

# **Der Einfluss von Toll-like Rezeptor 3 und Melanom-Differenzierungsantigen 5 auf die Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenstenose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Ann-Sophie Stefanie Boucher**

aus Bonn

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer
2. Gutachter: PD Dr. Philipp Ludwig Lutz

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.11.2023

Aus der Klinik und Poliklinik Innere Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Meiner Familie gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Aortenklappenstenose	10
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Risikofaktoren	11
1.1.3 Symptomatik und Diagnostik	11
1.1.4 Anatomie der Aortenklappe	13
1.1.5 Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenstenose	14
1.1.6 Prävention und Statin Therapie	17
1.1.7 Therapieoptionen	17
1.2 Immunsystem	19
1.2.1 Erworbenes Immunsystem	19
1.2.2 Angeborenes Immunsystem	20
1.2.3 Mustererkennungsrezeptoren	20
1.2.4 Toll-like Rezeptoren	21
1.2.4.1 Toll-like Rezeptor 3	24
1.2.5 TLR3 und Atherosklerose/ Aortenklappenstenose	25
1.2.6 MDA5	26
1.3 Zielsetzung und Fragestellung	27
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Mausmodell	28
2.1.1 Echokardiographie	28
2.1.2 Drahtinduzierte Aortenklappenstenose	33
2.1.3 Euthanasie der Mäuse	34
2.2 Versuchsgruppen	35
2.2.1 TLR3 Stimulation mittels Poly(I:C)	35
2.2.2 TLR3 Knockout	35
2.2.3 TLR3 Antagonisierung mittels C4a	36
2.2.4 MDA5 Knockout	36
2.3 Histologie	37

2.3.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	37
2.3.2	CD68 Färbung	38
2.4	Statistik	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	TLR3 Stimulation mittels Poly(I:C)	39
3.2	TLR3 Knockout	41
3.3	TLR3 Antagonisierung mittels C4a	46
3.4	MDA5 Knockout	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Induktion der Aortenklappenstenose	58
4.2	Übertragung des Mausmodells auf die humane Situation	59
4.3	TLR3 bei kardiovaskulären Erkrankungen	60
4.4	MDA5 als weiterer RNA Rezeptor	62
4.5	Klinische Anwendbarkeit	63
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance
<b>AS</b>	Aortenklappenstenose
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMP-2</b>	Bone Morphogenetic Protein 2
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine
<b>CARD</b>	Caspase Activation and Recruitment Domain
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>C4a</b>	Compound-4a
<b>DAMP</b>	Damage Associated Molecular Pattern
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ds</b>	doppelsträngig
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>EUROSCORE</b>	European System for Cardiac Operative Risk Evaluation
<b>FKDS</b>	Farbkodierte Dopplersonographie
<b>H.E.</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin

<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>IRF3</b>	Interferon-Regulationsfaktor 3
<b>IVRT</b>	Isovolumetrische Relaxationszeit
<b>KÖF</b>	Klappenöffnungsfläche
<b>LDL</b>	Low-Density Lipoprotein
<b>MAL</b>	Myeloid Differentiation Factor 88 Adapter-like
<b>MAVS</b>	Mitochondrial Antiviral Signaling Protein
<b>MBL</b>	Mannose-bindendes Lektin
<b>MDA5</b>	Melanoma Differentiation Gene 5
<b>MPG</b>	Mean Pressure Gradient
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MyD88</b>	Myeloid Differentiation Factor 88
<b>n</b>	Größe der Stichprobe
<b>NAP1</b>	NAK-Associated Protein 1
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor Kappa B
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Pattern
<b>PBS</b>	Phosphat Buffered Saline
<b>Poly(I:C)</b>	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>PW</b>	Pulse-wave
<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>RD</b>	Regulatorische Domäne

<b>RIG-I</b>	Retinoic Acid Inducible Gene I
<b>RIP1</b>	Rezeptor-interagierendes Protein 1
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>s.c.</b>	subkutan
<b>ss</b>	einzelsträngig
<b>STS-PROM</b>	Society of Thoracic Surgeons-Predicted Risk of Mortality Score
<b>TAVI</b>	Transcatheter Aortic Valve Implantation
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor $\beta$
<b>TIR</b>	Toll/ IL-1-R-Domäne
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TRAF3</b>	TNF Receptor-Associated Factor 3
<b>TRIF</b>	TIR-Domain-Containing-Adapter-Inducing-Interferon- $\beta$
<b>VEC</b>	Valvular endothelial cell
<b>VIC</b>	Valvular interstitial cell
<b>Vmax</b>	maximale transvalvuläre Flussgeschwindigkeit
<b>WT</b>	Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1 Aortenklappenstenose

#### 1.1.1 Epidemiologie

Bei der Aortenklappenstenose (AS) handelt es sich in Europa und Nordamerika mit 43 % um das häufigste Herzklappenervitium (Herold, 2021). Sie ist definiert durch eine Abnahme der Öffnungsfläche der Aortenklappe und beinhaltet je nach Verlauf und Fortschritt ein breites Spektrum an Symptomen, entsprechend variiert die klinische Relevanz.

Bei der Pathogenese unterscheidet man zwischen der erworbenen kalzifizierenden AS, der angeborenen (kongenitalen) AS und der postinflammatorischen AS, meist als rheumatische Form in Folge einer Infektion mit Streptokokken der Lancefield Gruppe A. Letztere zeigt sich in Industrienationen aufgrund der Möglichkeit zur Antibiotikatherapie jedoch rückläufig (Herold, 2021).

Die kalzifizierende AS kann sowohl bei trikuspidaler als auch bei bikuspidaler (ca. 1 % der Gesellschaft) oder unikuspidaler (ca. 0.02 % der Gesellschaft) Klappe auftreten. Es handelt sich dabei um die häufigste Ätiologie der AS, insbesondere bei älteren Menschen. 2-3 % der Patienten über 65 Jahre sind betroffen, das Verhältnis von Männern zu Frauen steht bei 1,6:1. Die zeitliche Entwicklung der AS hängt hierbei stark von den Klappengegebenheiten ab. Bei unikuspidalen Klappen tritt die Erkrankung meist bereits im Jugendalter beziehungsweise (bzw.) jungem Erwachsenenalter auf. Die kalzifizierende AS bei bikuspidaler Klappe tritt im Schnitt 10-20 Jahre früher auf als bei trikuspidaler Klappe und wird dadurch auch früher therapiebedürftig (Ladich et al., 2011). Im Jahr 2000 lag die Zahl der Patienten mit kalzifizierender AS in den United States of America (USA) bei 2,5 Millionen, geschätzt wird, dass es sich im Jahr 2030 um 4,5 Millionen handeln wird. Es werden 2030 ca. 72 Millionen Menschen im Alter von über 75 Jahren erwartet (Yutzey et al., 2014; Thaden et al., 2014). Die Erhöhung der Prävalenz der AS in den nächsten Jahrzehnten liegt zum einen im demographischen Wandel mit einer dauerhaft älter werdenden Gesellschaft begründet, da das Alter eine entscheidende Rolle als Risikofaktor spielt. Zum anderen stellt der Mangel an präventiven Optionen eine große Problematik dar (Osnabrugge et al., 2013; Lindman et al., 2016).

### 1.1.2 Risikofaktoren

In verschiedenen klinischen und epidemiologischen Studien konnten einige Risikofaktoren für das Entstehen einer kalzifizierenden AS benannt werden. Diese zeigen viele Gemeinsamkeiten mit den allgemein bekannten Risikofaktoren für Atherosklerose. Dazu gehören mit größter Relevanz das Alter und das männliche Geschlecht. Außerdem stellten sich auch modifizierbare Risikofaktoren wie das metabolische Syndrom, Diabetes mellitus Typ 2 und Hypertonus, Adipositas und Nikotinabusus dar, jedoch mit weniger ausgeprägter Korrelation (Yutzey et al., 2014). Viele weitere Erkrankungen, beispielsweise (bspw.) Nierenerkrankungen konnten ebenfalls als Risikofaktoren erkannt werden. Dazu zählen eine generelle Niereninsuffizienz und Störungen im Kalzium- und Phosphathaushalt, zum Beispiel (z.B.) auch bei Hyperparathyreoidismus (Stewart et al., 1997).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass erhöhte Lipoprotein(a)-Spiegel als unabhängiger Risikofaktor in direktem Zusammenhang mit der kalzifizierenden AS stehen (Hu et al., 2022; Kamstrup et al., 2014). Die Erhöhung des Serumspiegels auf >50 mg/dl geht bereits mit einer doppelt so schnellen Entwicklung der AS einher (Capoulade et al., 2015).

Gleiches gilt für die Hyperlipidämie und insbesondere die Hypercholesterinämie, vor allem Patienten mit trikuspidaler kalzifizierender AS zeigten hier signifikant erhöhte Serum Spiegel (Chui et al., 2001; Thanassoulis et al., 2010).

Außerdem stellt, wie oben bereits erläutert, ein abnormaler Aufbau der Aortenklappe in Form einer bikuspiden oder unikuspiden Klappe einen relevanten Risikofaktor dar.

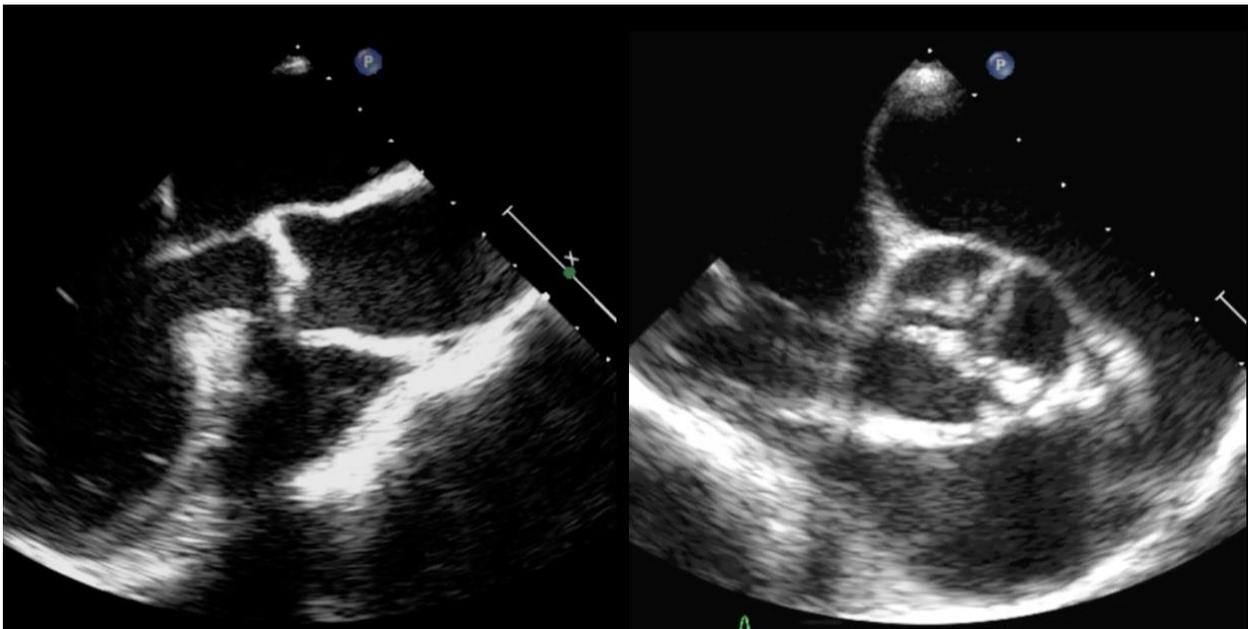
### 1.1.3 Symptomatik und Diagnostik

Die Erkrankung schreitet langsam über Jahre fort. Einige Patienten bleiben daher eine lange Zeit asymptomatisch, was teilweise zu einer verspäteten Diagnose führt. 5-10 % der Patienten erhalten diese erst bei Symptombeginn oder Dekompensation, was wiederum die Prognose der Patienten verschlechtert. Erschwerend kommt hinzu, dass die Patienten meist ein hohes Lebensalter aufweisen und somit häufig Komorbiditäten mitbringen. In der Regel kommt es erst bei ausgeprägten Verkleinerungen der Klappenöffnungsfläche auf <1,5 bzw. 1,0 cm<sup>2</sup> im Sinne einer mittel- bis hochgradigen AS zu hämodynamischer Relevanz und somit zu Symptombeginn. Treten Beschwerden wie

