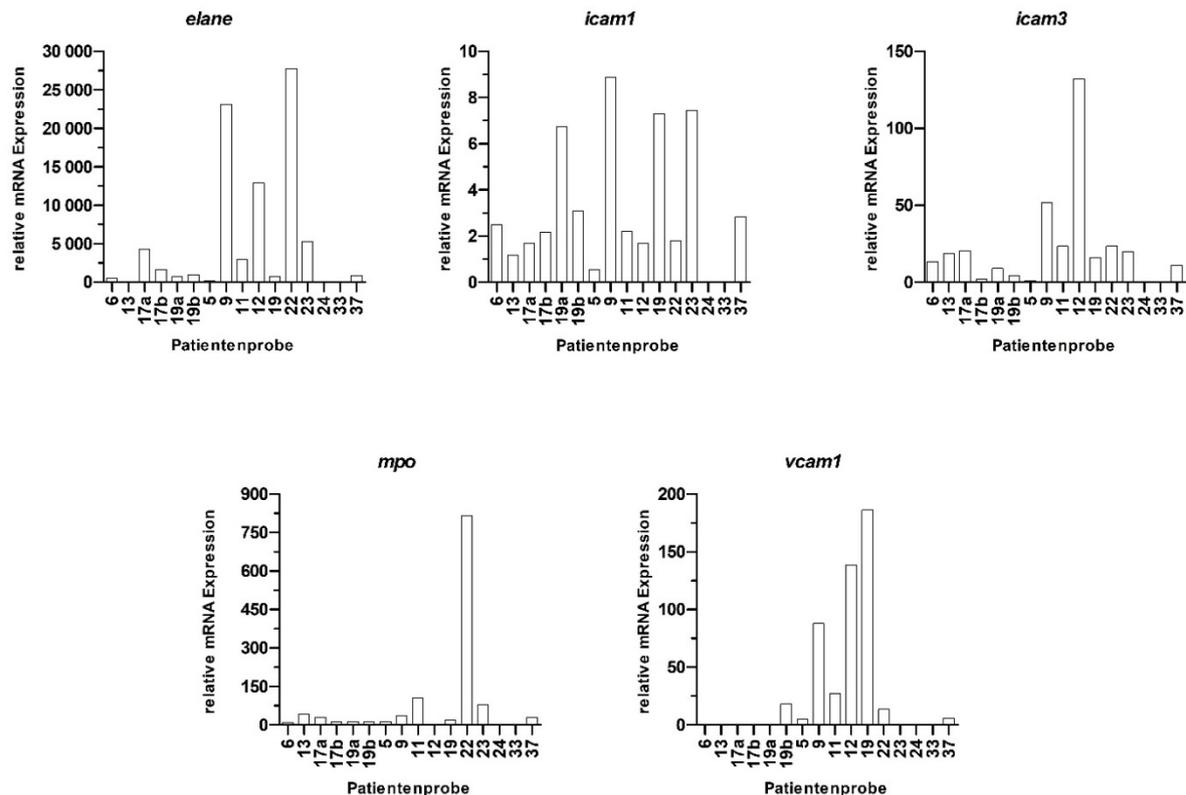


Abb. 4.8: RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Endothelaktivierung in humanen Endokard- und Endothelgewebeproben des rechten Herzens sowie der *V. subclavia* und *V. cava superior*. Relative Genexpressionswerte: neutrophile Elastase (elane), intracellular adhesion molecule 1 (icam1) und 3 (icam3), Myeloperoxidase (mpo) und vascular cell adhesion molecule 1 (vcam1). Die Genexpression wurde relativ zur Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Als native Referenzprobe dienten aus gesunden humanen Koronararterien gewonnene, kryokonservierte Endothelzellen (HCAEC).

4.2.2 Entzündungsmarker

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Entzündungsmediator, welcher die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine katalysiert und bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen überexprimiert ist. Mit Ausnahme der Proben 11, 24 und 33 ließ sich dies in allen weiteren Gewebeproben verifizieren. Insbesondere die Proben 19a (118-fache Expression) und 23 (1044-fache Expression) wiesen deutlich erhöhte Genexpressionen der Cyclooxygenase-2 auf.

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) war in allen Patientenproben – ausgenommen Probe 12, 24 und 33 – deutlich erhöht. Expressionsspitzen wurden v.a. in der 168.000-fach erhöhten Expression in Probe 19a und ca. 230.000-fach erhöhten Expression in Probe 23 deutlich.

Das ebenfalls der Familie der proinflammatorischen Zytokine angehörende Interleukin 6 konnte in den Proben 12, 22, 24 und 33 nicht nachgewiesen werden. Eine erhöhte Expression

zeigte sich in den Proben 6, 17b, 19a, 5, 9, 11, 19, 23 und 37. Bei den restlichen drei Gewebeproben (13, 17a und 19b) lagen reduzierte Genexpressionen im Vergleich zur Referenzprobe mit HCAEC vor.

Das Membranfaktorprotein (MCP), welches als Modulator des Komplementsystems bei inflammatorischen Prozessen dient, zeigte in fünf der sechzehn Proben eine erhöhte Genexpression. Während in neun Proben eine reduzierte Expression im Vergleich zur Referenzprobe vorlag, konnte in den Proben 24 und 33 keine Genexpression nachgewiesen werden.

Als Induktor humoraler Abwehrmechanismen fungiert der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) als Schlüsselmediator akuter Entzündungsreaktionen. In vierzehn Proben zeigten sich deutlich erhöhte Expressionswerte für das Gen. Probe 5 aus dem Jahr 2019 hatte mit einer 165-fach erhöhten Expression die im Vergleich geringste Genexpression. Wie in vorangegangenen Analysen konnte in den Proben 24 und 33 kein Expressionssignal nachgewiesen werden.

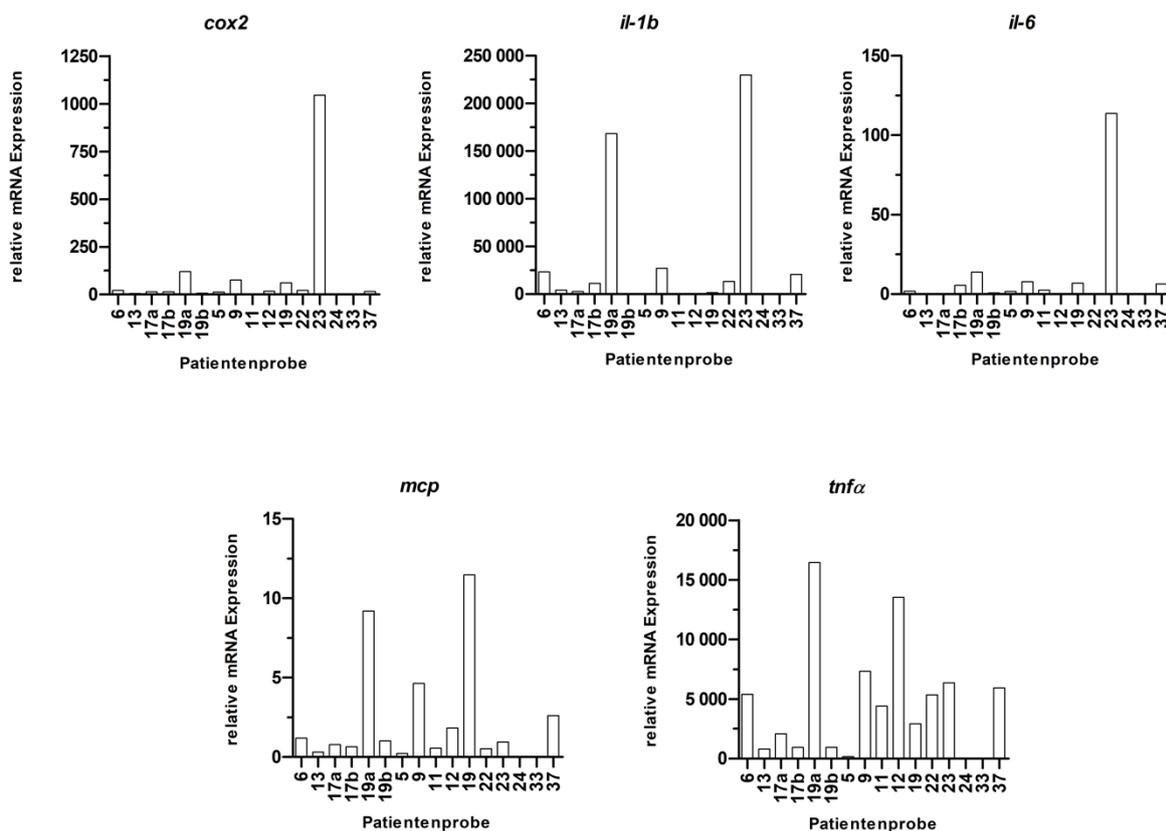


Abb. 4.9: RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Entzündung in humanen Herzwand- und Endothelgewebeproben des rechten Herzens sowie der *V. subclavia* und *V. cava superior*. Relative Genexpression von Cyclooxygenase 2 (*cox2*), Interleukin-1b (*il-1b*), Interleukin-6 (*il-6*), Membranfaktorprotein (*mcp*) und Tumornekrosefaktor α (*tnfa*). Die Genexpression wurde relativ zur Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Als native Referenzprobe dienten aus gesunden humanen Koronararterien gewonnene, kryokonservierte Endothelzellen (HCAEC).

4.2.3 Fibrosemarker

Das für das Aktin-Protein in glatter Gefäßmuskulatur codierende und mit der Aktivität von Myofibroblasten korrelierende Gen Aktin- α 2 (ACTA-2) wies in einigen Proben eine leicht erhöhte Genexpression auf. Die Proben 9 und 12 hatten eine ca. 60-fach, die Probe 33 eine ca. 80-fach erhöhte Genexpression im Vergleich zur Referenzprobe. In Probe 24 konnte aufgrund des geringen Probenmaterials kein Expressionssignal bestimmt werden.

Endothelin-1 (ET-1, EDN-1) ist ein endogenes Polypeptid und besitzt apoptotische und immunmodulatorische Eigenschaften, wobei es zugleich den stärksten Vasokonstriktor im menschlichen Organismus darstellt [80, 81, 92, 93]. Lediglich in den Proben 19a (zweifach) und 19 (sechsfach) war die Genexpression für das Gen signifikant erhöht. In zehn Proben waren die Expressionen im Vergleich zur Referenzprobe erniedrigt. Bei den Proben 24 und 33 konnte keine Expression bestimmt werden.

Die Matrix-Metalloproteinasen 2 (MMP-2) gehören zur Familie der Gelatinasen. Über eine Fibronectin-Typ-II-Domäne sind sie am Abbau extrazellulärer Matrix, wie Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin, beteiligt [43]. In den Proben 9 (fünffach), 11 (vierfach) und 19 (zweifach) waren die Genexpressionen im Vergleich zur HCAEC-Referenzprobe leicht erhöht. In Probe 12 war sie 40-fach erhöht. Bis auf die Proben 24 und 33, bei welchen aufgrund des geringen Probenmaterials keine Analyse gelang, waren die Genexpressionen in den restlichen zehn Proben gegenüber der Vergleichsprobe reduziert.

Sezerniert von Makrophagen, Fibroblasten und Myofibroblasten fördert der transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) die Bildung extrazellulärer Matrix in Fibroblasten sowie die Differenzierung von Myofibroblasten [85, 43]. Die Genexpression von TGF- β 1 war in den Patientenproben im Durchschnitt um ca. das 1,8-Fache gegenüber der Referenzprobe erhöht. In Gewebeprobe 5 konnte eine verminderte Expression festgestellt werden. In den Proben 24 und 33 konnte keine Expression bestimmt werden.

Der tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) fungiert als endogener Inhibitor interstitieller Kollagenasen und Matrix-Metalloproteinasen und limitiert so den extrazellulären Matrixumsatz [83, 84]. In der Analyse der Herzgewebeproben wurden in allen Patientenproben gesteigerte TIMP-1-Expressionen deutlich. Auffallend waren insbesondere die Proben 9 (22-fach) und 37 (25-fach). In Probe 24 konnte quantitativ bedingt erneut keine Genexpression bestimmt werden.

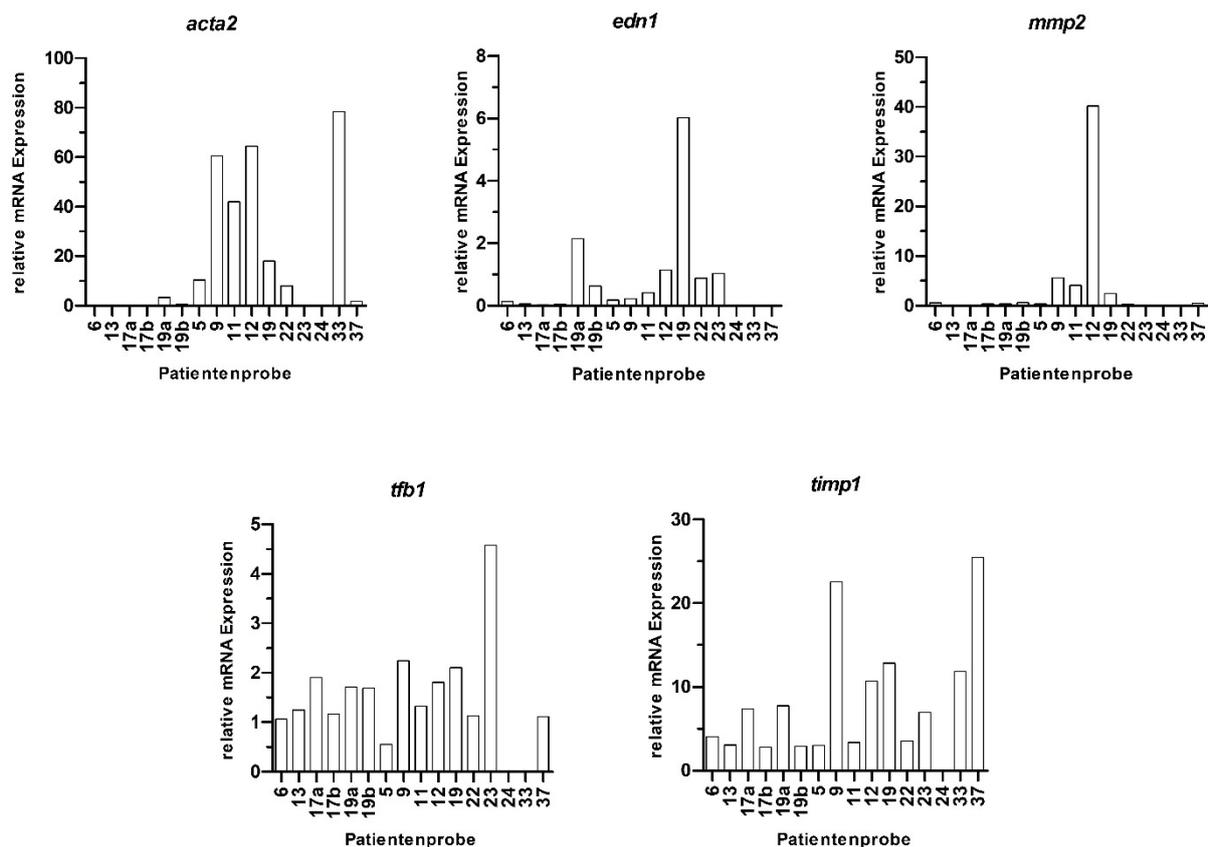


Abb. 4.10: RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Fibrose in humanen Herzwand- und Endothelgewebeproben des rechten Herzens sowie der *V. subclavia* und *V. cava superior*. Relative Genexpression von Aktin- α -2 (*acta2*), Endothelin-1 (*edn1*), Matrix-Metalloproteinase-2 (*mmp2*), transforming growth factor beta 1 (*tfb1*) und tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (*timp1*). Die Genexpression wurde relativ zur Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Als native Referenzprobe dienten aus gesunden humanen Koronararterien gewonnene, kryokonservierte Endothelzellen (HCAEC).

4.2.4 Kalzifizierungsmarker

Das der Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen, phospholipidbindenden Proteine angehörende Annexin-A2 (ANXA-2) [94] wies in der Hälfte aller Proben erhöhte Genexpressionen auf. Besonders hohe Expressionslevel konnten in den Proben 12 und 33 mit einer vier- bzw. siebenfach erhöhten Expression im Vergleich zur Referenzprobe beobachtet werden. In Probe 24 war, aufgrund des geringen Probenmaterials, kein Nachweis möglich.

Ähnlich erhöhte Genexpressionen konnten bei Analyse des, durch seine osteogene Wirkung an der vaskulären Kalzifikation beteiligten [88], bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) identifiziert werden. Fünf Proben waren in ihrer BMP-2-Expression rund fünffach gegenüber der Referenz erhöht. Acht Patientenproben zeigten reduzierte bis keine Genexpressionen. In den Proben 23, 24 und 33 konnten keine Expressionssignale registriert werden.

Als stärkster humaner Inhibitor der Kalzifikation zeigte das Matrix-Gla-Protein (MGP) in der Analyse zum Teil deutlich erhöhte Expressionswerte. Probe 11 war 73-fach, Probe 12 47-fach

und Probe 19 55-fach gegenüber der HCAEC-Probe erhöht. Sieben Proben lagen mit ihrem Expressionsniveau deutlich unter dem der Referenzprobe. In den Proben 24 und 33 waren keine Nachweise möglich.

Osteopontin (SPP-1) zeigte stark erhöhte Genexpressionen in allen Gewebeproben. So war Probe 17a ca. 77.000-fach, Probe 12 235.000-fach und Probe 33 74.000-fach gegenüber der Referenzprobe erhöht. In Probe 24 konnte erneut keine Genexpression bestimmt werden. Osteopontin fungiert in Abhängigkeit von der Konzentration als Induktor oder Inhibitor der Kalzifikation und ist v.a. bei Atherosklerose in seiner Expression hochreguliert [95].

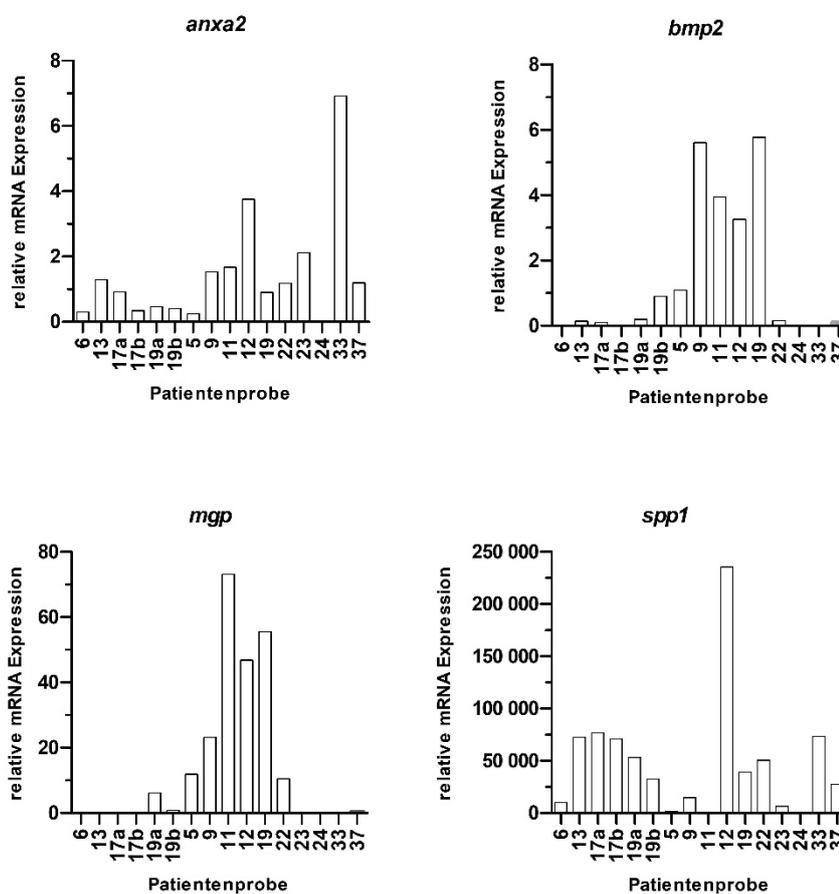


Abb. 4.11: RT-qPCR-Analyse ausgewählter Biomarker der Kalzifikation in humanen Herzwand- und Endothelgewebeproben des rechten Herzens sowie der *V. subclavia* und *V. cava superior*. Relative Genexpression von Annexin-A2 (*anxa2*), bone morphogenetic protein 2 (*bmp2*), Matrix-Gla-Protein (*mgp*) und secreted phosphoprotein 1 (*spp1*). Die Genexpression wurde relativ zur Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Als native Referenzprobe dienten aus gesunden humanen Koronararterien gewonnene, kryokonservierte Endothelzellen (HCAEC).

4.3 Proteinanalyse

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden nachfolgend durch die visuelle Auswertung der Western Blot-Analyse verifiziert. Aufgrund des geringen Probenmaterials konnte für die Patientenprobe 22 keine Proteinanalyse durchgeführt werden.

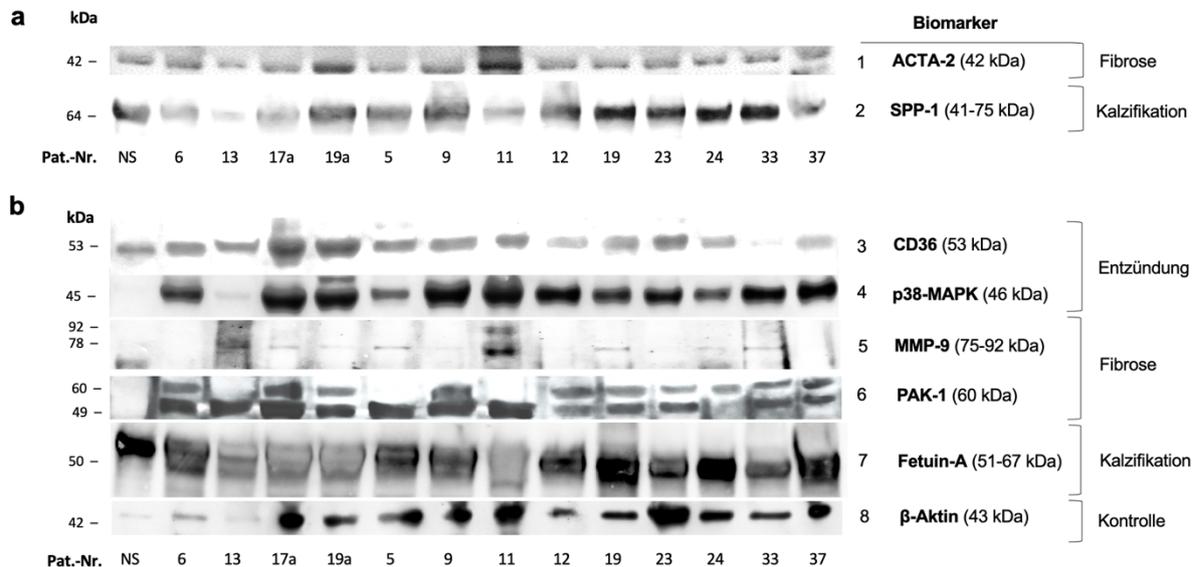


Abb. 4.12: Western Blot-Analyse ausgewählter Biomarker der Entzündung, Fibrose und Kalzifikation an Gewebeproben explantierter Herzschrittmachersonden. Die in der ersten Säule dargestellte Referenzgewebeprobe (NS) wurde nach *Sectio caesarea* aus der *V. umbilicalis* des *Funiculus umbilicalis* reseziert. β-Aktin in Blot 8 diente als Ladekontrolle des Western Blots. **(a)** Verifizierung der in der Genexpressionsanalyse detektierten Biomarker. Blot 1: Aktin-Alpha-2 (ACTA-2/α-SMA); Blot 2: Osteopontin (SPP-1/OPN). **(b)** Verifizierung der Proteinanalyse aus Abb. 4.12a durch Detektion zusätzlicher Biomarker der Entzündung, Fibrose und Kalzifikation. Blot 3: Thrombozytenglykoprotein 4 (CD36, GP-4); Blot 4: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK); Blot 5: Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9); Blot 6: p21-activated kinase 1 (PAK-1); Blot 7: Fetuin-A; Blot 8: β-Aktin.

