

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Die prognostische Bedeutung von Macrophage Migration  
Inhibitory Factor (MIF) und seinem endogenen Antagonisten  
Gremlin-1 im Plasma von Patienten mit kalzifizierter  
Aortenstenose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Brunner, Julia

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

Tag der Disputation: 22.06.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>III.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Klinische Bedeutung der degenerativen Aortenstenose .....	1
1.2	Bedeutung der systemischen und lokalen Inflammation bei der Entstehung von Atherosklerose und der Aortenstenose .....	7
1.3	Fragestellung .....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methodik.....</b>	<b>13</b>
2.1	Patientenkollektiv und Studiendesign.....	13
2.2	Klinische und apparative Untersuchungen.....	14
2.3	Blutprobengewinnung, Blutprobenverarbeitung und Blutprobenvorbereitung zur immunologischen Analyse .....	16
2.4	ELISA Analysen.....	17
2.5	Impedanzaggregometrie mittels Multiplate® .....	18
2.6	Datendarstellung und statistische Auswertung.....	20
2.7	Ethikvotum .....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
3.1	Darstellung der Patientencharakteristika der Studienpopulation .....	22
3.2	Die Plasma-Konzentrationen von MIF und Gremlin-1 waren bei Aortenstenose erhöht.....	26
3.2.1	MIF-Expression bei Patienten mit Aortenstenose im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe.....	26
3.2.2	Gremlin-1-Expression bei Patienten mit Aortenstenose im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe.....	27

3.3	Die Plasma-Konzentration von Gremlin-1 war assoziiert mit erhöhten kardialen Markern .....	28
3.4	Die Plasmakonzentrationen von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 korrelierten mit wichtigen klinischen Parametern .....	31
3.5	Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Plasma korrelierte mit ADP-Respondern .....	33
3.6	Patienten mit einer Frailty zeigten erhöhte MIF- und Gremlin-1 Plasmakonzentrationen .....	35
3.7	Es zeigten sich Zusammenhänge zwischen den Plasmakonzentrationen von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 im Plasma .....	37
3.8	Die Plasmakonzentrationen von MIF und Gremlin-1 sind assoziiert mit dem Auftreten des Endpunktes .....	37
4	Diskussion .....	41
4.1	Ergebnisdiskussionen .....	41
4.2	Limitationen der Studie .....	44
4.3	Schlussfolgerung .....	45
5	Zusammenfassung .....	46
6	Literaturverzeichnis .....	48
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	56
8	Publikationen .....	57
9	Danksagung .....	58

## I. Abkürzungsverzeichnis

ACS	akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aortenstenose
AUC	Area under the curve
ASS	Acetylsalicylsäure
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CNP	C-type Natriuretic Peptide
hs-CRP	hochsensitives C-reaktives Protein
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DM	Diabetes mellitus
ECM	extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Grem1	Gremlin 1
HCL	Salzsäure
HDL-Cholesterin	High-Density- Lipoprotein-Cholesterin
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HLP	Hyperlipidämie

HTN	Hypertonie
HZV	Herzzeitvolumen
KHK	koronare Herzkrankheit
KÖF	Klappenöffnungsfläche
LDL	Low Density Lipoprotein
oxLDL	oxidiertes LDL
LV	linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MIF	Macrophagen-Migration-Inhibitory-Factor
MMPs	Metalloproteinasen
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
NT-proBNP	N-terminale proBNP
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	perkutane coronare Intervention
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTCA	perkutane transluminare coronare Angioplastie
SED	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
TAVI	Transkatether-Aortenklappenimplantation

TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor-beta 1
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRAP-6	Thrombin Receptor Activator Peptide 6
TTE	transthorakale Echokardiographie
VECs	Valve endothelial cells
VEGF-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
VICs	Valve interstitial cells
VHF	Vorhofflimmern
VSMCs	vaskuläre glatte Muskelzellen

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: echokardiographische Klassifikation einer AS [1] .....	2
Tabelle 2: Überblick über die Patientencharakteristika .....	23
Tabelle 3: Die Plasmakonzentrationen von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 korrelieren mit wichtigen klinischen Parametern.....	32



### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überleben von Patienten mit einer Aortenstenose nach Auftreten von Symptomen modifiziert nach Ross und Braunwald [13] .....	4
Abbildung 2: Einflussfaktoren und osteogene Vorläuferzellen, die während der Klappenkalzifikation eine Rolle spielen, modifiziert nach Yip und Simmons [18] 9	
Abbildung 3: MIF-Expression bei Patienten mit einer AS im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe. ....	26
Abbildung 4: Gremlin-1 Expression bei Patienten mit einer AS im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe. ....	27
Abbildung 5: Patienten mit erhöhter Gremlin-1-Konzentration zeigten einen erhöhten BNP-Gehalt (Brain Natriuretic Peptid) am Tag der Intervention unter Einteilung in zwei Gruppen.....	29
Abbildung 6: Patienten mit erhöhter Gremlin-1-Konzentration zeigten einen erhöhten BNP-Gehalt (Brain Natriuretic Peptid) am Tag 1 nach der Intervention unter Einteilung in zwei Gruppen.....	30
Abbildung 7: Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Plasma korrelierte mit ADP-Respondern unter Einteilung in zwei Gruppen. ....	34
Abbildung 8: Patienten mit einer Frailty zeigten einen erhöhten MIF-Plasmaspiegel.....	35
Abbildung 9: Patienten mit einer Frailty zeigten einen erhöhten Gremlin-1-Plasmaspiegel.....	36

Abbildung 10: Die MIF-Plasmakonzentration war bei Patienten mit einer AS assoziiert mit dem Auftreten eines kombinierten Endpunktes (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung) unter Einteilung der Patienten in zwei Gruppen. .... 38

Abbildung 11: Die Gremlin-1-Plasmakonzentration war bei Patienten mit einer AS assoziiert mit dem Auftreten eines kombinierten Endpunktes (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung) unter Einteilung der Patienten in zwei Gruppen. .... 39

Abbildung 12: Die Gremlin-1-Plasmakonzentration war bei Patienten der gesamten Kohorte assoziiert mit dem Auftreten eines kombinierten Endpunktes (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung) unter Einteilung der Patienten in zwei Gruppen. .... 40

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Bedeutung der degenerativen Aortenstenose

Die degenerative, kalzifizierende Aortenklappenstenose (AS) ist in den Industrieländern die häufigste Herzklappenerkrankung, die mit zunehmendem Lebensalter zu finden ist. Im Alter über 65 Jahren beträgt die Prävalenz etwa 3% [1]. In mehr als 35% der Fälle wird sie von einer koronaren Herzkrankheit begleitet [2].

Bei der Entwicklung der Aortenstenose handelt es sich um einen aktiven, progredienten Prozess, in dem die Inflammation und Kalzifikation eine wichtige Rolle spielt, die zu einer relevanten Stenosierung der Klappe führen, die häufig im höheren Lebensalter operations-/oder interventionsbedürftig wird [1]. Histologisch besteht eine Ähnlichkeit der AS zur Atherosklerose. Auf dieser Grundlage fanden große randomisierte Studien am Menschen statt, sowohl zur Prävention als auch zur Therapie der Aortenstenose. Bei beiden Erkrankungen sind Plättchen, Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen an der Plaquentstehung beteiligt, welche ihren Beitrag zur Kalzifizierung leisten [1, 3]. Obwohl große Gemeinsamkeiten in der Atherosklerose und der AS bestehen, spricht die AS dennoch nur sehr wenig auf eine medikamentöse Therapie an. In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob sich mit einer medikamentösen Therapie mit Statinen und anderen Substanzgruppen zur Senkung des Cholesterin- und LDL-Spiegels auch die Progression der AS günstig beeinflussen lässt. Es konnte jedoch kein positiver Effekt der Therapie belegt werden und Statine erwiesen sich als nicht effektiv wirksam [4, 3, 5, 6], sodass vermutet werden muss, dass hier noch andere Faktoren bei der Kalzifizierung eine Rolle spielen.

Als Risikofaktoren für die Atherosklerose, wie auch für die AS, gelten unter anderem Alter, männliches Geschlecht, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus Typ 2 [7, 8].

Die Diagnose einer AS wird in der Echokardiographie gestellt. Die normale Klappenöffnungsfläche (KÖF) der Aortenklappe beträgt bei Erwachsenen 2,6 bis 3,5 cm<sup>2</sup>. Ab einer KÖF von < 1,5 cm<sup>2</sup> kommt es zu einer hämodynamisch wirksamen Stenose. Symptome treten bei den meisten Patienten erst ab einer KÖF < 1,0 cm<sup>2</sup> und einem mittleren systolischen Gradienten über 40-50 mmHg auf. Selbst eine schwere AS kann noch asymptomatisch sein [1, 9]. Es kommt zu einer Druckbelastung des linken Ventrikels (LV) mit einer konzentrischen Hypertrophie [1].

Zu den Leitsymptomen einer AS gehören Angina pectoris (AP), Synkope, Dyspnoe, Schwindel und ein Leistungsknick [10, 11,12].

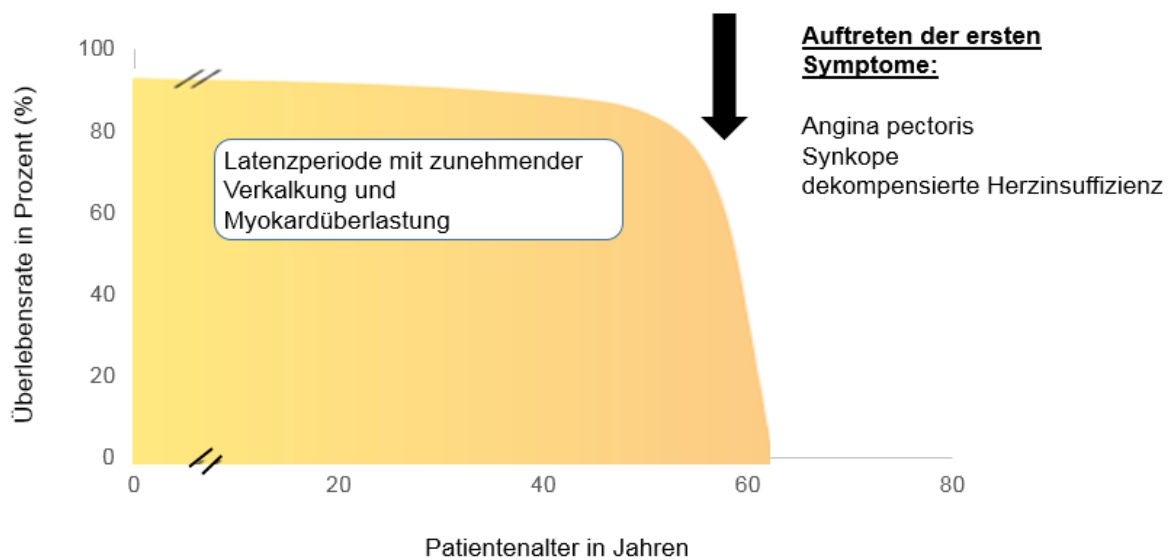
Die Klassifizierung (Graduierung) des Schweregrades der AS erfolgt, wie in Tabelle 1 dargestellt, anhand echokardiographische Kriterien.

**Tabelle 1: echokardiographische Klassifikation einer AS [1]**

Es wird die Klappenöffnungsfläche (KÖF) und die maximale transvalvuläre Flussgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) bestimmt.

	KÖF (cm <sup>2</sup> )	Mittlerer $\Delta p$ (mmHg)	$V_{max}$ (m/s)
Leichte AS	> 1,5	< 25	< 3,0
Mittelgradige AS	1,0-1,5	25-50	3,0-4,0
Schwere AS	< 1,0	> 50	> 4,0

Bei natürlichem Verlauf haben Patienten mit einer hochgradigen AS, wie in Abbildung 1 dargestellt, eine sehr schlechte Prognose [13]. Nach einer variablen, asymptomatischen Latenzzeit verschlechtert sich die Prognose der Patienten mit dem Auftreten von Symptomen, nach der Überlebenskurve nach Ross und Braunwald, rapide [13]. Das mittlere Überleben bei Angina pectoris beträgt 5 Jahre, bei Synkope 3 Jahre und nach einer dekompensierten Herzinsuffizienz 2 Jahre [13]. Die schlechte Prognose der inoperablen Patienten mit einer schweren AS wurde auch durch die PARTNER-Studie (Placement of AoRtic TraNscathetER Valve) belegt [13]. 50% der Patienten, welche mit einer medikamentösen Standardtherapie einschließlich mehrmaliger Ballondilatationen behandelt wurden, verstarben innerhalb des ersten Jahres. 68% der Patienten innerhalb von 2 Jahren [13]. Durch die Möglichkeit des operativen oder interventionellen Klappenersatzes haben betroffene Patienten nahezu eine normale Lebenserwartung. Das Voranschreiten der AS verläuft jedoch auch individuell sehr unterschiedlich. Hier spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, die noch nicht vollständig geklärt sind. Rund 50% der Patienten zeigen auch jahrelang kein oder nur ein geringes Voranschreiten der Erkrankung [13]. Als Orientierungsgröße können das Ausmaß der Klappenverkalkung sowie der Verlauf innerhalb der ersten Jahre dienen [13, Abb.1].



**Abbildung 1: Überleben von Patienten mit einer Aortenstenose nach Auftreten von Symptomen modifiziert nach Ross und Braunwald [13]**

Eine wirksame medikamentöse Therapie ist derzeit nicht etabliert. Weder zur Prävention, noch um die Erkrankung am Fortschreiten zu hindern [4]. ACE-Hemmer können zum Einsatz kommen, um die durch die AS verursachte Herzinsuffizienz zu behandeln, Symptome zu verbessern und die Zeit bis zum Klappenersatz zu überbrücken [13, 14].

Eine antithrombozytäre Therapie ist bei Patienten indiziert, welche neben dem Klappenvitium zusätzlich unter einer KHK oder einer anderen signifikanten atherosklerotischen Erkrankung leiden [8]. Ein alleiniges Klappenvitium stellt keine eindeutige Indikation zur antithrombozytären Therapie dar. Nach der neusten ESC-Leitlinie von 2017 wird bei Patienten mit einer AS, welche zusätzlich unter Vorhofflimmern (VHF) leiden, der Einsatz von nicht-Vitamin-K-antagonistischen oralen Antikoagulanzen (NOAKs) als Alternative zu Vitamin-K-Antagonisten mit einem Empfehlungsgrad IIa erwogen [8].

Bei der Entstehung der degenerativen Aortenstenose spielen zelluläre und molekulare Pathomechanismen zur Regulation der inflammatorischen Antwort und des Calciumgehaltes im Klappenapparat (sogenannte Biomineralisierung) eine Rolle. Allerdings sind die morphogenetischen, metabolischen, mechanischen, inflammatorischen und neuroendokrinen Einflüsse bis heute nicht eindeutig bekannt [14].

Da die einzige definitive Therapie der AS der Klappenersatz ist, haben neue Targets im Signaltransduktionsweg eine große Bedeutung, welche möglicherweise einen Angriffspunkt für neue Medikamente darstellen könnten.