Angina Pectoris, Dyspnoe, Schwindel oder Synkopen auf, steigt die Mortalität in den nächsten zwei Jahren ohne Therapie auf ca. 50 % (Makkar et al., 2012).

Die Diagnostik der AS kann anhand verschiedener Untersuchungsmethoden erfolgen. In der Auskultation lassen sich in Form eines spindelförmigen rauen Systolikums mit Punctum maximum im zweiten Interkostalraum rechts parasternal mit Fortleitung in die Karotiden und im Elektrokardiogramm (EKG) bei Stenosen höheren Grades in Form von Linksherzhypertrophiezeichen Hinweise auf eine AS finden. Schlussendlich handelt es sich bei der Echokardiographie, bzw. bei nicht ausreichender Qualität dieser der Linksherzkatheteruntersuchung, um den Goldstandard. (Herold, 2021).

In der transthorakalen Echokardiographie lässt sich mittels farbkodierter Dopplersonographie der mittlere Druckgradient über der Aortenklappe (MPG) und die maximale transvalvuläre Flussgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) messen (dadurch ist auch die Berechnung der Klappenöffnungsfläche (KÖF) möglich) sowie Größe und Funktion der Ventrikel bzw. Vorhöfe beurteilen. Weiterhin steht auch die transösophageale Echokardiographie zur Verfügung. Prinzipiell ist die Erhebung dieser Parameter auch mittels Magnetresonanztomographie (MRT) bzw. Computertomographie (CT) möglich, die Ultraschalluntersuchung bringt jedoch unter anderem durch ihre schnelle und einfache Verfügbarkeit sowie Harmlosigkeit viele Vorteile mit sich (Vahanian et al., 2022).



**Abb. 1:** Darstellung einer AS in der Echokardiographie

Sollte die nicht invasive Diagnostik nicht ausreichen, gibt es weitergehend die Möglichkeit zur invasiven Messung der Druckgradienten mittels Linksherzkatheteruntersuchung.

Der Schweregrad der AS lässt sich in leicht, mittel und schwer einteilen. Hierbei spielen die KÖF, deren Verhältnis zur Körperoberfläche, der MPG und Vmax eine entscheidende Rolle (Herold, 2021).

So stellt sich bei einer KÖF  $>1,5 \text{ cm}^2$  eine leichte, bei  $1,0-1,5 \text{ cm}^2$  eine mittelgradige und bei  $<1,0 \text{ cm}^2$  eine schwere AS dar, eine gesunde Aortenklappe hat eine Öffnungsfläche zwischen 3 und 4 cm (Ladich et al., 2011).

**Tab. 1:** Diagnosekriterien AS im Herzultraschall (Vahanian et al., 2022; Herold, 2021)

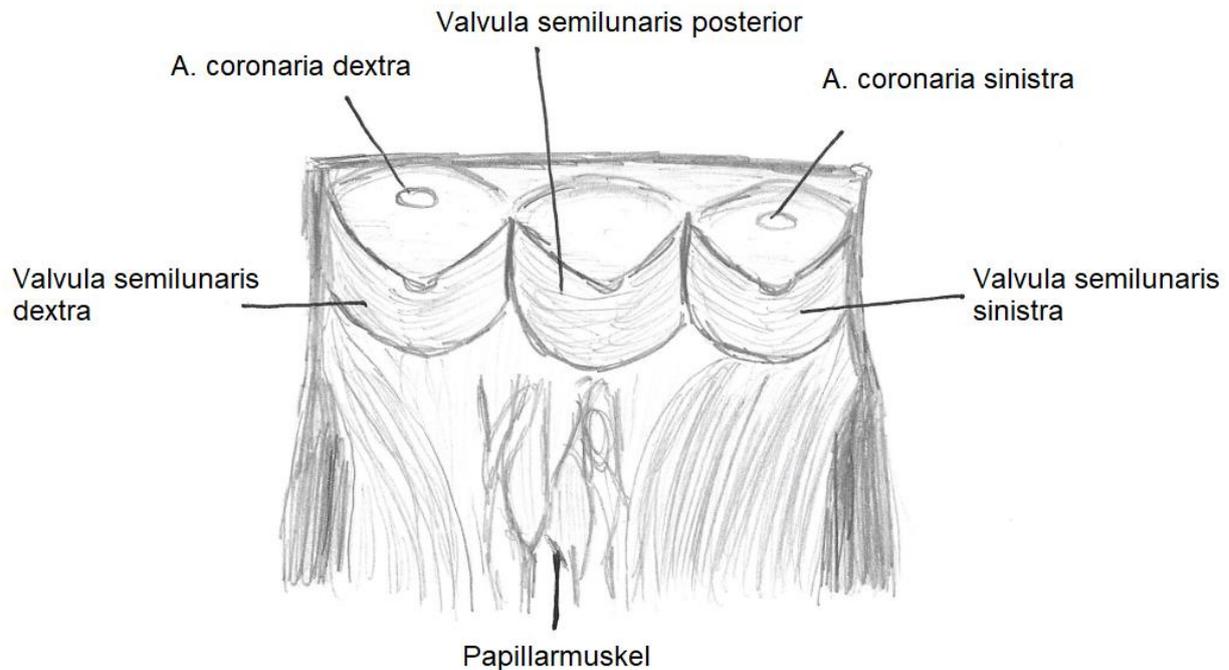
AS	leicht	mittelgradig	schwer
KÖF (cm <sup>2</sup> )	$> 1,5$	1-1,5	$< 1$
MPG (mmHg)	$< 25$	25-40	$> 40$
Vmax (m/s)	$< 3$	3-4	$> 4$

Eine Besonderheit bei der Diagnosestellung ergibt sich bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (EF) und AS. Hier kann durch die reduzierte linksventrikuläre Funktion kein erhöhter Gradient aufgebaut werden, sodass in den Ultraschalluntersuchungen niedrige transvalvuläre Gradienten gemessen werden. Dies nennt sich „low-flow, low-gradient-Aortenklappenstenose“. Auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener EF lässt sich diese Konstellation beobachten, es wird dann als „paradoxe low-flow, low-gradient AS“ bezeichnet (Herold, 2021; Vahanian et al., 2022; Bonow et al., 2008).

#### 1.1.4 Anatomie der Aortenklappe

Eine normale Aortenklappe besteht aus drei Taschenklappen, welche nach ihrer Lokalisation benannt sind. So gibt es die Valvula semilunaris dextra, sinistra und posterior bzw. septalis. Die Klappentaschen selbst bestehen wiederum aus drei Schichten, welche von Valvular Endothelial Cells (VECs) umgeben sind. Die drei Schichten wiederum beinhalten die sogenannten Valvular Interstitial Cells (VICs). Zum Ventrikel hin erstreckt sich die Ventrikularis aus kollagenen Fasern und Elastin, zur Aorta hin befindet sich die größte Schicht, die Fibrosa, bestehend aus kollagenen Fasern Typ 1 und Fibroblasten. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich die Spongiosa, hier finden sich lockeres

Bindegewebe sowie Glykosaminoglykane (Freeman und Otto, 2005; Lindman et al., 2016). Die verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen Bestandteilen haben in ihrer Gesamtheit die Funktion, die Aortenklappe zu schützen und den Prozess der Abnutzung durch wiederkehrende Öffnung und Schließung im Laufe des Lebens zu verlangsamen (Goody et al., 2020; Rutkovskiy et al., 2017).



**Abb. 2:** Sicht auf die aufgeklappte Aorta ascendens, die drei Taschen mit Einmündung der beiden Koronararterien sind zu erkennen (in Anlehnung an Gray und Lewis, 2000)

#### 1.1.5 Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenstenose

Lange dachte man, beim Pathomechanismus der AS handle es sich lediglich um einen degenerativen Prozess, allerdings stellte sich heraus, dass es viel mehr um einen aktiv regulierten zellulären Prozess geht, welcher durch endotheliale Schädigung und dadurch Inflammation hervorgerufen wird (Kwieceński et al., 2021; Rajamannan et al., 2011). Die Vergleichbarkeit mit dem Pathomechanismus der Atherosklerose ließ sich zunächst aufgrund der in großem Maße übereinstimmenden Risikofaktoren annehmen. Jedoch scheinen die beiden Erkrankungen mit einer Koinzidenz von ca. 60% einige Unterschiede aufzuweisen (Leon et al., 2016).

Bei der Pathogenese der AS lassen sich verschiedene Phasen unterscheiden, wobei die erste noch viele Gemeinsamkeiten mit der Pathogenese der Atherosklerose zeigt.