4.3.1 Entzündungsmarker

Die bei überschießenden Entzündungsreaktionen erhöhte p38-MAPK zeigte, außer in Probe 13 und der Nabelschnur-Referenzprobe, deutlich intensive Banden in allen Gewebeproben (vgl. Abb. 4.12).

Das Thrombozytenglykoprotein 4 (CD36) ist an der Bildung atherosklerotischer arterieller Läsionen v.a. durch die Wechselwirkung mit oxidiertem Lipoprotein (oxLDL) beteiligt. In der Proteinanalyse zeigten sich in allen Gewebeproben, ausgenommen die Proben 12, 33 und 37, erhöhte Intensitäten für den Biomarker.

Die Entzündungsmarker in der Proteinanalyse waren in nahezu allen Gewebeproben deutlich erhöht. Diese Ergebnisse ließen sich auch in den Genexpressionsanalysen erkennen. Vor allem in den Proben 19a, 9, 19 und 23 waren Erhöhungen in den Genexpressionen der Entzündungsmarker ersichtlic.

4.3.2 Fibrosierungsmarker

Alpha smooth muscle actin (α -SMA) dient als Marker für die Bildung von Myofibroblasten. Erhöhte Expressionen begünstigen das Entstehen einer Fibrose. Die Gewebeprobe 6, 19a, 9, 11, 23 und 33 zeigten eine höhere Bandenintensität als die Referenzprobe. Sowohl in der Genexpressionsanalyse als auch in der Proteinanalyse war der Fibrosemarker ACTA-2 in den Proben 9, 11 und 33 erhöht.

In der Proteinanalyse der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) ließen sich drei unterschiedliche Banden detektieren. Das aktivierte Enzym lief auf einer Höhe von 78 kDa und konnte in allen Proben, außer den Proben 6, 23 und 37, nachgewiesen werden. In Probe 11 konnte zudem bei einem Molekulargewicht von 92 kDa das Proenzym der MMP-9 detektiert werden.

Die Hauptbande von p21-activated Kinase 1 (PAK-1) zeigte in den Proben 6, 17, 19a, 9, 12, 19, 23, 24, 33 und 37 eine deutliche Intensitätssteigerung. In der Referenzprobe (Nabelschnur) war, ebenso wie in den Proben 13, 5 und 11, kein Signal erkennbar.

4.3.3 Kalzifizierungsmarker

Das Glykoprotein Osteopontin (OPN) war in allen Gewebeprobe, einschließlich der Nabelschnur-Referenzprobe, durch intensive Bandenintensitäten im Western Blot nachweisbar.

Fetuin-A zeigte im Vergleich zur Referenzprobe in allen Patientenproben, außer den Proben 19, 24 und 37, eine geringere Bandenintensität (vgl. Abb. 4.12). Korrelationen zwischen Genexpressions- und Proteinanalysen, die auf eine gesteigerte Kalzifikation in den Patientenproben hinweisen, zeigten sich insbesondere in den Proben 19a, 9, 11, 12, 19 und 33.

4.4 Matching von Patientendaten, Genexpressions- und Proteinanalyse

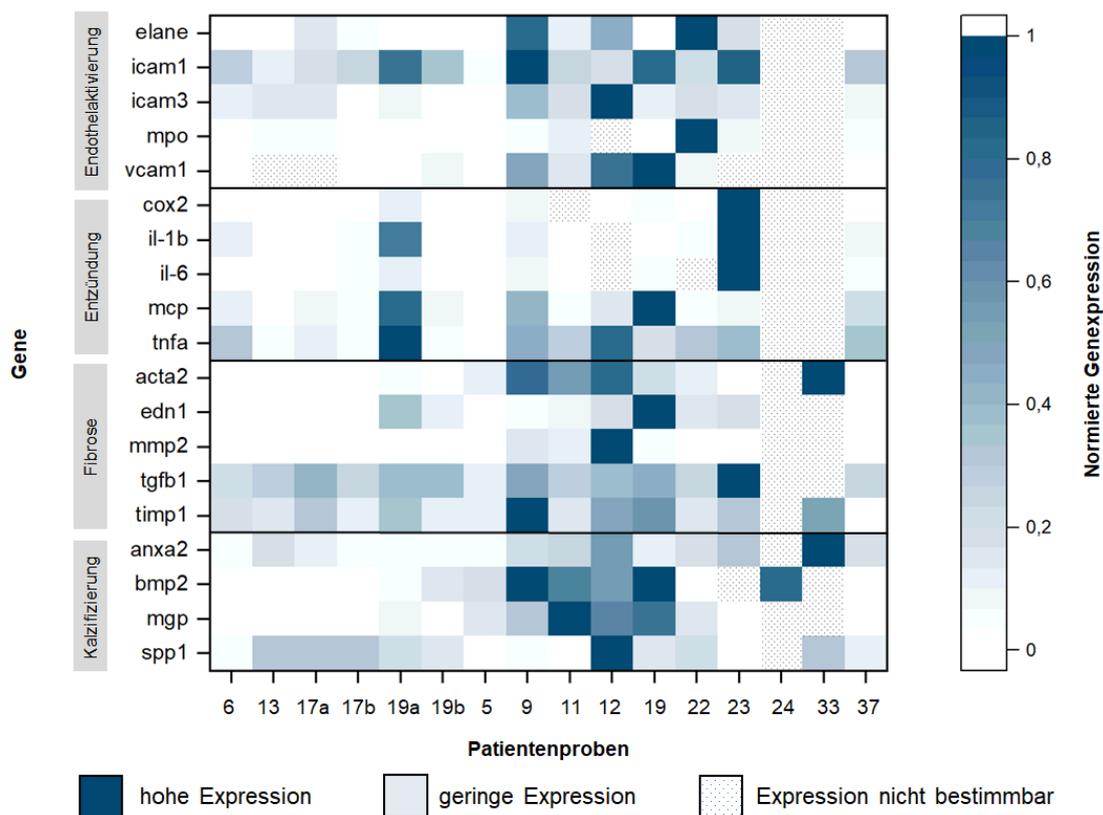
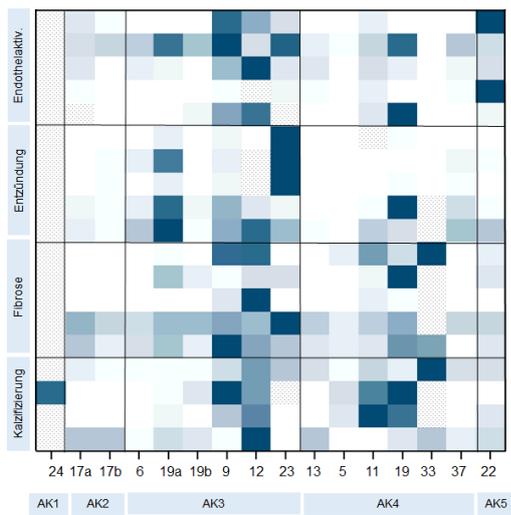


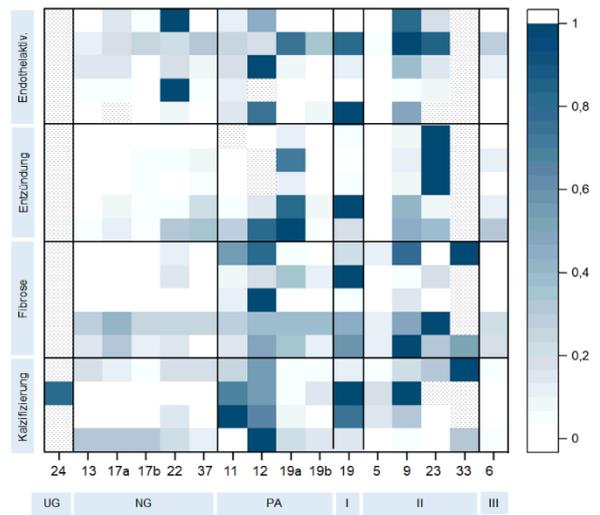
Abb. 4.13: In Heat Map visualisierte Expressionsmuster der Genexpressionsanalyse. Auf der y-Achse sind die analysierten Gene aufgetragen. Diese wurden anhand ihrer Funktion in die Kategorien Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrose und Kalzifizierung eingeteilt. Diese Genanordnung wurde ebenfalls in Abb. 4.14 verwendet. Die Nummerierung der Patientenproben ist chronologisch entsprechend dem Entnahmedatum auf der x-Achse aufgetragen. In Abb. 4.14 variiert die Reihenfolge entsprechend den betrachteten Merkmalen. Die im rechten Bildrand angeordnete Farbskala spiegelt die normierte Genexpression der Gene wider. Generell bedeuten intensive, kontrastreiche Farben eine hohe Genexpression, während helle Farben bzw. die Farbe „weiß“ eine geringe bzw. keine Expression anzeigen. In Bereichen der gepunkteten Muster konnte - technisch oder durch geringe Probenmengen bedingt - keine Analyse der entsprechenden Biomarker erfolgen.

In Abbildung 4.13 wurden die in Kapitel 4.2 ausgewerteten Ergebnisse der Genexpressionsanalyse in einer Heat Map dargestellt und entsprechend ihrem Verteilungsmuster ausgewertet. Auffällig waren geringe Genexpressionslevel der Kategorien Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrose und Kalzifizierung in den Patientenproben 6, 13, 17a, 17b, 19b, 5 und 37. Die Genexpressionen waren bei diesen Proben jeweils nur leicht (helle Farben) bzw. nicht (weiß) gegenüber der HCAEC-Referenzprobe erhöht. Erhöhte Expressionswerte der Endothelaktivierung ließen sich in den Proben 9, 12, 19, 22 und 23 feststellen. Gesteigerte Genexpressionen fanden sich darüber hinaus bei den Entzündungsmarkern der Proben 19a, 9, 12, 19 und 23 sowie den Fibrosemarkern in den Patientenproben 9, 12, 19, 23 und 33. Erhöhte Expressionen der Kalzifizierung wurden in den Proben 9, 11, 12, 19, 24 und 33 registriert.

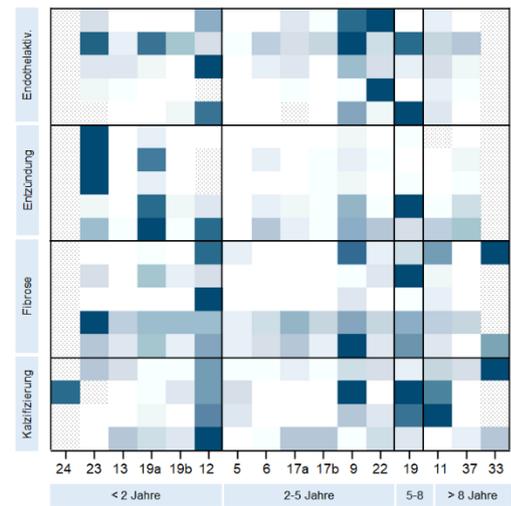
a



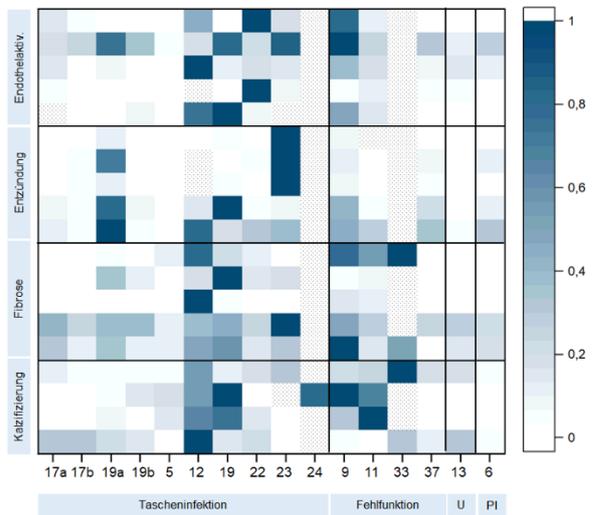
b



c



d



e

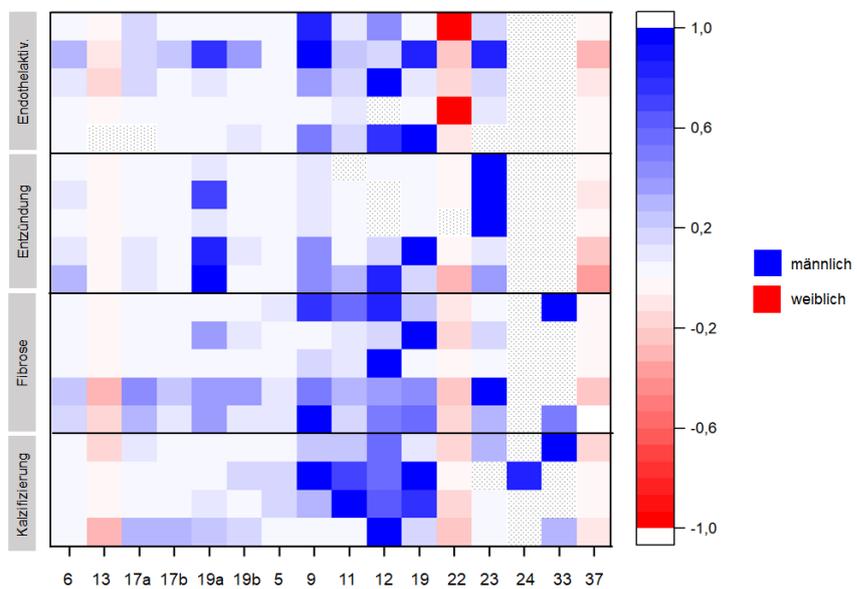


Abb. 4.14: Matching von Patientendaten (vgl. Kap. 4.1) und Genexpressionsanalyse (vgl. Kap. 4.2). Betrachtet wurden verschiedene Merkmale des Patientenkollektivs. Erläuterungen zum Aufbau, Achseneinteilung und Beschriftung der Heat Maps s. Abb. 4.13. **(a)** Darstellung der fünf Altersklassen (AK). Alter unter 50 Jahren (AK 1), 50-60 Jahren (AK 2), 60-70 Jahren (AK 3), 70-80 Jahren (AK 4) und über 80 Jahren (AK 5). **(b)** Genexpression in Abhängigkeit des BMI (Body-Mass-Index; kg/m²). UG = Untergewicht (< 18,5 kg/m²); NG = Normalgewicht (18,5-24,9 kg/m²); PA = Präadipositas (25,0-29,9 kg/m²); I = Adipositas Grad I (30,0-34,9 kg/m²); II = Adipositas Grad II (35,0-39,9 kg/m²); III = Adipositas Grad III (> 40 kg/m²). **(c)** Genexpression in Abhängigkeit der Sondenliegezeit der Herzschrittmachersonden. Einteilung in: unter 2 Jahre, 2-5 Jahre, 5-8 Jahre und über 8 Jahre. **(d)** Genexpression in Abhängigkeit der Explantationsindikation. U = Ulzeration; PI = Herzklappenprotheseninfektion. **(e)** Genexpressionsmuster bei Patienten weiblichen (rot) und männlichen (blau) Geschlechts.

Bei Darstellung der Genexpressionsdaten in Abhängigkeit verschiedener Merkmale des Patientenkollektivs (vgl. Abb. 4.14) ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den Patientenproben erkennen. In Abbildung 4.14a wurde die Genexpression der Biomarker mit dem Altersprofil des Patientenkollektivs abgeglichen. Trotz technisch nur begrenzt auswertbarer Genexpressionen, konnte in Probe 24 (Patientenalter: 30 Jahre) eine eindeutige Gewebekalzifikation registriert werden. Im Altersbereich zwischen 50 und 60 Jahren waren dagegen nur geringe Genexpressionen der Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrose und Kalzifikation nachweisbar. Auffällig erhöht waren die Genexpressionen dieser vier Kategorien in Altersklasse 3 (60-70 Jahre), vor allem in den Proben 9, 12 und 23. Die Proben 6 und 19b zeigten hingegen in dieser Altersklasse eher geringe Genexpressionen. Im Alter von 70-80 Jahren überwogen insbesondere erhöhte Genexpressionen der Fibrose- und Kalzifikationsmarker. Die nur aus einer Person bestehende Altersklasse 5 zeigte starke Expressionen der Endothelaktivierung. In Abgleich mit der Proteinanalyse (vgl. Kap. 4.3) konnten diese Ergebnisse verifiziert werden.

In Abbildung 4.14b wurden die Werte der Genexpressionsanalyse in Abhängigkeit des Body-Mass-Index angeordnet. Auffällig waren geringe Genexpressionen von Biomarkern der Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrose und Kalzifikation bei normalgewichtigen Patienten. In Probe 24 (Untergewichtigkeit) konnte eine starke Erhöhung des kalzifikationsspezifischen Biomarkers bone morphogenetic protein 2 (BMP2) festgestellt werden. In den unterschiedlichen Adipositas-Stadien konnte kein Fokus der Genexpressionsdaten beobachtet werden. Sowohl Biomarker der Endothelaktivierung und Entzündung als auch der Fibrose und Kalzifizierung waren in den entsprechenden Gewebeproben erhöht. Erhöhte Marker der Entzündung und Fibrose ließen sich bei adipösen Patienten auch in der Proteinanalyse wiederfinden. Entgegen den Erwartungen wies der von Adipositas Grad III betroffene Patient in keiner der vier Kategorien erhöhte Genexpressionen auf. Im Gegensatz dazu konnten in der Proteinanalyse jedoch deutliche Hinweise auf das Vorliegen von Entzündungen, Fibrose und Kalzifikation gefunden werden.

Bei einer Sondenliegezeit von bis zu zwei Jahren überwogen erhöhte Genexpressionen v.a. bei der Entzündung und Fibrose (vgl. Abb. 4.14c). Dieser Aspekt konnte durch die

Proteinanalyse bestätigt werden. Lediglich Probe 12 zeigte mit einer Sondenliegezeit von 23 Monaten in allen vier untersuchten Kategorien erhöhte Expressionswerte. Bei einer Liegezeit zwischen zwei bis fünf Jahren und fünf bis acht Jahren zeigten sich keine eindeutigen Verteilungsmuster der Genexpressionsdaten. Vermehrt gesteigerte Expressionen konnten bei der Endothelaktivierung, Fibrose und Kalzifikation ermittelt werden. Ausnahmen bildeten hierbei die Proben 5, 6, 17a und 17b, bei welchen geringere Genexpressionen vorlagen. Ab einer Liegezeit von acht Jahren waren die Genexpressionen bei Biomarkern der Fibrose und Kalzifikation erhöht. Im Vergleich mit der Western Blot-Analyse waren bei dieser Liegedauer v.a. Biomarker der Fibrose erhöht; Kalzifikationsmarker dagegen nicht.

Bei Betrachtung der Abhängigkeit von Genexpression und Indikation zur Sondenextraktion wurde zwischen den Indikationen Tascheninfektion, Fehlfunktion, Ulzeration und Herzklappenprotheseninfektion unterschieden (vgl. Abb. 4.14d). Bei Infektionen der Schrittmacheraggregattaschen zeigten sich keine konstanten Expressionsmuster. Waren die Genexpressionen in den Proben 5, 6, 17a und 17b von nahezu allen Biomarkern reduziert, so zeigten sich bei den Proben 12, 19 und 23 deutlich gesteigerte Genexpressionen sowie Intensitäten in der Proteinanalyse. Bei durch technische Fehlfunktionen der Sonden bedingten Extraktionen ließen sich, auch durch die zumeist längeren Liegezeiten bedingt (vgl. Abb. 4.4 u. Abb. 4.14c), gesteigerte Genexpressionen von Biomarkern der Fibrose und Kalzifikation erkennen. Gewebeproben, die bei Sondenextraktion nach Ulzeration oder Infektionen von Herzklappenprothesen gewonnen wurden, zeigten lediglich geringe Genexpressionen der untersuchten Biomarker. In der Proteinanalyse konnten durch die zusätzlich verwendeten Biomarker jedoch deutliche Aktivitätsnachweise der Entzündung, Fibrose und Kalzifikation für Probe 6 erbracht werden.

Im Geschlechtervergleich in Abbildung 4.14e sind weibliche Patienten rot, männliche Patienten blau dargestellt. Deutlich wurde, dass bei Frauen insbesondere Genexpressionen von Biomarkern der Endothelaktivierung und Fibrose erhöht waren, während bei männlichen Patienten die Biomarker-Genexpressionen in allen vier Kategorien erhöht waren. Augenscheinliche Schwerpunkte im Genexpressionsmuster ließen sich jedoch nicht erkennen. Vor allem in den Proben 9, 11, 12, 19 und 23 zeigten sich erhöhte Expressionen sowohl in der Endothelaktivierung und Entzündung als auch Fibrose und Kalzifikation. Diese Erkenntnisse ließen sich durch die Proteinanalyse nicht bestätigen. So zeigte Probe 13 zwar geringe Aktivitäten von Biomarkern der Entzündung und Kalzifikation, jedoch verstärkte Bandenintensitäten der Fibrosemarker. Auch Probe 37 zeigte in der Proteinanalyse ein gegensinniges Aktivitätsmuster zur Genexpression. Sowohl Entzündungs- als auch Fibrose- und Kalzifizierungsmarker waren in der Western Blot-Analyse deutlich erhöht.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Biomarker für die drei physiologischen Ereignisse Entzündung, Fibrosierung und Kalzifizierung zu identifizieren und deren Aktivierungen im klinischen Zusammenhang mit Entzündungen und Verwachsungen von Herzschrittmachersonden bzw. Risikofaktoren der Patienten zu betrachten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten für die Ereignisse der Entzündung, Fibrosierung und Kalzifizierung ausgewählte Biomarker identifiziert werden, die sich zur Bestimmung des Schweregrades der Pathophysiologien eignen. Darüber hinaus konnten insbesondere die Abhängigkeiten vom Body-Mass-Index sowie kardiovaskuläre Komorbiditäten als patientenbezogene Risikofaktoren für Sondenkomplikationen bestimmt werden.

Endothelaktivierungsmarker als ätiologische Faktoren der Entzündung

Das Gefäßendothel liegt der Gefäßintima luminal an und besteht aus einem durch Tight-Junctions und Desmosomen verknüpften einschichtigen Plattenepithel aus Endothelzellen [96]. Die endotheliale Glykokalyx stellt somit die direkte Barriere zwischen Blut und umgebenden Gewebe dar und schützt den Organismus vor der Infiltration pathogener Keime, physikalischen und chemischen Noxen sowie Mediatoren der zellulären und humoralen Immunabwehr [97]. Im Rahmen lokaler sowie systemischer Entzündungen induziert das Endothel als auto- und parakrines Organ die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden zur Immunmodulation und trägt zur Infektabwehr und Hämostase bei [98, 99]. Schwerwiegende Entzündungen, Sepsis oder Ischämie führen dagegen häufig zu einer überschießenden Aktivierung des Endothels [98] mit Bildung eines proinflammatorischen, prokoagulatorischen und proliferativen Milieus [100]. Durch die Freisetzung von Chemo- und Zytokinen sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen trägt die im Rahmen inflammatorischer Prozesse auftretende Aktivierung von Endothelzellen und der damit einhergehende Verlust der endothelialen Barrierefunktion maßgeblich zur Invasion von Pathogenen in das humane Gewebe bei [97]. Überschießende Endothelaktivierungen können pathologische Akkumulationen von inflammatorischen Leukozyten im Gewebe begünstigen und so akute und chronische Entzündungsereignisse (mit der charakteristischen Symptomkonstellation aus *Calor*, *Rubor*, *Tumor* und *Functio laesa*) sowie die Entstehung atherosklerotischer Läsionen fördern [100].

Vor dem Hintergrund der Endothelaktivierung als ätiologischer Faktor für die Entstehung inflammatorischer Ereignisse wurden die ursprünglich als Biomarker der Entzündung ausgewählten Gene im Verlauf der Untersuchungen neu unterteilt. Sie wurden den

physiologischen Ereignissen der Endothelaktivierung und Entzündung zugeordnet und in der Genexpressionsanalyse getrennt voneinander analysiert.