Auch heutzutage ist der operative Aortenklappenersatz immer noch der Goldstandard. Die verkalkte Klappe wird entfernt und durch eine mechanische oder biologische Klappenprothese ersetzt. Dies ist nur unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine möglich. Für diese Art der Therapie spricht die mehr als 30-jährige Erfahrung, mit 1-4% eine geringe Operationsmortalität, sich rasch bessernde Symptome und eine nahezu normale Lebenserwartung der Patienten, wenn der Eingriff bei erhaltender Ventrikelfunktion erfolgt [13]. Der Eingriff kann entweder klassisch, mit einer medianen Sternotomie, erfolgen oder über minimalinvasive Zugangswege, was die Operationszeit und die Liegedauer auf der Intensivstation deutlich verkürzt. Inzwischen sind für den Klappenersatz mechanische Klappen in verschiedenen Ausführungen, sowie biologische Klappen in Form von menschlichen Spender-Herzklappen oder aus tierischen Geweben hergestellte Klappen verfügbar. Circa ein Drittel der älteren, multimorbiden Patienten bringen ein so hohes Operationsrisiko mit sich, dass der operative Klappenersatz ein erhöhtes perioperatives Risiko mit sich bringt [13]. Am häufigsten entscheidet man sich aufgrund einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), einem erhöhten Lebensalter und Komorbiditäten, wie beispielsweise eine neurologische Erkrankung, gegen ein operatives Verfahren [13]. Mit Einführung der interventionellen Therapie mittels Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (transcatheter aortic valve implantation – TAVI) ergab sich im Jahr 2002 für diese Patienten eine neue Option. Hierbei wird ein Katheter transfemoral, transaxial oder transapikal

eingebraucht, die gefaltete künstliche Klappe über den Katheter bis zur stenosierten Klappe vorgeschoben und mittels Ballon oder als selbstexpandierende Klappe eingesetzt. Das Operationstrauma ist sehr gering, sodass eine schnellere Mobilisation des Patienten und somit eine schnellere Rekonvaleszenz erreicht werden kann. Die TAVI hat sich vor allem bei Patienten über 80 Jahren zum Standardverfahren entwickelt [13]. So haben inzwischen Patienten mit inakzeptablem oder erhöhtem Operationsrisiko eine effektive Therapieoption.

Als Laborparameter, welcher zur Einschätzung des Rekompensationsstatus eines Patienten herangezogen werden kann, kann das natriuretische Peptid (BNP, NT-proBNP) hilfreich sein [2]. Anhand des BNP kann unabhängig das symptomfreie Überleben und das postoperative Outcome von Patienten mit einer schweren AS vorhergesagt werden [15, 16]. Außerdem könnte es bei Patienten mit einer asymptomatischen AS nützlich sein, um den optimalen Zeitpunkt für eine operative Intervention zu bestimmen [8]. Ein hoher BNP-Spiegel zeigte in vorangehenden Studien, auch bei asymptomatischen Patienten, eine erhöhte Mortalität [16].

Als ein weiterer Laborparameter kann bei Patienten mit einer schweren Aortenstenose Troponin herangezogen werden. Erhöhte Plasmaspiegel gehen mit einer stark reduzierten LVEF einher [17]. Des Weiteren erwies sich Troponin bei diesen Patienten in der Vorhersage von kardiovaskulärer Mortalität sowie der Gesamtmortalität als hochsignifikant und gilt als stärkster unabhängiger Risikofaktor für das postoperative Überleben dieser Patienten [17].

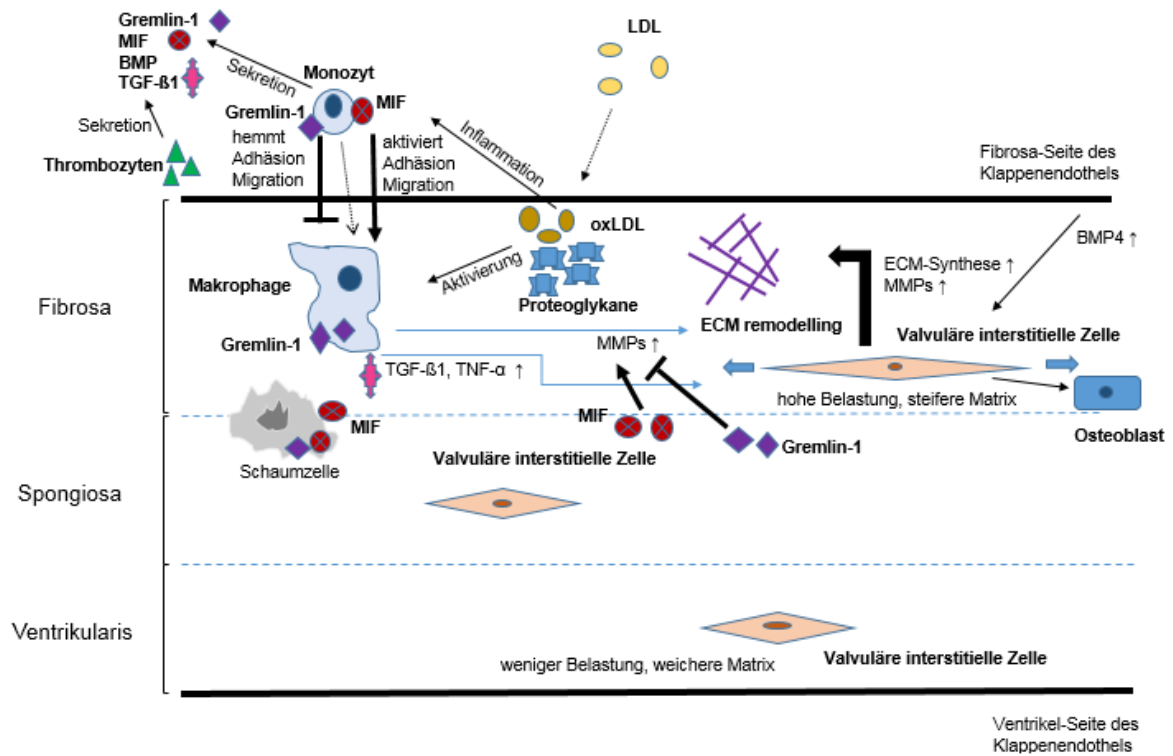


## **1.2 Bedeutung der systemischen und lokalen Inflammation bei der Entstehung von Atherosklerose und der Aortenstenose**

Das Voranschreiten der Aortenklappenkalzifikation und -stenose kann als ein aktiver Prozess mit Ähnlichkeit zur Atherosklerose angesehen werden [1, 3]. Es kommt unter anderem zur Lipoprotein-Akkumulation, Inflammation, Remodelling der extrazellulären Matrix und anschließender Kalzifizierung sowie Ossifikation [19]. Viele aktive Regulationsmechanismen und die inflammatorische Antwort spielen eine Schlüsselrolle. Die Klappenkalzifizierung zeigt außerdem Ähnlichkeit mit der Knochenmineralisierung. Dieselben Gene und Proteine spielen eine Rolle [20].

Verschiedene Zelltypen und komplexe Pathomechanismen spielen, wie in Abbildung 2 dargestellt wird, in der Biomineralisierung der Aortenklappe eine wichtige Rolle und sind an der Klappenkalzifikation beteiligt. Osteogene Zellen stammen unter anderem aus sich weiter differenzierenden interstitiellen Zellen (VICs) sowie zirkulierenden Knochenvorläuferzellen. Fibrosaseitig lagert sich bevorzugt Low-Density-Lipoprotein (LDL) ab. Damit einher geht sehr oft die Einlagerung von Proteoglykanen im Rahmen einer frühen Atherosklerose. Oxidiertes LDL (oxLDL) trägt zur Inflammation des Endothels bei und hat eine Wirkung als Chemoattractant für Monozyten und Makrophagen, welche sich überwiegend in der Fibrosa befinden. Aktivierte Makrophagen produzieren Metalloproteinasen (MMPs), welche ihren Beitrag zum Remodelling der extrazellulären Matrix (ECM) leisten und zahlreiche andere pro-inflammatorische und osteogene Faktoren. Unter anderem ist hier der Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) zu nennen, welcher unter anderem durch Thrombozyten ausgeschüttet wird, und zusammen mit Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) die Differenzierung der VICs zu Osteoblasten begünstigt. Mechanischer Stress an der Fibrosa durch Turbulenzen beim Fluss am Klappenapparat begünstigt eine vermehrte Produktion von Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4). BMPs werden außerdem von Thrombozyten und Monozyten sezerniert. Aortenseitige VICs zeigen einen anderen Phänotyp als ventrikelseitige VICs, was ebenfalls zur Entstehung der AS beiträgt. Ein weiteres zytokinähnliches Chemokin ist

Macrophage-Migration-Inhibitory-Factor (MIF). MIF spielt auch eine entscheidende Rolle in der lokalen und systemischen Inflammation und Kalzifikation und vermittelt pro-inflammatorische und pro-atherosklerotische Signale, welche Thrombozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen regulieren. Zusätzlich wird MIF auch in diesen Zellen nachgewiesen und aus ihnen freigesetzt, wenn diese zuvor eine Stimulation durch z.B. oxLDL oder eine Hypoxämie erhalten. Hierdurch wird die Inflammation und Kalzifikation getriggert. Gremlin-1 wird in Arterien ebenfalls von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen sezerniert. Es hemmt zum einen die Freisetzung von MIF und zum anderen die extrazelluläre Bindung von MIF an seine entsprechenden Rezeptoren, indem es eine direkte Bindung mit diesem eingeht. Somit fungiert Gremlin-1 als endogener Antagonist von MIF. MIF aktiviert die zirkulierenden Monozyten im Blut zur Adhäsion und Migration und aktiviert MMPs. Gremlin-1 hingegen hemmt die Adhäsion und Migration der Monozyten und Makrophagen und wirkt hemmend auf MMPs und die Schaumzellbildung.



**Abbildung 2: Einflussfaktoren und osteogene Vorläuferzellen, die während der Klappenkalzifikation eine Rolle spielen, modifiziert nach Yip und Simmons [18]**

Eine weitere wichtige Funktion im parakrinen Signaltransduktionsweg spielen Mitglieder der TGF-β1-Superfamilie, zu welchen auch die BMPs gezählt werden [24]. Sie sind an der Regulation der Entwicklung der Knochen und Körperachse sowie an der frühen Morphogenese von Herz und Klappenapparat beteiligt [23]. BMP-2, BMP-4 und BMP-7 regulieren Vorgänge, aus welchen die Osteoblasten hervorgehen [20, 22, 25]. Die Immunhistochemie kalzifizierter Aortenklappen zeigt eine hohe Expression von BMPs, ähnlich den atherosklerotischen Plaques [21, 26, 27]. TGF-β1 ist ein osteogenes Morphogen [28]. BMPs sind an, durch TNF-α vermittelten, inflammatorischen Prozessen beteiligt sowie an der Bildung von extrazellulärer Matrix [23]. Inflammatorischen Prozesse gehen der Kalzifikation und Ossifikation voraus, beziehungsweise finden sich an anderen Stellen innerhalb des Klappenapparates.

T-Zellen, Monozyten und Makrophagen infiltrieren die Klappe und setzen Zytokine frei. Dies stimuliert die Produktion von MMPs in Makrophagen und VICs. VICs reagieren darauf und durchlaufen eine adipogene, osteoblastäre und chondrogene Differenzierung, welche für die Entstehung der Aortenklappenkalzifikation und Aortenklappenstenose von großer Bedeutung ist [29]. Aortenseitig zeigen sich an der Klappe vornehmlich Plaque-ähnliche Veränderungen mit einer Auflockerung des Gewebes und Lipideinlagerungen in der Fibrosa [30-32]. Die ventrikelseitige Schicht bleibt intakt [33, 34]. Eingewanderte Makrophagen phagozytieren LDL-Cholesterin nach seiner Modifikation als oxLDL [35]. Mikroskopisch imponieren sie als Schaumzellen, makroskopisch bilden sie „fatty streaks“, welche dem frühesten atherosklerotischen Stadium entsprechen [36]. Proliferationsmechanismen von VICs und glatten Muskelzellen sowie die Einwanderung von Monozyten und Makrophagen in den atherosklerotisch veränderten Klappenapparat sind, ebenso wie die Regulationsmechanismen der MMPs in Makrophagen und in VICs, nur unvollständig beschrieben. In der Immunhistochemie veränderter Klappen finden sich im Rahmen der pro-inflammatorischen Antwort insbesondere T-Zellen und Makrophagen [37]. OxLDL ist ein pro-inflammatorisches Pathogen und führt zu einer Aktivierung und Aufrechterhaltung der angeborenen Immunantwort [38-40, 42]. Es entsteht durch spontane extrazelluläre Oxidation von LDL [41], welches in der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt. TNF- $\alpha$  aktiviert als pro-inflammatorisches Zytokin die vaskuläre Biomineralisation [43, 44, 45]. Außerdem sind osteogene Signaltransduktionskaskaden über BMPs an TNF- $\alpha$ -Aktivität gekoppelt [44]. Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) sind ebenfalls an der Kalzifizierung und Ossifikation beteiligt [25, 46-50]. BMP-Antagonisten treten signifikant geringer in der aortenseitigen Fibrosa der Klappe auf [51]. Diese ungleiche Verteilung auf beiden Seiten ist vermutlich für das unterschiedliche Auftreten und Voranschreiten der Klappenverkalkung mit ausschlaggebend [52]. BMPs werden über verschiedene intra- und extrazelluläre Vorgänge reguliert. Ein großer Anteil der extrazellulären Inhibitoren bindet die BMPs und verhindert somit die Interaktion mit ihren Rezeptoren, wodurch es zur Abschwächung der vermittelten Reaktion kommt [53].

Zu den endogenen BMP-Antagonisten zählt Gremlin-1. Es gehört wie die BMPs, der „Platelet Derived Growth Factor“ (PDGF), TNF- $\alpha$  und die TGF- $\beta$ -Familie zur „Cystine knot“- Superfamilie [54, 55], welche Aktivierungs- und Entzündungsprozesse beeinflussen. Als „Cystine knot“ bezeichnet man die Ringstruktur mit hochkonservierten Cysteinen im Protein, welche für die Funktion ausschlaggebend ist [54, 55, 56]. Eine Blockade der BMPs kann als mögliches Target in der medikamentösen Therapie von Aortenklappenstenosen und Atherosklerose angesehen werden [57]. Das sekretierte und glykosylierte Gremlin-1 bindet direkt an BMP-Proteine [58]. Durch Interaktionen mit verschiedenen Proteinen reguliert Gremlin-1 in vitro die Monozytenmigration [59], beeinflusst die Pathogenese chronisch-fibrotischer Erkrankungen der Niere [60, 61], der Lunge [62], sowie kardiale Remodellingprozesse [63]. In welchem Ausmaß Gremlin-1 in der Entstehung und dem Progress der degenerativen Aortenklappenstenose beteiligt ist, ist bisher nicht untersucht und beschrieben worden. Kürzlich ist es gelungen den Nachweis zu erbringen, dass Gremlin-1 auch MIF reguliert. Es findet in vitro eine direkte Bindung an MIF statt. Gremlin-1 reduziert die Freisetzung von MIF aus intrazellulären Speichern von Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen, führt zu einer reduzierten Schaumzellbildung, zu einer Hemmung der Aktivität von MMPs und zu einer Reduktion der Monozyten-Migration [64].