Zunächst kommt es in Folge einer chronischen Belastung zur Reizung und Schädigung des Endothels. Dies geschieht insbesondere durch die mechanischen Scherkräfte, bei der bikuspiden Aortenklappe deutlich ausgeprägter als bei der trikuspiden, wird jedoch auch durch verschiedenste Risikofaktoren ausgelöst und verstärkt (Lewin und Otto, 2005). Hier ist insbesondere die Endothelschicht in Richtung Aorta betroffen. Aufgrund der endothelialen Schäden können nun Lipoproteine, bspw. Low-Density Lipoprotein (LDL) und Lipoprotein B, (a) und E in die subendotheliale Fibrosa einwandern und dort akkumulieren (O'Brien et al., 1996; Freeman und Otto, 2005). Es kommt zur oxidativen Modifikation insbesondere von LDL in oxidiertes LDL. Die Stickstoffmonoxid-Synthase bildet reaktive Sauerstoffspezies und trägt damit erheblich zu diesem Prozess bei. Durch die oxidierten Lipoproteine werden nun verschiedenste Prozesse ausgelöst, welche allesamt zur weiteren Schädigung der Klappe und einer Inflammation führen. Zunächst sind oxidierte Lipoproteine selbst zytotoxisch. Weiterhin enthalten sie oxidierte Phospholipide, welche über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 stark proinflammatorisch wirken, dies führt zur Kalzifizierung valvulärer Zellen (Zeng et al., 2017; Parhami et al., 1997). Insgesamt kommt es durch die oxidative Modifikation und als Folge der Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Rezeptoren (PRR)) wie Toll-like Rezeptoren mit Aktivierung des Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) Signalwegs (die genaue Bedeutung der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und ihre Funktionsweisen werden in 1.2 näher erläutert) zu einer Einwanderung von Immunzellen. Dazu gehören bspw. Makrophagen, Cluster of Differentiation (CD) 4+ und CD8+ T-Zellen und Mastzellen, welche selber proinflammatorische Zytokine und proteolytische Enzyme produzieren. Die Makrophagen nehmen die Lipide auf und durch Ausschüttung von bspw. Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin 1 $\beta$  und Interleukin 6 kommt es zu einem fortlaufenden Kreislauf der Immunsystemaktivierung (Isoda et al., 2010; Galeone et al., 2013; Lee et al., 2010).

Außerdem kommt es zu einem fibrotischen Umbau des Gewebes. Der Umfang dieses Umbaus scheint einen großen Einfluss auf die Entstehung der Stenose zu haben. Es konnte festgestellt werden, dass insbesondere jüngere Patienten mit bikuspider Aortenklappe und auch Frauen bei noch deutlich geringerer Ausprägung der

Kalzifizierung bereits mehr fibrotischen Umbau aufwies (Shen et al., 2017; Simard et al., 2017). Die genauen Vorgänge bei der Fibrosierung sind nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Bekannt ist bereits, dass Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) von Bedeutung sind. Vor allem Angiotensin II ist ein Initiator von Inflammation und Fibrosierung (Helske et al., 2004).

Insgesamt führen also all diese verschiedenen zellulären Prozesse zu einer starken Inflammationsreaktion und Kalzium Einlagerung in die Zellen. Dadurch verändern sich die VICs, in dem entzündlichen Milieu werden sie immer weiter zur Differenzierung stimuliert. Es kommt zur Metaplasie, ein Teil der VICs wird zu Myelofibroblasten. Sie proliferieren und geben Kalzium und Phosphat als extrazelluläre Vesikel frei. Die VICs ähneln in diesem proliferierten Zustand dann osteoblastischen Zellen und die extrazellulären Vesikel ähneln Matrix Vesikeln die normalerweise im Knochen gebildet werden (Goettsch et al., 2016). Es werden Knochenmatrix-Proteine freigesetzt, welche einen Umbau der extrazellulären Matrix zur Folge haben, was wiederum eine ektopische Kalzifizierung mit Apoptose der Zellen bewirkt. Es handelt sich insofern um einen Teufelskreis, als diese Kalzifizierungen erneut Endothelreizung und somit Inflammationen auslösen, sodass die Erkrankung immer weiter fortschreitet (Kim, 1976; New et al., 2013). Die zuvor geschilderten Prozesse führen in ihrer Gesamtheit zu einer Obstruktion der Aortenklappe, welche wiederum die Funktion des linken Ventrikels beeinflusst. Je nach Ausprägung der Obstruktion kommt es zu einem erhöhten systolischen Druck, der im Endeffekt eine konzentrische Hypertrophie zur Folge hat. Zunächst ist es dem linken Herzen dadurch möglich, das Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten. Durch diese Kompensation entsteht oft zunächst zusätzlich auch eine diastolische Dysfunktion mit Rückstau vom Blut in die Lunge. Durch die fortschreitende Linksherzhypertrophie kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf der Myozyten und erhöhter Wandspannung, der subendokardiale Blutfluss kann gestört werden, was das Symptom Angina pectoris erklärt (Lindman et al., 2016; Herold, 2021; Zheng et al., 2020). Durch die resultierende systolische Herzinsuffizienz kann es dann über ein vermindertes Schlagvolumen, reduziertes Herzzeitvolumen, zerebrale Minderperfusion von Synkopen und Rhythmusstörungen zur kardialen Dekompensation kommen.

### 1.1.6 Prävention und Statin Therapie

Trotz der bekannten und mit Atherosklerose zum großen Teil übereinstimmenden Risikofaktoren konnte bisher keine Möglichkeit zur medikamentösen Prävention der Entwicklung der AS gefunden werden. Aufgrund der Relevanz von Hypercholesterinämie bzw. Hyperlipidämie als Risikofaktor wurde zunächst in mehreren Studien der Einfluss von cholesterin- bzw. lipidsenkenden Medikamenten auf die Progression der AS untersucht. Jedoch konnten die neuesten dieser Studien (SEAS, ASTRONOMER, SALTIRE) keinen positiven Effekt auf den Krankheitsfortschritt vermerken, weder schritt dieser langsamer fort, noch kam es zu einer Verbesserung der Situation (Cowell et al., 2005; Chan et al., 2010; Rossebø et al., 2008). Lediglich in der RAAVE Studie konnte ein Unterschied und sogar eine Verbesserung bei den Patienten mit mittlerer bis schwerer AS verzeichnet werden, die Rosuvastatin erhielten (Moura et al., 2007). Insgesamt konnte die Statintherapie somit jedoch bisher keine besonderen Erfolge in Bezug auf die Progression der AS erzielen. Gründe dafür könnten der sich unterscheidende Pathomechanismus im Vergleich zur Atherosklerose, welcher noch viele weitere Aspekte beinhaltet, oder auch die Notwendigkeit einer viel früheren und längeren Einnahme der Medikamente sein, da die Entwicklung der AS einem langen Prozess unterliegt.

### 1.1.7 Therapieoptionen

Aufgrund des Mangels an medikamentöser Therapie stellt der Aortenklappenersatz die einzige Therapieoption dar. Hier lässt sich zwischen chirurgischem und interventionellem Klappenersatz unterscheiden.

Die häufigste Indikation für den Ersatz ist ein symptomatischer Patient. Insofern betrifft es meist Patienten mit schwerer AS mit einer Klappenöffnungsfläche  $<1\text{cm}^2$  bzw. einer maximalen transvalvulären Flussgeschwindigkeit  $> 4,0\text{ m/s}$  sowie relevante „low-flow, low-gradient AS“, aber auch Patienten mit AS und fortgeschrittener linksventrikulärer Insuffizienz (Herold, 2021).

Bei asymptomatischen Patienten ist die Indikation differenzierter zu stellen. Haben die Patienten eine reduzierte linksventrikuläre EF auf  $<50\%$  besteht die Indikation. Gleiches gilt für Patienten mit schwerer AS und reduzierter Belastbarkeit. Auch bei Patienten mit einem abnormal schnellen Krankheitsfortschritt steht trotz fehlender Symptome die Indikation zum Klappenersatz. Außerdem sollte asymptomatischen Patienten, die sich

anderweitig ohnehin einem kardiochirurgischen Eingriff unterziehen, ein Ersatz der Klappe im Zuge des anstehenden Eingriffs angeboten werden (Otto et al., 2021; Vahanian et al., 2022).

Die Wahl der Methode zum Klappenersatz richtet sich individuell nach dem Patienten. Entscheidend sind hierbei vor allem die Vorerkrankungen, welche das Operationsrisiko beeinflussen. Um dieses Risiko zu ermitteln, wurden verschiedene Scores etabliert.

So gibt es bspw. den Society of Thoracic Surgeons-Predicted Risk of Mortality Score (STS-PROM) und das European System for Cardiac Operative Risk Evaluation (EuroSCORE). Beide Scores berücksichtigen insbesondere demographische und klinische Variablen. Zum Beispiel werden kardiale Vorerkrankungen wie auch Operationsbedingungen eingerechnet, um das Mortalitätsrisiko einzuschätzen (Bax et al., 2014).

Generell sollte der Patient unabhängig von der Wahl des Eingriffs von einem interdisziplinären Team betreut werden.

Beim operativen Klappenersatz, welcher lange Zeit die einzige Option überhaupt darstellte, zeigten sich bedingt durch die Komorbiditäten in höherem Alter insbesondere bei diesen Patienten viele Komplikationen. Daher ist diese Methode eher für Patienten mit einem niedrigen bis mittleren Operationsrisiko geeignet (Kanwar et al., 2018).

Der kathetergesteuerte interventionelle Klappenersatz, also die sogenannte Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI) hat in den letzten Jahren international immer mehr an Bedeutung gewonnen. In Deutschland hat diese Methodik den operativen Ersatz mittlerweile als häufigsten Eingriff abgelöst, auch in den USA nimmt die Zahl stetig zu (Grover et al., 2017; Reinöhl et al., 2015). Durch verhältnismäßig deutlich geringere Invasivität reduzieren sich hier auch die postinterventionellen Komplikationen, die bei einer Operation zu erwarten wären. Entsprechend wird der interventionelle Klappenersatz zwar insbesondere bei älteren oder vorerkrankten Patienten mit mittlerem bis hohem Operationsrisiko genutzt, die Indikation wird mittlerweile aber auch auf Patientengruppen mit niedrigerem Risiko ausgeweitet. Natürlich gibt es jedoch auch bei diesem Eingriff mögliche Komplikationen. Insbesondere die Entwicklung einer Aortenklappeninsuffizienz zeigt sich als unerwünschte Folge nach interventionellem Klappenersatz, andere Komplikationen sind Gefäßverletzungen, Herzrhythmusstörungen und akutes

Nierenversagen. Seltener kommt es zu postoperativen Schlaganfällen oder Aortenrupturen (Lindman et al., 2016; Kuck et al., 2020).

Patienten, deren Lebenserwartung weniger als ein Jahr beträgt, erhalten in der Regel keinen Aortenklappenersatz (Kanwar et al., 2018).

Durch die Möglichkeit, auch solchen Patienten einen Klappenersatz zukommen zu lassen, welche aufgrund mangelnder Operabilität sonst keine neue Klappe hätten erhalten können, kann nun vielen, insbesondere älteren Patienten eine höhere Lebenserwartung und mehr Lebensqualität geschenkt werden. Patienten die sonst keine Therapie erhalten hätten, zeigten in der PARTNER Studie eine um 20 % reduzierte 1-Jahres-Mortalität (Leon et al., 2010).