In der vorliegenden Arbeit konnten in der Genexpressionsanalyse im Vergleich zur Referenzprobe in allen auswertbaren Herzgewebeproben die neutrophile Elastase (ELANE) sowie die intracellular adhesion molecules 1 und 3 (ICAM-1; ICAM-3) mit erhöhten Genexpressionswerten nachgewiesen werden. Die durch diese Biomarker vermittelten physiologischen Funktionen sind in Tabelle 3.13 (Kapitel 3.2.4) bzw. im Anhang (Kapitel 9.1.1) erläutert. Im Vergleich zu den übrigen analysierten Genen (Myeloperoxidase; vascular cell adhesion molecule 1), bei denen keine signifikanten Erhöhungen der Expressionswerte registriert werden konnten, scheinen diese Biomarker geeignet zu sein, um prädiktive Aussagen zur Endothelaktivierung zu treffen. Wen *et al.* fanden 2018 in ihrer Untersuchung an genetisch veränderten Mäusen mit neutrophiler Elastase und Tieren mit pharmakologisch inhibierter neutrophiler Elastase heraus, dass die Elastase-2 maßgeblich an der Entstehung lokaler wie systemischer Entzündungen und der damit einhergehenden Bildung von Schaumzellen und atherosklerotischen Plaques beteiligt ist. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass dies einen neuen Ansatzpunkt in der molekularen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen könnte [101]. Mit ihren Erkenntnissen regten sie eine Etablierung der neutrophilen Elastase als Kalzifikationsmarker an [101]. Diese Erkenntnisse lassen sich durch die vorliegende Arbeit bestätigen. In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten Gewebeproben von Patienten mit erhöhten ELANE-Expressionswerten gesteigerte Fibrose- und Kalzifizierungsaktivität.

ICAM-1 und ICAM-3 induzieren als Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen bei inflammatorischen Prozessen die Leukozytenadhäsion und -transmigration in den vaskulären subendothelialen Raum [60, 59]. Dabei sind sie in erster Linie für die Drosselung der Geschwindigkeit der Leukozyten verantwortlich und ermöglichen diesen die Anheftung am Endothel in einem lockeren Verbund („Rolling“), um anschließend in Kombination mit anderen Adhäsionsmolekülen einen festen Verbund auszubilden und die Zellmigration zu Entzündungsherden zu ermöglichen (vgl. Abb. 9.1) [102]. In ihrer 2009 veröffentlichten Untersuchung zur Funktion von ICAM-1 in Endothelzellen vermuten Lawson *et al.*, dass das intracellular adhesion molecule 1 nicht nur im Rahmen der Endothelaktivierung an der Leukozyten-Adhäsion beteiligt ist, sondern auch direkt proinflammatorische Signalwege einleitet [103]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass gleichfalls die Bildung atherosklerotischer Plaques verstärkt wurde. In Zusammenhang mit verschiedenen Komorbiditäten des Patientenkollektivs konnten Lawson *et al.* bei Patienten mit Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit (KHK) erhöhte Spiegel des löslichen ICAM-1

(sICAM-1) im Blutserum detektieren [103]. Für alle Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit betrachtet wurden und die Komorbiditäten koronare Herzkrankheit und/oder Herzinsuffizienz aufwiesen, zeigten sich erhöhte ICAM-1- und ICAM-3-Expressionswerte in der Genexpressionsanalyse. Entsprechend konnten die Ergebnisse von Lawson *et al.* bestätigt werden. ICAM-1 und ICAM-3 scheinen somit geeignete Biomarker zu sein, um Aktivierungen des Endothels sowie inflammatorische Prozesse in Verbindung mit der Herzschrittmachertherapie anzuzeigen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um festzustellen, ob erhöhte ICAM-1/ICAM-3-Werte aus den Vorerkrankungen der Patienten resultieren oder im Verlauf der inflammatorischen und fibrotischen Ereignisse am Sondenmaterial induziert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass Patienten, die bereits vor Beginn der Schrittmachertherapie die kardiovaskulären Risikofaktoren KHK und Herzinsuffizienz aufweisen, prädestiniert sind, Sondenentzündungen und -verwachsungen zu entwickeln. Zur Minimierung der Komplikationsrate in der Schrittmachertherapie bietet sich bei Patienten mit diesen Komorbiditäten die Bestimmung von sICAM-1/sICAM-3 im Blutserum im Vorfeld einer Schrittmacherimplantation an.

Klassische Entzündungsmediatoren als Biomarker in der Diagnostik

In der vorliegenden Arbeit konnten in der Genexpressionsanalyse für die klassischen Entzündungsmarker Interleukin-1 β (IL-1 β) und tumor necrosis factor α (TNF- α) erhöhte Expressionswerte gegenüber der HCAEC-Referenzprobe nachgewiesen werden. Ebenfalls wurden in den Proteinanalysen für das p38-mitogen activated protein (p38-MAPK) deutlich erhöhte Bandenintensitäten in den Gewebeproben registriert. Die physiologischen Funktionen dieser Biomarker sind in Tabelle 3.13 (Kapitel 3.2.4) sowie im Anhang (Kapitel 9.1.2) näher erläutert.

Als Schlüsselmediator für die Entzündungsreaktion wird IL-1 β nach Erkennung pathogener Keime durch pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) als Vorläuferprotein exprimiert [104] und wirkt v.a. in der späten Phase der Entzündung [105]. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen bestanden zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme bei zehn von vierzehn Patienten Infektionen an den Herzschrittmachersonden. Aufgrund der vorliegenden Infektionen sind erhöhte Expressionswerte für IL-1 β naheliegend. Der Biomarker scheint folglich geeignet, um als Prädiktor inflammatorischer Prozesse an Schrittmachersonden zu dienen und in der Diagnostik zur Bestimmung von Herzschrittmacherinfektionen herangezogen zu werden.

Als weiterer Schlüsselmediator akuter Entzündungsmediatoren kann TNF- α herangezogen werden. TNF- α ist im gesunden Organismus nicht nachweisbar [51]. Erst bei Infektionen oder

entzündlichen Ereignissen steigt der Serumspiegel korrelierend zum Schweregrad der Erkrankung an [106, 51, 107]. In allen auswertbaren Herzgewebeproben dieser Arbeit zeigten sich erhöhte Expressionswerte für TNF- α . Simultan zu IL-1 β kann dieser Marker als diagnostischer Marker für Infektionen und Entzündungen in der Herzschrittmachertherapie angewandt werden.

In der Proteinanalyse konnten mit Hilfe des Western Blots in nahezu allen Gewebeproben erhöhte Bandenintensitäten für die p38-MAPK festgestellt werden. Die p38-MAPK kann durch verschiedene Umwelteinflüsse, wie oxidativem Stress und proinflammatorischen Zytokinen, aktiviert werden. Ähnlich wie TNF- α ist die p38-MAPK, neben der Regulation des Zellzyklus, an der Steuerung der Apoptoserate im Gewebe verantwortlich. Erhöhte Expressionswerte der p38-MAPK finden sich insbesondere bei überschießenden Entzündungsreaktionen [108]. Korrelierend mit den Ergebnissen von IL-1 β und TNF- α aus der Genexpressionsanalyse lässt sich anhand dieser drei Biomarker (IL-1 β , p38-MAPK, TNF- α) das Entzündungsgeschehen an Herzschrittmachersonden charakterisieren. In weiteren Studien sollten Untersuchungen über die Auswirkungen der TNF- α - und p38-MAPK-Konzentrationen in Bezug auf die Apoptose des umliegenden Gewebes durchgeführt werden. Diese könnten in Hinblick auf entzündete Schrittmachersonden möglicherweise Aussagen über den Einfluss dieser beiden Biomarker auf die Morphologie des Herz- und Endothelgewebes erlauben. Hierdurch induzierte Gewebeschädigungen könnten somit frühzeitig detektiert werden.

Biomarker zur Beurteilung der Fibroseprogredienz

Histologisch ist die Fibrose durch das Überwachsen und Vernarben von Gewebe, als Folge einer übermäßigen Ablagerung extrazellulärer Matrix, gekennzeichnet. Ursächlich dafür sind durch Infektionen, Noxen oder Gewebeerletzungen induzierte chronische Entzündungen [109, 110]. Durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Aktivierung immunologisch wirksamer Zellen werden u.a. Reparaturprozesse im Gewebe angeregt und schadhafte Zellen durch primitives Bindegewebe ersetzt (Fibroplasie). Aus diesen Bindegewebszellen kann bei einem gestörten Synthesegleichgewicht dauerhaftes Narbengewebe mit einem Mangel an funktionsfähigen Zellen entstehen. Die Anlagerung der von Myofibroblasten synthetisierten Proteine der extrazellulären Matrix, einschließlich Kollagen und Fibronectin [111], wird über verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)) reguliert. Wynn definiert die Fibrose als Ungleichgewicht zwischen einer gesteigerten Syntheseleistung der Myofibroblasten und einer reduzierten Inhibition dieser durch die TIMPs [109]. TGF- β 1, IL-6, IL-11 und andere Zytokine fördern die TIMP-1-Expression, während IL-1 β und TNF- α die Expression hemmen [112, 113]. Überexpressionen von TIMPs spielen insbesondere bei der

Entstehung fibrotischer Läsionen durch die übermäßige Ablagerung extrazellulärer Matrix und Hemmung der MMPs eine wichtige Rolle [114, 43].

In der vorliegenden Arbeit konnten in der Genexpressionsanalyse in allen auswertbaren Gewebeproben erhöhte TIMP-1-Expressionswerte beobachtet werden. Entgegen der aktuellen Studienlage konnte eine Hemmung der TIMP-1-Expression durch die Entzündungsmarker TNF- α und IL-1 β nicht nachgewiesen werden. Patientenproben mit hohen Expressionswerten für TIMP-1 korrelierten mit hohen Expressionswerten für die oben genannten Entzündungsmarker. Bei 71,4 % der auswertbaren Patientenproben konnte eine Hemmung der MMP-2-Genexpression durch TIMP-1 nachgewiesen werden. Lediglich bei vier Gewebeproben zeigte sich keine Korrelation zwischen erhöhten TIMP-1-Expressionen und reduzierten MMP-2-Expressionen. Tiefergehende Untersuchungen bzgl. dieser Problematik sind in weiteren Studien anzustreben.

Das alpha smooth muscle actin (α -SMA) ist ein von aktivierten Myofibroblasten exprimiertes Protein der glatten Gefäßmuskulatur [78], welches für die Regulation der Gefäßmotilität und -kontraktion verantwortlich ist [79]. Cherng *et al.* postulierten, dass die Expression von α -SMA eng mit der Aktivität von Myofibroblasten korreliert [115–117] und somit ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Fibrose und der Höhe der α -SMA-Konzentration besteht. In dieser Arbeit konnten in der Genexpressionsanalyse bei ca. zwei Drittel der Gewebeproben erhöhte Expressionswerte von α -SMA festgestellt werden. α -SMA und TIMP-1 scheinen anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als diagnostische Biomarker zur Bestimmung des Schweregrades der Gewebefibrose an Herzschrittmachersonden geeignet zu sein.

In der Proteinanalyse konnten bei allen Gewebeproben erhöhte Bandenintensitäten der p21-activated kinase 1 (PAK-1) registriert werden. Auffällig war dabei die Ausprägung einer zweiten Bande mit einem Molekulargewicht von 49 kDa. Grebeňová *et al.* interpretieren dieses Ergebnis als Bindung der GTPase Cdc42 an die p21-Bindungsdomäne (PBD) von PAK-1 [118]. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung führt durch Dissoziation der Dimere zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität [118]. In aktuellen Studien wurde herausgefunden, dass eine erhöhte PAK-1-Konzentration die durch Cdc42 und RAC-1 vermittelte Rho-Signalaktivität hemmt und somit der vaskulären Barrierestörung und Entstehung der interstitiellen Fibrose entgegenwirkt [119, 120]. Die im Rahmen dieser Arbeit im Western Blot ermittelten Bandenintensitäten von PAK-1 scheinen auf das Vorliegen ausgeprägter Fibrosen hinzudeuten. Zu vermuten ist, dass im Verlauf der interstitiellen Fibroseentstehung unter Einfluss der Rho-Signalkaskade die PAK-1-Expression gesteigert wird. Eine Steigerung der PAK-1-Kinaseaktivität (s. zweite Bande im Western Blot) könnte zur Limitierung bestehender Fibroseherde sowie ihrer Progredienz beitragen. PAK-1 scheint somit ein geeigneter

Biomarker zur Beurteilung der Fibroseprogredienz an implantierten Schrittmachersystemen zu sein.

Matrix-Gla-Protein, Osteopontin und Fetuin-A als Biomarker der Kalzifizierung

Im Verlauf physiologischer Alterungsprozesse des menschlichen Körpers differenzieren glatte Gefäßmuskelzellen zunehmend zu osteoblastischen Zellen [121]. In Verbindung mit der Ablagerung von Matrixvesikeln bedingt dies die Akkumulation und Kristallisation von Hydroxylapatit in der Extrazellulärmatrix sowie der Intima und Media der Gefäßwand [121–123]. Die Biomineralisierung ist ein komplexer Prozess, der zumeist als direkte Folge von Entzündungen und fibrotischen Läsionen des Gefäßendothels in Kombination mit bestehenden Komorbiditäten, wie Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie, in Erscheinung tritt [124]. Zusammen mit dem Untergang elastischer Fasern und damit einhergehenden Einschränkungen in der Gefäßcompliance und Vasomotion sind diese Pathophysiologien v.a. bei der Entstehung der Atherosklerose, KHK, Hypertonie und Herzinsuffizienz klinisch relevant [124].

Das Matrix-Gla-Protein (MGP) ist der stärkste humane Inhibitor der Kalzifizierung [89]. Nach Aktivierung übt MGP eine Reihe verschiedener Funktionen aus, die v.a. der Atherosklerose-Protektion dienen. Aktiviertes Matrix-Gla-Protein besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Hydroxylapatitkristallen; durch Aktivierung von Gefäßmakrophagen induziert MGP den Abbau des MGP-Hydroxylapatit-Komplexes mittels Phagozytose und Apoptose [89]. Darüber hinaus geht MGP Komplexe mit dem bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) ein und verhindert so dessen Bindung an den BMP-Rezeptor (vgl. Kap. 9.1.4). BMP-2 vermittelt über die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege die Osteogenese glatter Gefäßmuskelzellen und trägt zur Entstehung von Atherosklerose bei (vgl. Abb. 9.6) [88, 174]. In der vorliegenden Arbeit wurden in ca. 60 % der auswertbaren Gewebeproben erhöhte Expressionswerte für MGP nachgewiesen. In seiner Eigenschaft als Inhibitor der Kalzifikation können die erhöhten Expressionswerte als Gegenregulation des humanen Organismus auf bestehende Kalzifikationsherde angesehen werden. Vor diesem Hintergrund eignet sich MGP als Biomarker für die Diagnostik atherosklerotischer Prozesse an Herzschrittmachersonden.

Osteopontin (OPN) wurde ursprünglich als Knochensialoprotein entdeckt, welches die Anlagerung von Osteoklasten an die mineralisierte Knochenmatrix ermöglicht [95, 125]. In verschiedenen Studien konnte eine Konzentrationsabhängigkeit von Osteopontin auf die vaskuläre Kalzifizierung nachgewiesen werden, welche mit einer inhibierenden oder induzierenden Wirkung einhergeht [95, 125]. Fitzpatrick *et al.* konnten in ihrer Studie von 1994 nachweisen, dass die OPN-Expression in atherosklerotischen Plaque-Läsionen stark erhöht

war [95]. Des Weiteren ist eine Beteiligung des Proteins an zellulären Prozessen, wie der Zelladhäsion mit Fibroseinduktion und Inflammation, nachgewiesen worden [90]. Dabei wird angenommen, dass die kalzifizierende Wirkung v.a. auf der Verstärkung der Entzündung in atherosklerotischen Plaques beruht [91]. Für Osteopontin wurden in allen auswertbaren Patientenproben erhöhte Expressionswerte festgestellt. Dieses Ergebnis bestätigte die Proteinanalyse. In der Proteinanalyse konnten bei allen Proben die Ausbildung intensiver Proteinbanden nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht verifiziert werden, ob Osteopontin als Induktor kalzifizierender Prozesse fungierte oder aufgrund gegenregulatorischer Maßnahmen hochreguliert wurde. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den genauen Einfluss von Osteopontin auf Kalzifizierungsprozesse zu klären.

Das in der Proteinanalyse zusätzlich bestimmte Protein Fetuin-A fungiert als Inhibitor der ektopen Kalzifizierung im Blutkreislauf und ist am Abbau bestehende Hydroxylapatitkristallablagerungen beteiligt [184]. Erhöhte Fetuin-A-Spiegel zeigen folglich Assoziationen zu kardiovaskulären Erkrankungen und einer gesteigerten Kalzifikation im Gefäßsystem. Kongruent zu den Ergebnissen der Proteinanalyse von OPN zeigten sich im Western Blot auch bei Fetuin-A in allen Gewebeproben ausgeprägte Bandenintensitäten, was auf eine Gegenregulation auf bestehende Kalzifizierungsprozesse hindeutet.

In der Proteinanalyse konnten für die Kalzifizierungsmarker OPN und Fetuin-A ausgeprägte Proteinbanden für die Referenzprobe (*V. umbilicalis*) festgestellt werden. Ein adäquater Vergleich mit den Bandenintensitäten der Patientenproben ist dadurch für die Kalzifizierungsmarker nicht möglich. Der Nachweis erhöhter Kalzifizierungsmarker in der Referenzprobe ist physiologisch bedingt. Zwischen der 37. und 40. Schwangerschaftswoche werden über die Plazenta große Mengen von Calcium- und Phosphationen in den fetalen Organismus transportiert, um die Mineralisierung des kindlichen Stütz- und Bewegungsapparates zu fördern [126, 127]. Durch die Ablagerung von kristallinen Calciumphosphat-Salzen in der Plazenta sowie den umbilikalischen Gefäßen kann mit zunehmender Dauer der Schwangerschaft eine Kalzifizierung beobachtet werden [128, 126].

Vor diesem Hintergrund ist die *V. umbilicalis* als Referenzprobe zur Proteinanalyse von Kalzifizierungsmarkern ungeeignet. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sollten diesbezüglich in weiteren Untersuchungen mit einer alternativen Referenzprobe wiederholt werden. Eine weitergehende Analyse im Rahmen dieser Arbeit war aufgrund des geringen Probenmaterials nicht möglich.

In Anbetracht der intensiven Proteinbanden im Western Blot scheinen Osteopontin und Fetuin-A, trotz der ungeeigneten Referenzprobe, als diagnostische Biomarker der

Kalzifizierung geeignet zu sein. Weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Osteopontin-Studienlage sind anzustreben, um zwischen einer Verwendung als Precursor bzw. Verlaufsmarker bei atherosklerotischen Läsionen unterscheiden zu können.

Patientenabhängige Risikofaktoren als Ursache gewebeassoziierter Sondenkomplikationen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar [129]. In den vergangenen Jahrzehnten wurden Entzündungen, Immunreaktionen und Kalzifikationen der Gefäßwand in zahlreichen Studien umfänglich untersucht und die Atherosklerose als Hauptursache für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen identifiziert [129]. Die Atherosklerose stellt eine entzündliche Reaktion der *Tunica intima* (Intima) und *Tunica media* (Media) auf in der Intima eingelagerte Lipoproteine und der damit einhergehenden Bildung von atherosklerotischen Plaques dar [130]. Der Intima angelagertes LDL ist im Rahmen fettreicher Ernährung, Fettstoffwechselstörungen und proinflammatorischer Ereignisse – wie Infektionen und oxidativen Prozessen – ausgesetzt, welche im Verlauf zytotoxische Schäden am Gefäßendothel bedingen. Am Ort der Läsion kommt es zur Ausschüttung von Chemokinen, welche die Aktivierung und das Anlocken von Zellen des Immunsystems vermitteln (Chemotaxis). Neben Mast- und T-Zellen wandern auch Monozyten aus dem Knochenmark in das Gewebe ein und differenzieren unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen. Durch die Aufnahme von oxidiertem LDL transformieren sich die Makrophagen in Schaumzellen [131, 132]. Die so entstehenden gelblichen Lipideinlagerungen im Endothel werden auch als *fatty streaks* bezeichnet [130]. Luminal bildet sich an diesen eine fibröse Kappe aus Makrophagen, T-Lymphozyten und glatten Gefäßmuskelzellen, zentral können aus den Lipidansammlungen und Schaumzellen nekrotische Areale hervorgehen. Diese begünstigen Vernarbungen und Ulzerationen der betroffenen Gefäßwand. Oftmals führt dies zur Kalzifikation und Atrophie der Gefäßmedia und damit einhergehenden kardiovaskulären Komplikationen [131, 133].

Neben dem Nikotinabusus konnten Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen als die wichtigsten ätiologischen Risikofaktoren der Atherosklerose identifiziert werden [134]. Höchstes Risiko für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen besitzen demnach Patienten mit der auch als metabolisches Syndrom (Reaven-Syndrom, Syndrom X) zusammengefassten Konstellation aus arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipoproteinämie und abdomineller Fettleibigkeit [135, 136]. Da für das metabolische Syndrom bis heute keine einheitliche Definition existiert, ist eine Diagnosestellung im eigentlichen Sinne nicht möglich. Die WHO veröffentlichte 1998 eine Definition, aus der das

metabolischen Syndrom als Symptomkonstellation von Diabetes mellitus und zwei weiteren, gleichzeitig vorliegenden Komorbiditäten hervorging (vgl. Tabelle 5.1) [135].

Tab. 5.1: WHO-Definition des metabolischen Syndroms. Nach Alberti *et al.* [135].

Hauptkriterien	Nebenkriterien*
<ul style="list-style-type: none"> ▪ gestörte Glucosetoleranz oder ▪ Diabetes mellitus und/oder ▪ Insulinresistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ arterielle Hypertonie $\geq 140/90$ mmHg ▪ Hypertriglyceridämie/Hyperlipoproteinämie und/oder geringes HDL-Cholesterol ▪ abdominale Fettleibigkeit <ul style="list-style-type: none"> ▪ Taillen-Hüft-Verhältnis $> 1,00$ (Männer) bzw. $0,85$ (Frauen) oder ▪ BMI > 30 kg/m² ▪ Mikroalbuminurie

* zusätzlich zu einem Hauptkriterium müssen mindestens zwei Nebenkriterien für die Definition des metabolischen Syndroms erfüllt sein

In der vorliegenden Arbeit erfüllten sechs Patienten (42,6 %) die Kriterien des metabolischen Syndroms. Bei drei weiteren Patienten (21,4 %) konnten die gleichzeitig vorliegenden kardiovaskulären Risikofaktoren Adipositas, Dyslipoproteinämie und arterielle Hypertonie nachgewiesen werden. Insgesamt wiesen neun Patienten Grade der Adipositas auf. In der Genexpressionsanalyse konnten für einen Großteil der Patienten mit Adipositas sowohl erhöhte Expressionswerte der Entzündung und Fibrosierung als auch der Kalzifizierung nachgewiesen werden. Die Proteinanalyse bestätigte diese Ergebnisse. Entgegen den Erwartungen zeigte die Erhöhung der Expressionswerte keine Abhängigkeit vom Adipositas-Grad der Patienten. Deutlich wurde jedoch, dass Patienten, die nach Klassifikation der WHO als normalgewichtig galten, deutlich reduzierte Expressionswerte der Biomarker im Vergleich zu adipösen Patienten aufwiesen (vgl. Abb. 4.14b).

Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme ein metabolisches Syndrom bestand, zeigten unterschiedliche Schwerpunkte innerhalb der Genexpressionsanalyse. Die unterschiedlichen Verteilungen lassen sich möglicherweise durch die verschiedenen Phasen der Atherosklerose erklären. So konnten bei Patienten mit einer kurzen Sondenliegedauer v.a. Biomarker der Entzündung nachgewiesen werden, welche mit der Entstehung atherosklerotischer Frühläsionen [130] mit lokaler Inflammation und Ausbildung von *fatty streaks* zu korrelieren scheinen. Patientenproben, die erst nach längerer Liegedauer entnommen wurden, wiesen dagegen vermehrt erhöhte Expressionswerte fibrotischer und kalzifizierender Biomarker auf. Dies könnte Folge endothelialer Ulzerationen sowie ausgebildeter atherosklerotischer Plaques sein.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass fortgeschrittene Nierenerkrankungen die Entstehung atherosklerotischer Läsionen begünstigen [137]. Ursächlich dafür sind die aufgrund der eingeschränkten Nierentätigkeit in erhöhtem Maße über den Blutstrom

fortgeleiteten Calcium- und Phosphationen sowie aus der Hyperurikämie resultierende Angiotensin II-vermittelte Mikroangiopathien [138, 137]. Zusätzlich begünstigt die Hyperurikämie die Insulinresistenz und folglich die Entstehung eines metabolischen Syndroms [138]. In den vorliegenden Untersuchungen konnten diese Kausalitäten nicht nachgewiesen werden. Insgesamt bestanden bei vier Patienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme Nierenerkrankungen. Weder bei Patienten mit fortgeschrittenem chronischen Nierenversagen noch bei Patienten mit akutem Nierenversagen ließen sich wesentlich erhöhte Biomarker der Fibrose und Kalzifizierung nachweisen.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die aktuelle Lehrmeinung hinsichtlich entscheidender Risikofaktoren zur Entstehung und Progredienz atherosklerotischer Läsionen. Trotz des kleinen Patientenkollektivs konnte eine deutliche Abhängigkeit inflammatorischer, fibrotischer und kalzifizierender Prozesse vom Vorliegen von Adipositas und des metabolischen Syndroms nachgewiesen werden. Korrelationen zwischen dem Vorliegen renaler Erkrankungen und erhöhten Markern atherosklerotischer Läsionen wurden in dieser Arbeit weder in der Genexpressionsanalyse noch im Western Blot detektiert. Mögliche Ursachen dafür liegen neben dem geringen Probenumfang in den kurzweiligen Sondenliegezeiten ($\bar{\emptyset}$ 1,7 Jahre) bei renal erkrankten Patienten in dieser Untersuchung. Die Ergebnisse legen nahe, dass insbesondere bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. Komorbiditäten die durchzuführenden Kontrolluntersuchungen im Rahmen der Nachsorge von Herzschritt-macherimplantationen um das Screening auf Fibrose- und Kalzifizierungsmarker erweitert werden sollten. Kontrollintervalle von sechs bis zwölf Monaten scheinen in Hinblick auf die Progredienz fibrotischer und atherosklerotischer Läsionen geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sondenliegezeiten des Patientenkollektivs mit der Indikation zur Explantation verglichen. Dabei zeigte sich, dass zehn der vierzehn Explantationen (71,4 %) infektionsbedingt nach einer mittleren Verweildauer von 2,3 Jahren durchgeführt wurden. In vier Fällen (28,6 %) waren technische Fehlfunktionen des Herzschrittmachers nach einer mittleren Liegezeit von 9,5 Jahren Ursache der Entnahme. Damit liegt die Rate der infektiös bedingten Sondenextraktionen deutlich über dem mit 52,8 % ermittelten Wert aus der 2017 veröffentlichten ELECTRa-Studie [14, 139]. Insgesamt wurden in dieser Untersuchung 2,5-mal mehr Herzschrittmachersonden durch Infektionen explantiert als durch Schrittmacherfehlfunktionen. Bei durch Fehlfunktionen bedingten Explantationen konnten zusätzlich in zwei der vier Gewebeproben (14,3 %) eine sterile Entzündung nachgewiesen werden. Damit liegt die Rate infektiös bedingter Sondenextraktionen fünfmal höher als bei sterilen Entzündungen. Obwohl das Infektionsrisiko nach Implantation eines Herzschrittmachers mit einer Inzidenz von 0,5-1,0 % vergleichsweise gering ist [140], zeigen

die Ergebnisse dieser Arbeit, wie wichtig ein steriles Operationsgebiet sowie die Wunddesinfektion und -pflege nach Schrittmacherimplantation ist. In 57,1 % der Fälle dieser Untersuchung hatten sich Infektionen anterograd – ausgehend von der subkutanen Schrittmacheraggregatgattasche – auf die Schrittmachersonden ausgebreitet. Der anterograde Ausbreitungsweg von Infektionen konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen aufgezeigt werden [140]. Neue technologische Ansätze sind hier erforderlich, um die Zahl künftiger Sondeninfektionen zu minimieren. Analog zu den in der Herstellung von Elektrodensonden verwendeten keimresistenten Materialien und medikamentenfreisetzenden Oberflächenbeschichtungen könnten diese auch am Schrittmacheraggregat selbst Verwendung finden und die anterograde Penetration von Keimen eindämmen. Zielführend ist dabei die Kenntnis über häufig auftretende Erregerspezies an Schrittmachersonden, um eine Auswahl an geeigneten Antiinfektiva treffen zu können. Döring *et al.* konnten in ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2018 *S. aureus* mit 14,0-29,0 % als den am häufigsten auftretenden Erreger infizierter Schrittmachersonden identifizieren [140]. Darüber hinaus konnten in selteneren Fällen auch Streptokokken, Enterokokken, Pilze und Anaerobier als besiedelnde Erregerspezies nachgewiesen werden. In 12,0-21,0 % der Fälle konnte kein Erregernachweis erbracht werden [140].

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Hälfte aller untersuchten Gewebeproben eine Kontamination mit *S. aureus* nachgewiesen werden. Hiermit liegt der prozentuale Anteil an *S. aureus*-assoziierten Infektionen deutlich über den von Döring *et al.* ermittelten Werten. Ursächlich dafür könnte der geringe Probenumfang des hier betrachteten Patientenkollektivs sein. Als weitere Erregerspezies konnten, äquivalent zu den Ergebnissen von Döring *et al.*, in den durchgeführten Untersuchungen in geringerem Umfang *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *S. epidermidis* und *Saccharomyces* spp. nachgewiesen werden. Eine Patientenprobe (10,0 %) erbrachte keinen spezifischen Erregernachweis. Für die Entwicklung neuer Schrittmachersysteme bedeutet dies, dass hauptsächlich Antibiotikaklassen verwendet werden sollten, die im grampositiven Erregerspektrum wirksam sind. Für entsprechende Oberflächenbeschichtungen sollte der Fokus auf Cephalosporine, Carbapeneme sowie die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin gelegt werden. Sollte die Resistenzentwicklung grampositiver Bakterien im Bereich von β -Lactam-Antibiotika – wie in den letzten Jahrzehnten geschehen – weiter fortschreiten, sollte auf Reserveantibiotika, wie Linezolid und Tigecyclin, zurückgegriffen werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation sollten Biomarker hinsichtlich entzündlicher, fibrotischer und kalzifizierender Prozesse an implantierten Herzschrittmachersonden charakterisiert und in Abhängigkeit patientenbezogener Faktoren untersucht werden. Ziel war es in durchgeführten Genexpressionsanalysen Biomarker für die drei genannten physiologischen Ereignisse zu identifizieren und zu prüfen, ob in der nachfolgenden Proteinanalyse durch diese Gene codierte Proteine nachgewiesen werden können. In Zusammenschau der Patientenakten sollten anschließend klinisch relevante Faktoren des Patientenkollektivs ermittelt werden, welche Inflammationen und Verwachsungen an Schrittmachersonden begünstigen.

Für die Durchführung der Untersuchungen wurden vierzehn verschiedene Patientengewebeproben verwendet, die bei der herzchirurgischen Explantation von Schrittmachersonden gewonnen wurden. Diese wurden in der Genexpressionsanalyse verwendet, um humane RNA zu isolieren und diese anschließend in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Für jeden der neunzehn ausgewählten Gen-Biomarker wurde anschließend ein *TaqMan*[™]-basiertes Gen-Assay erstellt. Nach Amplifikation der cDNA mittels Real-Time-PCR wurden die ermittelten Daten mit Hilfe einer HCAEC-Referenzprobe normiert und grafisch ausgewertet. In der Proteinanalyse erfolgte nach Proteinextraktion und Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE die auf primären und sekundären Antikörpern basierende Western Blot-Analyse an sieben ausgewählten Biomarkern. Als Referenzprobe dienten Proteinextraktionen einer aus dem *Funiculus umbilicalis* nach *Sectio caesarea* präparierten *V. umbilicalis*. Die generierten Blots wurden anschließend visuell ausgewertet und mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse verglichen. Bedingt durch den geringen Umfang der Gewebeproben sowie nicht lieferbaren primären Antikörpern innerhalb des Untersuchungszeitraums konnten nicht für alle Biomarker, die in der Genexpressionsanalyse untersucht wurden, Proteinanalysen durchgeführt werden. In Zusammenhang mit den ermittelten Analysedaten wurden die Patientenakten des Kollektivs nachfolgend hinsichtlich patienten-individueller Krankheitsverläufe, Sondenliegezeiten, bestehenden Komorbiditäten und Explantationsindikation ausgewertet.

In dieser Arbeit konnte für insgesamt zwölf Biomarker eine klinische Relevanz in Bezug auf die Progredienz und Diagnose von Sondenverwachsungen nachgewiesen werden. Dabei eignen sich die Elastase-2 sowie ICAM-1 und 3 um prädiktive Aussagen über die Endothelaktivierung und der damit einhergehenden Entzündung zu treffen. IL-1 β , TNF- α und p38-MAPK sowie TIMP-1, α -SMA und PAK-1 konnten als spezifische Biomarker der

Entzündung bzw. Fibrose bestätigt werden. Zur Beurteilung der Progredienz kalzifizierter Läsionen eignen sich hingegen MGP, Osteopontin und Fetuin-A.

Probleme, die in dieser Arbeit bei der Untersuchung der Biomarker auftraten, waren v.a. durch die Verwendung der *V. umbilicalis* als Referenzprobe der Proteinanalyse bedingt. Durch die Tatsache, dass die maternale Plazenta sowie umbilikale Gefäße in der späten Schwangerschaftsphase – durch den vermehrten Transport von Calcium- und Phosphationen zur Mineralisierung des fetalen Skeletts – verkalken, konnte in der Proteinanalyse keine signifikante Aussage über das Vorliegen kalzifizierungstypischer Biomarker getroffen werden. Zusätzliche Untersuchungen sind diesbezüglich, unter Verwendung geeigneterer Referenzproben, erforderlich. Die geringe Anzahl explantierter SONDENSYSTEME und die Probenvielfalt hinsichtlich der unterschiedlichen Schrittmachersysteme lassen eine statistisch signifikante Aussage über potenzielle patientenbezogene Risikofaktoren nicht zu. Hierfür ist ein größeres Patientenkollektiv nötig, welches über einen längeren Zeitraum betrachtet werden sollte. Unter Einbeziehen relevanter Komorbiditäten und personenindividueller Erkrankungsverläufe konnten in dieser Arbeit dennoch Hinweise darüber erlangt werden, dass insbesondere kardiovaskuläre Vorerkrankungen, wie das metabolische Syndrom und Adipositas, sowie bakteriell bedingte Infektionen zum Einwachsen und Kalzifizieren von Herzschrittmachersonden beitragen. Nierenerkrankungen, die in vorangegangenen Studien als Prodromi atherosklerotischer Läsionen detektiert werden konnten, bedingten in dieser Untersuchung keine Erhöhung der Expression fibrotischer oder kalzifizierender Biomarker.

In der vorliegenden Arbeit konnten, nach aktuellem Forschungsstand, erstmals für die Entzündung, Fibrosierung und Kalzifizierung implantierter Herzschrittmacher charakteristische Biomarker an Gewebeproben lebender Patienten identifiziert werden. Bisherige Untersuchungen dazu fanden ausschließlich an verstorbenen Körperspendern statt. Vor diesem Hintergrund stellt diese Untersuchung einen Beitrag in der klinischen und technologischen Optimierung gewebeassoziiertes Schrittmacherkomplikationen dar.

Bezüglich der festgestellten Komorbiditäten empfehlen sich insbesondere bei Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen erweiterte Kontrolluntersuchungen, um im Rahmen der Schrittmachernachsorge die Komplikations- und Mortalitätsrate weiter senken zu können. In Hinblick auf die Entwicklung neuartiger Technologien in der Schrittmachertherapie konnten spezifische Erreger identifiziert werden, denen mit modernen Antiinfektiva-freisetzenden Systemen entgegengetreten werden kann. Hinsichtlich steriler Entzündungen bietet sich eine Optimierung von – auch auf das Schrittmacheraggregat bezogenen – Oberflächenmaterialien bzw. deren Beschaffenheit sowie die Verwendung immunmodulierender Substanzen als Oberflächenbeschichtung an.

7 Thesen

1. In Deutschland tragen über eine Million Patienten aktive Schrittmacher, CRT- und ICD-Implantate. Jährlich finden ca. 75 000 Schrittmacher- und 25 000 Defibrillatorneuimplantationen statt.
2. Vor dem Hintergrund einer alternden Gesellschaft und damit verbundenen längeren System-Liegezeiten werden Explantationen der Schrittmachersysteme häufiger.
3. Materialdegradation, mechanische Beanspruchung und Abrasion führen zum Funktionsverlust von Herzschrittmachern oder Defibrillatoren. Revisions-Operationen werden auf Grund des hohen Komplikationsrisikos jedoch häufig nur im Fall von System-Infektionen durchgeführt (52,8 % aller Revisionen).
4. Zu extrahierende Sonden können stark mit dem menschlichen Gewebe verwachsen, sodass es im zeitlichen Verlauf zu einer Thrombus-Endothelialisierung, Fibrosierung und letztendlich Kalzifikation kommen kann, welche die Extraktion zusätzlich erheblich erschwert und ein einfacher Systemwechsel nicht mehr möglich ist.
5. Zur Beurteilung der drei physiologischen Vorgänge Entzündung, Fibrosierung und Kalzifizierung wurden in dieser Arbeit bereits etablierte Biomarker in Gewebeproben explantierter Herzschrittmachersonden analysiert. Bisherige Untersuchungen dazu fanden ausschließlich an postmortal gewonnenen Gewebeproben statt. Der Unterschied zwischen dieser Studie und anderen besteht in der molekularen und biochemischen Analyse aktiver Entzündungs- und Gewebsumformungsprozesse, die an postmortal entnommenen Systemen nicht durchgeführt werden können.
6. Das regelmäßige Screening der Biomarker neutrophile Elastase, Interleukin-1 β (IL-1 β) und *soluble intracellular adhesion molecule 1* und 3 (sICAM-1/sICAM-3) im Serum eignet sich zur Beurteilung der Entzündungsprogredienz an implantierten Schrittmachersonden.
7. Der Einfluss erhöhter *tumor necrosis factor α* (TNF- α)- und p38-MAPK-Konzentrationen auf die Apoptose periinflammatorischen Gewebes bietet einen möglichen Ansatzpunkt in der Detektion induzierter Herz- und Endothelgewebsbeschädigungen.

8. Die Biomarker *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* (TIMP-1), Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) und PAK-1 eignen sich zum Nachweis fibrotischer Läsionen an implantierten Herzschrittmachersonden.
9. Aussagen über kalzifizierende Prozesse an implantierten Herzschrittmachersonden können anhand der Biomarker Matrix-Gla-Protein (MGP), Osteopontin und Fetuin-A getroffen werden.
10. Adipositas, Dyslipidämien, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus sind die wichtigsten ätiologischen Risikofaktoren für die Entstehung von Entzündungs-, Fibrosierungs- und Kalzifizierungsprozessen an implantierten Herzschrittmachernsystemen.
11. Die Entwicklung neuer Sondenisolationmaterialien sowie immunmodulierender und medikamentenfreisetzender Oberflächenbeschichtungen kann das Risiko für postoperative Komplikationen in Zukunft reduzieren.

8 Literaturverzeichnis

1. Brignole M, Auricchio A, Baron-Esquivias G, Bordachar P, Boriani G, Breithardt O-A, Cleland J, Deharo J-C, Delgado V, Elliott PM, Gorenek B, Israel CW, Leclercq C, Linde C, Mont L, Padeletti L, Sutton R, Vardas PE, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Blomstrom-Lundqvist C, Badano LP, Aliyev F, Bönsch D, Břata W, Buser P, Charron P, Daubert J-C, Dobreanu D, Faerestrånd S, Le Heuzey J-Y, Mavrakīs H, McDonagh T, Merino JL, Nawar MM, Nielsen JC, Pieske B, Poposka L, Ruschitzka F, van Gelder IC, Wilson CM (2013) 2013 ESC Guidelines on cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy: the Task Force on cardiac pacing and resynchronization therapy of the European Society of Cardiology (ESC). Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Eur Heart J* 34(29): 2281–2329
2. Markewitz A (2013) Jahresbericht 2011 des Deutschen Herzschrittmacher- und Defibrillatorregisters : Fachgruppe Herzschrittmacher und AQUA-Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH (Annual report 2011 of the German pacemaker and defibrillator register: Section pacemakers and AQUA-Institute for Applied Quality Improvement and Research in Health Care). *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 24(4): 223–248
3. Markewitz A (2017) Jahresbericht 2014 des Deutschen Herzschrittmacher- und Defibrillatorregisters, Teil 1 – Herzschrittmacher : Fachgruppe Herzschrittmacher und AQUA – Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 28(1): 70–106
4. Markewitz A (2019) Jahresbericht 2017 des Deutschen Herzschrittmacher- und Defibrillator-Registers – Teil 1: Herzschrittmacher : Fachgruppe Herzschrittmacher und Defibrillatoren beim IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (Annual Report 2017 of the German Pacemaker and Defibrillator-Register. Part 1: Cardiac Pacemaker : Working Group on Pacemaker and Defibrillators at the IQTIG-Institute for Quality Assurance and Transparency in Healthcare). *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 30(4): 377–388
5. Trappe H-J, Gummert J (2011) Current pacemaker and defibrillator therapy. *Dtsch Arztebl Int* 108(21): 372-9; quiz 380
6. Keiler J, Schulze M, Sombetzki M, Heller T, Tischer T, Grabow N, Wree A, Bönsch D (2017) Neointimal fibrotic lead encapsulation - Clinical challenges and demands for implantable cardiac electronic devices. *J Cardiol* 70(1): 7–17
7. Sommer P, Hindricks G (2012) Herzrhythmusstörungen. *Notf.med. up2date* 7(03): 243–256
8. Maisel WH, Kramer DB (2008) Implantable cardioverter-defibrillator lead performance. *Circulation* 117(21): 2721–2723
9. Kleemann T, Becker T, Doenges K, Vater M, Senges J, Schneider S, Saggau W, Weisse U, Seidl K (2007) Annual rate of transvenous defibrillation lead defects in implantable cardioverter-defibrillators over a period of 10 years. *Circulation* 115(19): 2474–2480
10. Kitamura S, Satomi K, Kurita T, Shimizu W, Suyama K, Aihara N, Niwaya K, Kobayashi J, Kamakura S (2006) Long-term follow-up of transvenous defibrillation leads: high incidence of fracture in coaxial polyurethane lead. *Circ J* 70(3): 273–277
11. Link MS, Hill SL, Cliff DL, Swygman CA, Foote CB, Homoud MK, Wang PJ, Estes N, Berul CI (1999) Comparison of frequency of complications of implantable cardioverter-defibrillators in children versus adults. *The American Journal of Cardiology* 83(2): 263–266
12. Cooper JM, Stephenson EA, Berul CI, Walsh EP, Epstein LM (2003) Implantable cardioverter defibrillator lead complications and laser extraction in children and young adults with congenital heart disease: implications for implantation and management. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14(4): 344–349
13. Silvetti MS, Drago F, Grutter G, Santis A de, Di Ciommo V, Ravà L (2006) Twenty years of paediatric cardiac pacing: 515 pacemakers and 480 leads implanted in 292 patients. *Europace* 8(7): 530–536
14. Perez AA, Woo FW, Tsang DC, Carrillo RG (2018) Transvenous Lead Extractions: Current Approaches and Future Trends. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 7(3): 210–217
15. Tofield A (2017) Transvenous lead extraction. *Eur Heart J* 38(32): 2457–2458

16. Hussein AA, Wilkoff BL (2016) Transvenous Lead Extraction of Cardiac Implantable Electronic Devices: Who, When, How and Where? *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 69(1): 3–6
17. Tischer TS, Hollstein A, Voss W, Wendig I, Lauschke J, Schneider R, Knorre GH von, Bänsch D (2014) A historical perspective of pacemaker infections: 40-years single-centre experience. *Europace* 16(2): 235–240
18. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20(2): 86–100
19. Kołodzińska A, Kutarski A, Koperski Ł, Grabowski M, Małecka B, Opolski G (2012) Differences in encapsulating lead tissue in patients who underwent transvenous lead removal. *Europace* 14(7): 994–1001
20. Maciąg A, Syska P, Sterliński M, Przybylski A, Sitkowska E, Oręziak A, Bilińska M, Kuśmierczyk M, Szwed H (2015) Lead extraction: The road to successful cardiac resynchronization therapy. *Cardiol J* 22(2): 188–193
21. Merchant FM, Levy MR, Kelli HM, Hoskins MH, Lloyd MS, Delurgio DB, Langberg JJ, Leon AR, El-Chami MF (2015) Predictors of Long-Term Survival Following Transvenous Extraction of Defibrillator Leads. *Pacing Clin Electrophysiol* 38(11): 1297–1303
22. Maytin M, Epstein LM (2011) The challenges of transvenous lead extraction. *Heart* 97(5): 425–434
23. Smith MC, Love CJ (2008) Extraction of transvenous pacing and ICD leads. *Pacing Clin Electrophysiol* 31(6): 736–752
24. Keiler J, Schulze M, Dreger R, Springer A, Öner A, Wree A (2020) Quantitative and Qualitative Assessment of Adhesive Thrombo-Fibrotic Lead Encapsulations (TFLE) of Pacemaker and ICD Leads in Arrhythmia Patients-A Post Mortem Study. *Front Cardiovasc Med* 7: 602179
25. Tiemann D, Schäffler A, Pschyrembel W (2020) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 268., neu bearbeitete Auflage. De Gruyter, Berlin, Boston
26. Bracke F, Meijer A, van Gelder B (2003) Venous occlusion of the access vein in patients referred for lead extraction: influence of patient and lead characteristics. *Pacing Clin Electrophysiol* 26(8): 1649–1652
27. Korsake K, Meyer F, Dillner J, Udelnow A, Powerski M, Albrecht R, Halloul Z (2020) Venöses Thoracic-outlet-Syndrom mit akuter Thrombose der V. subclavia (Paget-von-Schroetter-Syndrom). *Gefäßchirurgie* 25(1): 44–50
28. Starck CT, Salzberg SP, Grünenfelder J, Kofidis T, Holzmeister J, Falk V (2011) Sondenextraktionen - eine anspruchsvolle Aufgabe. EMH Swiss Medical Publishers
29. Ward R, Anderson J, McVenes R, Stokes K (2007) In vivo biostability of polyether polyurethanes with fluoropolymer and polyethylene oxide surface modifying endgroups; resistance to metal ion oxidation. *J Biomed Mater Res A* 80(1): 34–44
30. May RM, Magin CM, Mann EE, Drinker MC, Fraser JC, Siedlecki CA, Brennan AB, Reddy ST (2015) An engineered micropattern to reduce bacterial colonization, platelet adhesion and fibrin sheath formation for improved biocompatibility of central venous catheters. *Clin Transl Med* 4: 9
31. Herrlich S, Spieth S, Gerstmann H, Virnich A, Zipfel F, Kitschmann A, Goettsche T, Osypka P, Zengerle R (2012) Drug release mechanisms of steroid eluting rings in cardiac pacemaker lead electrodes. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2012: 681–684
32. Sperzel J, Burri H, Gras D, Tjong FVY, Knops RE, Hindricks G, Steinwender C, Defaye P (2015) State of the art of leadless pacing. *Europace* 17(10): 1508–1513
33. Dingermann T, Winckler T, Zündorf I (2011) Gentechnik, Biotechnik. Grundlagen und Wirkstoffe, 2., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
34. Arnemann J (2019) Reverse Transkriptase-PCR. In: Gressner AM, Arndt T (eds) P-Z, 3. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 2066
35. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28(2): 655–661
36. Jähnichen S (2005) Real time quantitative PCR using TaqMan® probes. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TaqMan_Probes.jpg. Accessed 8 May 2021