MIF wird als Lymphokin kontinuierlich exprimiert, intrazellulär gespeichert und ist an der zellvermittelten Immunität, Immunregulation und Inflammation beteiligt. Die MIF-Expression wurde für Monozyten, dendritische Blutzellen, glatte Muskelzellen, B-Zellen, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten nachgewiesen [65,66,67]. Es reguliert die Makrophagenfunktion indem es anti-inflammatorische Effekte der Glucokortikoide abwehrt [68] und inflammatorische Prozesse im kardiovaskulären System reguliert. Pro-atherogene Faktoren wie oxLDL stimulieren die MIF-Expression. Während der Ausbildung von atherosklerotischen Plaques findet sich MIF in humanen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen [69]. Eine MIF-Blockade bewirkt eine stabilere Zusammensetzung der Plaques, eine Reduktion verschiedener inflammatorischer Mediatoren, welche typischerweise mit Atherosklerose

assoziiert sind, und eine reduzierte lokale Expression von Entzündungsmediatoren und Transkriptionsfaktoren in der Aorta [70, 71]. Die Plaque-Fläche stellt sich nur gering verändert dar, dafür sind deutlich weniger Makrophagen enthalten [72]. MIF beeinflusst also die Entzündungsreaktion im Endothel sowie die Adhäsion und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand [72].

### **1.3 Fragestellung**

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Prozesse und Zusammenhänge, welche für die inflammatorische Antwort der Gefäßwand, Kalzifikation und Ossifikation verantwortlich, und somit ausschlaggebend für die Entwicklung einer Aortenstenose sind, ausführlich beschrieben.

Die gezielte Blockade der BMPs durch Gremlin-1 sowie eine gezielte Blockade von MIF stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt bei der Therapie der degenerativen Aortenklappenstenose dar und wurde bisher nicht näher untersucht.

Auf der Grundlage bisheriger Studien stellten wir daher die Hypothese auf, dass die systemischen Plasmaspiegel von TGF- $\beta$ 1, Gremlin-1 und MIF eine Rolle in der Entstehung der hochgradigen, degenerativen Aortenstenose spielen und von diagnostischer und prognostischer Relevanz für die Patienten sind.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1, Gremlin-1 und MIF im peripheren venösen Blut, genauer gesagt im Plasma, bei Patienten mit einer hochgradigen Aortenstenose zu messen und die Zusammenhänge zwischen diesen Faktoren mit der Entstehung der Aortenstenose, kardiovaskulären Risikofaktoren, inflammatorischen Markern, dem Ansprechen auf eine antithrombozytäre Therapie und dem klinischen Verlauf der Patienten zu untersuchen.

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Patientenkollektiv und Studiendesign**

Im Rahmen der fortlaufenden klinischen Tüpic-Studie (Projektnummer 270/2011BO1) an der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen Abteilung Innere Medizin III wurden Patienten mit einer hochgradigen, symptomatischen Aortenstenose und Indikation zur TAVI oder einem operativen Klappenersatz eingeschlossen, welche nach erfolgter Aufklärung über die Studie schriftlich ihr Einverständnis erteilt haben.

Retrospektiv wurden aus diesem Patientenkollektiv 156 konsekutive Patienten mit einer schweren Aortenstenose eingeschlossen, die zwischen Mai 2010 und März 2012 eine TAVI erhalten hatten, um die prognostische Bedeutung von MIF und seinem endogenen Antagonisten Gremlin-1 im Plasma dieser Patienten mit kalzifizierter Aortenstenose zu untersuchen.

Als Kontrollgruppe dienten 45 Patienten ohne AS aus dem Patientenkollektiv der Tüpic-Studie im Zeitraum von August 2011 bis Juni 2013. Diese wurden bezüglich Alter, Geschlecht, kardiovaskulären Risikofaktoren, Vorerkrankungen (Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Vorhofflimmern, koronarer Herzkrankheit) und Medikation, welche ACE-Hemmer, AT1-Rezeptor-Blocker, Beta-Blocker, Statine, Aspirin, Clopidogrel, Aldosteron-Antagonisten und Vitamin-K-Antagonisten beinhalteten, gematcht und als Fall-Kontroll-Studie analysiert.

Als primärer klinischer Endpunkt der Studie wurde eine Kombination aus Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall und Rehospitalisierung definiert. Die Patienten stellten sich entweder planmäßig regelmäßig im Abstand von jeweils 6 Monate nach Entlassung in der Ambulanz der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen zum klinischen Follow-up vor oder wurden bei versäumen der Termine zur Nachverfolgung im entsprechenden Abstand telefonisch kontaktiert. Der mittlere Nachverfolgungszeitraum betrug 24 Monate.

Bei der Erfassung und Aufarbeitung der patientenbezogenen Daten wurde stets die ärztliche Schweigepflicht, ein vertraulicher Umgang mit allen vorhandenen Daten sowie die Auflagen des Datenschutzgesetzes beachtet. Es fand eine Pseudonymisierung der Patientendaten nach Abschluss der Datenerhebung statt.

## 2.2 Klinische und apparative Untersuchungen

Es erfolgte die Eruiierung der patientenspezifischen Daten bezüglich ihrer medizinischen Vorgeschichte mitsamt einer ausführlichen körperlichen Untersuchung sowie die Liegedauer der Patienten. Klinische Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht und Dauermedikation bei Aufnahme bzw. Entlassung der Patienten wurden erfasst. Des Weiteren wurden kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Vorhofflimmern (VHF), Hypertonie (HTN), Hyperlipidämie (HLP), Diabetes mellitus (DM), Niereninsuffizienz (NI), pulmonale Hypertonie (PAH), koronare Herzerkrankung (KHK) und Nikotinabusus erhoben. Laborchemisch wurden neben den Routine-Laborparametern das Gesamtcholesterin, High Density Lipoprotein (HDL), Brain natriuretic Peptide (BNP), C-reaktives Protein (CRP), Kreatinin, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR-MDRD), Troponin, HbA1c und Harnstoff bestimmt.

Für alle Patienten wurde das perioperative Risiko mittels etablierten Risikoscores wie EURO-Score und STS-Score sowie der Framingham Score 2002 und die Frailty ermittelt. Aus den vorhandenen anamnestischen und laborchemischen Daten konnten der EuroSCORE (**E**uropean **S**ystem for **C**ardiac **O**perative **R**isk **E**valuation) mit Hilfe des New EuroSCORE II (2011) Calculator [73] ermittelt werden. Der Score dient zur Vorhersage des postoperativen Mortalitätsrisikos, vor allem weiblicher Pateinten, bei einer offenen Herzoperation [74] sowie zur Vorhersage der Dauer des Krankenhausaufenthaltes [74]. Der STS-Score (The **S**ociety of **T**horacic **S**urgeons) wurde mit Hilfe des Online STS Adult Cardiac Surgery Risk Calculator [75] ermittelt und sagt ebenfalls das postoperative



Mortalitätsrisiko von Patienten bei einer offenen Herzoperation vorher [74]. Der Framingham Score 2002 wurde anhand des Framingham Coronary Heart Disease Risk Score Calculator [76] ermittelt und wird verwendet, um die Wahrscheinlichkeit einer Person in Prozent abzuschätzen, in den folgenden 10 Jahren einen Herzinfarkt zu erleiden [77].

Das Frailty-Syndrom ist ein geriatrisches Syndrom mit einer Altersassoziation. Geriatrische Patienten weisen verminderte funktionelle Reserven durch eine geringere Leistungsfähigkeit der Organsysteme auf. Somit sind sie anfälliger für eine Hospitalisierung infolge von Immobilität und einer Sturzneigung. Ihre Mortalitätsrate ist erhöht [78]. Zwischen der Frailty und der Erhöhung von inflammatorischen Markern wie TNF- $\alpha$  und hs-CRP besteht eine starke Assoziation. Klinische manifestiert sich die Erhöhung der inflammatorischen Marker in der kardiovaskulären Morbidität. Umgekehrt kann man die kardiovaskuläre Morbidität als den wesentlichen Entstehungsfaktor der Frailty ansehen [78].

Bei allen Patienten mit einer AS wurde vor der TAVI eine strukturierte transthorakale Echokardiographie (TTE) zur klinischen Evaluation durchgeführt. Der Schweregrad der AS wurde mittels Bestimmung des maximalen und mittleren transvalvulären Druckgradienten nach der Bernoulli-Gleichung und der KÖF nach der Kontinuitätsgleichung ermittelt.

Die hämodynamische Beurteilung der Patienten mit einer AS erfolgte anhand einer Koronarangiographie, um eine begleitende KHK zu evaluieren. Die Kontrollgruppe ohne AS erhielt zur Evaluation einer KHK ebenfalls diese diagnostische Maßnahme.

### **2.3 Blutprobengewinnung, Blutprobenverarbeitung und Blutprobenvorbereitung zur immunologischen Analyse**

Jedem Patienten mit einer AS sowie jedem Kontrollpatienten ohne AS wurde direkt vor Beginn der obligaten Koronarangiographie Vollblut aus der Arteria femoralis abgenommen und in die entsprechenden S-Monovetten (EDTA, Serum) (S-Monovette® 9ml K3E, SARDTEDT Aktiengesellschaft & Co., Deutschland) für die späteren ELISA Analysen gefüllt. Innerhalb von 2 Stunden erfolgte die Weiterverarbeitung der Blutproben.

Die S-Monovetten wurden nach dem Befüllen 30 Minuten bei Zimmertemperatur bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die EDTA-Blutröhrchen zur ELISA Analyse wurden nach 30 Minuten mit 3000 rpm für 10 Minuten bei 23°C mit Bremse zentrifugiert (Zentrifuge HeraeusMultifug 3S+ Georg Kästner Rottenbug Deutschland). Der Überstand (Plasma) wurde in 1,5ml Microcentrifuge Tube (neoLabMigger Laborbedarf - Vertriebs GmbH Heidelberg, Deutschland) mit einer Eppendorf Pipette und dazugehöriger Pipettenspitze (Eppendorf AG Hamburg, Deutschland) abpipettiert und anschließend bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Am Vorabend der ELISA Analysen wurden die Tubes zum Auftauen bei Zimmertemperatur (18-23°C) über Nacht aufbewahrt. Jede Probe wurde einmalig eingefroren und zur Analyse aufgetaut.

## 2.4 ELISA Analysen

Die ELISA Analysen wurden nach der jeweiligen Beschreibung des Herstellers durchgeführt. Für jede EDTA-Plasma Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Verwendet wurden das RayBio® Human MIF ELISA Kit (RayBiotech, Inc., Norcross, USA), das Quantikine®ELISA Human TGF- $\beta$ 1 Kit (R&D System, Inc. Minneapolis, USA), sowie das Cloud-Clone®ELISA Kit für Gremlin 1 (GREM1) (Cloude-Clone Corp., Houston, USA).

Zuerst erfolgte die Vorbereitung der Reagenzien und EDTA-Plasma Proben indem sie auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht wurden. Es schloss sich die Verdünnung der Plasma/ Serum Probe nach Angabe im Protokoll, beziehungsweise beim MIF-ELISA individuell ermittelt von 1:10, an. Die notwendige Standard-Reihe wurde nach Anleitung hergestellt sowie die jeweiligen Verdünnungsreihen und eine Waschlösung. Die Wells wurden befüllt, abgeklebt und nach Vorschrift im Vortexer inkubiert. Anschließend fanden mehrmalige Waschvorgänge und das Trocknen der Platten statt. Die verschiedenen Antikörper wurden zugegeben, im Vortexer inkubiert und dazwischen mehrmals nach Anleitung gewaschen. Zum Abschluss wurde die Stop-Lösung dazugegeben und es erfolgte die unmittelbare Auswertung im Microplate Reader (BIO-RAD MODEL 550 Microplate Reader Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) bei 450nm.

## 2.5 Impedanzaggregometrie mittels Multiplate®

Zur Funktionsdiagnostik der Thrombozyten wurde das Multiplate® (Dynabyte GmbH, München, Deutschland) eingesetzt, welches auf dem Prinzip der Impedanzaggregometrie basiert. Durch die Zugabe von Agonisten in das Patientenvollblut werden die Thrombozyten aktiviert und aggregieren auf der Oberfläche von zwei silberbeschichteten Sensordrähten (Kathode und Anode), welche sich in einer Multiplate®-Messzelle (Dynabyte GmbH, München, Deutschland) mit Rührstab befinden. Dies führt zur Zunahme des elektrischen Widerstandes (Impedanz) zwischen den beiden Drähten. Die Änderung des Widerstandes wird als Maß für die Thrombozytenaggregation verwendet und kontinuierlich und gegen die Zeit aufgetragen. Die Software des Multiplate® berechnet die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC: „Area under the curve“). So erhält man Informationen über die Plättchenaggregation im Verhältnis zur Zeit. [79].

Verwendet wurden der ADPtest, ASPItest, TRAPtest und COLtest (Dynabyte GmbH, München, Deutschland).

Der ADPtest diente zur quantitativen Bestimmung der Thrombozytenfunktion, wobei der Adenosindiphosphat-Rezeptor (ADP-Rezeptor) der Plättchen stimuliert wurde. Am bedeutendsten war der ADP-Rezeptor (P2Y<sub>12</sub>), welcher durch Antagonisten wie Clopidogrel, Ticagrelor, Ticlopidin und Prasugrel blockiert wurde. Als Responder auf eine Therapie mit Clopidogrel wurden Patienten mit Werten <50 AU\*min, als Non-Responder wurden Patienten mit Werten >50AU\*min definiert.

Der ASPItest diente zur quantitativen Bestimmung der aktivierten Plättchen durch Arachidonsäure. Diese ist ein Substrat der Zyklooxygenase (COX), welche Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) bildet. Thromboxan A<sub>2</sub> aktiviert wiederum sehr stark die Thrombozyten. Die COX kann durch Inhibitoren wie Aspirin® und NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) blockiert werden.

Der TRAPtest diente zu quantitativen Bestimmung der Aktivierung der Thrombozyten durch TRAP-6 (Thrombin Receptor Activator Peptide 6). Dieser bindet direkt an den Thrombin-Rezeptor der Plättchen, was zu einer enorm starken Aktivierung führt. Durch diesen Test konnte die Wirkung von GpIIb/IIIa-Antagonisten wie Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban unter bestehender Therapie mit Aspirin® und Clopidogrel ermittelt werden.

Der COLtest diente zur quantitativen Bestimmung der Thrombozytenaktivierung durch Kollagen. Dadurch wird Arachidonsäure freigesetzt und durch die COX zu Thromboxan A2 metabolisiert.

Für die Messung wurde die r-Hirudin-Monovette verwendet, welche einen Entzug des freien Calciums im Vollblut verhindert. Calcium dient als wichtiger „second messenger“ in der Aktivierung der Thrombozyten. Die Messung mit dem Multiplate® erfolgte in einem Zeitraum von 30 Minuten bis maximal 1 Stunde nach dem Befüllen der Monovette. Die Multiplate®-Messzellen mit einem magnetischen Polytetrafluorethylenbeschichteten Rührstab wurden eingesetzt und durch einen Stecker mit dem Multiplate® verbunden. Während der gesamten Messung durchmischte der Rührstab die hinzugegebenen Reagenzien mit 800 Umdrehungen pro Minute. Es wurden 300µl 37°C warme isotonische Kochsalzlösung 0,9% (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) und 300µl Vollblut in die Messzelle pipettiert. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden in jede der 4 Messzellen die entsprechend benötigten 20µl Reagenz (ADP für ADPtest, ASPI für ASPItest, TRAP für TRAPtest, COL für COLtest) hinzu pipettiert und die 6-minütige Messung gestartet.