## 1.2 Immunsystem

Das Immunsystem spielt für den Menschen von Beginn an eine entscheidende Rolle in der Abwehr vielzähliger Pathogene – Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten und Prionen. Seine Hauptaufgabe ist es, den Menschen vor Infektionen zu schützen bzw. auf diese möglichst schnell zu reagieren und fremde Moleküle zu erkennen, ohne dabei körpereigene Moleküle anzugreifen. Die Differenzierung zwischen fremd und körpereigen ist also von großer Bedeutung. Dementsprechend gibt es eine Vielzahl an Mechanismen, um diese Differenzierung zu gewährleisten (Pape et al., 2018).

Zunächst lässt sich zwischen zwei Arten des Immunsystems unterscheiden, welche sich wiederum ebenfalls weiter unterteilen lassen. So gibt es das angeborene Immunsystem, welches sofort zur Verfügung steht und zu einer sehr schnellen, eher undifferenzierten Immunantwort führt. Im Gegensatz dazu werden die Funktionen des erworbenen Immunsystems im Laufe des Lebens entwickelt und immer weiter modifiziert, sodass eine deutlich spezifischere Immunantwort möglich ist. Diese erfolgt jedoch entsprechend langsamer als die schnelle angeborene Immunantwort. Gemeinsam gelingt es den beiden Formen der Immunabwehr die meisten eindringenden Pathogene abzuwehren (Chaplin, 2010; Neumann, 2008).

### 1.2.1 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem wird auch als spezifisches Abwehrsystem bezeichnet, da es die Fähigkeit besitzt, fremde Moleküle genau zu erkennen und somit auch präzise zu

eliminieren. Es beinhaltet ein zelluläres Gedächtnis, sodass die spezifischen Wege zur Elimination bestimmter Moleküle und Pathogene über Jahre hinweg immer wieder abgerufen werden können (Pape et al., 2018).

### 1.2.2 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet eine erste Barriere zwischen Umwelt und Organismus. Dabei lässt sich zwischen mechanischen bzw. physischen Barrierefunktionen und spezifischen Zellen wie auch Rezeptoren unterscheiden.

Zunächst stellen sich die Haut und somit die verschiedenen äußeren aber auch inneren epithelialen Schichten im gesamten Körper als Grenze zur Umwelt dar. Auch chemische Gegebenheiten wie bspw. die pH Unterschiede im Gastrointestinaltrakt sowie Verdauungsenzyme funktionieren als Abwehr. Viele sezernierte Flüssigkeiten wie bspw. Speichel oder Tränen mit antimikrobiellen Bestandteilen (Lysozym) sind von großer Bedeutung (Medzhitov und Janeway, JR, 2000).

Des Weiteren spielen zelluläre Bestandteile des Immunsystems eine entscheidende Rolle.

Hier stehen Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen im Vordergrund (Beutler, 2004b). Insbesondere Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen eliminieren Pathogene über Phagozytose. Die Pathogene erkennen sie anhand spezifischer Strukturen, welche von spezifischen Rezeptoren, den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren detektiert werden. Diese werden in 1.2.3 ausführlich besprochen. Außerdem fungieren vor allem dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen und kommunizieren so mit dem erworbenen Immunsystem (Bar-On und Jung, 2010). Die bei der angeborenen Immunabwehr beteiligten Zellen sind bei Aktivierung in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu aktivieren um weitere Zellen anzulocken und somit die Immunreaktion zu verstärken (Gordon, 2002).

### 1.2.3 Mustererkennungsrezeptoren

Wie oben bereits erwähnt, existieren spezifische Rezeptoren, die den Zellen des angeborenen Immunsystems die genaue Erkennung pathogener Moleküle ermöglichen. Diese Rezeptoren werden Mustererkennungsrezeptoren oder auch Pattern Recognition

Rezeptoren (PRR) genannt. Ebenfalls erwähnt wurde bereits die große Relevanz der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden bei der Immunantwort, dies wird durch die PRR möglich.

PRR finden sich sowohl auf der Zelloberfläche immunologischer Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophilen, als auch intrazellulär, bspw. membrangebunden in (Endo-)Lysosomen. Sie kommen aber auch frei im Zytosol vor (Janeway, JR und Medzhitov, 2002). So lassen sich die PRR in lösliche und membrangebundene Rezeptoren unterscheiden. Zu den löslichen PRR gehören zum Beispiel das Mannose-bindende Lektin (MBL) oder die Retinoic Acid Inducible Gene I (RIG-I) ähnlichen Proteine, zu den membrangebundenen gehören unter anderem die C-Typ-Lektin-Rezeptoren und die Gruppe der Toll-like Rezeptoren, auf welche in 1.2.4 genauer eingegangen wird. Aufgabe der PRR ist es, bestimmte nicht-variable molekulare Strukturen der Pathogene zu erkennen, welche sich Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) nennen. Diese PAMPs finden sich nur auf bzw. in Mikroorganismen und nicht im eigenen Körper, wodurch die Unterscheidung körpereigenen und -fremden gewährleistet wird. Hier hat jeder PRR seine eigenen spezifischen PAMPs, die er erkennt, sodass eine Vielzahl verschiedener Strukturen abgedeckt wird, welche spezifisch für ein Pathogen sind. Beispiele dafür sind bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA), einzelsträngige wie auch doppelsträngige Ribonukleinsäure (ss/dsRNA), Peptidoglykane und Glykane (Medzhitov, 2009). Es werden jedoch teilweise auch körpereigene Strukturen von den PRR erkannt, welche sich Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) nennen. Sie werden bei verschiedensten Schädigungen von bspw. Epithel oder Endothel freigesetzt um an diesen geschädigten Stellen ebenfalls das Immunsystem zu aktivieren.

Durch Stimulierung der verschiedenen PRR werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die wiederum zur Expression proinflammatorischer Zytokine führen. Auf zellulärer Ebene werden die bereits genannten Zellen des angeborenen Immunsystems mobilisiert und aktiviert, sodass es bspw. durch Phagozytose zur Eliminierung der Krankheitserreger kommt (Kawai und Akira, 2010).

#### 1.2.4 Toll-like Rezeptoren

Bei den Toll-like Rezeptoren (TLR) handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine. Taufelien der Gattung *Drosophila* dienten zur Untersuchung und

Entdeckung. Die erste Identifikation der Rezeptoren im Säugetier erfolgte 1997 (Beutler, 2004a). Mittlerweile konnten 10 TLR im menschlichen Körper entdeckt werden, in der Maus ließen sich bereits 13 TLR finden (Kumar et al., 2009; Janeway, JR und Medzhitov, 2002). Alle TLR gleichen sich strukturell insofern, als sie eine Ektodomäne zur Ligandenbindung bestehend aus N-terminalen leucinreichen LRR-Sequenzen und eine intrazelluläre Toll/IL-1R-Domäne (TIR) mit Adaptermolekülen beinhalten (Kawai und Akira, 2010). Die verschiedenen TLR erkennen entsprechend auch verschiedene PAMPs und werden von unterschiedlichen Zellen exprimiert. So lassen sich TLR sowohl auf Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems finden. Des Weiteren werden sie auch von einigen Nicht-Immunzellen exprimiert. Tabelle 2 stellt eine Übersicht über die bekannten menschlichen TLR sowie einige der von ihnen erkannten PAMPs dar. Bei TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 handelt es sich um intrazelluläre Rezeptoren, welche an Endosomen/ Endolysosomen gebunden vorkommen. Die restlichen TLR befinden sich auf der Zellmembran (Kawai und Akira, 2010).

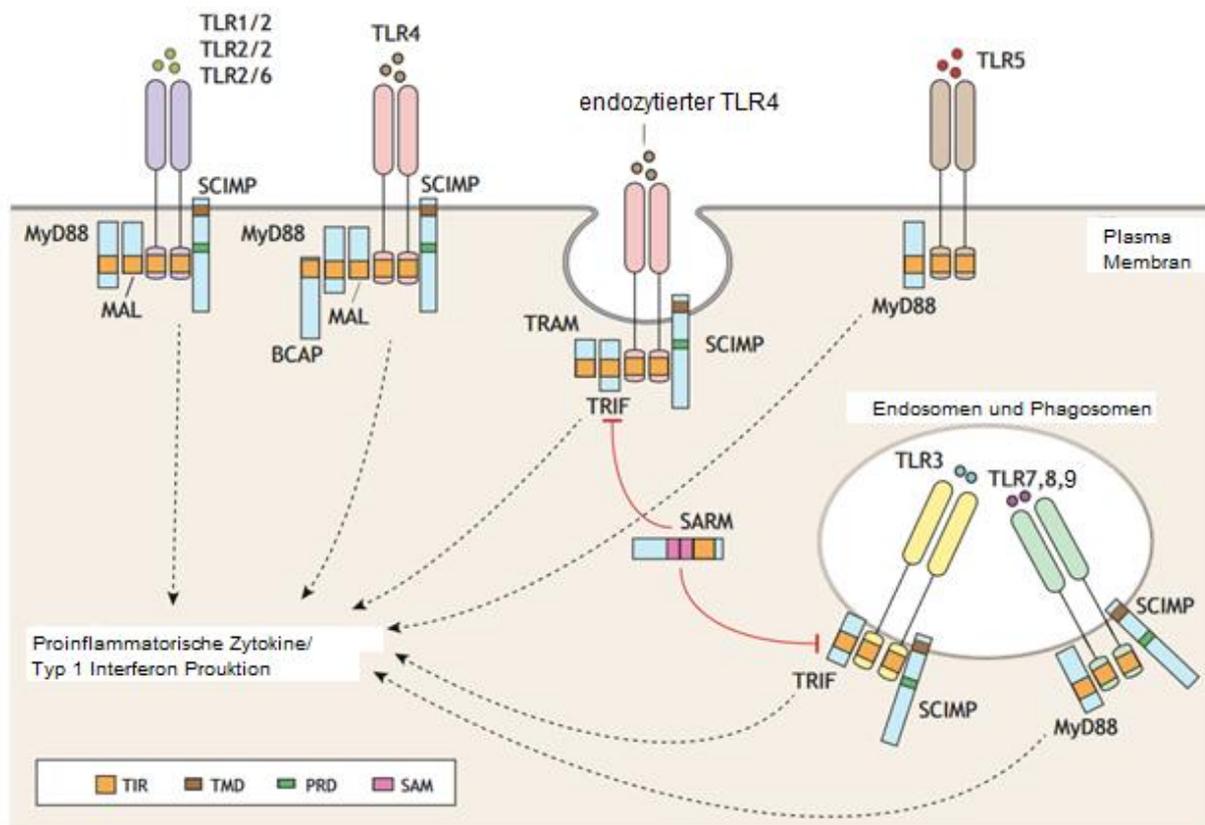
**Tab. 2:** Übersicht Toll-like Rezeptoren des Menschen, eine Auswahl ihrer zugehörigen PAMPs und Adaptermoleküle (Luo et al., 2019)

TLR	Ligand	Adaptermolekül
TLR1	Triacyl-Lipopeptide	MyD88/ MAL
TLR2	Glyco-, Lipo- und Proteolipide	MyD88/ MAL
TLR3	dsRNA	TRIF
TLR4	Lipopolysaccharide	MyD88/ MAL/ TRIF
TLR5	Bakterielles Flagellin	MyD88, TRIF
TLR6	Diacyl-Lipopeptide	MyD88/ MAL
TLR7	ssRNA, Imidazochinolin	MyD88
TLR8	ssRNA, Imidazochinolin	MyD88
TLR9	CPG dsDNA	MyD88/ MAL
TLR10	Virale Glykoproteine, dsRNA	MyD88

Abgesehen von der PAMP Erkennung haben die TLR außerdem die Fähigkeit, die in 1.2.3 erwähnten DAMPs zu erkennen. Hier handelt es sich um körpereigene Moleküle, welche bei Gewebeschäden freigesetzt werden (Seong und Matzinger, 2004).