37. Thermo Fisher Scientific Grundlagen der Real-Time PCR. So funktionieren TaqMan Assays. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>. Accessed 16 May 2021
38. Qiagen (2020) Wie setzt sich Buffer RLT zusammen? - QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=2acb974c-4cca-4744-a2cf-60b5f483339b&lang=en>. Accessed 6 May 2020
39. RNeasy Plus Mini Kit - QIAGEN Online-Shop (2020). <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-plus-mini-kit/?clear=true#productdetails>. Accessed 6 May 2020
40. Qiagen (2020) What is the composition of Buffer RW1? - QIAGEN. <https://www.qiagen.com/de/resources/faq?id=f1993258-73ac-4c5d-929a-528459328e5f&lang=en>. Accessed 6 May 2020
41. Arnemann J (2019) DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In: Gressner AM, Arndt T (eds) P-Z, 3. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 719
42. Thermocycler (2018). <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/thermocycler/66289>. Accessed 6 May 2020
43. Wetzi V (2017) Fibrose-assoziierte Biomarker – Einfluss der Behandlung mit Serelaxin im murinen Nierenfibrose-Modell und prädiktiver Aussagewert in der pulmonalen Hypertonie. Dissertation, Universitätsbibliothek Regensburg
44. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45
45. Rajendrani Mukhopadhyay (2011) The man behind the Western blot: W. Neal Burnette. <https://www.asbmb.org/asbmb-today/people/122911/the-man-behind-the-western-blot-w-neal-burnette>. Accessed 8 Oct 2020
46. Burnette W (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112(2): 195–203
47. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(7): 3116–3120
48. Kurien BT, Scofield RH (2015) Western blotting: an introduction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1312: 17–30
49. Al-Tubuly AA (2000) SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med* 40: 391–405
50. Rassow J (2012) *Biochemie, 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Duale Reihe*. Thieme, Stuttgart
51. Wußling H Expression von Entzündungsmarkern und Aktivierung von Signalwegen in Monozyten und Makrophagen durch eine extrazelluläre Azidose. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
52. Hauk A (2013) Die Dot-Blot-Technik. *Biologie in unserer Zeit* 43(1): 20
53. SERVA Electrophoresis GmbH (2010) Bradford Reagent, 5x. Reagenz für die Proteinkonzentrationsbestimmung. GEBRAUCHSANLEITUNG, Heidelberg
54. Schägger H, Jagow G von (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166(2): 368–379
55. Merck Millipore, Merck KGaA (2021) Proteins. Water for Western Blotting - Application Overview. <https://www.merckmillipore.com/DE/de/water-purification/learning-centers/applications/proteins/western-blotting/6MOB.qB.w.IAAAFANOCENfTx.nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>. Accessed 20 May 2021
56. Bruennert D Molekulare Wirkmechanismen von Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie
57. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F (2010) Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev* 62(4): 726–759

58. Takahashi H, Nukiwa T, Yoshimura K, Quick CD, States DJ, Holmes MD, Whang-Peng J, Knutsen T, Crystal RG (1988) Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* 263(29): 14739–14747
59. Lyck R, Enzmann G (2015) The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Curr Opin Hematol* 22(1): 53–59
60. Springer TA (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57: 827–872
61. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, Heinecke JW (2004) Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 90(3): 724–733
62. Teng N, Maghzal GJ, Talib J, Rashid I, Lau AK, Stocker R (2017) The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep* 22(2): 51–73
63. Rashid I, Maghzal GJ, Chen Y-C, Cheng D, Talib J, Newington D, Ren M, Vajandar SK, Searle A, Maluenda A, Lindstedt E-L, Jabbour A, Kettle AJ, Bongers A, Power C, Michaëlsson E, Peter K, Stocker R (2018) Myeloperoxidase is a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaque. *Eur Heart J* 39(35): 3301–3310
64. Singh RJR, Mason JC, Lidington EA, Edwards DR, Nuttall RK, Khokha R, Knauper V, Murphy G, Gavrilovic J (2005) Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovasc Res* 67(1): 39–49
65. Kong D-H, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S (2018) Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* 19(4)
66. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM (1998) PPAR γ Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. *Cell* 93(2): 241–252
67. Park YM (2014) CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* 46(6): e99
68. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y (1998) Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 α/β , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 β is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 187(9): 1463–1475
69. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R (2015) Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* 42(6): 991–1004
70. Erta M, Quintana A, Hidalgo J (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci* 8(9): 1254–1266
71. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2018) Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(8)
72. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813(5): 878–888
73. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP (1991) Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 9: 431–455
74. Liszewski MK, Atkinson JP (2015) Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations. *Hum Genomics* 9(1): 7
75. Yamamoto H, Fara AF, Dasgupta P, Kemper C (2013) CD46: the 'multitasker' of complement proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 45(12): 2808–2820
76. Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA (2009) p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med* 15(8): 369–379
77. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T (2010) Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49(7): 1215–1228
78. Murray LA, Knight DA, Laurent GJ (2009) Chapter 15 - Fibroblasts. In: Barnes PJ, Drazen JM (eds) *Asthma and COPD. Basic mechanisms and clinical management*, 2. ed. Academic Pr, Amsterdam, London, pp 193–200
79. Yuan S-M (2015) α -Smooth Muscle Actin and ACTA2 Gene Expressions in Vasculopathies. *Braz J Cardiovasc Surg* 30(6): 644–649
80. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ, Maguire JJ (2016) Endothelin. *Pharmacol Rev* 68(2): 357–418
81. Matsubara TJ, Fujii K (2019) Endothelin-1 and Atrial Cardiomyopathy. *Int Heart J* 60(2): 238–240

82. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG (2014) The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 71(4): 549–574
83. Stetler-Stevenson WG (2008) Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 1(27): re6
84. Nie Q-H, Zhang Y-F, Xie Y-M, Luo X-D, Shao B, Li J, Zhou Y-X (2006) Correlation between TIMP-1 expression and liver fibrosis in two rat liver fibrosis models. *World J Gastroenterol* 12(19): 3044–3049
85. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY (2016) TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12(6): 325–338
86. Kichina JV, Goc A, Al-Husein B, Somanath PR, Kandel ES (2010) PAK1 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 14(7): 703–725
87. Mayer G, Poirier S, Seidah NG (2008) Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem* 283(46): 31791–31801
88. Wang S, Hu S, Wang J, Liu Y, Zhao R, Tong M, Cui H, Wu N, Chen X (2018) Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits vascular calcification through blockade of the BMP2-Smad1/5/8 signaling pathway. *Stem Cell Res Ther* 9(1): 160
89. Roumeliotis S, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V (2019) Association of the Inactive Circulating Matrix Gla Protein with Vitamin K Intake, Calcification, Mortality, and Cardiovascular Disease: A Review. *Int J Mol Sci* 20(3)
90. Zhao H, Chen Q, Alam A, Cui J, Suen KC, Soo AP, Eguchi S, Gu J, Ma D (2018) The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis* 9(3): 356
91. Wolak T (2014) Osteopontin - a multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 236(2): 327–337
92. Ahmed M, Rghigh A (2016) Polymorphism in Endothelin-1 Gene: An Overview. *Curr Clin Pharmacol* 11(3): 191–210
93. Freeman BD, Machado FS, Tanowitz HB, Desruisseaux MS (2014) Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life Sci* 118(2): 110–119
94. Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82(2): 331–371
95. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT (1994) Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest* 94(4): 1597–1604
96. Ulfing N (2019) *Kurzlehrbuch Histologie, 5. unveränderte Auflage. Kurzlehrbuch. Georg Thieme Verlag, Stuttgart*
97. Hippenstiel S (2004) *Endothel und Entzündung: Pathomechanismen der bakteriellen Endothelaktivierung. Habilitationsschrift, Humboldt-Universität zu Berlin*
98. Müller-Hartmann F (2007) *Die Endothelaktivierung nach Hypoxie und Reoxygenierung - Hemmstrategien in vitro, Ludwig-Maximilians-Universität München*
99. Volkmann AS *In vitro Untersuchung zum Einfluss von DEHP auf die Endothelaktivierung. In vitro Untersuchung zum Einfluss von DEHP auf die EndothelaktivierungUR - <https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/handle/10900/45607>, Universität Tübingen*
100. Warnholtz A, Buse J, Wild P, Münzel T (2006) Prognostische Bedeutung der endothelialen Dysfunktion. *Kardio up* 2(03): 218–225
101. Wen G, An W, Chen J, Maguire EM, Chen Q, Yang F, Pearce SWA, Kyriakides M, Li Zhang, Ye S, Nourshargh S, Xiao Q (2018) Genetic and Pharmacologic Inhibition of the Neutrophil Elastase Inhibits Experimental Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 7(4)
102. Stark T *Alpha-Liponsäure hemmt die Entstehung der Transplantatvaskulopathie durch ICAM-1-/VCAM-1-Suppression in transplantierten Herzen bei der Ratte, Universitätsbibliothek*
103. Lawson C, Wolf S (2009) ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 61(1): 22–32
104. Lopez-Castejon G, Brough D (2011) Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 22(4): 189–195
105. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, White MR, Dinarello CA, Apte RN (2011) IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol* 187(9): 4835–4843
106. van Horssen R, Hagen TLM ten, Eggermont AMM (2006) TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 11(4): 397–408
107. Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology* 214(2): 149–160

108. Yang Y, Kim SC, Yu T, Yi Y-S, Rhee MH, Sung G-H, Yoo BC, Cho JY (2014) Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators of Inflammation* 2014: 352371
109. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology* 214(2): 199–210
110. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Béres NJ, Fekete A, Szabó AJ, Vannay Á (2015) Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators of Inflammation* 2015: 764641
111. Zhao W, Wang X, Sun K-H, Zhou L (2018) α -smooth muscle actin is not a marker of fibrogenic cell activity in skeletal muscle fibrosis. *PLOS ONE* 13(1): e0191031
112. Wenzel C Untersuchungen zu Isoenzymen der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 bei adulten Patienten mit cystischer Fibrose, Universitätsbibliothek
113. Woessner JF, Nagase H (2002) Matrix metalloproteinases and TIMPs, Reprint. Protein profile. Oxford University Press, New York
114. Salajegheh A (2016) Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1 and TIMP-2). In: Salajegheh A (ed) *Angiogenesis in Health, Disease and Malignancy*. Springer International Publishing, Cham, pp 317–324
115. Cherng S., Young J., Ma H. (2008) Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). *The Journal of American Science*(4)
116. Park J, Tallquist MD (2017) Cardiac Fibroblast. In: Sawyer DB, Vasan RS (eds) *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*. Elsevier Science, Saint Louis, pp 420–433
117. Chan MW, Hinz B, McCulloch CA (2010) Chapter 8 - Mechanical Induction of Gene Expression in Connective Tissue Cells. In: Shivashankar GV (ed) *Methods in Cell Biology : Nuclear Mechanics & Genome Regulation*, vol 98. Academic Press, pp 178–205
118. Grebeňová D, Holoubek A, Röselová P, Obr A, Brodská B, Kuželová K (2019) PAK1, PAK1 Δ 15, and PAK2: similarities, differences and mutual interactions. *Sci Rep* 9(1): 17171
119. Strassheim D, Gerasimovskaya E, Irwin D, Dempsey EC, Stenmark K, Karoor V (2019) RhoGTPase in Vascular Disease. *Cells* 8(6): 551
120. Wang Y, Wang S, Lei M, Boyett M, Tsui H, Liu W, Wang X (2018) The p21-activated kinase 1 (Pak1) signalling pathway in cardiac disease: from mechanistic study to therapeutic exploration. *Br J Pharmacol* 175(8): 1362–1374
121. Leopold JA (2015) Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends in Cardiovascular Medicine* 25(4): 267–274
122. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM (2018) Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* 114(4): 590–600
123. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, St Hilaire C, Shanahan C (2014) Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J* 35(23): 1515–1525
124. Demer LL, Tintut Y (2014) Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(4): 715–723
125. Icer MA, Gezmen-Karadag M (2018) The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical biochemistry* 59: 17–24
126. Correia-Branco A, Kallol S, Adhikari N, Caiaffa CD, Jayaraman N, Kashpur O, Wallingford MC (2020) Placental Calcification: Long-standing Questions and New Biomedical Research Directions. In: Aikawa E, Hutcheson JD (eds) *Cardiovascular Calcification and Bone Mineralization*, 1st ed. 2020. Springer International Publishing; Imprint: Humana, Cham, pp 263–296
127. Fox H (1964) Calcification of the placenta. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 71: 759–765
128. Khong TY, Dilly SA (1989) Calcification of umbilical artery: two distinct lesions. *J Clin Pathol* 42(9): 931–934
129. Hansson GK, Hermansson A (2011) The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12(3): 204–212
130. Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, Löwe B (2018) *Innere Medizin*, 4., überarbeitete Auflage. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
131. Kellner U, Frahm SO, Mawrin C, Krams M, Schüller S (2019) *Kurzlehrbuch Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

132. Willerson JT, Ridker PM (2004) Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 109(21 Suppl 1): I12-10
133. Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, Böcker-Denk-Heitz-Moch (eds) (2008) *Pathologie*, 4., vollst. überarb. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München
134. Herold G (ed) (2019) *Innere Medizin 2019*. Eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Gerd Herold; De Gruyter, Köln, Berlin, Boston
135. Alberti K, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* 15(7): 539–553
136. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S (2018) Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol* 36(1): 14–20
137. Moe SM, Chen NX (2008) Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 19(2): 213–216
138. Stiefelhagen P (2014) Hyperurikämie: Epiphänomen oder kausaler Risikofaktor? <https://www.kardiologie.org/hyperurikaemie-epiphaenomen-oder-kausaler-risikofaktor-/42400>. Accessed 3 May 2021
139. Bongiorno MG, Kennergren C, Butter C, Deharo JC, Kutarski A, Rinaldi CA, Romano SL, Maggioni AP, Andarala M, Auricchio A, Kuck K-H, Blomström-Lundqvist C (2017) The European Lead Extraction ConTRolled (ELECTRa) study: a European Heart Rhythm Association (EHRA) Registry of Transvenous Lead Extraction Outcomes. *Eur Heart J* 38(40): 2995–3005
140. Döring M, Richter S, Hindricks G (2018) The Diagnosis and Treatment of Pacemaker-Associated Infection. *Dtsch Arztebl Int* 115(26): 445–452
141. Hartman CL, Ford DA (2018) MPO (Myeloperoxidase) Caused Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(8): 1676–1677
142. Nauseef WM (2018) Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 642: 1–9
143. Strzepa A, Pritchard KA, Dittel BN (2017) Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell Immunol* 317: 1–8
144. Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ (1981) Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 95(3): 293–301
145. Lehrer RI, Cline MJ (1969) Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J Clin Invest* 48(8): 1478–1488
146. Liao JK (2013) Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest* 123(2): 540–541
147. Chovatiya R, Medzhitov R (2014) Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell* 54(2): 281–288
148. Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, Arguelles S (2018) Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Curr Pharm Des* 24(14): 1449–1484
149. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. Annual review of pharmacology and toxicology 38: 97–120
150. Bakhle YS, Botting RM (1996) Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediators of Inflammation* 5(5): 305–323
151. Choromańska B, Myśliwiec P, Choromańska K, Dadan J, Chabowski A (2017) The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv Clin Exp Med* 26(4): 717–722
152. Dinarello CA (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery 1. *FASEB j.* 8(15): 1314–1325
153. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6): 805–820
154. Cardone J, Le Friec G, Kemper C (2011) CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clin Exp Immunol* 164(3): 301–311
155. Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429(3): 403–417
156. Wang S, Ding L, Ji H, Xu Z, Liu Q, Zheng Y (2016) The Role of p38 MAPK in the Development of Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci* 17(7)
157. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2(3): 222–228

158. Roulston A, Reinhard C, Amiri P, Williams LT (1998) Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 273(17): 10232–10239
159. Kalliolias GD, Ivashkiv LB (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 12(1): 49–62
160. Guo D-C, Papke CL, van Tran-Fadulu, Regalado ES, Avidan N, Johnson RJ, Kim DH, Pannu H, Willing MC, Sparks E, Pyeritz RE, Singh MN, Dalman RL, Grotta JC, Marian AJ, Boerwinkle EA, Frazier LQ, LeMaire SA, Coselli JS, Estrera AL, Safi HJ, Veeraraghavan S, Muzny DM, Wheeler DA, Willerson JT, Yu RK, Shete SS, Scherer SE, Raman CS, Buja LM, Milewicz DM (2009) Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am J Hum Genet* 84(5): 617–627
161. Liu L, Wu L, Zheng L, Ding L, Chen G, Fan X, Yao Y (2019) Associations Between Multiple Circulating Biomarkers and the Presence of Atrial Fibrillation in Hypertrophic Cardiomyopathy with or Without Left Ventricular Outflow Tract Obstruction. *Int Heart J* 60(2): 327–335
162. Leask A (2010) Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* 106(11): 1675–1680
163. Hanke K (2013) Untersuchungen zum Einfluss von Matrixmetalloproteinasen (MMP) auf pathophysiologische Veränderungen am Herzen bei Diabetes mellitus Typ 2, Universität zu Lübeck
164. Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8): 827–839
165. Nüchel J, Ghatak S, Zuk AV, Illerhaus A, Mörgelin M, Schönborn K, Blumbach K, Wickström SA, Krieg T, Sengle G, Plomann M, Eckes B (2018) TGFB1 is secreted through an unconventional pathway dependent on the autophagic machinery and cytoskeletal regulators. *Autophagy* 14(3): 465–486
166. Ke Y, Lei M, Solaro RJ (2008) Regulation of cardiac excitation and contraction by p21 activated kinase-1. *Prog Biophys Mol Biol* 98(2-3): 238–250
167. Huebner K, Cannizzaro LA, Frey AZ, Hecht BK, Hecht F, Croce CM, Wallner BP (1988) Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II. *Oncogene Res* 2(4): 299–310
168. Wang C-Y, Lin C-F (2014) Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Dis Markers* 2014: 308976
169. Hajjar K (1999) Annexin II A Mediator of the Plasmin /Plasminogen Activator System. *Trends in Cardiovascular Medicine* 9(5): 128–138
170. Moss SE, Morgan RO (2004) The annexins. *Genome Biol* 5(4): 219
171. Hedhli N, Falcone DJ, Huang B, Cesarman-Maus G, Kraemer R, Zhai H, Tsirka SE, Santambrogio L, Hajjar KA (2012) The annexin A2/S100A10 system in health and disease: emerging paradigms. *J Biomed Biotechnol* 2012: 406273
172. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D (2013) Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 14(3): 6259–6305
173. Fairwozy RH, Cooper J, White J, Giambartolomei C, Folkersen L, Wannamethee SG, Jefferis BJ, Whincup P, Ben-Shlomo Y, Kumari M, Kivimaki M, Wong A, Hardy R, Kuh D, Gaunt TR, Casas JP, McLachlan S, Price JF, Hingorani A, Franco-Cereceda A, Grewal T, Kalea AZ, Humphries SE (2017) Identifying low density lipoprotein cholesterol associated variants in the Annexin A2 (ANXA2) gene. *Atherosclerosis* 261: 60–68
174. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91(4): 1800–1809
175. Derwall M, Malhotra R, Lai CS, Beppu Y, Aikawa E, Seehra JS, Zapol WM, Bloch KD, Yu PB (2012) Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(3): 613–622
176. Akahori H, Tsujino T, Masuyama T, Ishihara M (2018) Mechanisms of aortic stenosis. *J Cardiol* 71(3): 215–220
177. Liberman M, Pesaro AEP, Carmo LS, Serrano CV (2013) Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications. *Einstein (Sao Paulo)* 11(3): 376–382
178. Bartoli-Leonard F, Wilkinson FL, Langford-Smith AWW, Alexander MY, Weston R (2018) The Interplay of SIRT1 and Wnt Signaling in Vascular Calcification. *Front Cardiovasc Med* 5: 183

179. Krüger T, Floege J (2010) Matrix-Gla-Protein (MGP). *Nephrologie* 5(2): 152–154
180. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R (2003) Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 1(1): 178–185
181. Schurgers LJ, Teunissen KJF, Knapen MHJ, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, Reutelingsperger CP, Cleutjens JPM, Vermeer C (2005) Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(8): 1629–1633
182. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF (2010) Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment. *J Cell Mol Med* 14(8): 2037–2044
183. Kolodzinska K, Kutarski A, Grabowski M, Jarzyna I, Małeczka B, Opolski G (2012) Abrasions of the outer silicone insulation of endocardial leads in their intracardiac part: a new mechanism of lead-dependent endocarditis. *Europace* 14(6): 903–910

9 Anhang

9.1 Erläuterungen zur Auswahl der Biomarker der Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrosierung und Kalzifikation

Nachfolgend genannte Biomarker wurden in der Genexpressionsanalyse und Proteinanalyse hinsichtlich ihres Einflusses auf unterschiedliche Steuerungsmechanismen der Endothelaktivierung, Entzündung, Fibrosierung und Kalzifizierung untersucht. Das Kapitel gibt einen kurzen Überblick über den Hintergrund und die Funktion der einzelnen Gene und Proteine, um zu verdeutlichen, warum diese in den Analyseverfahren betrachtet wurden.

9.1.1 Biomarker der Endothelaktivierung

Endothelzellen sind aus Angio- und Hämangioblasten differenzierte Zellen, welche die Innenseiten von Blut- und Lymphgefäßen sowie Herzvorhöfen und -kammern auskleiden. Dabei liegen sie der Intima luminal an und bilden, verknüpft durch Tight-Junctions und Desmosomen, einen flachen, einschichtigen Verband – das Endothel [96]. Diese insgesamt ca. 1000 m² umfassende Grenzschicht zwischen intra- und extravasalem Raum [99] stellt die erste Kontaktstelle zu hämatogen fortgeleiteten Noxen und Mikroorganismen dar. Im Rahmen lokaler wie systemischer Entzündungen induziert das Endothel als auto- und parakrines Organ die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden zur Immunmodulation und trägt so adäquat zur Infektabwehr und Hämostase bei [98, 99]. Schwerwiegende Entzündungen, Sepsis oder Ischämie führen dagegen häufig zu einer überschießenden Aktivierung des Endothels [98] mit Bildung eines proinflammatorischen, prokoagulatorischen und proliferativen Milieus [100]. Die Endothelaktivierung vermittelt durch Makrophagen und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) die Dilatation des Gefäßlumens, wodurch der Blutfluss – bei gleichzeitiger Reduktion der Flussgeschwindigkeit – gesteigert wird. Neben einer erhöhten Gefäßpermeabilität begünstigt dies die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche sowie die Anhaftung von Leukozyten. Die endotheliale Aktivierung und Leukozytenadhäsion erfolgt dabei durch eine sogenannte Adhäsionskaskade, bei der die Leukozyten – im Anschluss an das Rolling, die Verwachsung und Transmigration [98] – durch die Endothelbarriere und die darunterliegende Basalmembran wandern (Diapedese) (vgl. Abb. 9.1). Überschießende Endothelaktivierungen können pathologische Akkumulationen von inflammatorischen Leukozyten im Gewebe begünstigen und so chronische Entzündungsereignisse sowie die Entstehung atherosklerotischer Läsionen fördern [100]. Nachfolgend sollen die Biomarker betrachtet werden, die als Grundlage der Genexpressionsanalysen dieser Arbeit dienten und als Induktoren der Endothelaktivierung und Leukozytenadhäsion fungieren.