Die Software berechnete zwei Aggregationskurven. Einerseits die „Area under the curve“ und andererseits den Unterschied zwischen den beiden Einzelmessungen. War die Abweichung der beiden Einzelmessungen zu groß, erfolgte eine Meldung von Seiten des Multiplate®, sodass die entsprechende Messung wiederholt werden konnte.

## 2.6 Datendarstellung und statistische Auswertung

Retrospektiv wurden 156 konsekutive Patienten mit einer schweren Aortenstenose eingeschlossen, die zwischen Mai 2010 und März 2012 eine TAVI erhalten hatten, um die prognostische Bedeutung von MIF und seinem endogenen Antagonisten Gremlin-1 im Plasma dieser Patienten mit kalzifizierter Aortenstenose zu untersuchen. Als Kontrollgruppe dienten 45 Patienten ohne AS aus dem Patientenkollektiv der Tüpic-Studie im Zeitraum von August 2011 bis Juni 2013. Diese wurden bezüglich Alter, Geschlecht, kardiovaskulären Risikofaktoren, Vorerkrankungen und Medikation gematcht und als Fall-Kontroll-Studie analysiert.

Der Shapiro-Wilk-Test wurde angewendet, um die Normalverteilung der kontinuierlichen Parameter zu vermitteln. Normalverteilte, kontinuierliche Daten wurden als Mean  $\pm$  Standardabweichung (SED) oder Standardfehler (SEM) dargestellt. Nicht normalverteilte, kontinuierliche Variablen wurden als Median und interquartile range (IQR) angegeben. Um die Mittelwerte zwischen zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der t-Test verwendet. Der Chi-Quadrat Test wurde angewendet, um kategoriale Parameter zu analysieren.

Bei der Gruppeneinteilung ist Gruppe 1 mit Werten unterhalb des Medians oder des Mittelwertes, so wie an entsprechender Stelle im Text angegeben, definiert. Gruppe 2 ist mit Werten oberhalb des Medians oder des Mittelwertes, so wie an entsprechender Stelle im Text angegeben, definiert. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) eingesetzt. Ein p-Wert  $\leq$  0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Korrelationen von MIF, Gremlin-1, TGF- $\beta$  und anderen Laborparametern wurden mittels Korrelationsanalysen nach Spearman Rank ermittelt.

Als primärer klinischer Endpunkt der Studie wurde eine Kombination aus Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall und Rehospitalisierung definiert. Der mittlere Nachverfolgungszeitraum betrug 24 Monate.

Um die Zusammenhänge von Risikofaktoren und der MIF-/Gremlin-1-Konzentration im Plasma mit dem Auftreten des primären Endpunktes während des Beobachtungszeitraums zu analysieren, wurden Kaplan-Meier-Kurven berechnet (Log-Rank Test). Als Anfangszeitpunkt zur Ermittlung der Überlebenszeit diente der Tag der Blutentnahme während des Herzkatheter-Eingriffes. p-Werte  $\leq 0.05$  wurden als signifikant betrachtet.

Die statistische Analyse wurde mit SPSS, Version 21.0 für Windows (SPSS inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

## **2.7 Ethikvotum**

Die vorliegende Studie erfolgte nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki von 1946. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten hatten zuvor ihre schriftliche Einwilligung in die Studie erteilt. Ein Antrag zur Studiendurchführung bei der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Tübingen unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Luft wurde zur Begutachtung vorgelegt. Die Tüpic-Studie wurde von dieser Ethikkommission unter der Projektnummer 270/2011BO1 und 528/2018B02 zugelassen

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Darstellung der Patientencharakteristika der Studienpopulation

Zwischen Mai 2010 und März 2012 wurden 156 Patienten mit einer schweren AS konsekutiv in die vorliegende Studie eingeschlossen, welche eine Indikation zum Aortenklappenersatz hatten. Als Kontrollgruppe wurden 45 Patienten ohne AS aus der Tüpic-Studie im Zeitraum von August 2011 bis Juni 2013 gematcht und eingeschlossen. Patienten mit einer schweren AS waren mit  $79,7 \pm 7,0$  Jahren im Durchschnitt älter als Patienten der gematchten Gruppe ohne AS mit  $77,3 \pm 6,3$  Jahren ( $p = 0,039$ ). Bezüglich der kardiovaskulären Risikofaktoren hatten Patienten mit einer AS signifikant häufiger eine pulmonal-arterielle Hypertonie (71,2% vs. 13,3%,  $p < 0,001$ ). Hinsichtlich der Begleitmedikation war auffallend, dass Diuretika (81,4% vs. 66,7%,  $p = 0,035$ ) signifikant häufiger von Patienten mit einer Aortenstenose eingenommen wurden. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen bestand bezüglich der Frailty. Patienten mit einer AS wiesen mit 60,9% eine signifikant höhere Frailty auf als die gematchte Gruppe ohne AS mit 28,9% ( $p < 0,001$ ). Bezüglich der Laborparameter hat die gematchte Gruppe ohne AS einen signifikant höheren Hämoglobin-Wert ( $13,3 \pm 1,8$  vs.  $12,0 \pm 1,5$ ,  $p < 0,001$ ). Patienten mit einer AS zeigten signifikant höhere Troponin-Werte ( $0,1 \pm 0,3$  vs.  $0,0 \pm 0,0$ ,  $p = 0,002$ ). Weitere Gegenüberstellungen beider Gruppen können aus Tabelle 2 entnommen werden.



**Tabelle 2: Überblick über die Patientencharakteristika**

Patientencharakteristika	Total	Gematchte Gruppe ohne AS	AS	p-Wert
	<b>N=201</b>	<b>N=45</b>	<b>N=156</b>	
Alter *	79,2 ± 6,9	77,3 ± 6,3	79,7 ± 7,0	<b>0,039</b>
<b>Geschlecht- Anzahl (%)</b>				
männlich	102 (50,7)	24 (53,3)	78 (50,0)	0,694
weiblich	99 (49,3)	21 (46,7)	78 (50,0)	
<b>Kardiovaskuläre Risikofaktoren – Anzahl (%)</b>				
Vorhofflimmern	97 (48,3)	21 (46,7)	76 (48,7)	0,808
Arterielle Hypertonie	170 (84,6)	38 (84,4)	132 (84,6)	0,978
Hyperlipidämie	107 (53,2)	25 (55,6)	82 (52,6)	0,723
Diabetes mellitus	63 (31,3)	14 (31,1)	49 (31,4)	0,970
Niereninsuffizienz	85 (42,3)	16 (35,6)	69 (44,2)	0,299
Pulmonal-arterielle Hypertension	110 (57,6)	6 (13,3)	104 (71,2)	<b>&lt;0,001</b>
Koronare Herzerkrankung – Anzahl in (%)				
Keine	60 (29,9)	2 (4,4)	58 (37,2)	<b>&lt;0,001</b>
1-Gefäß-Erkrankung	42 (20,9)	7 (15,6)	35 (22,4)	
2-Gefäß-Erkrankung	25 (12,4)	11 (24,4)	14 (9,0)	
3-Gefäß-Erkrankung	49 (24,4)	21 (46,7)	28 (17,9)	
3-Gefäß-Erkrankung mit ACVB	25 (12,4)	4 (8,9)	21 (13,5)	

Patientencharakteristika	Total	Gematchte Gruppe ohne AS	AS	p-Wert
<b>Begleitmedikation – Anzahl (%)</b>				
Aspirin	123 (61,2)	28 (62,2)	95 (60,9)	0,872
Clopidogrel	46 (22,9)	7 (15,6)	39 (25,0)	0,184
Marcumar	47 (23,4)	12 (26,7)	35 (22,4)	0,555
Statin	117 (58,2)	26 (57,8)	91 (58,3)	0,947
ACE-Hemmer	118 (58,7)	25 (55,6)	93 (59,6)	0,626
AT1-Blocker	29 (14,4)	10 (22,2)	19 (12,2)	0,091
Diuretika	157 (78,1)	30 (66,7)	127 (81,4)	<b>0,035</b>
Aldosteron-Antagonist	36 (17,9)	9 (20,0)	27 (17,3)	0,678
Beta-Blocker	146 (72,6)	32 (71,1)	114 (73,1)	0,794
<b>Frailty</b>	108 (53,7)	13 (28,9)	95 (60,9)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Framingham-Score 2002 in % *</b>	14,3 ± 8,6	15,6 ± 8,8	14,1 ± 8,6	0,365
<b>STS-Score*</b>	20,0 ± 10,1	N/A	20,0 ± 10,1	
<b>EURO-Score*</b>	23,9 ± 13,8	N/A	23,9 ± 13,8	
<b>Echokardiographie-Daten*</b>				
LVF (EF %)	50,0 ± 11,0	49,4 ± 9,5	50,2 ± 11,3	0,690
Max, Druckgradient (mmHg)	65,4 ± 31,3	10,0 ± 5,9	74,0 ± 24,0	<b>&lt;0,001</b>
Mittlerer Druckgradient (mmHg)	27,4 ± 9,0	11,0 ± 2,8	43,7 ± 15,1	<b>0,003</b>
KÖF (cm <sup>2</sup> )	0,7 ± 0,2	N/A	0,7 ± 0,2	

Patientencharakteristika	Total	Gematchte Gruppe ohne AS	AS	p-Wert
<b>Laborparameter*</b>				
Blutdruck systolisch (mmHg)	132,9 ± 22,1	133,6 ± 20,8	132,1 ± 23,4	0,709
HDL (mg/dl)	51,2 ± 14,6	49,4 ± 17,0	51,6 ± 14,0	0,474
Gesamtcholesterin (mg/dl)	181,0 ± 44,3	181,5 ± 50,7	180,9 ± 42,8	0,945
BNP (pg/ml)	941,7 ± 1676,8	2426,1 ± 3592,0	790,3 ± 1270,3	0,101
CRP (mg/dl)	1,3 ± 2,3	1,2 ± 2,5	1,3 ± 2,3	0,979
Hb in (mg/dl)	12,3 ± 1,7	13,3 ± 1,8	12,0 ± 1,5	<b>&lt;0,001</b>
Kreatinin (mg/dl)	1,2 ± 0,8	1,1 ± 0,7	1,3 ± 0,8	0,351
GFR- MDRD (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	63,0 ± 25,3	65,5 ± 18,3	62,4 ± 27,0	0,373
Troponin (mg/dl)	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3	<b>0,002</b>
HbA1c (in %)	7,1 ± 1,4	7,0 ± 1,2	7,2 ± 1,5	0,592
Harnstoff (mg/dl)	51,3 ± 23,9	49,4 ± 22,0	53,1 ± 25,7	0,395
Thrombozyten (T/μl)	231,8 ± 76,1	234,4 ± 81,1	231,1 ± 74,9	0,800

Alle Werte mit \* sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung (T-Test), alle anderen Angaben beziehen sich auf die Anzahl und Prozent (n (%), Chi-Quadrat-Test).

N= Anzahl; AS= Aortenstenosen; ACVB = Aorto-Coronarer-Venen-Bypass; ACE= Angiotensin-Converting-Enzym; AT1= Angiotensin 1; LVF= linksventrikuläre Funktion; EF= Ejektionsfraktion; KÖF= Klappenöffnungsfläche; HDL= High-Density- Lipoprotein; BNP= brain natriuretic peptide; CRP= C-reaktives Protein; Hb= Hämoglobin; GFR= glomeruläre Filtrationsrate; MDRD= Modification of Diet in Renal Disease; HbA1c= Hämoglobin A1c

## 3.2 Die Plasma-Konzentrationen von MIF und Gremlin-1 waren bei Aortenstenose erhöht

### 3.2.1 MIF-Expression bei Patienten mit Aortenstenose im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe

Durch die ELISA Analysen fanden wir, dass Patienten mit einer Aortenstenose eine erhöhte MIF-Expression im Plasma aufwiesen. Patienten mit einer schweren AS zeigten im Gegensatz zur gematchten Kontrollgruppe ohne AS eine signifikant höhere MIF-Konzentration (Abb. 3, 10,44 ng/ml  $\pm$  1,17 vs. 4,68 ng/ml  $\pm$  0,54,  $p < 0,001$ ; Mean  $\pm$  SEM).

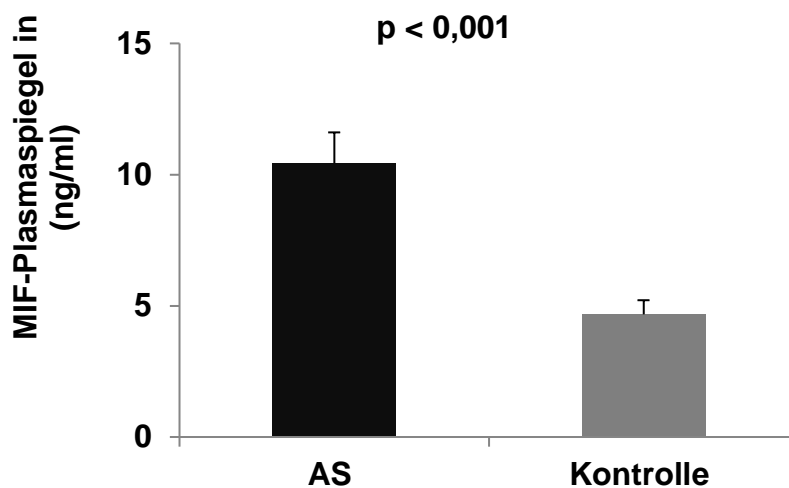
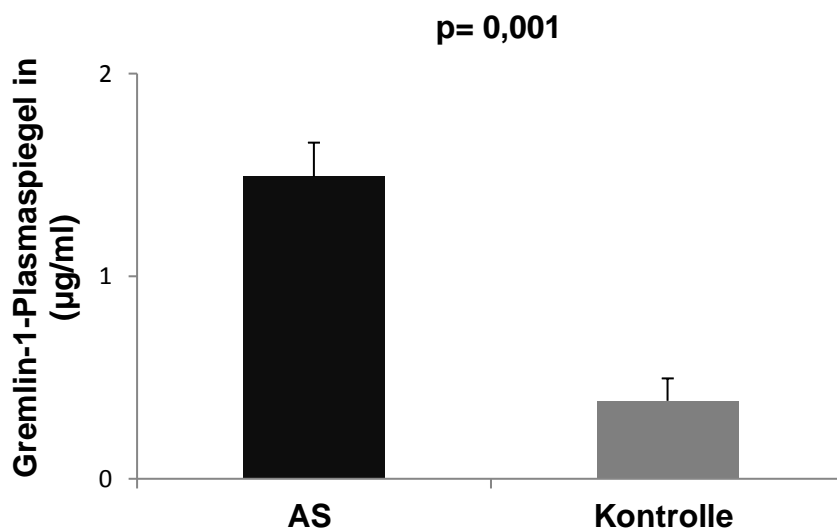


Abbildung 3: MIF-Expression bei Patienten mit einer AS im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe.