Durch Ligandenbindung kommt es mit Hilfe von Adaptermolekülen zu einer Aktivierung von Signalwegen, welche am Ende die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zur Folge haben. Hier spielt insbesondere das Adaptermolekül Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) eine entscheidende Rolle, da es mit Ausnahme von TLR3 bei allen TLR an

der Aktivierung dieser Signalwege beteiligt ist, auch MyD88 Adapter-Like (MAL) ist oft beteiligt. Ein weiteres relevantes Adaptermolekül bei vielen TLR stellt das TIR Domain-Containing-Adaptor-Inducing-Interferon (IFN) - $\beta$  (TRIF) dar, welches auch bei TLR3 beteiligt ist (siehe Tab. 2) (Luo et al., 2019).



**Abb. 3:** Die verschiedenen Lokalisationen und Adaptermoleküle der TLR in Anlehnung an Luo et al., 2019

Die TLR bilden eine besondere Gruppe unter den PRR, indem der Aktivierung ihrer Signalwege keine direkte Phagozytose folgt. Stattdessen ist hier bspw. die Aktivierung des Interferon-Regulationsfaktor 3 (IRF3) Signalweges oder des NF- $\kappa$ B-Signalweges zu nennen, welcher direkt zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF und verschiedene Interleukinen wie IL-1, IL-6 und IL-12 führt (Janeway, JR und Medzhitov, 2002; Iwasaki und Medzhitov, 2004).

#### 1.2.4.1 Toll-like Rezeptor 3

Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist der TLR3. Dieser PRR wird insbesondere von dendritischen Zellen exprimiert und befindet sich intrazellulär, membrangebunden an Endosomen. Sein Ligand ist virale dsRNA, jedoch auch endogene RNA aus nekrotischen Zellen (Karikó et al., 2004).

Zur Bindung dieses Liganden dient die Ektodomäne, welche aus 23 regulären und 2 irregulären hufeisenförmig angeordneten LRRs besteht. Bis auf die laterale Oberfläche ist die Ektodomäne mit oligomannosereichen Zuckerresten glykosyliert und weist eine negative Ladung auf. Die nicht glykosylierte positiv geladene Fläche dient dabei als Bindestelle für den Liganden, da es sich bei diesem um eine negativ geladene Säure handelt. An besagter Stelle scheinen die beiden Aminosäuren Histidin und Asparagin eine große Rolle bei der Bindung zu spielen (Bell et al., 2006). Das pH-Optimum zur Ligandenbindung liegt bei einem pH von weniger als 4,2. Hier steigt die Affinität mit sinkendem pH (Fukuda et al., 2006).

Wie bereits erwähnt stellt der TLR3 eine Besonderheit unter den TLR dar, insofern als er als einziger von ihnen nicht über das Adaptermolekül MyD88 wirkt. Dazu fehlt die zur Bindung von MyD88 essenzielle Aminosäure Prolin, welche beim TLR3 an der entsprechenden Stelle durch Alanin ersetzt ist (Kaisho und Akira, 2001; Akira, 2003). Relevant ist bei diesem Rezeptor das Adaptermolekül TRIF, welches mit Hilfe weiterer Adaptermoleküle wie NAK-Associated Protein 1 (NAP1) und TNF Receptor-Associated Factor 3 (TRAF3) den Transkriptionsfaktor IRF3, bzw. mit Hilfe des Rezeptor-interagierenden-Proteins 1 (RIP1) den NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert (Vercammen et al., 2008; Lee et al., 2006; Meylan et al., 2004).

Durch die Aktivierung dieser Signalwege kommt es zur Ausschüttung verschiedener Typ 1 Interferone, proinflammatorischer Zytokine wie TNF und Interleukine, deren Funktion es ist, gegen die viralen Zellen und somit viralen Infektionen mittels Immunreaktion vorzugehen (Akira, 2003).

Um den TLR3 sowohl in vitro als auch in vivo bspw. in Mausmodellen stimulieren zu können, steht ein RNA Molekül aus einem Poly-Inosinsäure- und einem Poly-Cytidinsäure-Strang zur Verfügung. Die beiden Stränge binden über Wasserstoffbrücken aneinander, bilden in dieser Kombination einen Doppelstrang und werden dann als Poly(I:C) bezeichnet. Bindet Poly(I:C) als Ligand an die Ektodomäne des TLR3 kommt es

zu der zuvor beschriebenen Aktivierung der Signalwege, weshalb es auch als Interferonstimulator bezeichnet wird (Field et al., 1967).

Des Weiteren ist seit 2011 ein Molekül bekannt, welches am TLR3 antagonistisch wirkt. Dieses Molekül nennt sich Compound-4a (C4a) und wurde von Cheng et al. erforscht. Es bindet an derselben Stelle des Rezeptors wie der eigentliche Ligand und verhindert somit die proinflammatorische Reaktion auf dsRNA durch TLR3 (Cheng et al., 2011).

#### 1.2.5 TLR3 und Atherosklerose/ Aortenklappenstenose

In verschiedenen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des TLR3 und Endothelschädigung gezeigt werden. Insbesondere bei der Pathogenese der Atherosklerose, welche einige Ähnlichkeiten zu der der AS aufzeigt, scheint TLR3 eine Rolle zu spielen.

Zimmer et. al. untersuchten 2011 im Mausversuch die Entwicklung atherosklerotischer Plaques in der murinen A. carotis nach mechanischer Reizung. Es zeigte sich, dass die A. carotis der Mäuse nach Stimulation des TLR3 mittels Poly(I:C) eine deutlich ausgeprägtere Endothelschädigung und Plaquebildung aufwies, insbesondere im Vergleich mit TLR3 Knockout Mäusen. In vitro Versuche konnten die Ergebnisse bestätigen, Endothelzellen die mit Poly(I:C) stimuliert wurden, produzierten proinflammatorische Zytokine und es kam zur Apoptose (Zimmer et al., 2011).

Des Weiteren wurden bereits VICs aus entnommenen Aortenklappen, bspw. nach Aortenklappenersatz auf ihre Reaktion auf Poly(I:C) hin untersucht. Zhan et. al. konnten 2015 eine deutliche Aktivierung der verschiedenen proinflammatorischen Signalwege in den entnommenen Zellen nach Stimulation detektieren. Außerdem führte die Stimulation des TLR3 zu vermehrter Ausschüttung von Proteinen, welche Kalzium Ablagerungen zur Folge haben wie zum Beispiel Bone Morphogenetic Protein (BMP-2) oder Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) (Zhan et al., 2015).

Dieselbe Arbeitsgruppe führte die Versuche 2017 weiter, insbesondere IL-6, IL-8 und das Monocyte Chemoattractant Protein-1 wurden nach Stimulation mit Poly(I:C) freigesetzt. Weiterhin konnte hier die Relevanz des NF- $\kappa$ B Signalweges bestätigt werden. Wurden Teile dieses Signalwegs gehemmt, fiel die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen trotz Stimulation der Zellen aus. Somit konnte gezeigt werden, dass die

proinflammatorische Wirkung von TLR3 Aktivierung maßgeblich über das Adaptermolekül TRIF und damit den NF- $\kappa$ B Signalweg abläuft (Zhan et al., 2017).

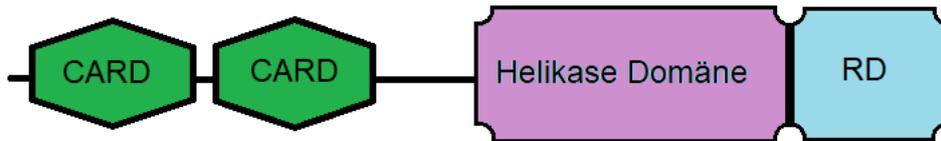
#### 1.2.6 MDA5

Bei dem Melanoma Differentiation Gene 5 (MDA5) handelt es sich wie auch bei den Toll-like Rezeptoren um einen PRR. Jedoch gehört dieser Rezeptor zur Familie der sogenannten RIG-I-like Helikasen, welche im Zytosol fast aller kernhaltiger Zellen des Körpers vorkommen und insbesondere virale RNA erkennen (Saito et al., 2007).

MDA5 erkennt als Liganden vor allem langstreckige doppelsträngige RNA, wie auch der TLR3. Der Aufbau des Rezeptors weicht jedoch von TLR3 ab. MDA5 besteht aus einer C-terminalen regulatorischen Domäne (RD), einer zentralen Helikase Domäne (ATPase Domäne) und zwei N-terminalen Caspase Activation and Recruitment Domänen (CARD). Die RD Domäne wie auch die CARD-Domäne sind hier entscheidend für Erkennung und Bindung des Liganden (Yoneyama et al., 2004). Ist die Erkennung und Bindung des Liganden erfolgt, kommt es Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig zu einer Aktivierung des Rezeptors. Auch hier spielt dann ein Adaptermolekül eine Rolle. Das sogenannte Mitochondrial Antiviral Signaling Protein (MAVS) führt über Kontakt zur CARD-Domäne letztendlich zu einer Induktion proinflammatorischer Signalwege, welche wie auch bei TLR3 Aktivierung eine Typ-1 Interferon Freisetzung auslösen (Seth et al., 2005).

Genauso wie TLR3 lässt sich MDA5 entsprechend auch durch Poly(I:C) stimulieren (Gitlin et al., 2006).

Dass MDA5 ebenfalls eine Rolle zumindest bei der Pathogenese der Atherosklerose bzw. Plaque-Bildung spielt, zeigte sich in einer Studie von 2016. Hier wurden zunächst in vitro entnommene koronare Endothelzellen mit Poly(I:C) stimuliert, sie zeigten eine erhöhte Expression von MDA5 und es kam zu oben genannten Prozessen wie vermehrtem oxidativem Stress, Apoptose und der Ausschüttung von Zytokinen. Auch in vivo konnte dies anhand von Mäusen, denen Poly(I:C) appliziert wurde, bestätigt werden, während Tiere mit einem MDA5 Knockout die entsprechenden Reaktionen nicht aufzeigten (Asdonk et al., 2016).