9.1.1.1 Neutrophile Elastase / Elastase-2

Die neutrophile Elastase (Elastase-2) ist eine Protease aus der Chymotrypsin-Superfamilie der Serinproteasen und wird vom ELANE-Gen auf Chromosom 19 codiert [58]. Die Elastase-2 wird v.a. von neutrophilen Granulozyten, aber auch Monozyten und Mastzellen als inaktives Präproprotein synthetisiert. Dieses besitzt neben einem katalytischen Zentrum auch ein Signalpeptid sowie ein N-terminales Prodipeptid und C-terminales Propeptid [58]. Vermittelt durch das Signalpeptid wird das N-terminale Dipeptid durch Cathepsin C gespalten und die Elastase so in die proteolytisch aktive Form überführt [58, 57]. Neben der Lyse pathogener Keime ist die neutrophile Elastase auch für die Regulation inflammatorischer Prozesse von Bedeutung. Zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies und Myeloperoxidasen ist die neutrophile Elastase in der Lage die äußere Membran von Bakterien zu zerstören und deren Abbau in Phagolysosomen zu fördern [57]. In entzündlichem Milieu dagegen wird Elastase-2 von neutrophilen Granulozyten in die unmittelbare Umgebung sezerniert. Dort liegt es gelöst im Plasma oder gebunden an der Plasmamembran von Zellen der Extrazellulärmatrix vor und induziert über verschiedene Signalwege die Aktivierung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren [57].

9.1.1.2 Intracellular adhesion molecule 1 und 3

Die beiden intracellular adhesion molecules 1 (ICAM-1, CD54) und 3 (ICAM-3) sind Oberflächenproteine aus der Superfamilie der Immunglobuline [59]. Exprimiert werden die Zelladhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Endothelzellen, Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, wobei Fibroblasten, Epithelzellen und Perizyten spezifisch ICAM-1 exprimieren [59]. Als Rezeptoren der Zelloberfläche vermitteln sie sowohl den Kontakt zwischen einzelnen Zellen, als auch zwischen Komponenten der Extrazellulärmatrix [102] und induzieren so, im Rahmen inflammatorischer Prozesse, die Leukozytenadhäsion und -transmigration in den vaskulären subendothelialen Raum [60, 59]. Dabei sind sie in erster Linie für die Drosselung der Leukozyten-Geschwindigkeit verantwortlich und ermöglichen diesen die Anheftung am Endothel in einem lockeren Verbund („Rolling“), um anschließend in Kombination mit anderen Adhäsionsmolekülen einen festen Verbund auszubilden und die Zellmigration zu Entzündungsherden zu ermöglichen (vgl. Abb. 9.1) [102]. Mehrere Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass ICAM-1/3 nicht nur an der Leukozytenadhäsion inflammatorischer Läsionen beteiligt sind, sondern auch selbst proinflammatorische Signalwege sowie die Angiogenese einleiten [103]. Aus den Ergebnissen dieser Studien lässt sich ableiten, dass insbesondere das lösliche ICAM-1 (sICAM-1) die Progression atherosklerotischer Läsionen und chronischer Entzündungen fördert [103].

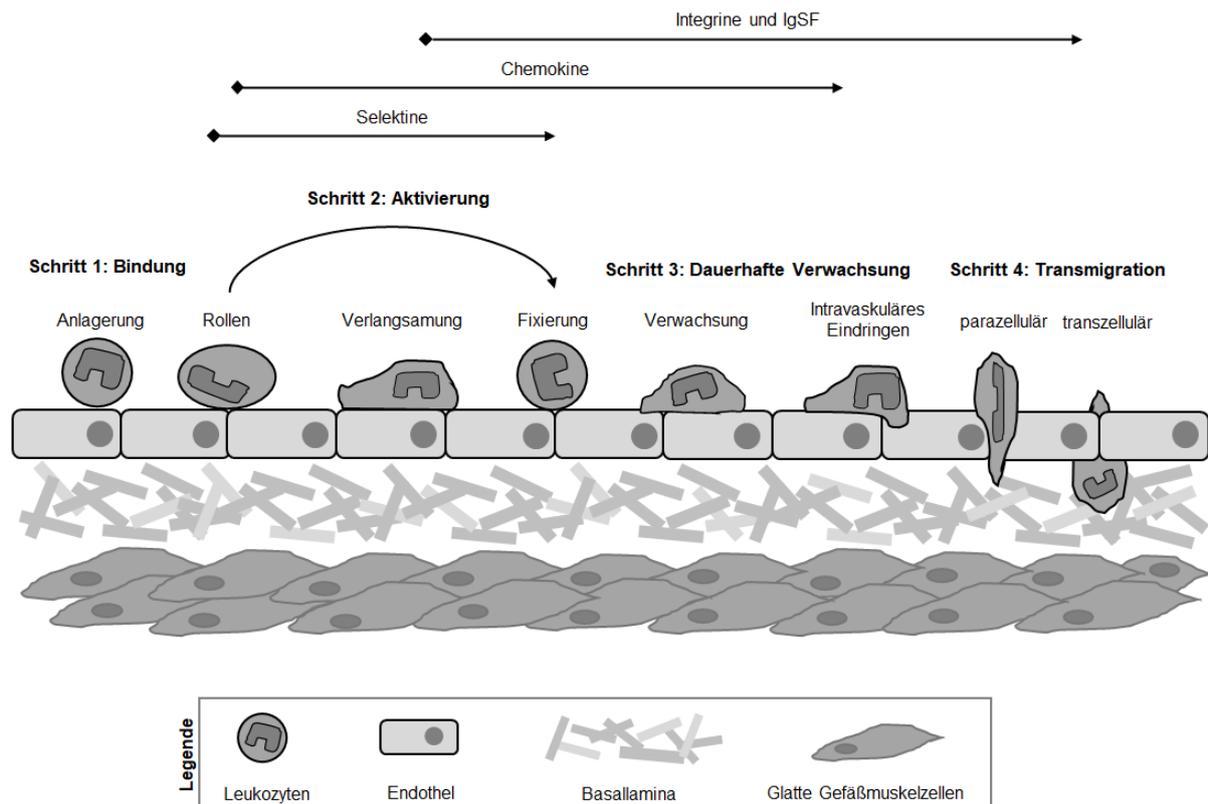


Abb. 9.1: Transendotheliale Leukozytenmigration in den vaskulären subendothelialen Raum. Bei Entzündungen des Gefäßendothels wandern Leukozyten an den Läsionsort und lagern sich am Endothel an. Vermittelt durch Selektine und Chemokine werden die Leukozyten durch das Rollen entlang des Endothels aktiviert und lagern sich anschließend in einem lockeren Verbund an das Endothel. Integrine und Immunglobuline der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) ermöglichen nachfolgend eine Festigung des Verbunds und das Verwachsen mit der Endotheloberfläche. Nach Durchbrechen der Endothelzellbarriere gelangen die Leukozyten über para- oder transzelluläre Migration in den subendothelialen Raum (Basallamina und glatte Gefäßmuskelnzellen) [103]. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Lawson *et al.* [103]

9.1.1.3 Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein erstmals 1941 von Agner beschriebenes Hämprotein [141] und wird der Gruppe der Peroxidasen zugeordnet [142]. MPO wird v.a. von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und der Mikroglia von Nervenzellen exprimiert und übernimmt wichtige Aufgaben in der Wirtsabwehr und Entzündungsregulation. Dabei katalysiert das Enzym die Oxidation von Chloridionen mithilfe von Wasserstoffperoxid, wodurch die stark bakterizide Hypochlorsäure entsteht [61]. Die Myeloperoxidase ermöglicht es so, bei Infektionen Krankheitserreger im Rahmen der Phagozytose abzutöten [141]. Bei einem Mangel des Enzyms kommt es insbesondere bei Patienten mit Komorbiditäten, wie z.B. Diabetes mellitus, zu einer stark erhöhten Infektanfälligkeit [143]. Parry *et al.* zeigten in ihren Studien auf, dass v.a. Pilzkrankungen der Gattung *Candida* durch einen MPO-Mangel schwerer beherrschbar sind [144, 145]. Im Gegensatz dazu wurde in verschiedenen Studien herausgefunden, dass MPO beim Vorliegen steriler Entzündungen die Inflammation fördert

und durch oxidative Metabolite das Gefäßendothel schädigt. So konnten erhöhte MPO-Spiegel und -aktivitäten bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis, nachgewiesen werden [141, 143]. Darüber hinaus begünstigt eine erhöhte Myeloperoxidase-Expression die Entstehung und Ruptur atherosklerotischer Plaques [63] durch die Bildung von Schaumzellen (vgl. Kapitel 3.3.2), die Förderung prokoagulanter und prothrombotischer Effekte sowie die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und Gewebefaktoren [62, 63].

9.1.1.4 Vascular cell adhesion molecule 1

Das vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) gehört ebenso wie die interzellulären Adhäsionsmoleküle zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie von Adhäsionsmolekülen [64]. VCAM-1 ist an der Regulation der inflammatorischen Gefäßadhäsion sowie der transendothelialen Migration von Leukozyten, Makrophagen und T-Zellen beteiligt [65]. Exprimiert wird VCAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen und liegt dabei entweder oberflächengebunden oder – durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gespalten – in löslicher Form (sVCAM-1) vor. Zytokine wie TNF- α oder Interleukin 6 [146] induzieren bei entzündlichen Ereignissen die VCAM-1-Expression, welches daraufhin direkt mit dem $\alpha 4\beta 1$ -Integrin auf der Leukozytenoberfläche interagiert [65]. Die dadurch aktivierten Signalmoleküle – darunter Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), NADPH-Oxidase 2 (NOX-2), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und MMPs – lockern den Endothelzellverband durch temporäre Unterbrechung der Tight-Junctions und ermöglichen so die Transmigration der Leukozyten in den subendothelialen Raum [65].

9.1.2 Biomarker der Entzündung

Die Entzündung ist eine der effektivsten physiologischen Methoden des menschlichen Körpers, um Infektionen, Gewebeschäden, Stress oder Noxen zu bekämpfen [147, 148]. Entzündungsreaktionen sind zunächst nur lokal begrenzt, können sich bei länger anhaltendem Entzündungsstimulus oder körperlicher Immunschwäche aber auch systemisch und chronisch manifestieren. Auch im vaskulären System, v.a. bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen, spielen Entzündungen eine entscheidende Rolle [132]. Proinflammatorische Ereignisse, wie Infektionen oder hohe Plasmakonzentrationen von oxidiertem LDL, führen zu zytotoxischen Schäden am Gefäßendothel. Am Ort der Läsion kommt es zur Ausschüttung von Chemokinen, welche die Aktivierung und das Anlocken von Zellen des Immunsystems vermitteln (Chemotaxis). Neben Mast- und T-Zellen wandern auch Monozyten aus dem Knochenmark in das Gewebe ein und differenzieren unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen. Durch die Aufnahme von LDL transformieren sich die Makrophagen in Schaumzellen [131, 132]; die so entstehenden gelblichen Lipideinlagerungen im Endothel

werden auch als ‚fatty streaks‘ bezeichnet. Luminal bildet sich an diesen eine fibröse Kappe aus Makrophagen, T-Lymphozyten und glatten Gefäßmuskelzellen; zentral können aus den Schaumzellen nekrotische Areale hervorgehen [131]. Diese begünstigen Vernarbungen und Ulzerationen der betroffenen Gefäßwand und erhöhen das Risiko für spätere Plaque-Rupturen. Langfristig führen diese Faktoren zur Kalzifikation und Atrophie der Gefäßmedia und damit einhergehenden kardiovaskulären Komplikationen [131, 133].

9.1.2.1 Cyclooxygenase-2 / Prostaglandinsynthase-2

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist zusammen mit der Cyclooxygenase-1 (COX-1) das Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese [51]. Als Ausgangspunkt der Synthese dient dabei das Eicosanoid Arachidonsäure, welches durch die zytosolische Phospholipase A₂ aus Membranlipiden freigesetzt wird. Die COX-2 besitzt zwei enzymatische Aktivitäten, die Cyclooxygenase und die Hydroperoxidase [50]. Mit Hilfe dieser beiden entsteht in einem ersten Schritt durch Oxidation der Arachidonsäure das Prostaglandin G₂, welches wiederum durch Reduktion in das Prostaglandin H₂, dem Substrat für die Bildung der verschiedenen Prostaglandine, umgewandelt wird (vgl. Abb. 9.2) [149].

Von der Cyclooxygenase sind heute drei Isoformen (COX-1, COX-2, COX-3) bekannt, wobei über die Cyclooxygenase-3 nur wenig bekannt ist [149]. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um eine Splicevariante der COX-1 handelt. Die Cyclooxygenase-1 wird konstitutiv in nahezu allen Zelltypen und Geweben exprimiert und ist zusammen mit gewebespezifischen Synthasen für die Bildung von Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan-A₂ (TXA₂) verantwortlich [149]. Damit übernimmt die COX-1 wichtige Funktionen sowohl in der Thrombozytenaggregationshemmung (über PGI₂) als auch in der TXA₂-vermittelten Thrombozytenaggregation der Hämostase und der Zytoprotektion [51]. Die Cyclooxygenase-2 wird nicht ubiquitär exprimiert, lediglich in einigen Organgeweben wie der Niere und des Magens zeigt sich zur Organentwicklung und -funktionserhaltung eine gesteigerte Expression [50]. Neben regulatorischen Funktionen ist die COX-2 an der Synthese von Prostaglandin E₂ und Prostacyclin beteiligt und bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen überexprimiert [150]. Induziert wird die Expression der Cyclooxygenase-2 durch die Inflammation selbst sowie durch Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Hemmend wirken sich dagegen die antiinflammatorische Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 aus [150, 51]. Da Entzündungen des Gefäßendothels (bspw. im Rahmen von Verletzungen, Infektionen oder Lipidperoxidation) durch die Entstehung entzündlicher und übermäßig freier Radikale als Prädiktor atherosklerotischer Läsionen und somit der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen angesehen werden können [132, 148], soll in der vorliegenden Arbeit die Expression von COX-2 am Gewebe explantierter Herzschrittmachersonden untersucht werden.

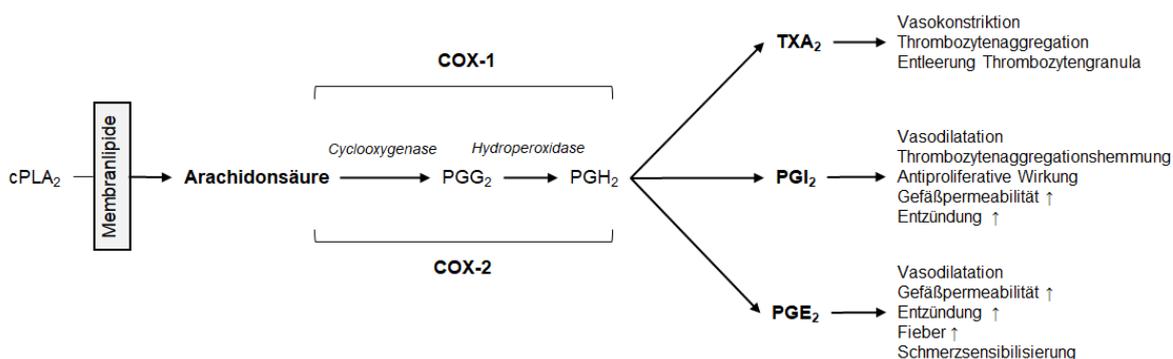


Abb. 9.2: Cyclooxygenasevermittelte Prostaglandinsynthese und Funktion ausgewählter Prostaglandine. Zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂), Prostaglandine (PG~), Cyclooxygenase (COX), Thromboxan-A₂ (TXA₂), Prostazyklin (PGI₂). Eigene Darstellung.

9.1.2.2 Cluster of differentiation 36

Der cluster of differentiation 36 (CD36) ist ein Membranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 88 kDa und gehört zur Gruppe der Klasse-B-Scavenger-Rezeptoren [151]. CD36 wird auf einer Vielzahl verschiedener Zellen, darunter Makrophagen, Monozyten, Adipozyten, Endothel- und Herzzellen sowie glatten Muskelzellen, exprimiert. Seine Hauptfunktion besteht u.a. in der Bindung von oxidiertem LDL (oxLDL) und Phospholipiden, Kollagen, apoptotischen Zellen und Thrombospondin [151, 67]. Die Bindungsstellen der einzelnen Liganden sind dabei an unterschiedlichen Sequenzen des CD36 lokalisiert [67].

Phospholipide sind elementare Bestandteile von Lipoproteinen und Zellmembranen; oxidativer Stress, wie er z.B. bei Infektionen oder Entzündungen auftritt, fördert die Entstehung von oxidierten Phospholipiden (oxPL) [67]. Nachdem zirkulierende Monozyten zu Beginn der Atherosklerose-Entstehung in die Gefäßintima aufgenommen werden und dort zu Makrophagen differenzieren, fungieren oxLDL und oxPL als spezifische Liganden am Kernhormonrezeptor Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor γ (PPAR γ) und induzieren die Expression von CD36 auf der Zelloberfläche von Makrophagen [66]. Dieses „Eat-Me-Signal“ [67] vermittelt die Aufnahme von oxLDL und oxPL in die Makrophagen. Die Wechselwirkung zwischen oxLDL und den Makrophagen induziert eine Reihe immunmodulatorischer Signalwege und die Aktivierung von Zytokinen. Gleichzeitig differenzieren Makrophagen zu Schaumzellen, welche durch Lipideinlagerungen im Endothel den Ausgangspunkt der Atherosklerose darstellen (vgl. Kapitel 9.1.2). Verschiedene Studien kamen deshalb zu dem Fazit, dass ein CD36-Mangel die oxLDL-Aufnahme in Makrophagen reduziert und die Bildung atherosklerotischer Läsionen hinauszögert [67, 151].

9.1.2.3 Interleukin-1 β

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin aus der Familie der Interleukine-1. Das Protein wird nach Erkennung pathogener Keime durch pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) als Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von 31 kDa exprimiert [104]. Erst nach Spaltung durch die Protease Caspase 1 (CASP1; IL-1 β -converting Enzym) liegt IL-1 β in biologisch aktivem Zustand vor [152, 153]. IL-1 β gilt als eines der Schlüsselmediatoren der Entzündungsreaktion. Horai *et al.* konnten herausfinden, dass ein IL-1 β -Mangel zu einer Störung der akuten und pyretischen Entzündungsreaktion führt [68, 69]. Im Gegensatz zu IL-1 α wirkt IL-1 β dabei erst in der späten Phase der Entzündungsreaktion [105].

9.1.2.4 Interleukin-6

Das humane Interleukin-6 (IL-6) ist ein glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 21-28 kDa [72]. Neben dem Zytokin IL-6 gehören auch Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-27 (IL-27), Interleukin-31 (IL-31), Cardiotropin-1 (CT-1), Novel Neutrophin-1/B-Cell Stimulating Factor-3 (NNT-1) und Neutropoietin (NPN) zur Interleukin-6-Familie [72]. Mit Ausnahme von IL-31 besitzen alle Zytokine des IL-6-Typs das Membranglykoprotein gp130 (CD130) als gemeinsame Signalrezeptoruntereinheit. CD130 bildet zusammen mit dem Typ-1-Zytokinrezeptor IL-6R (gp80/CD126) einen Rezeptorkomplex, welcher über die Aktivierung von JAK / STAT-, ERK- und PI3K-Signaltransduktionswegen die Signaltransduktion und biologische Aktivität von IL-6 vermittelt [72]. IL-6 wird vorwiegend von aktivierten Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten synthetisiert und besitzt eine hohe funktionelle Pleiotropie [51, 72]. So spielt IL-6 nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Akute-Phase-Reaktionen, sondern stimuliert auch die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen [51, 70, 71]. Scheller *et al.* zeigten in ihrer Arbeit von 2011, dass das Zytokin sowohl entzündungsfördernd als auch entzündungshemmend wirken kann [72]. Dabei muss zwischen zwei verschiedenen Signalkaskaden unterschieden werden. Bei der klassischen Signalübertragung geht IL-6 einen Komplex mit den auf Zielzellen exprimierten gp130 und IL-6R ein [72]. Diese Interaktion vermittelt regenerative und entzündungshemmende Funktionen. Sind auf den Zielzellen keine IL-6R exprimiert, verläuft die Signalübertragung als transsignaling. Dabei binden die durch proteolytische Spaltung aus membrangebundenen IL-6R entstandenen löslichen IL-6R (sIL-6R) via gp130 auf der Zellmembran und vermitteln den entzündungsfördernden Effekt des Proteins [72].

9.1.2.5 Membrancofaktorprotein

Das Membrancofaktorprotein (MCP; CD46) ist ein ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen exprimiertes Oberflächen-Glykoprotein [154]. Als Cofaktor des Serinproteasefaktors 1 vermittelt es die Inaktivierung von C3b/C4b auf der Wirtszelle und schützt diese so vor ungewollten Angriffen durch das aktivierte Komplementsystem [73, 74]. Das Komplementsystem ist Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems und besteht aus einer Vielzahl sequentiell wechselwirkender Proteine, bei welchen es sich zumeist um als inaktive Zymogene vorliegende Proteasen handelt [74]. Diese können über den klassischen, alternativen oder Lektin-Weg des Komplementsystems kaskadenartig aktiviert werden und so über die Zwischenschritte der Opsonierung, Chemotaxis und des Membran-Angriffs-Komplexes (MAC) potenzielle Pathogene eliminieren.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen geringer IL-2-Konzentration die CD46-Aktivierung die Differenzierung von T-Zellen in proinflammatorische TH1-Helferzellen fördert und somit die Expression von Interleukin-10 und Interferon- γ (IFN- γ) induziert [154, 75]. CD46 fungiert folglich nicht nur als Protektor der Wirtszelle bei Kontakt mit Pathogenen, sondern rekrutiert auch weitere Zytokine und induziert so Signalkaskaden zur Modulation der Immunantwort bei Inflammation [75].

9.1.2.6 p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen

Die p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38-MAPK) gehören zusammen mit der extrazellulär signalregulierten Kinase 1/2 (ERK-1/2) und der c-Jun N-terminalen Proteinkinase (JNK) zur Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) [155, 156]. Aktuell sind vier Isoformen (p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ) bekannt, welche über verschiedene Gene codiert werden und unterschiedliche Expressionsmuster im Gewebe aufweisen. Im Herzgewebe konnte insbesondere p38 α nachgewiesen werden [156]. p38-MAPK werden auch als stressaktivierte Proteinkinasen (SAPKs) bezeichnet, da sie spezifisch durch eine Reihe verschiedener Umwelteinflüsse, wie z.B. oxidativen und osmotischen Stress, UV-Strahlung, proinflammatorischen Zytokinen und Todesrezeptoren (z.B. TNFR-1; vgl. Kapitel 9.1.2.7), aktiviert werden [156]. Diese vermitteln die phosphatabhängige Aktivierung von MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K), welche wiederum über Phosphorylierung die mitogenaktivierten Proteinkinasen-Kinasen (MAP2K) MKK3, MKK4 und MKK6 aktivieren. Abhängig vom Stimulus und Zelltyp induzieren die MAP2K mittels Phosphorylierung eine Konformationsänderung in den vier verschiedenen Isoformen der p38-MAPK (s.o.) und aktivieren diese [76]. Die Dauer der Phosphorylierung ist dabei entscheidend für die Funktion der p38-MAPK: langanhaltende Phosphorylierungen induzieren v.a. die Apoptose [157], während

vorübergehende Phosphorylierungen – durch Expression von Wachstumsfaktoren – eher den Zellzyklus und das Überleben der Zelle regulieren [76, 158].

9.1.2.7 Tumornekrosefaktor α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein stark proinflammatorisches Zytokin und ein weiterer Schlüsselmediator akuter Entzündungsreaktionen. Das Protein besitzt ein pleiotropes Wirkungsspektrum (vgl. Abb. 9.3), zu welchem u.a. die Aktivierung Akuter-Phase-Proteine, Apoptose entzündlich geschädigter Zellen und die Zelldifferenzierung gehören [51, 77].

TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen, T-Lymphozyten und Endothelzellen als 26 kDa schweres pro-TNF synthetisiert und auf der Plasmamembran exprimiert. Dort wird es durch das TNF-converting-Enzym (TACE; ADAM17) freigesetzt und von Matrix-Metallproteinasen in das 17 kDa schwere TNF- α gespalten [106, 107].