Patienten mit AS (N=156) zeigten signifikant höhere MIF-Plasmaspiegel (10,44 ng/ml  $\pm$  1,17) im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe (N=45) (4,68 ng/ml  $\pm$  0,54),  $p < 0,001$ ; Mean  $\pm$  SEM.

### 3.2.2 Gremlin-1-Expression bei Patienten mit Aortenstenose im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe

Durch die ELISA Analysen fanden wir, dass Patienten mit einer AS eine erhöhte Gremlin-1-Expression im Plasma aufwiesen. Patienten mit einer schweren AS zeigten im Gegensatz zur gematchten Kontrollgruppe ohne AS eine signifikant höhere Gremlin-1-Konzentration (Abb. 4,  $1,49 \mu\text{g/ml} \pm 0,17$  vs.  $0,38 \mu\text{g/ml} \pm 0,11$ ,  $p=0,001$ ; Mean  $\pm$  SEM).



**Abbildung 4: Gremlin-1 Expression bei Patienten mit einer AS im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe.**

Patienten mit einer AS (N=156) zeigten signifikant höhere Gremlin-1-Plasmaspiegel ( $1,49 \mu\text{g/ml} \pm 0,17$ ) im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe (N=45) ( $0,38 \mu\text{g/ml} \pm 0,11$ ),  $p=0,001$ ; Mean  $\pm$  SEM.

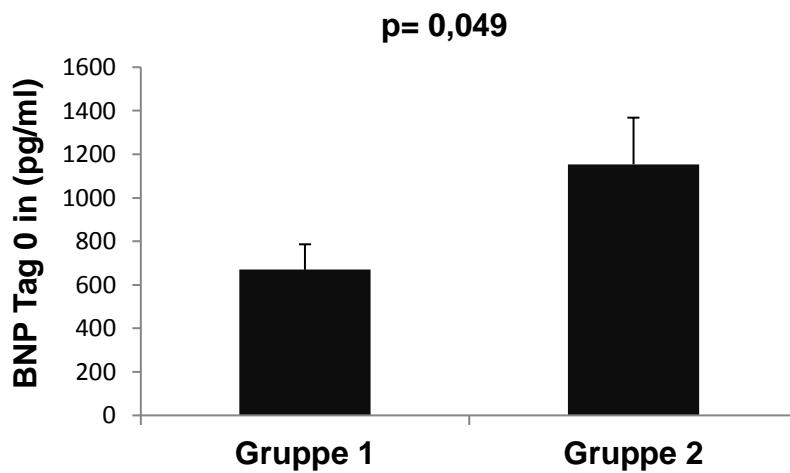
### **3.3 Die Plasma-Konzentration von Gremlin-1 war assoziiert mit erhöhten kardialen Markern**

Durch die ELISA Analysen fanden wir, dass Patienten mit einer erhöhten Gremlin-1-Konzentration im Plasma gleichzeitig erhöhte kardiale Marker aufwiesen.

Es erfolgte eine Einteilung der gesamten Kohorte bezüglich der erhobenen Laborparameter in zwei Gruppen ober- und unterhalb des Medians der Gremlin-1-Konzentration im Plasma ( $0,93 \mu\text{g/ml}$ ). Gruppe 1 wurde mit Werten unterhalb des Medians, Gruppe 2 mit Werten oberhalb des Medians definiert.

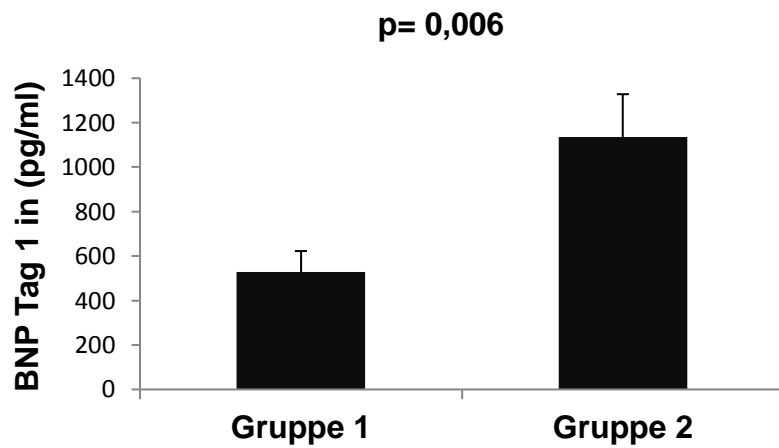
Für den BNP-Gehalt (Brain Natriuretic Peptid) am Tag der Intervention (N=162) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Patienten der Gruppe 2 zeigten deutlich höhere BNP-Werte (Abb. 5,  $669,44 \text{ pg/ml} \pm 116,86$  vs.  $1154,16 \text{ pg/ml} \pm 214,10$ ,  $p=0,049$ ; Mean  $\pm$  SEM).

Diese Beobachtung ergab sich ebenfalls für den BNP-Gehalt am Tag 1 nach der Intervention (N=149). Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,006$ ). Patienten der Gruppe 2 zeigten deutlich höhere BNP-Werte (Abb. 6,  $528,08 \text{ pg/ml} \pm 94,56$  vs.  $1134,54 \text{ pg/ml} \pm 193,69$ ,  $p=0,006$ ; Mean  $\pm$  SEM).



**Abbildung 5: Patienten mit erhöhter Gremlin-1-Konzentration zeigten einen erhöhten BNP-Gehalt (Brain Natriuretic Peptid) am Tag der Intervention unter Einteilung in zwei Gruppen.**

Patienten der Gruppe 2 (Gremlin-1-Median > 0,93 µg/ml, N=91) zeigten einen signifikant höheren BNP-Wert (1154,16 pg/ml ± 214,10) im Vergleich zur Gruppe 1 (Gremlin-1-Median < 0,93 µg/ml, N=71, 669,44 pg/ml, ±116,86),  $p= 0,049$ , Mean ±SEM.



**Abbildung 6: Patienten mit erhöhter Gremlin-1-Konzentration zeigten einen erhöhten BNP-Gehalt (Brain Natriuretic Peptid) am Tag 1 nach der Intervention unter Einteilung in zwei Gruppen.**

Patienten der Gruppe 2 (Gremlin-1-Median > 0,93 µg/ml, N=87) zeigten einen signifikant höheren BNP-Wert (1134,54 pg/ml ± 193,69) im Vergleich zur Gruppe 1 (Gremlin-1-Median < 0,93 µg/ml, N=62, 528,08 pg/ml, ±94,56), p= 0,006, Mean ±SEM.



### **3.4 Die Plasmakonzentrationen von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 korrelierten mit wichtigen klinischen Parametern**

Interessanterweise zeigte sich ein Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und der Plasmakonzentration von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1.

Der Gremlin-1-Wert korrelierte signifikant positiv mit den BNP-Werten am Tag nach der Intervention ( $r=0,309$ ,  $p<0,01$ ), den CRP-Werten am Tag der Intervention ( $r=0,603$ ,  $p<0,01$ ), den CRP-Werten am Tag nach der Intervention ( $r=0,580$ ,  $p<0,01$ ) und dem Kreatininwert ( $r=0,186$ ,  $p<0,01$ ). Es zeigte sich außerdem eine signifikante negative Korrelation mit dem Hb-Wert am Tag der Intervention ( $r=-0,245$ ,  $p<0,01$ ) und eine schwach signifikante Korrelation mit dem GFR-MDRD-Wert ( $r=-0,170$ ,  $p<0,05$ ). MIF korrelierte schwach signifikant positiv mit dem Kreatininwert ( $r=0,148$ ,  $p<0,05$ ) (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Die Plasmakonzentrationen von MIF, Gremlin-1 und TGF-β1 korrelieren mit wichtigen klinischen Parametern**

	MIF	Gremlin-1	TGF-β	BNP d0	BNP d1	CRP d0	CRP d1	CRP d1/d0 %	HB d0	HB d1	HbA1c %	Tz d0	TZ d1	TZ d1/d0 %	TZ d2/d0 %	Thromboabfall T0-T3	Trop d0	Trop d1	Kreatinin	GFR MDRD	Gesamt Cholesterin	
Gremlin-1	,205**																					
TGF-β	,210 **	,055																				
BNP d0	-,002	,060	-,055																			
BNP d1	,027	,309**	-,084	,937**																		
CRP d0	,061	,603**	-,001	,027	,302**																	
CRP d1	,013	,580**	-,078	,060	,236**	,844**																
CRP d1/d0 %	-,091	-,075	-,011	-,089	-,096	-,185 *	-,021															
HB d0	-,117	-,245**	-,026	,263 **	-,269 **	-,288**	-,364**	,172 *														
HB d1	-,016	-,083	,091	-,131	-,172 *	-,278 **	-,379 **	,032	,722**													
HbA1c %	,043	-,163	-,206	-,049	-,362	-,277	-,313	-,262	,358 *	,527 **												
TZ d0	,068	-,088	,279 **	-,133	-,128	,044	,016	-,144	-,104	-,071	,151											
TZ d1	,089	-,014	,066	-,042	-,060	,159*	,003	-,239 **	-,112	,001	,228	,799 **										
TZ d1/d0 %	,011	,142	-,046	,128	,127	,175 *	,013	-,197 *	-,211 **	,144	,284	-,217 **	,389 **									
TZ d2/d0 %	,040	,075	-,171 *	,113	,102	,181 *	,101	-,179 *	-,187 *	,031	,332	-,298 **	,137	,686**								
Thromboabfall T0-T3	,014	-,111	,101	-,154	-,147	-,095	-,072	-,016	,081	-,007	-,200	,737**	,369**	-,455**	-,554**							
Trop d0	-,013	,041	,011	,003	,026	,088	,074	-,033	-,097	,001	-,235	,044	,027	-,001	,021	-,055						
Trop d1	,008	-,027	,000	-,055	-,085	-,059	-,036	,025	-,093	-,046	-,191	,176	-,028	-,248**	-,292**	,424**	,135					
Kreatinin	,148*	,186**	-,031	,230 **	,364 **	,148 *	,158	-,087	-,222 **	-,190 *	-,192	-,124	,001	,204 *	,071	-,132	,079	-,030				
GFR MDRD	-,123	-,170*	,035	-,168 *	-,277 **	-,122	-,169 *	,083	,299 **	,249 **	,235	,147 *	,099	-,071	-,031	,110	-,131	-,030	-,720**			
Gesamt Cholesterin	-,082	,004	,075	-,177 *	-,138	-,036	-,126	-,155	,136	,007	,117	,131	,128	-,103	-,098	,121	-,101	-,101	-,231 **	,188 *		
HDL Aufnahme	,067	-,115	-,084	-,142	-,083	-,190*	-,247 **	,075	,079	,033	,062	,053	-,013	-,177 *	-,197 *	,130	-,166 *	-,166*	-,242 **	,219 **	,418**	

### Verwendete Abkürzungen in der Tabelle 3:

\*\* = Signifikanz (2-seitig)  $p < 0.01$ ; \* = Signifikanz (2-seitig)  $p < 0.05$ ;

d0= Messwert am Tag der Intervention; d1= Messwert am Tag nach der Intervention;

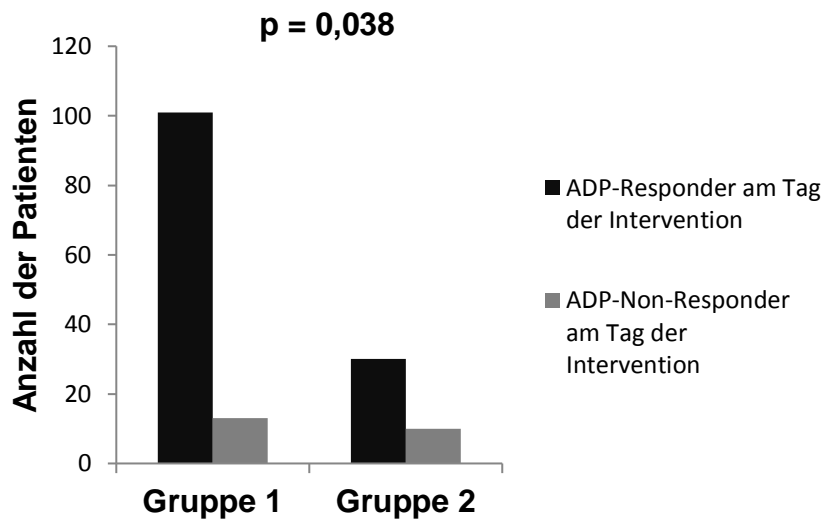
MIF= Makrophagen-Inhibitions-Faktor; Grem-1= Gremlin-1; TGF- $\beta$ = Transforming-growth-factor-beta; BNP= brain natriuretic peptide (pg/ml), CRP= C-reaktives Protein(mg/dl); Hb= Hämoglobin (mg/dl); HbA1c= Hämoglobin A1c (in %); Tz= Thrombozyten (T/ $\mu$ l); Thromboabfall T0-T3= Thrombozytenabfall vom Tag der Intervention bis zum dritten Tag nach der Intervention; Trop= Troponin (mg/dl); GFR-MDRD = glomeruläre Filtrationsrate Modification of Diet in Renal Disease (mL/min/1.73m<sup>2</sup>); HDL= High-Density- Lipoprotein (mg/dl).

### **3.5 Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Plasma korrelierte mit ADP-Respondern**

Die Einteilung der Patienten mit einer schweren Aortenstenose (N=154) erfolgte wieder in zwei Gruppen ober- und unterhalb des Mittelwertes der TGF- $\beta$ 1-Konzentration (15,02 ng/ml). Gruppe 1 wurde mit Werten unterhalb des Mittelwertes, Gruppe 2 mit Werten oberhalb des Mittelwertes definiert.

Die residuelle Plättchenaktivität wurde mittels Aggregometrie unter antithrombozytärer Therapie bestimmt. Als Responder auf Clopidogrel wurde ein ADP-Wert  $\leq 50$  Units in der Aggregometrie mittels Multiplate ® definiert.

Es zeigten sich Zusammenhänge mit der TGF- $\beta$ 1-Konzentration. Patienten, welche als ADP-Responder (N=131) am Tag der Intervention angesehen wurden, gehörten im Vergleich zu Non-Respondern (N=23) am Tag der Intervention signifikant häufiger zur Gruppe 1 (Abb. 7, ADP-Responder N=101 vs. N=30, ADP-Non-Responder N=13 vs. N=10,  $p = 0,038$ ). Diese Beobachtung konnte für MIF und Gremlin-1 nicht gemacht werden (Abb. nicht dargestellt).