**Abb. 4:** Aufbau von MDA5 in Anlehnung an Yoneyama et al., 2004

### 1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Im Rahmen der Entwicklung einer AS kommt es zu einer vermehrten Nekrose und Apoptose von Endothelzellen und Stromazellen in der Aortenklappe und hierdurch zur Freisetzung von Nukleinsäuren, die wiederum zur Aktivierung intrazellulärer RNA-Rezeptoren führt. Inflammatorische Prozesse spielen bei der Pathogenese der AS nachweislich eine entscheidende Rolle und es liegt nah, dass die genannten Rezeptoren daran beteiligt sind. Bei der Untersuchung von VICs konnte *in vitro* bereits eine Korrelation zwischen TLR3 Aktivierung und Progression der Krankheit verdeutlicht werden (siehe 1.2.5).

Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es, die Rolle der intrazellulären RNA-Sensoren, insbesondere des TLR3 und MDA5, auf die Entwicklung der AS zu untersuchen und die bisher erfolgte Forschung um ein „*in vivo* Modell“ zu erweitern.

Anhand eines speziellen Mausmodells zur mechanischen Induktion einer AS (Niepmann et al., 2019) und folgender Echokardiographie wird untersucht, inwiefern sowohl genetische Knockouts, wie auch Antagonisten oder Agonisten besagter PRR die Entstehung der AS bei den betroffenen Mäusen beeinflussen.

## 2. Material und Methoden

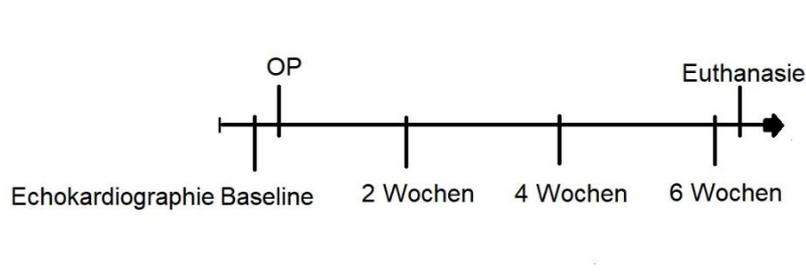
### 2.1 Mausmodell

Für die Tierversuchsreihe (Aktenzeichen: 81-02.04.2018.A250) wurden im Haus für experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn gezüchtete, bzw. von Janvier Labs gekaufte Mäuse verwendet.

Es handelte sich um männliche Tiere. Zu Beginn des Versuchs waren die Tiere 10 bis 12 Wochen alt.

Die Wildtyp Mäuse (WT) entsprechen dem Genotyp C57BL/6J, welcher typisiert und standardisiert ist. Für die unterschiedlichen Versuche wurden zum Vergleich Mäuse mit einem Gen-Knockout verwendet. Hierbei handelte es sich um Tiere mit TLR3 Knockout sowie MDA5 Knockout.

Im Folgenden wird der Ablauf des Mausversuchs detailliert beschrieben. In Abbildung 5 ist dieser Ablauf, den alle Mäuse durchlaufen graphisch dargestellt.



**Abb. 5:** Zeitstrahl genereller Versuchsablauf (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

#### 2.1.1 Echokardiographie

Zu Beginn eines Mausversuchs erfolgte zunächst eine Baseline Herzultraschall Untersuchung der Mäuse, um die Ausgangsparameter zu ermitteln. Genutzt wurde eine Fujifilm Visualsonics Vevo 2100 bzw. 3100 Ultra High Frequency Imaging Platform.

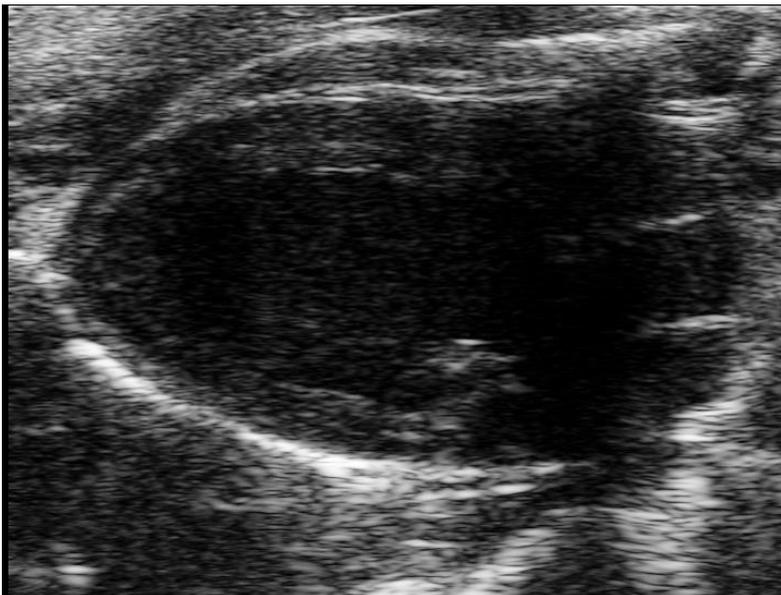
Postoperativ wurden die Tiere nach zwei, vier und sechs Wochen der Echokardiographie unterzogen.

Zur Vorbereitung der Echokardiographie wurden die Mäuse mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran sediert. Sie wurden auf einer Wärmplatte mit Ableitungen für EKG und Atemfrequenz fixiert und mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um

ihre Körpertemperatur konsequent bei 37,0 °C zu halten. Zur Messung der Temperatur lag rektal eine Temperatursonde. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe befeuchtet. Um den Schallkopf direkt auf die Haut der Maus aufbringen zu können, wurde der Bauch der Mäuse mit einer Enthaarungscreme enthaart und gewaschen. Danach erfolgte die Applikation des Ultraschall Gels.

Zur Erhebung der linksventrikulären Funktionsparameter sowie zur Beurteilung der Aortenklappenfunktion wurde ein Protokoll mit sechs Anleitungen etabliert.

Parasternal lange Achse: In dieser Aufnahme wird prominent im Bild der linke Ventrikel inklusive Aortenklappe dargestellt. Dazu wird der Schallkopf von der linken Seite der Maus aus um ca. 45 Grad gekippt längs auf die Herzachse ausgerichtet. Hier ist es möglich, vor allem die EF sowie das fassende Volumen des Ventrikels zu ermitteln.



**Abb. 6:** Parasternal lange Achse in der Echokardiographie der Maus

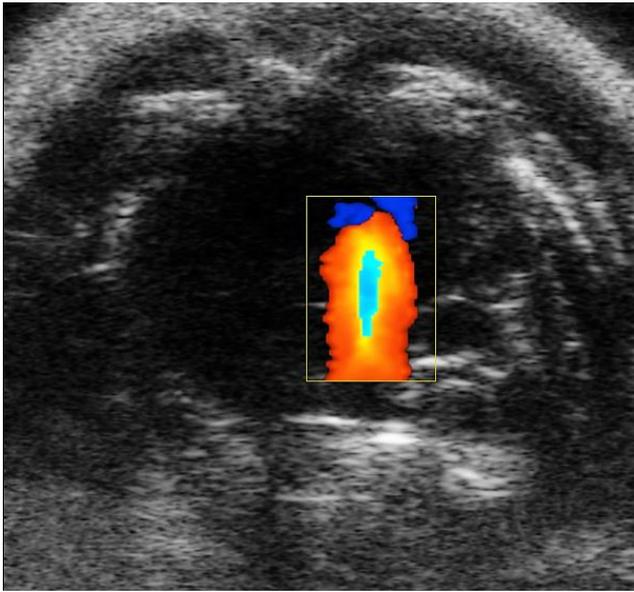
Parasternal kurze Achse: Hier wird der linke Ventrikel auf Ebene der Papillarmuskeln quer geschnitten, wodurch sich vor allem die Kontraktion des Herzmuskels beurteilen lässt. Um diese Anlotung zu erzielen, dreht man den Schallkopf aus der parasternalen langen Achse um 90 Grad, sodass der linke Ventrikel in seiner Querachse angeschnitten wird. Wendet

man den sogenannten Motion-Mode an, lassen sich die Kontraktion des Myokards nachverfolgen und etwaige Pumpeinschränkungen erkennen.



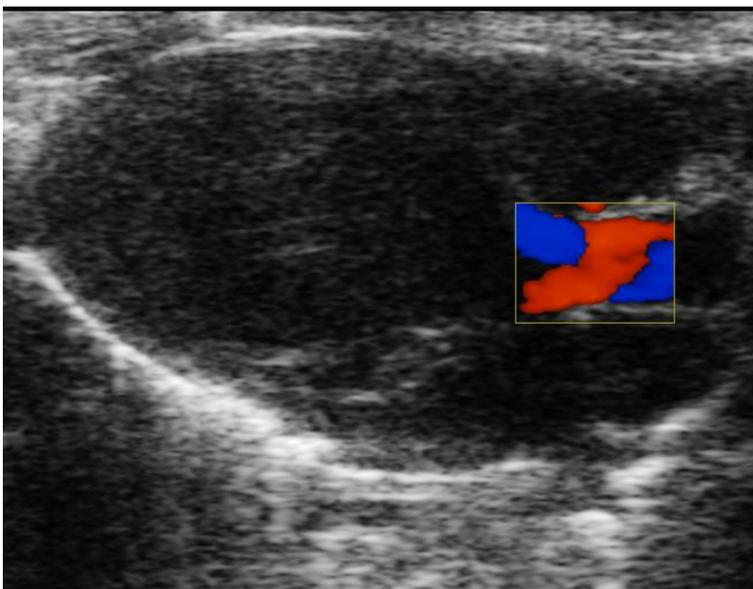
**Abb. 7:** Parasternal kurze Achse in der Echokardiographie der Maus

Apikaler Vier Kammer Blick: In dieser Achse sind von apikal alle vier Kammern des Herzens sichtbar, bei der Maus wird allerdings die rechte Seite des Herzens häufig vom Sternum überlagert. Die Anlotung erfolgt ähnlich wie beim Menschen, der Schallkopf wird im Bereich der Herzspitze angesetzt und das Herz wird von unten angeschnitten. Vor allem die Mitralklappe ist beurteilbar, mithilfe farbkodierter Dopplersonographie (FKDS) lassen sich der Blutfluss über der Klappe darstellen und mittels Pulsed-Wave Doppler (PW-Doppler) Geschwindigkeiten messen. So können auch an der Mitralklappe Insuffizienzen oder Stenosen diagnostiziert werden. Es ist weiterhin möglich, die frühe diastolische Füllung des Ventrikels von der spätdiastolischen Füllung zu unterscheiden. Außerdem lässt sich die isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) messen.