TNF- α ist im gesunden Organismus nicht nachweisbar [51]. Erst bei Infektionen oder entzündlichen Ereignissen steigt der Serumspiegel korrelierend zum Schweregrad der Erkrankung an [51, 107]. Das Zytokin induziert in Folge eine Reihe humoraler Abwehrmechanismen, wie die Steigerung der Cyclooxygenase-2-Expression [107], Aktivierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten über die Sekretion von MCP-1 sowie die Regulation der Endothelzelladhäsion zur Rekrutierung von Leukozyten [51, 106]. Bei höheren Plasmakonzentrationen wirkt es über die Expressionssteigerung von IL-6 pyretisch. Eine Schlüsselposition nimmt TNF- α bei der Regulation der Apoptose und des Zellüberlebens ein (vgl. Abb. 9.3) [51].

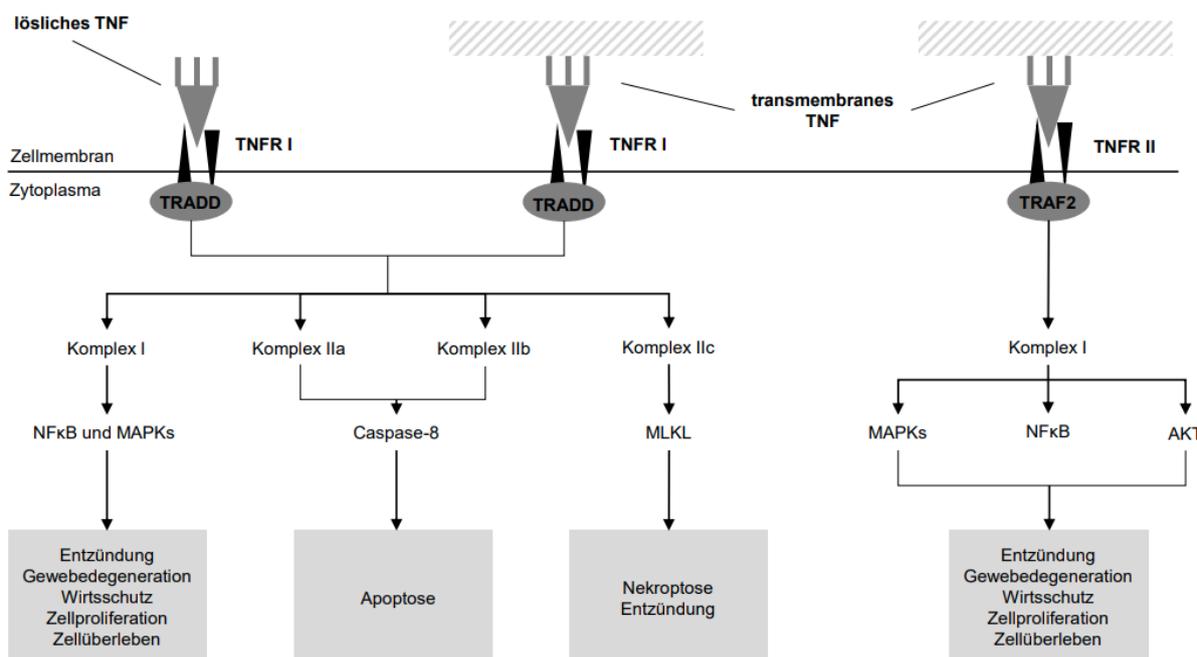


Abb. 9.3: Signaltransduktion und regulatorische Funktionen von Tumornekrosefaktor- α . Der TNF-Rezeptor 1 (TNFR-I) kann sowohl durch lösliches TNF als auch durch membrangebundenes TNF aktiviert werden. Am TNFR-I ist eine Todesdomäne lokalisiert, die das Adaptermolekül TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein) bindet. TRADD vermittelt Apoptose-Signale und aktiviert nach Bildung von Komplex I den NF κ B (nuclear factor κ B). Komplex I induziert Entzündungen, Gewebedegeneration und steuert die Immunabwehr gegen Pathogene. Über die Komplexe IIa und IIb wird der programmierte Zelltod fehlerhafter Zellen koordiniert, während Komplex IIc (Nekrosom) die Nekroptose und Entzündung induziert. Der TNF-Rezeptor 2 (TNFR-II) wird hauptsächlich über das membrangebundene TNF aktiviert. Die Rekrutierung und Komplexbildung mit dem TNFR-assoziierten Faktor 2 (TRAF-2) initiiert die Bildung von Komplex I, welcher einerseits NF κ B aktiviert, andererseits v.a. homöostatische Modalitäten reguliert. Mitogen-activated protein kinase (MAPK); mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL). Abbildung modifiziert nach Kalliolias *et al.* [159].

9.1.3 Biomarker der Fibrosierung

Im Laufe der letzten Jahrzehnte ist die Fibrosierung zu einem immer größeren Problem im Gesundheitssystem der Industrieländer geworden. Mehr als 45 % der Todesfälle können auf chronisch-fibroproliferative Erkrankungen zurückgeführt werden. Neben der Lungen- und Leberfibrose gehören dazu auch chronische Nieren-, Darm und Herz-Kreislauf-Erkrankungen [110]. Histologisch ist die Fibrose durch das Überwachsen und Vernarben von Gewebe, als Folge einer übermäßigen Ablagerung extrazellulärer Matrix (ECM), gekennzeichnet. Ursächlich dafür sind durch Infektionen, Noxen oder Gewebeverletzungen induzierte chronische Entzündungen [109, 110]. Durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Aktivierung immunologisch wirksamer Zellen werden u.a. Reparaturprozesse im Gewebe angeregt. Dabei kann zwischen zwei Phasen unterschieden werden: in der Regenerationsphase werden beschädigte Zellen durch Zellen desselben Typs ersetzt, während in der Phase der Fibroplasie schadhafte Zellen durch primitives Bindegewebe ersetzt werden. Aus diesen Bindegewebszellen kann bei einem gestörten Synthesegleichgewicht

dauerhaftes Narbengewebe entstehen. Durch die Gewebemetaplasie entsteht ein Mangel an funktionsfähigen Zellen, woraus Funktionseinschränkungen der Organgewebe resultieren.

Die Anlagerung der von Myofibroblasten synthetisierten Proteine der extrazellulären Matrix, einschließlich Kollagen und Fibronectin [111], wird über verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) reguliert. Wynn definiert die Fibrose als Ungleichgewicht zwischen einer gesteigerten Syntheseleistung der Myofibroblasten und einer reduzierten Inhibition dieser durch die TIMPs [109]. Die fortschreitende Vernarbung ist insbesondere bei chronisch oder systemisch verlaufenden Erkrankungen, wie der Herz-Kreislauf-Fibrose, gefährlich; im fortgeschrittenen Stadium einer Erkrankung können sie zu Organversagen führen und letal enden [109].

9.1.3.1 Alpha smooth muscle actin

Das alpha smooth muscle actin (α -SMA) ist ein vom Aktin- α 2-Gen (ACTA-2) codiertes Aktin-Protein der glatten Gefäßmuskulatur. In dieser ist es v.a. für die Regulation der Gefäßmotilität und -kontraktion verantwortlich und am Aufbau der Zellstruktur beteiligt [79]. Verschiedenen Studien konnten belegen, dass Mutationen im ACTA-2-Gen und die daraus resultierende fehlerhafte α -SMA-Struktur eine häufige Ursache für klinisch relevante Vaskulopathien, wie Koronararterienerkrankungen, Aneurysmen und Dissektionen der Bauchaorta sowie ischämischer Schlaganfälle, sind [160]. α -SMA wird neben Vimentin und Desmin von aktivierten Myofibroblasten exprimiert [78]. Cherng *et al.* postulierten, dass die Expression von α -SMA eng mit der Aktivität von Myofibroblasten korreliert [115–117] und somit ein Zusammenhang zwischen Schweregrad der Fibrose (vgl. Kapitel 9.1.3) und der Höhe der α -SMA-Konzentration besteht.

9.1.3.2 Endothelin-1

Endothelin-1 (ET-1, EDN-1) ist ein endogenes Polypeptid und besitzt apoptotische und immunmodulatorische Eigenschaften, wobei es zugleich den stärksten Vasokonstriktor im menschlichen Organismus darstellt [80, 81, 92, 93]. Neben positiv inotroper und chronotroper kardialer Wirkung stimuliert es die Homöostase und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Verschiedene Faktoren, wie Diabetes mellitus, erhöhtes Alter und Hypertonie, aber auch vaskuläre Erkrankungen und angeborene Herzfehler, steigern die Expression von Endothelin-1 [81]. Dabei wird in einem ersten Schritt das Vorläuferprotein Pre-pro-ET-1 durch das humane ET-1-Gen synthetisiert und über das Zwischenprodukt Big-ET-1 zum Endothelin-1 gespalten [92]. Liu *et al.* zeigten in ihrer Studie von 2018, dass Big-ET-1 mit den Plasmakonzentrationen von n-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-ProBNP) und Troponin I korreliert und somit als Biomarker für kardialen Stress dienen kann [161, 81].

In verschiedenen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass ET-1 über zwei verschiedene Ebenen die Morphologie des Herzens beeinflusst. Hohe ET-1-Spiegel induzieren einerseits die Apoptose sowie die elektrophysiologische Umwandlung der Vorhof-Kardiomyozyten durch Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels. Andererseits wirken sie als starker Mediator der Fibrose [162] durch Induktion der Herzfibroblastenproliferation und der Extrazellulärmatrix-Synthese bei gleichzeitiger Hemmung der Kollagenaseaktivität [82]. Diese Faktoren bedingen nicht nur eine anatomische Umgestaltung der Kardiomyozyten, sondern sind durch die Veränderung der Elektrophysiologie auch maßgeblich an der Entstehung von Vorhofflimmern, einer der Hauptindikationen für die Schrittmacherimplantation, beteiligt [81].

9.1.3.3 Matrix-Metalloproteinase-2 und Matrix-Metalloproteinase-9

Sowohl die Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2, Gelatinase A) als auch die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9, Gelatinase B) gehören zur Familie der zinkabhängigen Endopeptidasen [112]. Alle MMPs besitzen eine ähnliche Grundstruktur, welche aus einer N-terminalen Propeptidsequenz, einem katalytischen Zentrum mit enthaltener Zink-Bindungsstelle und einer C-terminalen Domäne bestehen (vgl. Abb. 9.4) [163].

Gelatinasen werden als Zymogene sezerniert und proteolytisch über die Transkriptionsebene, vermittelt durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone oder direkte Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte, aktiviert [164, 43]. MMP-2 besitzt, wie MMP-9, eine spezifische Fibronectin-Typ II-Domäne, mit Hilfe derer sie Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie denaturiertes und natives Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin, abbauen können [43] und maßgeblich der Entstehung fibrotischer Läsionen entgegenwirken. Neben der proteolytischen Funktion sind MMPs an der Regulation inflammatorischer Ereignisse und der Aktivierung von Myofibroblasten beteiligt (vgl. Kapitel 9.1.3) [43].

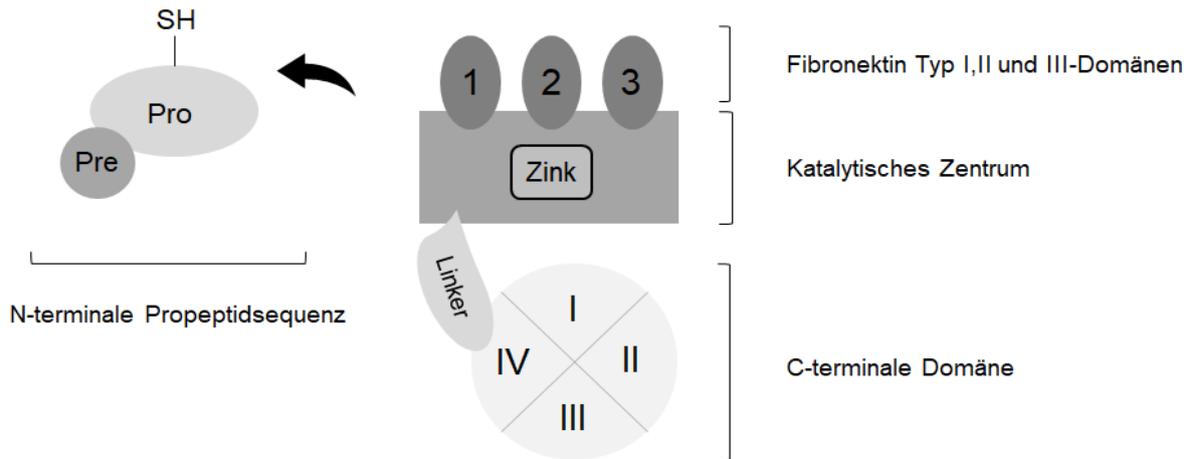


Abb. 9.4: Grundstruktur der Gelatinasen A und B. Nach Synthese des Proteins werden über Thiol-Gruppen (SH) der Pre-Pro-Untereinheit Zink-Ionen gebunden, wodurch das Protein Aggregate bildet und in den inaktiven Zustand übergeht [163]. Bei Abspaltung der N-terminalen Pre-Pro-Sequenz wird die Zink-Komplexierung gelöst und das Protein aktiviert. Das katalytische Zentrum enthält die Zink-Bindungsstelle. Die hier gebundenen Zink-Ionen dienen dem Elektronentransfer und ermöglichen die Umsetzung der zu katalysierenden Reaktionen. Über einen Linker ist das katalytische Zentrum mit der C-terminalen Domäne verbunden. Diese besteht wiederum aus vier Hemopexin-Domänen (I-IV) und ist verantwortlich für die Bindung von TIMPs, Substraten und einem Teil der proteolytischen Aktivität der MMPs [163]. Am katalytischen Zentrum sind außerdem drei Fibronektin-Domänen (Typ I-III) angelagert, welche zur Bindung und Spaltung der Extrazellulärmatrix essenziell sind. Abbildung modifiziert nach Hanke, 2013 [163].

9.1.3.4 Tissue inhibitor of metalloproteinase 1

Der tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) ist Teil der vier Mitglieder umfassenden TIMP-Familie und agiert – sezerniert von aktivierten Makrophagen und Zellen der Extrazellulärmatrix – als endogener Inhibitor interstitieller Kollagenasen und Matrix-Metalloproteinasen, um den extrazellulären Matrixumsatz zu limitieren [83, 84]. Die inhibitorische Wirkung beruht dabei auf der nichtkovalenten Bindung der Cystein-enthaltenden N-terminalen Domäne von TIMP-1 an das katalytische Zentrum der MMPs [83]. Dort blockiert es die Zink-Bindungsstelle und verhindert so die durch Bindung von Zink-Ionen induzierte enzymatische Aktivität der Gelatinasen (vgl. Abb. 9.4) [114]. TGF- β 1, IL-6, IL-11 und andere Zytokine fördern die TIMP-1-Expression, während IL-1 β und TNF- α die Expression hemmen [112]. Überexpressionen von TIMPs spielen insbesondere bei der Tumorgenese und Entstehung fibrotischer Läsionen durch die übermäßige Ablagerung extrazellulärer Matrix und Hemmung der MMPs eine wichtige Rolle [114, 43].

9.1.3.5 Transforming growth factor beta 1

Der transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) ist ein profibrotisches Zytokin, welches v.a. von Makrophagen, Fibroblasten und Myofibroblasten sezerniert wird und die Bildung extrazellulärer Matrix in Fibroblasten, Differenzierung von Myofibroblasten und Expression anderer Fibrose-assoziiierter Biomarker, wie α -SMA und TIMP, stimuliert [43, 85]. Des Weiteren hemmt es die Proliferation von Endothel- und Immunzellen [165]. Von TGF- β sind bisher drei humane Isoformen bekannt, die als Prä-Pro-Proteinmonomere sezerniert werden [165]. Das nicht-kovalent an latency-associated proteins (LAPs) gebundene Protein ist über das latent TGF- β binding protein (LTBP) mit der Extrazellulärmatrix verbunden. Erst durch proteolytische Abspaltung der LAP-LTBP-Domäne durch MMPs, reaktive Sauerstoff-Spezies oder Plasmin wird TGF- β aktiviert [43]. Dabei induziert es über die Phosphorylierung von SMAD-Proteinen und deren Translokation in den Zellkern die Transkription verschiedener profibrotischer Moleküle und Gensequenzen (vgl. Abb. 9.5) [85].

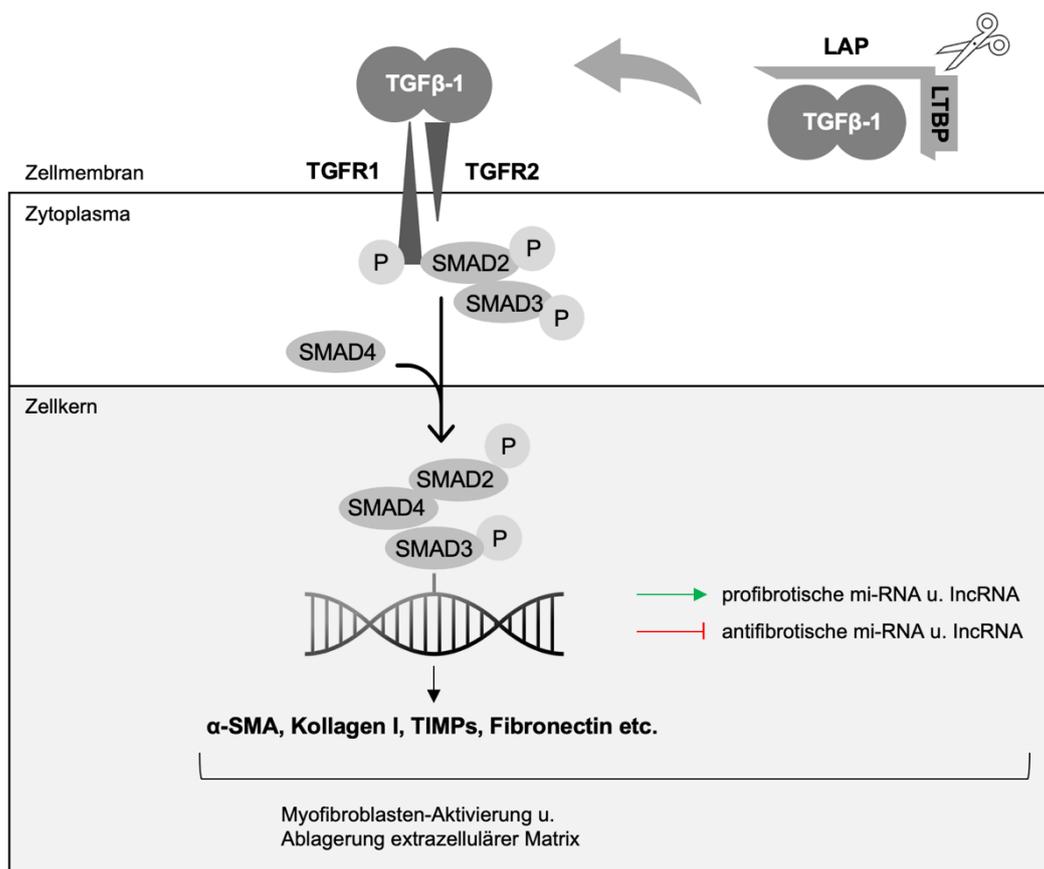


Abb. 9.5: TGF- β -Signalweg bei Gewebefibrose [85]. Nach proteolytischer Abspaltung der LAP-LTBP-Domäne, z.B. durch MMPs oder reaktive Sauerstoff-Spezies, wird TGF- β aktiviert [43]. Die Homodimerform von TGF- β bindet an den TGF- β -Rezeptor 2 (TGFR2), welcher daraufhin den TGF- β -Rezeptor 1 (TGFR-1) rekrutiert und diesen aktiviert. Der TGFR-1 phosphoryliert SMAD3 und SMAD2. Diese gehen anschließend einen Komplex mit SMAD4 ein und translozieren in den Zellkern. Dabei bindet die SMAD-3-Domäne an die Genpromotoren und induziert die Transkription profibrotischer Moleküle, wie α -SMA, Kollagen I, Bronectin und TIMPs. Gleichzeitig steigert SMAD3 die Transkription von pro-fibrotic-miRNA und -lncRNA, während es die von anti-fibrotic-miRNA und -lncRNA hemmt [85]. LAP (latency-associated proteins); LTBP (latent TGF β binding protein). Modifiziert nach Meng *et al.*, 2016 [85].

9.1.3.6 p21-activated kinase 1

Die p21-activated kinase 1 (PAK-1) gehört, als eine von sechs Isoformen der PAKs, zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und wird durch die Rho-GTPasen cell division control protein 42 (Cdc42) und Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1 (RAC-1) aktiviert [120, 166]. Exprimiert wird das Protein überwiegend im Gehirn, den Gefäßen und im Herzen [86, 166]. Hier nimmt es über die Phosphorylierung von Substratproteinen und der Induktion verschiedener Signalwege eine Rolle verschiedener Aufgaben wahr, wie der Regulation von Zellzyklus, Zelladhäsion, Apoptose, Calcium-Homöostase und der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix [86]. Aktuelle Studien konnten nachweisen, dass eine erhöhte PAK1-Konzentration die durch Cdc42 und RAC-1 vermittelte Rho-Signalaktivität hemmt [119]. Dabei konnte sowohl die Rho-vermittelte vaskuläre Barrierestörung als auch die Entstehung der interstitielle Fibrose gehemmt werden [120].

9.1.4 Biomarker der Kalzifizierung

Vaskulären Verkalkungen kommt in der modernen Medizin eine immer wichtigere Bedeutung zu. Etwa 60 % der über 60-Jährigen und 80 % der über 80-Jährigen sind von vaskulären Verkalkungen betroffen [124]. Vermittelt durch die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen zu osteoblastischen Zellen und der Ablagerung von Matrixvesikeln [121], kommt es zur Akkumulation und Kristallisation von Hydroxylapatit und Calciumphosphat in der Extrazellulärmatrix sowie der Media und Intima der Gefäßwand [122, 123]. Folgen dieser Pathologien sind v.a. mechanisch bedingt. Durch die Einschränkungen der Elastizität und Dehnbarkeit von Gefäßen und der daraus resultierenden verminderten Gefäßcompliance und Vasomotion stehen insbesondere die Entstehung der Atherosklerose, Hypertonie, Linksherzhypertrophie sowie die Herz- und Koronarinsuffizienz im klinischen Vordergrund [124]. Die Biomineralisierung ist ein komplexer Prozess, der zumeist als direkte Folge von Entzündungen und fibrotischen Läsionen des Gefäßendothels in Kombination mit bestehenden Komorbiditäten, wie Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie, in Erscheinung tritt. Verschiedene inflammatorische und immunmodulatorische Mediatoren sind an der Entstehung kalzifizierter Vaskulopathien beteiligt. Die wichtigsten Biomarker sollen nachfolgend – in Hinblick auf die durchgeführten Analysen dieser Arbeit – genauer betrachtet werden.

9.1.4.1 Annexin-A2

Annexin-A2 ist ein 36 kDa schweres Protein und gehört zur Familie der Annexine, einer Gruppe von Ca^{2+} -abhängigen phospholipidbindenden Proteinen [94]. Die codierende Gensequenz (ANXA-2) ist auf dem Chromosom 15q22.2 lokalisiert [167].

Annexin-A2 kann als Monomer oder Heterotetramer in Kombination mit dem S100-p11-Protein sowohl intra- als auch extrazellulär vorliegen [171, 172]. Das Protein ist über Bindung der R1-Domäne von ANXA-2 an die Cystein-Histidin-reiche Domäne (CHRD) der Proprotein-konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) an der Regulation des Cholesterinstoffwechsel beteiligt [173]. Diese Interaktion hemmt PCSK9-induziert die Down-Regulierung der LDL-Rezeptoren (low density lipoprotein receptor), wodurch die Cholesterinaufnahme in die Hepatozyten gefördert wird [87]. Hohe Annexin-A2-Konzentrationen senken folglich die PCSK9- und LDL-Cholesterin-Plasmaspiegel, wodurch atherosklerotische Läsionen reduziert und in Folge das Risiko koronarer Herzkrankheiten minimiert werden kann [87, 173].