**Abbildung 7: Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Plasma korrelierte mit ADP-Respondern unter Einteilung in zwei Gruppen.**

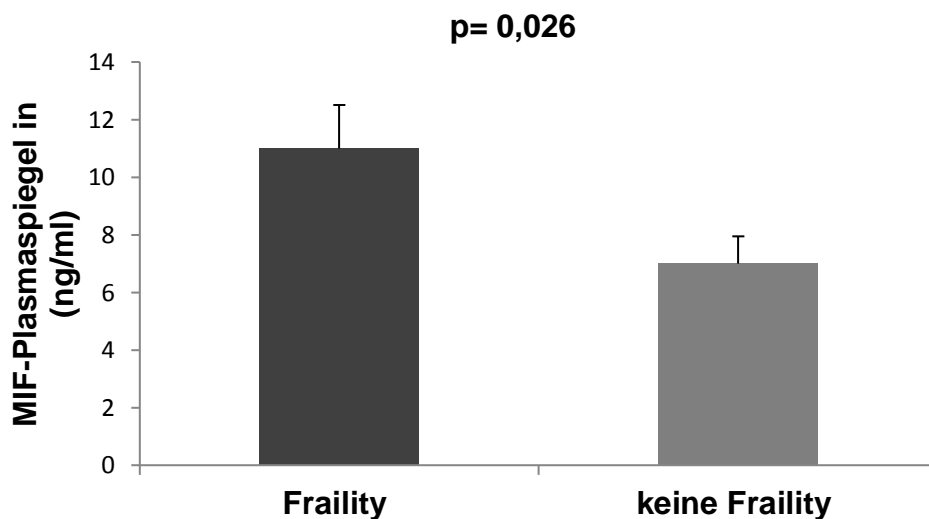
Patienten, welche als ADP-Responder (N=131) angesehen wurden, gehörten im Vergleich zu Non-Responder (N=23) signifikant häufiger zur Gruppe 1 (TGF- $\beta$ 1 < 15,02 ng/ml, ADP Responder Tag 0 N=101 vs. ADP-Non-Responder Tag 0 N=13) als zur Gruppe 2 (TGF- $\beta$ 1 > 15,02 ng/ml, ADP Responder Tag 0 N=30 vs. ADP-Non-Responder Tag 0 N=10), p=0,038.

### 3.6 Patienten mit einer Frailty zeigten erhöhte MIF- und Gremlin-1 Plasmakonzentrationen

Durch unsere Analysen fanden wir, dass Patienten, welche die Kriterien einer Frailty erfüllten, höhere MIF- und Gremlin-1-Plasmaspiegel aufwiesen.

Die Einteilung der Patienten der gesamten Kohorte (N=201) bezüglich der Frailty wurde anhand der Anamnese, unter der Berücksichtigung entsprechenden Kriterien, unternommen.

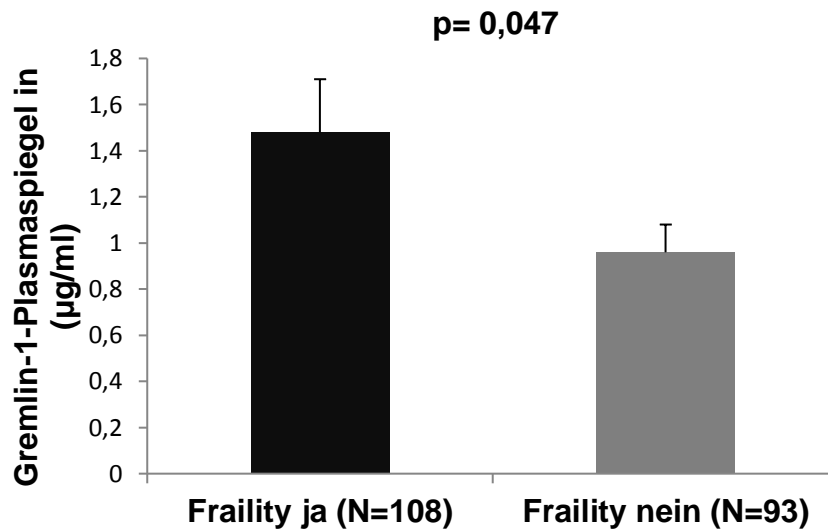
Patienten mit einer Frailty zeigten eine signifikant höhere MIF-Konzentration im Plasma als die Patienten ohne Frailty (Abb. 8, 11,00 ng/ml  $\pm$  1,51 vs. 7,00 ng/ml  $\pm$  0,95,  $p=0,026$ ; Mean  $\pm$  SEM).



**Abbildung 8: Patienten mit einer Frailty zeigten einen erhöhten MIF-Plasmaspiegel.**

Patienten mit einer Frailty (N=108) zeigten signifikant höhere MIF-Plasmaspiegel (8,11,00 ng/ml  $\pm$  1,51) im Vergleich zu Patienten ohne Frailty (N=93) (7,00 ng/ml  $\pm$  0,95),  $p=0,026$ ; Mean  $\pm$  SEM.

Bezüglich der Gremlin-1-Konzentration im Plasma zeigte sich ebenfalls eine Signifikanz (Abb. 9,  $1,48 \mu\text{g/ml} \pm 0,23$  vs.  $0,96 \mu\text{g/ml} \pm 0,12$ ,  $p=0,047$ ; Mean  $\pm$  SEM).



**Abbildung 9: Patienten mit einer Frailty zeigten einen erhöhten Gremlin-1-Plasmaspiegel.**

Patienten mit einer Frailty (N=108) zeigten signifikant höhere Gremlin-1-Plasmaspiegel ( $1,48 \mu\text{g/ml} \pm 0,23$ ) im Vergleich zu Patienten ohne Frailty (N=93) ( $0,96 \mu\text{g/ml} \pm 0,12$ ),  $p=0,047$ ; Mean  $\pm$ SEM.

### **3.7 Es zeigten sich Zusammenhänge zwischen den Plasmakonzentrationen von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 im Plasma**

In unseren Analysen fanden wir neben den bereits zuvor schon beschriebenen Zusammenhängen, dass die Plasmaspiegel von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 signifikant positiv miteinander korrelieren.

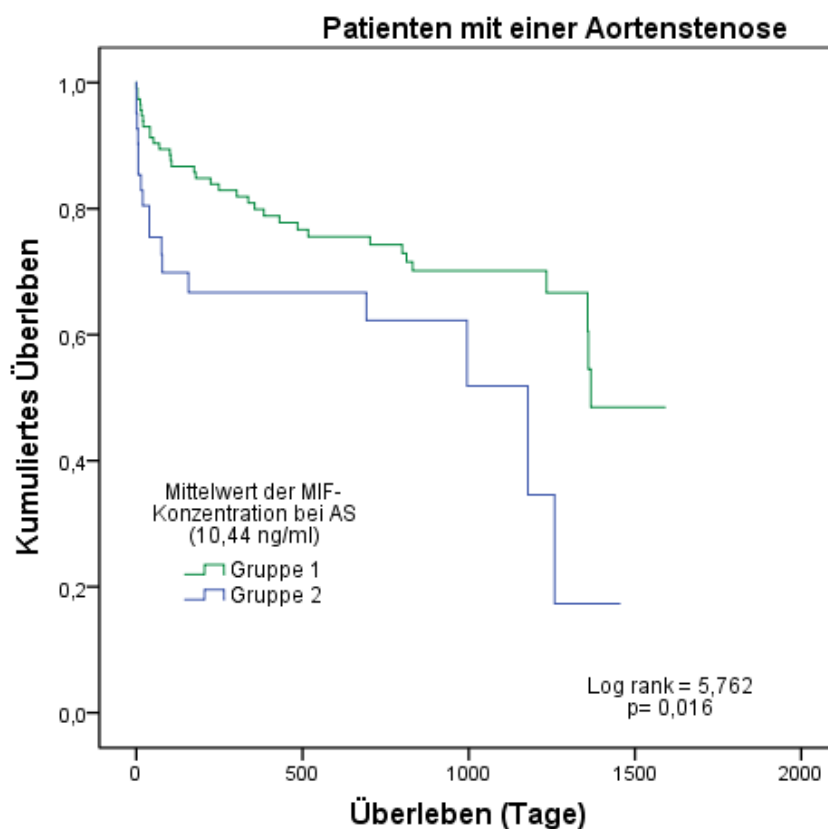
In Bezug auf Tabelle 3 korreliert der Gremlin-1-Wert signifikant positiv mit dem MIF-Wert ( $r=0,205$ ,  $p<0,01$ ). Der TGF- $\beta$ 1-Wert korreliert ebenfalls signifikant positiv mit dem MIF-Wert ( $r=0,210$ ,  $p<0,01$ ).

### **3.8 Die Plasmakonzentrationen von MIF und Gremlin-1 sind assoziiert mit dem Auftreten des Endpunktes**

In unseren Analysen fanden wir, dass die Plasmakonzentrationen von MIF und Gremlin-1 eine Assoziation mit dem Auftreten eines definierten Endpunktes zeigten.

Die Einteilung der Patienten erfolgte jeweils in zwei Gruppen ober- und unterhalb des Mittelwertes der MIF- und Gremlin-1-Plasmakonzentration. Gruppe 1 wurde mit Werten unterhalb des Mittelwertes, Gruppe 2 mit Werten oberhalb des Mittelwertes definiert.

Betrachtet man die Patienten mit einer Aortenstenose (N=156) bezüglich der MIF-Konzentration im Plasma (10,44ng/ml, Mean) und dem Erreichen eines kombinierten Endpunktes, definiert als Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall oder Rehospitalisierung, so zeigte sich in unserer Kohorte, dass Patienten der Gruppe 2 signifikant häufiger den Endpunkt erreichten als Patienten der Gruppe 1 (Abb. 10, Log Rank= 5,762, p= 0,016).

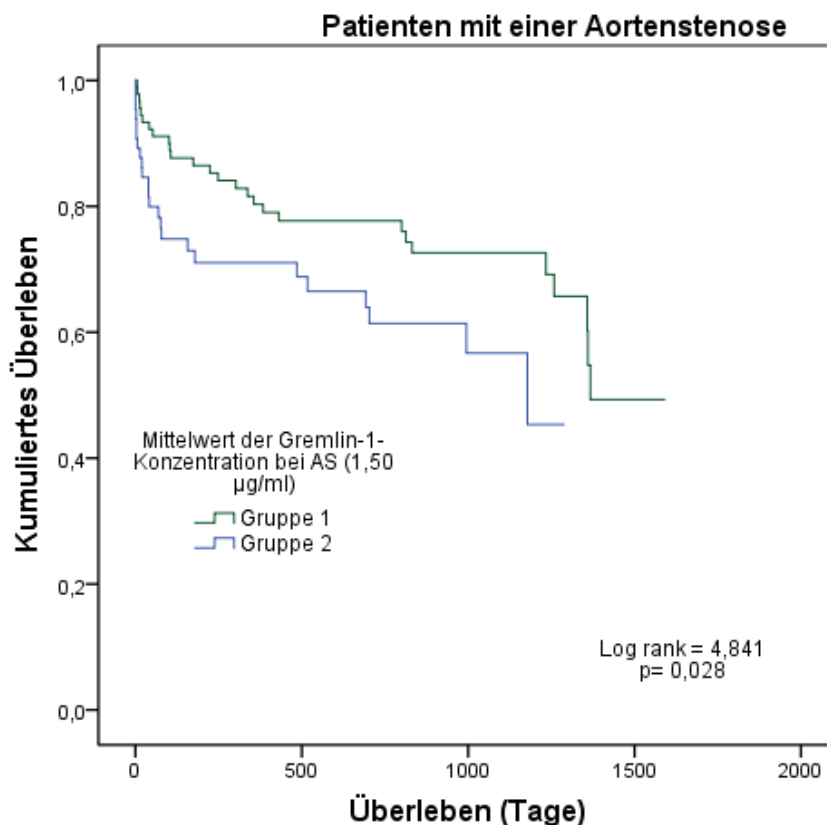


**Abbildung 10: Die MIF-Plasmakonzentration war bei Patienten mit einer AS assoziiert mit dem Auftreten eines kombinierten Endpunktes (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung) unter Einteilung der Patienten in zwei Gruppen.**

Patienten der Gruppe 2 (MIF-Mean > 10,44 ng/ml, N=41, Events= 17) erreichten signifikant häufiger einen kombinierten Endpunkt im Vergleich zur Gruppe 1 (MIF-Mean < 10,44 ng/ml, N=115, Events= 34), Log Rank= 5,762, p= 0,016.



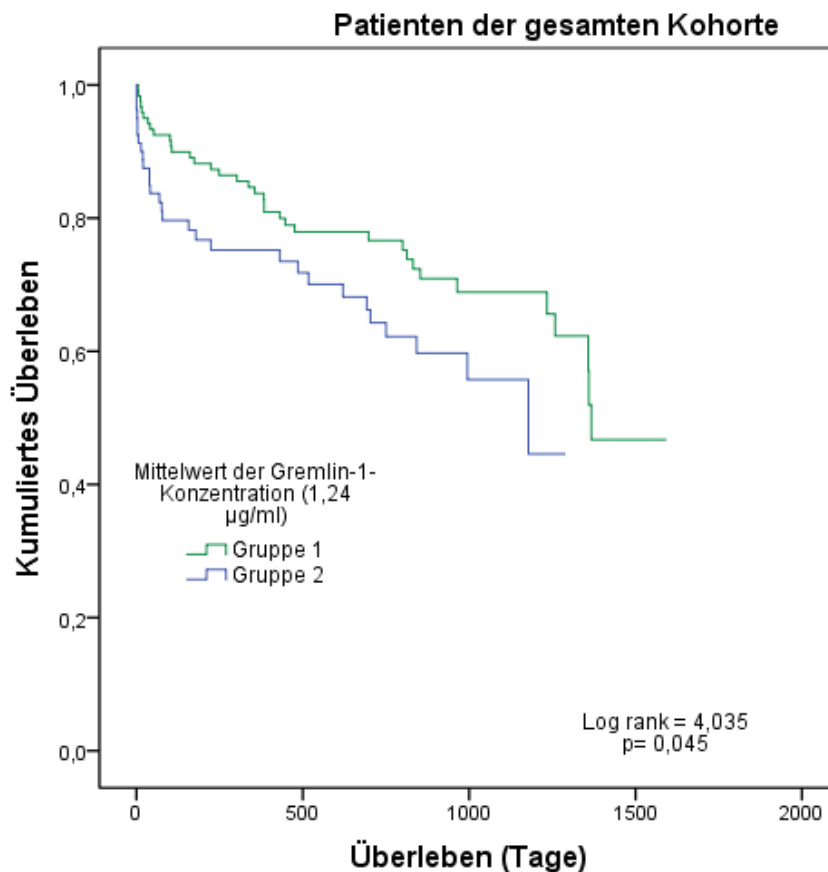
Dieselbe Beobachtung konnten wir für Patienten mit einer Aortenstenose (N=156) bezüglich der Gremlin-1-Werte im Plasma (1,50 µg/ml, Mean) und dem Erreichen eines kombinierten Endpunktes, definiert als Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall oder Rehospitalisierung machen. Patienten der Gruppe 2 erreichten signifikant häufiger den Endpunkt als Patienten der Gruppe 1 (Abb. 11, Log Rank= 4,841, p= 0,028)



**Abbildung 11: Die Gremlin-1-Plasmakonzentration war bei Patienten mit einer AS assoziiert mit dem Auftreten eines kombinierten Endpunktes (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung) unter Einteilung der Patienten in zwei Gruppen.**

Patienten der Gruppe 2 (Gremlin-1-Mean > 1,50 µg/ml, N=65, Events= 24) erreichten signifikant häufiger einen kombinierten Endpunkt im Vergleich zur Gruppe 1 (Gremlin-1-Mean < 1,50 µg/ml, N=91, Events= 27), Log Rank= 4,841, p= 0,028.