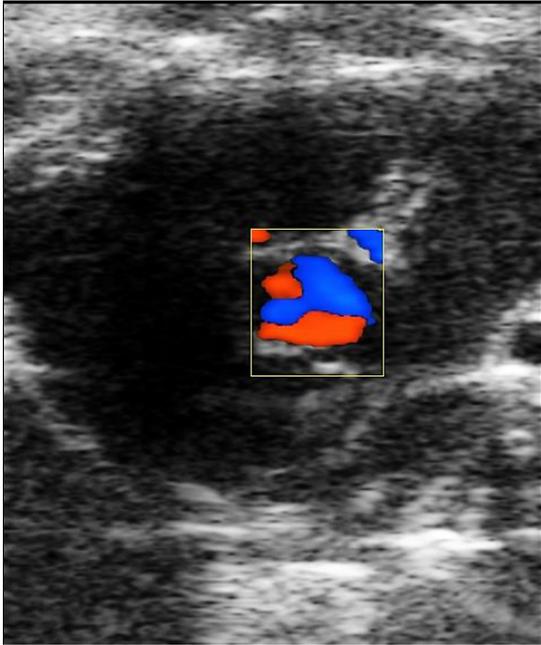
**Abb. 8:** Apikaler vier Kammer Blick in der Echokardiographie der Maus - der Blutfluss über der Mitralklappe wird mittels farbkodierter Dopplersonographie dargestellt

Links-laterale Achse: Diese Achse ähnelt der parasternal langen Achse, jedoch mit dem Unterschied, dass der Schallkopf etwas lateraler angesetzt wird, der Fokus liegt hier auf der Aortenklappe. Sie wird mittels FKDS und PW-Doppler untersucht, wodurch eine Aortenklappeninsuffizienz diagnostiziert werden kann.



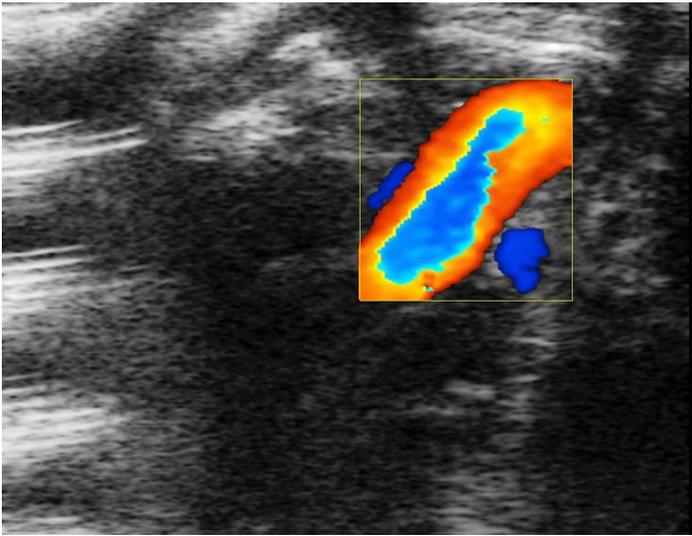
**Abb. 9:** Linkslaterale Achse in der Echokardiographie der Maus - der Blutfluss über der Aortenklappe wird mittels farbkodierter Dopplersonographie dargestellt

Aortenklappen Aufsicht: Ähnlich wie in der parasternal kurzen Achse, erfolgt hier ein Querschnitt des Herzes, dieser richtet sich jedoch auf Ebene der Aortenklappe. Es wird der Schallkopf erneut um 90 Grad gedreht und auch hier lässt sich mittels FKDS der Blutfluss darstellen.



**Abb. 10:** Aortenklappen-Aufsicht in der Echokardiographie der Maus - der Blutfluss über der Aortenklappe wird mittels FKDS dargestellt

Suprasternale Achse: Hier wird der Schallkopf von oberhalb des Sternums der Maus in Richtung Herz ausgerichtet. Diese Achse entspricht keiner gebräuchlichen bei der Echokardiographie des Menschen. Im Bild zeigt sich der linke Ventrikel sowie der Ausfluss in die Aorta über die Aortenklappe längs geschnitten. Auch hier wird mittels FKDS und PW-Doppler der Blutfluss dargestellt. So ist es möglich, die Flussbeschleunigung über der Aortenklappe zu ermitteln. Mit diesem Wert kann diagnostiziert werden, ob bei der Maus eine AS vorliegt oder nicht.



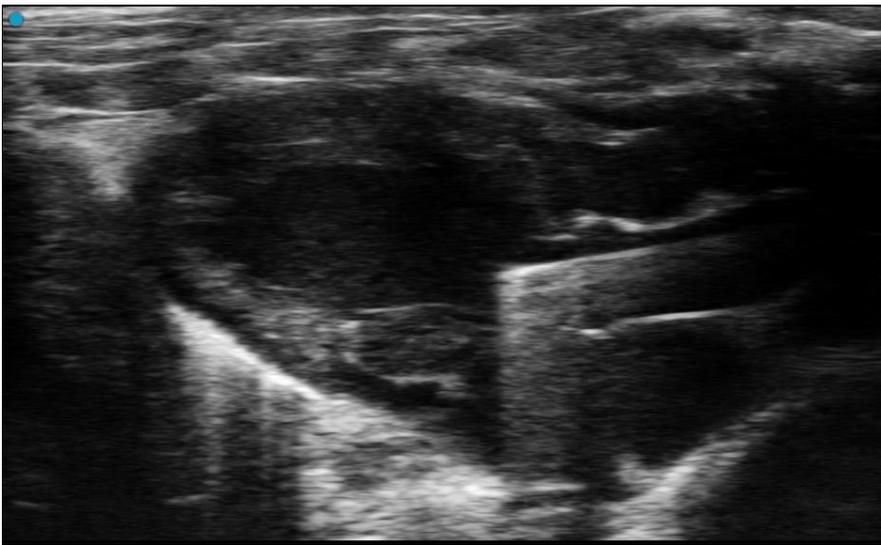
**Abb. 11:** Suprasternale Achse in der Echokardiographie der Maus - der Blutfluss im Aorten-Ausflusstrakt wird mittels FKDS dargestellt

Die Auswertung der im Ultraschall aufgenommenen Bilder erfolgte mittels Fujifilm Visualsonics VevoLab Software.

### 2.1.2 Drahtinduzierte Aortenklappenstenose

In unserem Labor wurde das Model von Honda et al. zur Induktion einer AS erweitert (Niepmann et al., 2019; Honda et al., 2014). Zur Sedierung wurde eine Mischung aus 1 ml Ketamin, 0,8 ml Xylazin und 8,2 ml 0,9%iges Natrium Chlorid (NaCl) (Fresenius Kabi, Deutschland) angesetzt. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert mit  $10 \mu\text{l/g}$  Körpergewicht + 10 %. Das Narkotikum wurde in den rechten Unterbauch intraperitoneal (i.p.) appliziert. Sobald die Tiere nicht mehr auf Schmerzreize reagierten, wurden sie unter einem Mikroskop auf einer Wärmplatte fixiert. Nun wurde unter mikroskopischer Sicht die rechte A. carotis frei präpariert, abgeklemmt und anschließend eröffnet. Dann wurde ein Koronardraht (ASAHI INTECC MIRACLEbros 6) über die A. carotis bis zur Aortenklappe und unter Ultraschallsicht darüber in den linken Ventrikel vorgeschoben. Zur Induktion der Stenose erfolgte ein 20-maliges Vor- und Zurückschieben des Drahtes bis kurz vor die Klappe. Dann wurde der an der Spitze um ca.  $15^\circ$  gebogene Draht knapp vor Klappenebene fixiert und 100-mal um sich selbst gedreht. Der Draht wurde wieder aus dem Herzen herausgezogen und in der parasternal langen Achse wurde im Ultraschall mit farbkodiertem Doppler überprüft, ob es bei der Operation auch nicht zur einer

Aortenklappeninsuffizienz gekommen war, da dies vermieden werden sollte. Die A. carotis wurde komplett abgeklemmt und die Wunde der Maus mit Einzelknopfnähten verschlossen. Bevor die Maus wach wurde, erhielt sie noch das Schmerzmittel Buprenorphin subkutan (s.c.).



**Abb. 12:** Drahtinduzierte Endothelschädigung an der Aortenklappe, hier ist der Draht im linken Ventrikel knapp unterhalb der Klappe positioniert

### 2.1.3 Euthanasie der Mäuse

Sechs Wochen postoperativ und nach der letzten Ultraschalluntersuchung wurde den Mäusen eine individuell vom Gewicht abhängige Überdosis Ketamin und Xylazin injiziert. Die Blutentnahme erfolgte mit einer mit Heparin beschichteten Küvette aus dem retroorbitalen Venenplexus. Hier konnten bis zu 1,5 ml pro Maus entnommen werden. Des Weiteren wurden den Tieren inguinale Lymphknoten entfernt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -80 °C gelagert.

Dann wurde den Tieren unter dem Mikroskop das Herz ausgebaut und gespült. Es wurde gewogen und schließlich in Tissue Tec (Leicabiosystems, UK) eingebettet. Auch die entnommenen Herzen wurden bei -80 °C eingefroren.

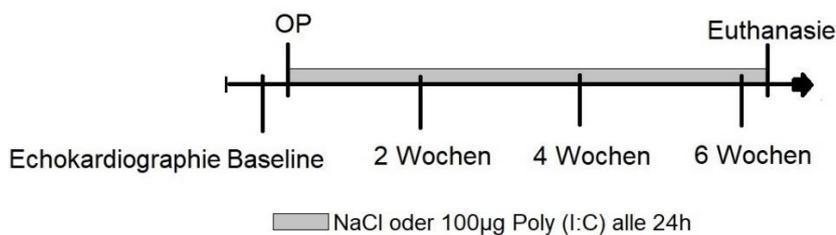
## 2.2 Versuchsgruppen

### 2.2.1 TLR3 Stimulation mittels Poly(I:C)

Zur Stimulation des TLR3 in vivo wurde hier das sechswöchige Prozedere inklusive Baseline Ultraschall, Operation, postoperativem Ultraschall und Euthanasie bei zwei Gruppen von Mäusen durchgeführt. Es wurden ausschließlich WT Tiere verwendet (C57/Bl6J), die Gruppe bestanden initial aus jeweils zehn Tieren, in der Kontrollgruppe sind jedoch zwei und in der Versuchsgruppe drei Tiere verstorben, so dass sie aus der Auswertung ausgeschlossen wurden.

Die Kontrollgruppe erhielt in einem ersten Versuch alle 48 Stunden, in einem zweiten dann täglich 200 µl 0,9 % NaCl i.p. gespritzt. Der Versuchsgruppe wurde zur gleichen Zeit pro Injektion 100 µg Poly(I:C) (Sigma Aldrich) gelöst in 200 µl 0,9 % NaCl i.p. gespritzt.

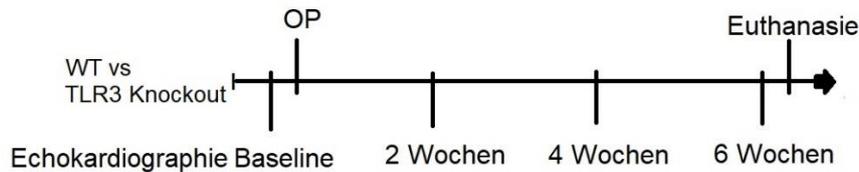
Poly(I:C) wurde also mit 5 µg/µl dosiert.