9.1.4.2 bone morphogenetic protein 2

Das bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) gehört zur Superfamilie der transforming growth factor beta proteine ($\text{TGF-}\beta$) und ist auf Grund seiner osteogenen Wirkung ein entscheidender Regulator der Knochenbildung und Gefäßverkalkung [88] (vgl. Abb. 9.6). Wang *et al.* konnten in in-vivo-Modellen zur arteriellen Verkalkung zeigen, dass die BMP-2-Expression in der Adventitia und atherosklerotischen Plaques hochreguliert ist [88; 174] und die Überexpression von BMP-2 in glatten Muskelzellen zu einer Beschleunigung der Gefäßkalzifizierung führt. Eine Hemmung von BMP-2 könnte somit zielführend bei der Therapie der Atherosklerose sein [175].

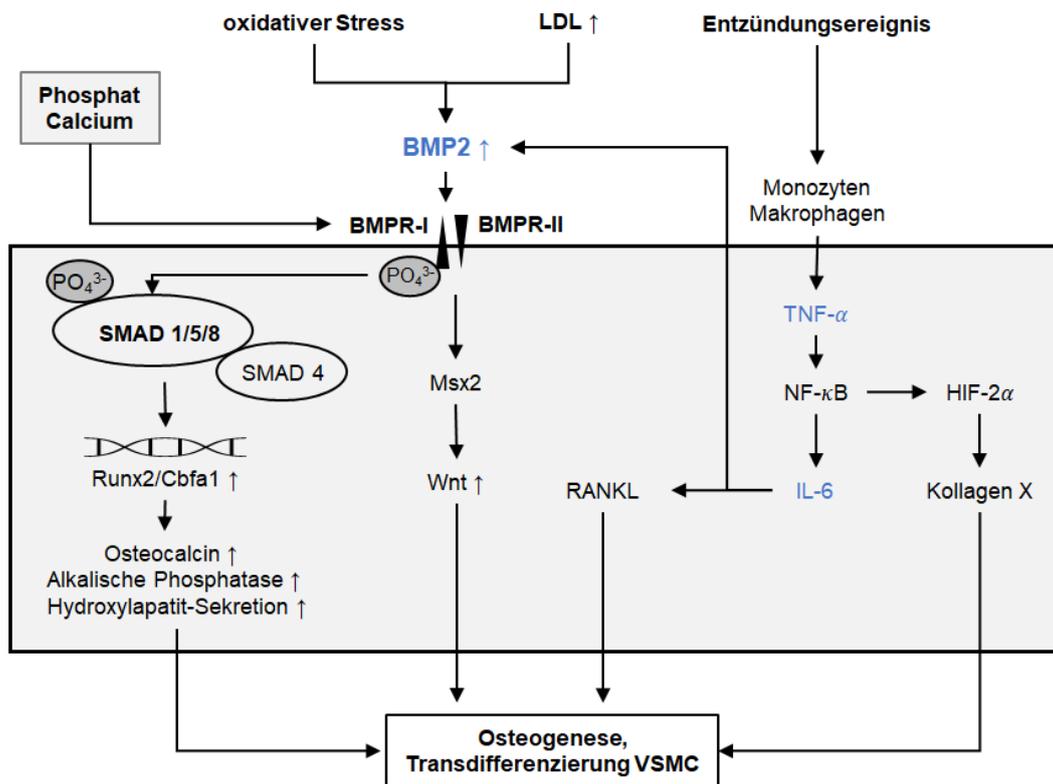


Abb. 9.6: Molekulare Mechanismen des Einflusses von BMP-2 auf die Kalzifikation glatter Muskelzellen. Oxidativer Stress, Entzündungsereignisse und hohe LDL-Werte fördern die Bildung von BMP-2. Durch Phosphorylierung des BMPR-I (bone morphogenetic protein receptor 1) nach Bindung des BMP-2 kommt es zur Aktivierung der SMAD 1/5/8-Kaskade. Diese fungiert als Transkriptionsfaktor zur Induktion der Runx2/Cbfa1-Expression. Der dadurch vermittelte Anstieg von Osteocalcin, alkalischer Phosphatase und der Hydroxylapatit-Sekretion begünstigen die Kalzifikation der glatten Muskelzellen in der Gefäßmedia. Low-density lipoprotein (LDL), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B), Interleukin-6 (IL-6), Hypoxie-induzierter Faktor 2 α (HIF-2 α), receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL), Msh homebox 2 (Msx2), runt-related transcription factor 2/core-binding factor subunit alpha-1 (Runx2/Cbfa1), vascular smooth muscle cell (VSMC). Modifiziert nach Akahori *et al.* [176-178].

9.1.4.3 Matrix-Gla-Protein

Das Matrix-Gla-Protein (MGP) ist ein 12 kDa schweres, endogenes Protein und der stärkste humane Inhibitor der Kalzifizierung [89]. Neben Osteocalcin und den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie Protein C und S gehört es zur Familie der Gla-Proteine [179]. MGP wird von Chondrozyten und glatten Gefäßmuskelzellen sekretiert und besitzt fünf Glutamatdomänen, welche zur Aktivierung des Proteins Vitamin-K-abhängig γ -carboxyliert werden. Ein Mangel an Vitamin-K führt folglich zur inaktiven, nichtcarboxylierten und dephosphorylierten Form von MGP (dpucMGP) [89, 179].

Nach Aktivierung übt MGP eine Reihe verschiedener Funktionen aus, die v.a. der Atherosklerose-Protektion dienen. Zum einen besitzt aktiviertes Matrix-Gla-Protein eine hohe Bindungsaffinität zu Hydroxylapatitkristallen; durch Bindung an Calcium- und Phosphationen aktiviert MGP Gefäßmakrophagen und induziert den Abbau des MGP-Hydroxylapatit-

Komplexes durch Phagozytose und Apoptose [89]. Andererseits geht MGP Komplexe mit BMP-2 ein und verhindert so dessen Bindung an den BMP-Rezeptor. BMP-2 vermittelt über die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege die Osteogenese glatter Gefäßmuskelzellen und trägt so zur Entstehung von Atherosklerose bei (vgl. Kapitel 9.1.4.2). Sweatt *et al.* dokumentierten bereits 2003, dass in verkalkten Arterien alternder Ratten MGP uncarboxyliert vorlag und BMP-2 nicht gebunden wurde [180]. Zwei Jahre später schlussfolgerten Schurgers *et al.*, dass eine fehlerhafte Carboxylierung von MGP mit der intimalen und medialen Gefäßverkalkung verbunden ist [181].

9.1.4.4 Osteopontin / Secreted Phosphoprotein 1

Osteopontin (OPN) ist ein integrinbindendes Glykophosphoprotein und Mitglied der SIBLING-Familie (small integrin-binding ligand, N-linked Glycoprotein) und wird vom Gen Secreted Phosphoprotein 1 (SPP-1) codiert [182, 51, 125]. Bisher sind drei Unterformen von Osteopontin bekannt, wobei ausgehend vom OPN-a durch alternatives Splicing OPN-b und OPN-c entstehen. Durch posttranslationale Modifikationen und die damit verbundene zellspezifische Adaptierung variiert das Molekulargewicht von Osteopontin zwischen 41 und 74 kDa [51, 182].

Ursprünglich wurde Osteopontin als Knochensialoprotein entdeckt, welches die Anlagerung von Osteoklasten an die mineralisierte Knochenmatrix ermöglicht. Neuere Studien konnten zeigen, dass das Protein auch an einer Reihe weiterer Prozesse, wie der Immunmodulation, Zelladhäsion mit Förderung der Fibrose, Inflammation und Tumorgenese, beteiligt ist [90]. SPP-1 wird dabei nicht nur von Osteoblasten und Osteozyten, sondern auch von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Endothelzellen, NK-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten sezerniert [90]. Aufgrund seiner unterschiedlichen Bindungsdomänen tritt es mit einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren auf Abwehrzellen, wie CD44 und Integrinen, in Kontakt [51, 90]. Fitzpatrick *et al.* konnten in einer Studie von 1994 nachweisen, dass die OPN-Expression in atherosklerotischen Plaque-Läsionen stark erhöht ist [95]. Weitere Studien sind in den nachfolgenden Jahren zu ähnlichen Ergebnissen gekommen und konnten beispielsweise den Einfluss von Osteopontin auf die Genese der KHK zeigen [125]. Dabei wird angenommen, dass die kalzifizierende Wirkung von Osteopontin v.a. auf der Verstärkung der Entzündung in atherosklerotischen Plaques beruht [91].

9.2 Erläuterungen zur Sondenextraktion und -isolation

9.2.1 Sondenextraktion

Bedingt durch das hohe Risiko perioperativer Komplikationen, wie Perikardtamponaden, Trikuspidalklappenverletzungen und Verletzungen großer Venen [6], werden Sondenextraktionen heute zumeist operativ in Allgemeinanästhesie oder unter herzchirurgischer Bereitschaft im Herzkatheterlabor durchgeführt. Neben Vorbereitungen zur hämodynamischen Überwachung und Bluttransfusion steht dabei auch ein Notfall-Team zur kardiopulmonalen Reanimation bereit [22].

Die Heart Rhythm Society klassifiziert aktuell fünf Indikationsbereiche zur transvenösen Sondenextraktion. Neben Infektionen, chronischen Schmerzen und venösen Thrombosen gehören dazu auch funktionsfähige und -lose Sonden. Oberflächliche Infektionen ohne Geräte- oder Sondenbeteiligung stellen dabei keine Indikation zur Systementfernung dar [28]. Die für die Extraktion zur Verfügung stehenden chirurgischen Maßnahmen haben sich in den letzten Jahrzehnten stetig weiterentwickelt. Grundsätzlich kann zwischen einem perkutanen, transvenösen Verfahren und einem offen-chirurgischen Verfahren mittels Thorakotomie und Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine unterschieden werden [28]. Durch technische Innovationen und der Entwicklung neuer laser- oder elektrochirurgisch gestützter Operationsverfahren zur mechanischen Abrasion fibrotischer Verwachungsstellen rückt die moderne Medizin zunehmend von offen-chirurgischen Interventionen ab.

Die transvenöse Sondenextraktion beruht in erster Linie auf dem Prinzip des Zuges (Traktion) an der Sonde [28]. Sollte dieser allein nicht ausreichen, werden zusätzlich röhrenförmige Extraktionssheaths entlang der liegenden Schrittmachersonde vorgeschoben, um so eine Dissektion zwischen Sonde und fibrotischem Gewebe zu erzielen. Um bei Zug an der Sonde einen Sondenbruch zu vermeiden, werden Lead-Locking-Devices (Spectranetics®) oder Locking-Stylets (Liberator® Beacon®, COOK® Medical) in die Sonde eingebracht und in Richtung Sondenspitze vorgeschoben (vgl. Abb. 9.7). Diese ermöglichen eine Kontrolle der Zugfestigkeit und erhöhen die ausgeübte Extraktionskraft auf die Sondenspitze, wodurch Dehnungen des Isolationsmaterials minimiert und eine vollständige Extraktion der Sonde ermöglicht wird [16, 22]. Der One-Tie® Compression Coil und Bulldog™ Lead Extender (beide COOK® Medical) bieten in dieser Situation zusätzliche Stabilität entlang des Sondenkabels [16]. Bei starken Verwachungen der Sonde ist das einseitige Zugverfahren durch die erhöhte Gefahr vaskulärer Gewebsverletzungen oftmals nicht ausreichend. In diesen Fällen werden in erster Linie aus Teflon oder Polypropylen bestehende Teleskopscheiden (Extraktionssheaths)

verwendet, welche entlang des Elektrodenkabels zur Sondenspitze vorgeschoben werden und so einen Gegendruck zur Zugkraft am Sondenkabel darstellen (vgl. Abb. 9.7).

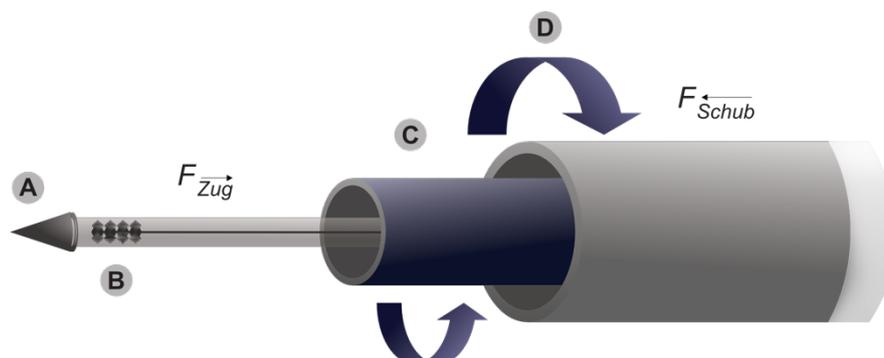


Abb. 9.7: Schematische Darstellung der Sondenextraktion. Lead-Locking-Devices (Spectranetics®) oder Locking-Stylets (Liberator® Beacon®, COOK® Medical) (B) werden in die Sonde eingebracht und bis zur Sondenspitze (A) vorgeschoben. Durch das „Locking“ werden die Stylets in der Sonde verankert und reduzieren die auf die Sonde wirkende Zugspannung. Komplikationen wie Sondenbrüche können so verhindert werden. Ist eine Extraktion des Sondenkabels durch einfachen Zug (F_{Zug} (Zugkraft)) nicht möglich, werden Teflon- oder Polypropylen-Extraktionssheaths (C) entlang des Sondenkabels vorgeschoben (F_{Schub} (Schubkraft)). Aufgebaut aus zwei ineinander liegenden, gegensätzlich rotierenden Schläuchen (D), ermöglicht der innere den Vorschub des Systems, während der äußere Schlauch das fibrotische Gewebe durchbricht und weitet [22]. Eigene Darstellung.

Aus Edelstahl bestehende Extraktionssheaths werden heutzutage lediglich zum Aufbrechen kalzifizierter Läsionen angewandt [22]. Sollten Teleskopscheiden nicht ausreichen, um das vorhandene fibrotische Gewebe zu lösen, können alternativ mechanisch sowie laser- (CVX-300® Excimer Laser, Spectranetics®) oder elektrochirurgisch (PERFECTA® Electrosurgical Dissection Sheath, COOK® Medical) gestützte Extraktionssheaths verwendet werden. Laserchirurgische Verfahren basieren auf gepulsten Ultraviolettlasern mit einer Wellenlänge von 308 nm, welche durch photochemische und -thermische Reaktionen molekulare Bindungen aufbrechen und fibrotisches Gewebe destruieren [16, 28]. Dabei kann Gewebe schonend bis zu einer Tiefe von 50 µm abgetragen werden [22, 28]. Kostengünstiger, aber ähnlich effizient, funktionieren elektrochirurgische Operationsverfahren. Die aus Polytetrafluorethylen (PTFE) bestehenden Dissektionshüllen enthalten bipolare Wolframelektroden an der distalen Spitze. Die zwischen den Bipolaren erzeugte Hochfrequenzenergie ermöglicht im Vergleich zur Laserchirurgie eine lokalisierte, lineare statt kreisförmige Ablation [22]. Im Vergleich zu Teleskopscheiden bieten diese elektronisch basierten Ablationsverfahren eine höhere Wahrscheinlichkeit zur vollständigen Resektion bei reduzierter Gewebeschädigung und kürzeren Extraktionszeiten. Die Komplikationsrate ist dabei nicht erhöht [22]. Eine Alternative zur Entnahme entlang des anatomischen Implantationsweges bietet die transfemorale Elektrodenentnahme mittels Needle's Eye Snare® (COOK® Medical) oder Byrd Workstation™ (COOK® Medical) [22, 28]. Über einen Zugang in der *V. femoralis* wird neben der Dissektionsschlinge eine Biopptomzange entlang der *V. cava inferior* in die Herzkammern vorgeschoben. Nach Greifen der Elektroden Spitze wird

diese mit der Schlinge fixiert und retrograd über die Beinvene entnommen. Die Schwierigkeit in diesem Verfahren besteht in der bildgebungsgestützten Lokalisation der Sondenspitze. Eine Orientierung entlang des Sondendrahtes ist nicht möglich [22].

9.2.2 Strategien zur nebenwirkungsarmen Schrittmachertherapie

9.2.2.1 Sondenisolation

Technische Sondenfehlfunktionen und Isolationsdefekte an Elektrodenkabel sind eine häufige Ursache für die Extraktion von Schrittmachersonden. Insbesondere abrasive Einflüsse auf das Isolationsmaterial wurden in der Vergangenheit intensiv untersucht [6]. Dabei konnten zum Teil erhebliche Unterschiede in der Verwendung verschiedener Isolationsmaterialien festgestellt werden. Die heutzutage häufig verwendete Silikonisolation wies in Studien eine deutlich höhere Biostabilität im Vergleich zu Polyurethanisolationen auf [183, 6]. Diese unterliegen insbesondere durch Metalloxidation einem erhöhten Verschleiß, welcher im zeitlichen Verlauf häufiger zu Sondenfehlfunktionen führt. Werden die Elektroden zu zentral unter der Klavikula oder mehrere Elektrodenkabel in einem Gefäß platziert, birgt dies das Risiko kontinuierlicher Bewegungen der Sondenkabel [6]. Der damit einhergehenden mechanische Abrieb des Isolationsmaterials konnte häufiger bei Silikonisolationen als bei Polyurethanisolationen beobachtet werden [6, 183]. Neue Elektrodenisolationen zielen aus diesen Gründen auf eine Kombination aus Silikon und Polyurethan ab, wie polyurethanbeschichteten Silikonisolationen oder einer Kopolymerisierung aus beiden Materialien (IsoFlex™ Optim™, St. Jude Medical™). Weitere Möglichkeiten bieten Beschichtungen der Sonde mit gleitfähigen Schmierstoffen (Fast-Pass™, St. Jude Medical™), Organosiloxan-Monomeren (SILGLIDE®, Applied Membrane Technology) oder Fluorpolymeren bei Polyurethanisolationen [6, 29]. Speziell strukturierte Texturen des Isolationsmaterials konnten in Studien zusätzlich die bakterielle Kontamination und Fibrosierung reduzieren [30].

9.2.2.2 Sondenverankerung

Neben der Optimierung des Isolationsmaterials kommen auch an der Elektrodenverankerung zunehmend neuentwickelte, korrosionsfreie Legierungen und Beschichtungen - wie Platin, Platin-Iridium und platinbeschichtetes Tantal - zum Einsatz. Diese sind neben der Verwendung aktiver Elektrodenverankerungen (Attain StarFix™, Medtronic), welche durch den Einsatz von Polyurethanlappen im Bereich der Sondenspitze Dislokationen signifikant reduzieren können, eine weitere Möglichkeit, die Verweildauer von Herzschrittmachersonden zu erhöhen [6]. Nachteile der aktiven Sondenfixierung ergeben sich durch fixationsunabhängige Indikationen zur Extraktion. So ist eine Extraktion insbesondere

beim Vorliegen von Thrombosen oder Fibrosierungen deutlich komplizierter als bei der Verwendung konventioneller, passiver Verankerungsmechanismen [6].

9.2.2.3 Eluting-Systeme

Ein weiterer Ansatz in der Optimierung der Schrittmachertherapie besteht in dem Einsatz medikamentenfreisetzender Systeme (Drug-Eluting-Systeme). Bereits in den 1980er Jahren [6] entwickelte die biotechnologische Forschung steroideluirende Elektrodenspitzen. Am häufigsten werden hierbei die Glucocorticoide Dexamethasonacetat und Dexamethason-Natriumphosphat verwendet [31]. Eluierende Systeme werden zunehmend auch durch die Verwendung des Mitosehemmstoffs Paclitaxel sowie des mTOR-Inhibitors Sirolimus (Rapamycin) ergänzt [6]. Die immunsupprimierende und -modulierende Wirkung dieser Stoffe nimmt Einfluss auf die fibrotische Reaktion an der Schrittmacherverankerung. Durch Reduktion dieser können Komplikationen minimiert und erhöhte Stimulations- und Defibrillationsschwellen verhindert werden. Herausforderungen und Grenzen dieser Systeme bestehen in der zeitlich begrenzten Wirksamkeit der eluierten Pharmaka [6].

9.2.2.4 Sondenfreie Herzschrittmacher

Gegenstand aktueller Forschungen ist die Entwicklung sondenfreier Herzschrittmacher. Ein vollständig implantierbares System wurde erstmals im Jahr 2012 mit dem Nanostim™ Leadless Pacemaker-System (St. Jude Medical™) entwickelt. Ein Jahr später folgte das Micra™ Transcatheter Pacing System (Medtronic) [32]. Die vollständig intrakardialen Systeme werden über die *V. femoralis* in den rechten Ventrikel vorgeschoben und dort mittels Verschraubung verankert [6]. Damit eignen sich die Systeme v.a. für Patienten mit einer Indikation zur VVIR-Stimulation (Ventrikel-Ventrikel-Inhibierung, frequenzadaptiert) [32]. Die derzeitige Auslegung dieser Geräte zur ausschließlichen Verwendung im rechten Ventrikel schränkt den Einsatzbereich im Vergleich zu konventionellen, sondenbasierten Schrittmachersystemen jedoch deutlich ein. Alternativ ermöglicht die ultraschallbasierte Technologie des WiCS™-Systems (EBR Systems) über Zugang durch die *A. femoralis* die Stimulation des linken Ventrikels. Das für die kardiale Resynchronisationstherapie verwendete Gerät wird über einen subkutanen Impulsgenerator mittels Ultraschallimpulsen mit elektrischer Energie versorgt [6, 32]. Trotz der kompakten Bauweise besitzen sondenfreie Herzschrittmacher eine Lebensdauer von sieben bis zehn Jahren. Damit scheinen die Geräte nach ersten Studien deutlich wartungsärmer zu sein; durch die Abwesenheit von Elektrodenkabeln und Gerätetaschen sinkt außerdem das Risiko für Elektrodenbrüche, Infektionen und Fibrosierungen. Nachteile dieser Therapieform ergeben sich v.a. aus den noch unausgereiften Fixierungsmechanismen sowie dem erhöhten Risiko schwerer perioperativer Komplikationen, wie Herzperforationen oder -tamponaden [32].

10 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Dekan der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock, für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation.

Ebenso danke ich Prof. Dr. med. Pascal M. Dohmen, Klinikdirektor der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, für die Bereitstellung der bei der herzoperativen Explantation von Herzschrittmachersonden gewonnenen und für diese Arbeit erforderlichen Gewebeproben.

Ich danke in besonderem Maße Frau PD Dr. rer. nat. habil. Martina Sombetzki für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, den zahlreichen hilfreichen Tipps rund um die Erstellung und den Aufbau der Dissertation sowie den Korrekturvorschlägen zu dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Franziska Woitschach und Frau M. Sc. Franziska Winkelmann danke ich für die nette Einarbeitung in das Themengebiet, den zahlreichen Hilfestellungen bei der Bewältigung der Laborarbeiten und die Zeit, die sie für die Korrektur dieser Arbeit aufgebracht haben.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Anne Rabes für die freundlichen Tipps und Hilfestellungen bei der Erstellung der Heat Maps in dieser Arbeit.

Frau M. Sc. Cindy Schulz, Frau Nicole Deinet und Frau Kati Russow möchte ich für die tatkräftige Unterstützung während der endlosen Stunden im Labor und die netten Gespräche abseits der Forschungsthematik bedanken.

Herrn Dr. rer. nat. Jonas Keiler danke ich für die stets prompte Beantwortung meiner Fragen und der Bereitstellung von Bildmaterial aus dem Institut für Anatomie der Universität Rostock.

Ich danke Herrn PD Dr. med. habil. Carlos Fritzsche für die Bereitstellung der Patientenakten und die interessanten Gespräche während der Mittagspausen.

Ein großer Dank gilt Herrn Dipl.-Pharm. Christian Vick für die zahlreichen Stunden, die er für das Korrekturlesen dieser Arbeit aufgebracht hat, den Hinweisen zur korrekten Verwendung chemisch und pharmazeutischer Fachtermini und der Hilfe bei der Optimierung des Layouts dieser Arbeit.

Frau Dipl.-Finw. Kathleen Baume und Herrn KptzS a.D. Ulrich Gruhner danke ich in besonderem Maße für die geopferte Zeit im Korrekturlesen dieser Arbeit.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich durch eigenhändige Unterschrift, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus den Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in dieser Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Rostock, 01.12.2021

Ort, Datum

Unterschrift des Doktoranden

12 Lebenslauf