Betrachtet man die Patienten der gesamten Kohorte (N=201) bezüglich der Gremlin-1-Werte im Plasma (1,24 µg/ml, Mean) und dem Erreichen eines kombinierten Endpunktes, definiert als Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall oder Rehospitalisierung, so zeigte sich in unserer Kohorte, dass Patienten der Gruppe 2 signifikant häufiger den Endpunkt erreichten als Patienten der Gruppe 1 (Abb. 12, Log Rank= 4,034, p= 0,045).



**Abbildung 12: Die Gremlin-1-Plasmakonzentration war bei Patienten der gesamten Kohorte assoziiert mit dem Auftreten eines kombinierten Endpunktes (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung) unter Einteilung der Patienten in zwei Gruppen.**

Patienten der Gruppe 2 (Gremlin-1-Mean > 1,24 µg/ml, N=80, Events= 29) erreichten signifikant häufiger einen kombinierten Endpunkt im Vergleich zur Gruppe 1 (Gremlin-1-Mean < 1,24 µg/ml, N=121, Events= 36), Log Rank= 4,035, p= 0,045.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ergebnisdiskussionen

Unsere Arbeit konnte zeigen, dass die MIF-und-Gremlin-1-Expression bei Patienten mit einer AS signifikant höher ist als bei der gematchten Kontrollgruppe ohne AS (Abb.3, Abb. 4). Für die TGF- $\beta$ 1-Expression ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit einer AS und der gematchten Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen wurden in der degenerativen AS bisher in der Literatur nicht beschrieben und bieten einen interessanten Ansatz für weiterführende, prospektive Studien mit einem größeren Patientenkollektiv, um die hier erlangten Ergebnisse zu verifizieren und zu bestätigen. Hohe MIF-und Gremlin-1-Werte können als Hinweis auf eine vermehrt regulierte Inflammation und daraus resultierender Fibrose und Regeneration angesehen werden. Hohe Gremlin-1-Werte triggern Inflammation, Regeneration und Fibrose. Die Bestimmung von Gremlin-1 und MIF kann als diagnostisches und prognostisches Werkzeug dienen.

Eine weitere Beobachtung war, dass die Plasmaspiegel von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 signifikant positiv miteinander korrelieren. Der Gremlin-1-Wert korreliert signifikant positiv mit dem MIF-Wert (Tab. 3). Dies verdeutlicht die Bedeutung von Gremlin-1 und MIF als Gegenspieler nochmals. Es ist bereits bekannt, dass Gremlin-1 die MIF-Expression reguliert, *in vitro* direkt an MIF bindet und die Freisetzung von MIF aus intrazellulären Speichern von Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen reduziert [64]. Die Plasmaspiegel von TGF- $\beta$ 1 korrelieren ebenfalls signifikant positiv mit dem MIF-Wert (Tab. 3). Der Zusammenhang von TGF- $\beta$ 1 und MIF ist bis jetzt unbekannt und in der Literatur nicht beschrieben worden. TGF- $\beta$ 1-Signaling führt zur vermehrten Expression von BMPs [83]. Gremlin-1 ist ein endogener Antagonist der BMPs und reguliert so Vorgänge in der Inflammation, Kalzifikation und Ossifikation [ 54, 55]. Um abschließende Rückschlüsse ziehen zu können, müssten weitreichendere Studien durchgeführt werden.

Es konnten Zusammenhänge zwischen der Gremlin-1-Expression und dem kardialen Marker BNP am Tag der Intervention und am ersten Tag nach der Intervention gezeigt werden (Abb.5, Abb. 6). Die Gremlin-1-Konzentration korreliert signifikant mit den BNP-Werten am Tag nach der Intervention (Tab. 3). BNP dient zur Verlaufskontrolle und Risikoklassenbestimmung der Herzinsuffizienz. Bei der degenerativen AS sind erhöhte BNP-Werte ein Hinweis auf eine beginnende kardiale Dekompensation. Der Zusammenhang von hohen Gremlin-1-Werten mit einer Herzinsuffizienz und einer einhergehenden schweren Beeinträchtigung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) wurde bereits 2013 von unserer Arbeitsgruppe beschrieben und ist bekannt [80]. Somit ist Gremlin-1 bei degenerativen AS von großer Bedeutung. Es hat als diagnostisches Mittel einen Mehrwert und liefert weitere Informationen, welche das unspezifische BNP alleine nicht erbringen kann. Allein die Höhe des gemessenen Gremlin-1-Wertes könnte Rückschlüsse auf das Ausmaß der bereits vorhandenen Herzinsuffizienz und LVEF bei vorliegender AS zulassen. Durch die Informationen, welche Gremlin-1 zusätzlich zum BNP liefert, kann die degenerative AS besser beurteilt und somit auch besser behandelt werden.

Die Gremlin-1 Konzentration korreliert signifikant positiv mit den CRP-Werten am Tag der Intervention und am Tag nach der Intervention sowie dem Kreatininwert (Abb.5, Abb.6, Tab.3). Es zeigte sich außerdem eine signifikante negative Korrelation mit dem Hb-Wert am Tag der Intervention (Tab. 3). Aufgrund der proinflammatorischen Wirkung von Gremlin-1 ist eine Korrelation mit dem CRP-Wert erklärbar. Somit könnten aufgrund der Höhe der gemessenen Gremlin-1-Werte bereits Rückschlüsse auf das Ausmaß der Inflammation, der Regeneration und der Fibrose bei vorliegender AS gezogen werden. Eventuell lassen sich Störfaktoren, welche das CRP mitbeeinflussen, umgehen, sodass die Gremlin-1-Expression eine wichtige Zusatzinformation bei der degenerativen Aortenstenose liefert.

Patienten, welche in der Aggregometrie als ADP-Responder am Tag der Intervention angesehen wurden, wiesen im Vergleich zu Non-Respondern signifikant häufiger TGF- $\beta$ 1-Plasmaspiegel unterhalb des Mittelwertes der TGF- $\beta$ 1-Konzentration auf (Abb.7). Clopidogrel inhibiert den Adenosindiphosphat-(ADP) -Rezeptor vom Subtyp P2Y12, welcher sich auf der Oberfläche von Thrombozyten befindet [81]. Da TGF- $\beta$ 1 von Thrombozyten produziert wird [82], lässt sich eine Blockade des ADP-Rezeptors durch Clopidogrel eventuell mit einer verminderten Produktion von TGF- $\beta$ 1 erklären. Dies wurde bis jetzt allerdings noch nicht in der Literatur beschrieben. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob Patienten mit einer degenerativen AS und einem hohen TGF- $\beta$ 1-Plasmaspiegel eventuell von einer verstärkten Plättchenhemmung profitieren, beziehungsweise Hochrisiko-Patienten mit vorliegender AS durch eine Bestimmung des TGF- $\beta$ 1-Plasmaspiegels frühzeitig identifiziert und suffizienter behandelt werden können.

Patienten der gesamten Kohorte mit Frailty zeigten signifikant höhere MIF- und Gremlin-1-Konzentrationen im Plasma als Patienten ohne Frailty (Abb.8). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass eine Blockade von MIF verschiedene inflammatorische Mediatoren reduziert [71]. Da zwischen der Frailty und der Erhöhung inflammatorischer Markern wie TNF- $\alpha$  und hs-CRP eine starke Assoziation besteht [78], könnte man die erhöhten MIF-Werte beim Vorliegen von Frailty damit erklären. Da Gremlin-1 als Antagonist von MIF agiert [64], könnten diese Werte ebenfalls reaktiv erhöht sein. Somit lassen die gemessenen Gremlin-1- und MIF-Werte bereits Rückschlüsse auf den Zustand der Patienten mit und ohne degenerativer AS zu, sodass Hochrisikopatienten frühzeitig erkannt und besser behandelt werden können.

In unseren Analysen fanden wir, dass die Plasmakonzentrationen von MIF und Gremlin-1 eine Assoziation mit dem Auftreten des klinischen Endpunktes zeigten. Patienten mit einer AS, welche mit dem MIF-Plasmaspiegel oberhalb des Mittelwertes der MIF-Konzentration bei AS lagen, erreichten signifikant häufiger einen kombinierten Endpunkt (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung) (Abb.10). Patienten mit einer AS und einem Gremlin-1-Plasmaspiegel oberhalb des Mittelwertes der Gremlin-1-Konzentration bei AS, erreichten ebenfalls signifikant häufiger einen kombinierten Endpunkt (Abb.11). Auch die Patienten der gesamten Kohorte, welche mit dem Gremlin-1-Plasmaspiegel oberhalb des Mittelwertes der Gremlin-1-Konzentration lagen, erreichten signifikant häufiger einen kombinierten Endpunkt (Abb.12). Die Zusammenhänge von Gremlin-1 und MIF bei Patienten mit einer AS und dem Erreichen von Endpunkten ist weitgehend unbekannt und bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben. Es wäre durchaus denkbar, Patienten mit hohen Gremlin-1- und MIF-Werten schon zu Beginn einer Behandlung als Hochrisiko-Patienten zu identifizieren und dementsprechend zu behandeln. Um die Hypothese zu bestätigen und zu stützen, müssten groß angelegte Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten durchgeführt werden um gegebenenfalls frühzeitig Hochrisikopatienten für einen rasch progredienten Krankheitsverlauf der AS zu identifizieren und enghemmaschiger zu kontrollieren.

## **4.2 Limitationen der Studie**

Die vorgelegte Arbeit ist eine retrospektive Beobachtungsstudie und somit nicht prospektiv. Um eine fundierte Aussage bezüglich der diagnostischen und prognostischen Rolle von TGF- $\beta$ 1, Gremlin-1 und MIF als Bio-Marker für AS, deren Assoziationen mit dem Auftreten und dem Schweregrad von AS sowie den kardiovaskulären Risikofaktoren, den inflammatorischen Markern und dem Outcome der Patienten treffen zu können, wäre eine groß angelegte prospektive Studie mit einer weitaus größeren Anzahl an Patienten erforderlich. Sie dient daher zur Hypothesengenerierung.

### 4.3 Schlussfolgerung

Die beschriebenen Ergebnisse zeigten eine signifikante und unabhängige Assoziation erhöhter MIF- und Gremlin-1-Konzentrationen, jedoch nicht der TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen, bei Patienten mit einer AS im Vergleich zu den Patienten der gematchten Kontrollgruppe ohne AS. Der Gremlin-1-Plasmaspiegel korreliert mit den Parametern einer Herzinsuffizienz, was zuvor bereits beschrieben wurde [80]. Durch den Zusammenhang der TGF- $\beta$ 1-Plasmaspiegel mit ADP-Respondern könnten Risikopatienten schneller identifiziert und suffizienter behandelt werden. Es gilt zu prüfen, ob solche Patienten von einer vermehrten Plättchenhemmung profitieren. Da Patienten mit einer AS und hohen MIF- und Gremlin-1-Plasmakonzentrationen signifikant häufiger einen kombinierten Endpunkt erreichen, wäre dies als diagnostisches und prognostisches Kriterium zur Identifizierung von Risikopatienten nutzbar. Eine gezielte Blockade von MIF und Gremlin-1 wäre nach Durchführung großer, weiterführender Studien ein interessanter und vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt bei der Therapie der degenerativen Aortenstenose.

## 5 Zusammenfassung

Die degenerative, kalzifizierende AS ist in den Industrieländern die häufigste Klappenerkrankung mit einer zunehmenden Prävalenz im Alter. Durch eine immer älter werdende Bevölkerung werden wir zunehmend mit Erkrankungen des älteren Menschen konfrontiert. Trotz großer Bemühungen und umfangreicher Studien ist nach wie vor keine wirksame medikamentöse Therapie der AS etabliert. Daher liegt das Hauptaugenmerk aktueller Forschung auf der Identifizierung neuer Targets zur medikamentösen Therapie, um in das Vorschreiten der sklerotischen und stenotischen Vorgänge der AS eingreifen zu können. Dafür ist es notwendig die systemische und lokale Inflammation im Blut und an der Klappe besser zu verstehen und Zusammenhänge herauszuarbeiten.

Die aktuellen Kenntnisse der klinischen Bedeutung von MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 bei AS sind sehr gering. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1, Gremlin-1 und MIF im peripheren venösen Blut bei Patienten mit einer hochgradigen AS zu messen, um mögliche Assoziationen mit den inflammatorischen Markern und dem Outcome der Patienten herzustellen, anhand dieser Untersuchungen eine Aussage über die mögliche Rolle als Bio-Marker für AS treffen zu können und aufgrund dieser Aussagen eine diagnostische und prognostische Vorhersage für die Patienten treffen zu können. Insgesamt wurden 156 Patienten mit einer hochgradigen AS und 45 gematchte Kontrollpatienten ohne AS untersucht. Die Konzentrationen der Marker MIF, Gremlin-1 und TGF- $\beta$ 1 wurden mittels ELISA im EDTA-Plasma der Patienten bestimmt

Durch unsere Analysen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer AS höhere MIF- und Gremlin-1-Werte aufwiesen als ihre gematchte Kontrollgruppe, was als Hinweis auf eine vermehrt regulierte Inflammation und daraus resultierender Fibrose, Regeneration und Kalzifikation angesehen werden kann. Des Weiteren konnten Zusammenhänge zwischen der Gremlin-1-Expression und dem kardialen Marker BNP gezeigt werden, was Gremlin-1 auch als



diagnostischen Marker für eine Herzinsuffizienz mit reduzierter LVEF interessant macht. Patienten mit einer AS und erhöhten MIF- und Gremlin-1-Plasmakonzentrationen erreichten häufiger einen kombinierten Endpunkt (Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall, Rehospitalisierung).

MIF und Gremlin-1 könnten somit als Biomarker für die Diagnose und die Prognose einer AS dienen und zur Identifizierung von Risikopatienten und zur Vorhersage von Endpunkten herangezogen werden. Zusätzlich wäre eine Therapie in Form einer gezielten Blockade von MIF und Gremlin-1 ein interessanter und vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt bei der Therapie der degenerativen AS.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Gerd Herold und Mitarbeiter, Innere Medizin, Köln 2014, S. 172-175.
- 2 C.W. Hamm et al.: Diagnostische Herzkatheteruntersuchung. In: Clinical Research in Cardiology, Band 97, Nr. 8, S. 475–512 (2008).
- 3 Greten, Heiner; Greten, Tim; Rinninger, Franz: Innere Medizin, 13. vollständig überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2010.
- 4 Loomba RS and Arora R. Statin therapy and aortic stenosis: a systematic review of the effects of statin therapy on aortic stenosis. In: Am J Ther. 2010;17: e110-4.
- 5 Bischoff Angelika: Aortenstenose: Studie prüft präventive Wirkung von Statinen.  
In: Dtsch Arztebl 2006; 103(44): A-2964 / B-2582.
- 6 Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, et al. for the SEAS (Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis)-Investigators. In: N Engl J Med. 2008; 359:1343-1356.
- 7 Kaden J.J.: Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenstenose  
In: Herz; Oktober 2006; 31(7): 620–628.
- 8 Baumgartner; Falk; Bax; De Bonis et al.: 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. In: European Heart Journal, Volume 38, Issue 36, 21 September 2017, Pages 2739–2791.
- 9 Roskamm, H., Neumann, F.-J., Kalusche, D., Bestehorn, H.-P. (Hrsg.): Herzkrankheiten: Pathophysiologie Diagnostik Therapie, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2004; 29(9): 699.
- 10 Ehlers, Christoph; Andresen, Dietrich: Diagnostik von Synkopen.  
In: Dtsch Arztebl 2006; 103(7): A-412 / B-357 / C-340.
- 11 Hainsworth R: Syncope and fainting: classification and pathophysiological basis. In: Mathias CJ, Bannister R, Hrsg.: Autonomic failure. A textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system, 4th edition Oxford: Oxford University Press 1999: 428–36.
- 12 Kroidl, R.; Schwarz, S.; Lehnigk, B.; Fritsch, J.: Kursbuch Spiroergometrie: Technik und Befundung verständlich gemacht, 3. Vollständig überarbeitete Auflage, In: Thieme Verlag, Leipzig 2015; 3(8): 154-156.

- 13 Treede, H.: Refresher Innere Medizin: Aortenklappenstenose– Diagnose und Therapieoptionen, In: Thieme-Refresher Innere Medizin 2016: R25–R40.
- 14 Akat K, Borggreffe M and Kaden JJ. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. In: *Heart*. 2009; 95:616-23.
- 15 Bergler-Klein J, Klaar U, Heger M, Rosenhek R, Mundigler G, Gabriel H, Binder T, Pacher R, Maurer G, Baumgartner H. Natriuretic peptides predict symptom-free survival and postoperative outcome in severe aortic stenosis. In: *Circulation* 2004; 109: 2302–2308.
- 16 Clavel MA, Malouf J, Michelena HI, Suri RM, Jaffe AS, Mahoney DW, Enriquez-Sarano M. B-type natriuretic peptide clinical activation in aortic stenosis: impact on long-term survival. In: *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 2016–2025.
- 17 Barbieri FA. Prädiktoren für postoperatives Überleben bei Patienten mit hochgradiger Aortenstenose. In: DGK Pressemitteilungen, 82. Jahrestagung 2016.
- 18 Yip CY, Simmons CA. The aortic valve microenvironment and its role in calcific aortic valve disease. In: *Cardiovasc Pathol*. 2011 May-Jun;20(3):177-82.
- 19 Akat K, Borggreffe M, Kaden JJ. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. In: *Heart*. 2009 Apr;95(8):616-23.
- 20 Hruska KA, Mathew S and Saab G.: Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. In: *Circ Res*. 2005; 97:105-14.
- 21 Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM and Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. In: *J Clin Invest*. 1993; 91:1800-9.
- 22 Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL and Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. In: *N Engl J Med*. 2005; 352:1959-66.
- 23 Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC and He TC. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. In: *Front Biosci*. 2008; 13:2001-21.
- 24 Armstrong EJ and Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. In: *Circ Res*. 2004; 95:459-70.

- 25 Johnson RC, Leopold JA and Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. In: *Circ Res*. 2006; 99:1044-59.
- 26 Mohler ER, 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG and Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. In: *Circulation*. 2001; 103:1522-8.
- 27 Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C and Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1998-2003.
- 28 Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, 3rd and Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. In: *Ann Thorac Surg*. 2003; 75:457-65; discussion 465-6.
- 29 Chester AH and Taylor PM. Molecular and functional characteristics of heart-valve interstitial cells. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007; 362:1437-43.
- 30 Laird DF, Mucalo MR, Yokogawa Y. Growth of calcium hydroxyapatite (Ca-HAp) on cholesterol and cholestanol crystals from a simulated body fluid: A possible insight into the pathological calcifications associated with atherosclerosis. In: *J Colloid Interface Sci*. 2006 Mar 15;295(2):348-63.
- 31 Wang HP, Feng XJ, Gou BD, Zhang TL, Xu SJ, Wang K. Effects of LDL, cholesterol, and their oxidized forms on the precipitation kinetics of calcium phosphates. In: *Clin Chem*. 2003 Dec;49(12):2027-36.
- 32 Schoen FJ, Levy RJ. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. In: *J Biomed Mater Res*. 1999 Dec 15;47(4):439-65.
- 33 Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM and O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. In: *Circulation*. 1994; 90:844-53.
- 34 Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. In: *Circulation*. 2011 Oct 18;124(16):1783-91.

- 35 Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. In: *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1211-7.
- 36 Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. In: *Circulation*. 1994 May;89(5):2462-78.
- 37 Wallby L, Janerot-Sjoberg B, Steffensen T and Broqvist M. T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. In: *Heart*. 2002; 88:348-51.
- 38 Song R, Zeng Q, Ao L, Yu JA, Cleveland JC, Zhao KS, Fullerton DA, Meng X. Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Nov;32(11):2711-20.
- 39 Yan J, Stringer SE, Hamilton A, Charlton-Menys V, Götting C, Müller B, Aeschlimann D, Alexander MY. Decorin GAG synthesis and TGF- $\beta$  signaling mediate Ox-LDL-induced mineralization of human vascular smooth muscle cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Mar;31(3):608-15.
- 40 Taylor J, Butcher M, Zeadin M, Politano A, Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein promotes osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells by up-regulating Osterix expression in an Msx2-dependent manner. In: *J Cell Biochem*. 2011 Feb;112(2):581-8.
- 41 Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. In: *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jul 1;13(1):39-75.
- 42 Erridge C. The roles of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis. In: *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Feb;18(2):52-6.
- 43 Tintut Y, Patel J, Parhami F and Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. In: *Circulation*. 2000; 102:2636-42.
- 44 Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A, Cheng SL and Towler DA. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:2589-96.

- 45 Isoda K, Matsuki T, Kondo H, Iwakura Y and Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:708-15.
- 46 Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, Frutkin A, Dichek D and Giachelli CM. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. In: *Circ Res.* 2009; 104:733-41.
- 47 Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y and Ikeda Y. Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. In: *J Leukoc Biol.* 2003; 74:833-45.
- 48 Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, Ohanian J, Fridell YW and Canfield AE. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. In: *Circ Res.* 2003; 92:1123-9.
- 49 Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R and Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. In: *Nat Med.* 2010; 16:1400-6.
- 50 Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H and Kaneda Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354:453-8.
- 51 Ankeny RF, Thourani VH, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Nerem RM and Jo H. Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves--association with low BMP antagonists and SMAD6. In: *PLoS One.* 2011;6: e20969.
- 52 Ankeny RF, Thourani VH, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Nerem RM and Jo H. Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves--association with low BMP antagonists and SMAD6. In: *PLoS One.* 2011;6: e20969.
- 53 Canalis E, Economides AN and Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. In: *Endocr Rev.* 2003; 24:218-35.
- 54 Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM and Harland RM. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. In: *Mol Cell.* 1998; 1:673-83.

- 55 van Bezooijen RL, Papapoulos SE and Lowik CW. Bone morphogenetic proteins and their antagonists: the sclerostin paradigm. In: *J Endocrinol Invest.* 2005; 28:15-7.
- 56 Topol LZ, Bardot B, Zhang Q, Resau J, Huillard E, Marx M, Calothy G and Blair DG. Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of Drm/Gremlin. In: *J Biol Chem.* 2000; 275:8785-93.
- 57 Derwall M, Malhotra R, Lai CS, Beppu Y, Aikawa E, Seehra JS, Zapol WM, Bloch KD and Yu PB. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32:613-22.
- 58 National Center for Biotechnology Information: Gene ID: 26585: GREM1 gremlin 1, DAN family BMP antagonist [ *Homo sapiens* (human) ] URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26585> Stand 07.02.2016.
- 59 Chen B, Blair DG, Plisov S, Vasiliev G, Perantoni AO, Chen Q, Athanasiou M, Wu JY, Oppenheim JJ and Yang D. Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists Drm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. In: *J Immunol.* 2004; 173:5914-7.
- 60 Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Aros C, Ardiles L, Flores C, Carpio D, Carvajal G, Ruiz-Ortega M and Egido J. Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in glomerular crescents of pauci-immune glomerulonephritis. In: *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22:1882-90.
- 61 Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA and Brazil DP. Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. In: *Nephron Physiol.* 2006;103: p139-48.
- 62 Boers W, Aarrass S, Linthorst C, Pinzani M, Elferink RO and Bosma P. Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins. In: *J Biol Chem.* 2006; 281:16289-95.
- 63 Mueller KA, Tavlaki E, Schneider M, Jorbenadze R, Geisler T, Kandolf R, Gawaz M, Mueller, II and Zuern CS. Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. In: *J Card Fail.* 2013; 19:678-84.

- 64 Muller I, Schonberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, Leder C, Muller K, Lang M, Appenzeller F, Lunov O, Buchele B, Fahrleitner M, Olbrich M, Langer H, Geisler T, Lang F, Chatterjee M, de Boer JF, Tietge UJ, Bernhagen J, Simmet T and Gawaz M. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. In: *J Biol Chem*. 2013; 288:31635-45.
- 65 Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. & Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. In: *Microbes Infect*. 2002;4, 449–460.
- 66 Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. In: *J. Exp. Med*. 1994;179, 1895– 1902.
- 67 Bacher, M. et al. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. In: *Amer. J. Pathol*. 1997;150, 235–246.
- 68 National Center for Biotechnology Information: Gene ID: 4282: MIF macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) [ *Homo sapiens* (human) ]  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4282> Stand 17.03.2016.
- 69 Morand EF, Leech M and Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. In: *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5:399-410.
- 70 Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, Roller M, Bucala R and Weber C. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E- deficient mice. In: *Circulation*. 2004; 109:380-5.
- 71 Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, Wang B, Xie T, Fu H, Zhang Y, Satoskar AR, David JR, Metz CN, Bucala R, Fang K, Simon DI, Chapman HA, Libby P and Shi GP. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. In: *Circulation*. 2004; 109:3149-53.
- 72 Burger-Kentischer A, Gobel H, Kleemann R, Zerneck A, Bucala R, Leng L, Finkelmeier D, Geiger G, Schaefer HE, Schober A, Weber C, Brunner H, Rutten H, Ihling C and Bernhagen J. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). In: *Atherosclerosis*. 2006; 184:28-38.
- 73 EuroSCORE interactive calculator. EuroScore Study Group 2011 URL <http://www.euroscore.org/calc.html> Stand 08.04.2018.



- 74 Metzler B: SYNTAX-, STS- und EuroSCORE - Wie genau sind sie in der Risikobewertung bei Herzerkrankungen?  
In: Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology 2011; 18 (11-12): 355-361.
- 75 Online STS Adult Cardiac Surgery Risk Calculator. STS Adult Cardiac Surgery Database Version 2.81 URL  
<http://riskcalc.sts.org/stswebriskcalc/#/calculate> Stand 08.04.2018.
- 76 Framingham Coronary Heart Disease Risk Score. Estimates risk of heart attack in 10 years. URL <https://www.mdcalc.com/framingham-coronary-heart-disease-risk-score> Stand 08.04.2018.
- 77 National Heart, Lung and Blood Institute: Risk Assessment Tool for Estimating Your 10-year Risk of Having a Heart Attack URL  
<http://cvdrisk.nhlbi.nih.gov> Stand 28.02.2016.
- 78 Gerd Herold und Mitarbeiter, Innere Medizin, Köln 2014, S. 956.
- 79 Mario Herkommer, Tobias Geisler: Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion: pro und kontra. In: *Kardio up* (2010); 6(3): 202-207.
- 80 Mueller KA, Tavlaki E, Schneider M, Jorbenadze R, Geisler T, Kandolf R, Gawaz M, Mueller II, Zuern CS. Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. In: *J Card Fail.* 2013; 10: 678-84.
- 81 Gunther Hollopeter, Hans-Michael Jantzen, Diana Vincent, Georgia Li, Laura England, Vanitha Ramakrishnan, Ruey-Bing Yang, Paquita Nurden, Alan Nurden, David Julius & Pamela B. Conley. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs In: *Nature* 2001; 409: 202-207.
- 82 Grainger DJ, Wakefield L, Bethell HW, Farndale RW, Metcalfe JC. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. In: *Nat Med.* 1995; 9: 932-7.
- 83 Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. In: *Genes Dev.* 2000 Mar 15;14(6):627-44.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Innere Medizin, Abteilung für Kardiologie und Kreislauferkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Tobias Geisler sowie unter der wissenschaftlichen Anleitung durch Dr. med. Karin A. L. Müller durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit durch Frau Dr. med. Karin A. L. Müller und Prof. Dr. med. Tobias Geisler aus der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie und Kreislauferkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen.

Hiermit erkläre ich, Julia Brunner, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift „Die prognostische Bedeutung von Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) und seinem endogenen Antagonisten Gremlin-1 im Plasma von Patienten mit kalzifizierter Aortenstenose“ selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen von mir als solche gekennzeichnet wurden.

Die Durchführung der apparativen und laborchemischen Untersuchungen erfolgte durch Dr. med. Karin A. L. Müller, Prof. Dr. med. Tobias Geisler, Lydia Laptev und mich.

Die Datenauswertung erfolgte durch Dr. med. Karin A. L. Müller, Prof. Dr. med. Tobias Geisler und durch mich.

Die Rekrutierung der Patienten sowie die klinischen Follow-ups wurden durchgeführt durch Dr. med. Karin A.L. Müller und durch mich.

---

Ort, Datum

---

Julia Brunner

## 8 Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Müller K. A. L., Brunner J., Holzer N., Rath D., Zuern C., Gawaz M., Geisler T., Müller I. I.: Increased levels of Gremlin-1 and MIF but not TGF- $\beta$ 1 are associated with severe valvular aortic stenosis in symptomatic patients undergoing aortic valve repair. Clin Res Cardiol 105, Suppl 1, March 2016.

## 9 Danksagung

Für das zur Verfügung stellen des Themas und die Möglichkeit der spannenden wissenschaftlichen Mitarbeit sowie der Bereitstellung der Mittel zur Durchführung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz und Prof. Dr. med. Tobias Geisler bedanken.

Für die Betreuung der Dissertation möchte ich mich außerdem ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Tobias Geisler bedanken. Die gemeinsame Arbeit in der Arbeitsgruppe unter seiner Betreuung im Rahmen von Tuepic gab mir die Möglichkeit, einen guten Einblick in die klinische Forschung zu bekommen und mich aktiv an dieser zu beteiligen. Die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe war stets spannend und abwechslungsreich.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. Karin A. L. Müller für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Sie hatte stets ein offenes Ohr für Probleme und Fragestellungen bei der Erstellung der Dissertation. Ihr außergewöhnliches Engagement in der Betreuung, die vielen fachlichen Anregungen und zielorientierte Lösungsvorschläge erleichterten das Erstellen der Dissertation und zuvor die Erhebung der Studiendaten im Wesentlichen. Ihre stets fröhliche und sehr motivierende Art schaffte eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank gebührt der MTA Frau Lydia Laptev für die überaus liebevolle Betreuung und Einarbeitung im Labor. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hatte für jedes Problem einen Lösungsvorschlag parat. Dadurch wurde die Laborarbeit um ein Vielfaches erleichtert.

Zuletzt gilt noch ein weiterer großer Dank meinen Freunden, welche mich immer unterstützt und motiviert haben. Ein großer Dank geht an meine Schwester Karina Brunner und Stefanie Dietz fürs Korrekturlesen.