**Abb. 13:** Zeitstrahl Versuchsablauf 2.2.1, WT werden über 6 Wochen hinweg mit 0,9 % NaCl oder 100 µg Poly(I:C) alle 24 h behandelt (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

### 2.2.2 TLR3 Knockout

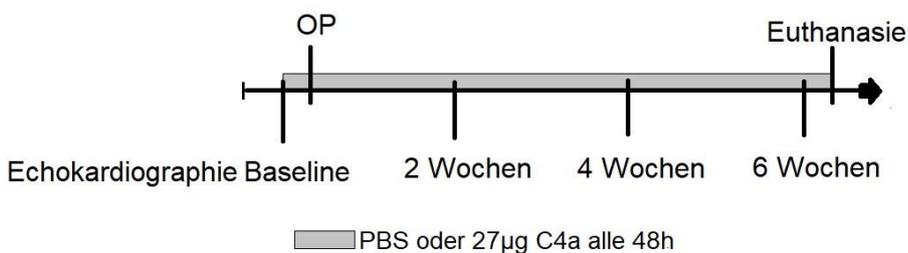
Hier wurde der gesamte Versuchsablauf an Mäusen mit einem TLR3 Knockout (n = 22) durchgeführt, um sie mit WT Mäusen (n = 22) (C57/Bl6J) zu vergleichen. Bei den histologischen Untersuchungen betrug die Anzahl der Tiere pro Gruppe in diesem Versuch 15.



**Abb. 14:** Zeitstrahl Versuchsaufbau 2.2.2, WT werden über 6 Wochen hinweg mit TLR3 Knockout Mäusen verglichen (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

### 2.2.3 TLR3 Antagonisierung mittels C4a

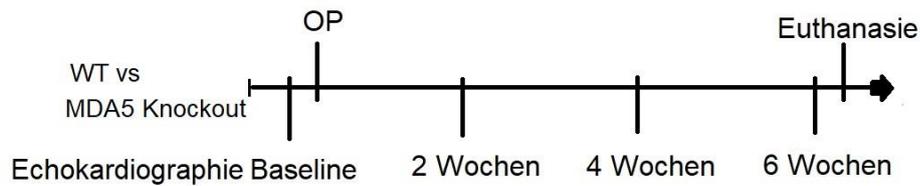
Diese Versuchsreihe wurde an WT Mäusen (C57/Bl6J) durchgeführt, welche in 2 Gruppen unterteilt wurden. Die Kontrollgruppe (n = 17) erhielt alle 48 Stunden eine s.c. Injektion von 200 µl 1%igem Phosphat Buffered Saline (PBS). Die Versuchsgruppe (n = 17) erhielt zum selben Zeitpunkt eine s.c. Injektion von 27 µg C4a (Millipore Sigma) gelöst in 200 µl PBS, also in einer Konzentration von 1,35 mg/ml. Die erste Injektion erfolgte 48 Stunden vor der Operation. Bei den histologischen Untersuchungen verringert sich auch hier die Anzahl (Hämatoxylin-Eosin Färbung: Kontrollgruppe n = 14, Versuchsgruppe n = 15; CD68 Färbung: Kontrollgruppe n = 12, Versuchsgruppe n = 16)



**Abb. 15:** Zeitstrahl Versuchsaufbau 2.2.3, WT werden über 6 Wochen hinweg mit PBS oder 27 µg C4a alle 48 h behandelt (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

### 2.2.4 MDA5 Knockout

Das in 2.1 beschriebene Prozedere wurde bei diesem Versuch an MDA5 Knockout Mäusen (n = 18) durchgeführt, welche im Vergleich mit WT Mäusen (n = 16) (C57/Bl6J) standen. Bei den histologischen Untersuchungen betrug die jeweilige Gruppenzahl 6.



**Abb. 16:** Zeitstrahl Versuchsablauf 2.2.4, WT werden über 6 Wochen hinweg mit MDA5 Knockout Mäusen verglichen (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

### 2.3 Histologie

Die in Tissue Tec eingebetteten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Herzen wurden histologisch weiterverarbeitet. Dazu wurden sie zunächst in einem Kryostaten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in  $0,8\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten, welche auf Objektträger appliziert wurden. Im Anschluss wurden auch die Schnitte vor der Weiterverarbeitung erneut bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte in 10-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop (Axio Observer, Zeiss, Deutschland) mittels Zeiss ZEN Imaging Software (Carl Zeiss Microscopy Deutschland).

#### 2.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung wurden die auf Objektträgern liegenden Herzschnitte zunächst mit absteigender Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 %) und schließlich destilliertem Wasser je 6 Minuten gewässert. Dann erfolgte für 30 Sekunden die Färbung mit Hämatoxylin (Carl Roth, Deutschland) zur blauen Färbung der Zellkerne und erneute Spülung mit destilliertem Wasser. Für weitere 30 Sekunden erfolgte die rötliche Färbung des Gewebes mit 0,5 % Eosin-G (Carl Roth, Deutschland), dann wieder die Spülung mit destilliertem Wasser. Nun wurde mit aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %) für je 6 Minuten entwässert. Zuletzt inkubierten die Schnitte für 6 Minuten in Xylol (Apply Chem GmbH, Deutschland) und wurden dann mit Entellan (Sigma Aldrich) eingedeckt.

### 2.3.2 CD68 Färbung

Die auf Objektträgern liegenden Herzschnitte inkubierten zunächst für 20 Minuten in Aceton und wurden dann dreimal für jeweils fünf Minuten in 1 % PBS gewaschen. Mit 50  $\mu$ l 2 % Bovine Serum Albumine (BSA) in PBS wurde dann geblockt. 50  $\mu$ l Primär Antikörper wurden 30 Minuten später (Anti-CD68 rat IgG2a, Acris Antibodies, Deutschland) 1:100 in 2 % BSA/PBS auf die Schnitte gegeben. Eine Negativkontrolle wurde dabei ausgespart. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C im Dunkeln. Dann wurde erneut 15 Minuten in 1 % PBS gewaschen. Der Sekundär Antikörper wurde mit 50  $\mu$ l (Cy3 Affini Pure Donkey anti Rat IgG, Jackson Immuno Research Laboratories In) 1:500 in 2 % BSA/PBS verdünnt auf die Schnitte gegeben und 1 h im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurde erneut für 15 Minuten in 1 % PBS gewaschen und die Schnitte mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (Vector Laboratories) eingedeckt.

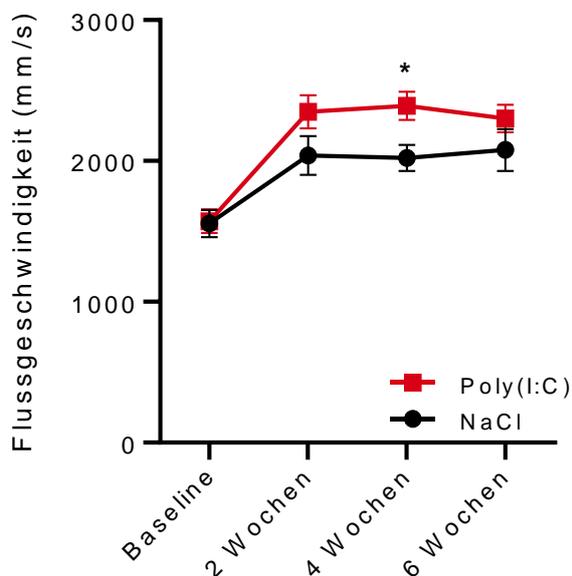
### 2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism. Zur Darstellung der erhobenen Daten wurde in den Graphen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler genutzt. Die Analyse der Werte erfolgt mittels Student T-Test zum Vergleich zweier Gruppen. Als statistisch signifikant wurden P-Werte von oder kleiner 0,05 gewertet. Gekennzeichnet wird die Ausprägung der Signifikanz folgendermaßen: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ .

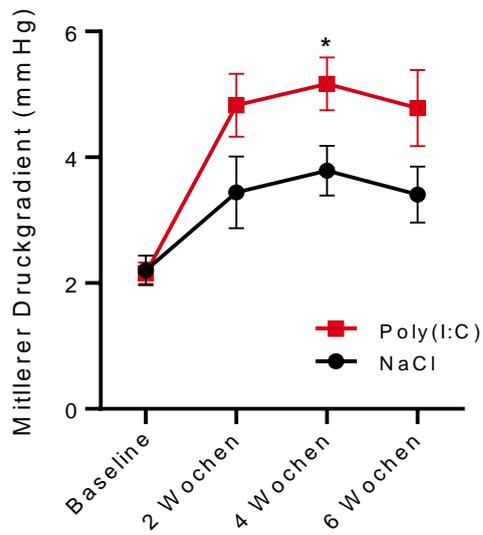
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 TLR3 Stimulation mittels Poly(I:C)

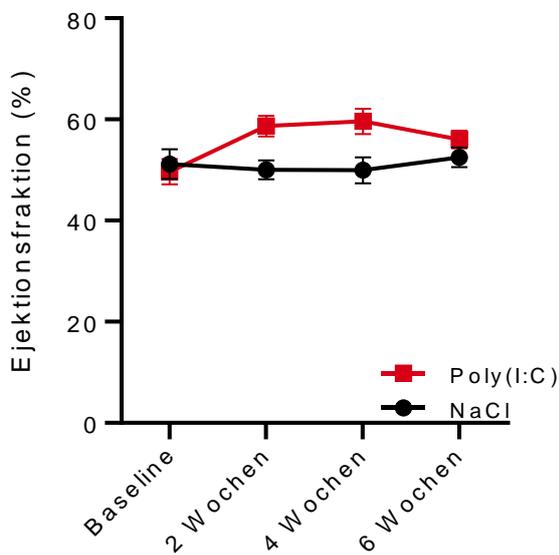
In diesem Versuch wurde durch die Gabe von Poly(I:C) der TLR3 stimuliert. Die Tiere entwickelten sowohl in der Kontroll-, als auch in der Versuchsgruppe zuverlässig eine AS, deren hämodynamische Relevanz sich in der Echokardiographie durch eine Zunahme der transaortalen Flussgeschwindigkeit quantifizieren ließ. Insgesamt zeigte sich der Unterschied zwischen den beiden Gruppen jedoch lediglich nach vier Wochen im Vergleich der transaortalen Flussgeschwindigkeit signifikant (p-Wert: 0,018), ansonsten war die Ausprägung der entwickelten AS ähnlich. Das erwartete Ergebnis der Stimulation in Form einer stärker ausgeprägten AS ließ sich also nur teilweise bestätigen (siehe Abb. 17). Um auszuschließen, dass die AS sich aufgrund einer linksventrikulären Dysfunktion in der suprasternalen Achse nicht darstellen ließ, wurde die Entwicklung der EF der Mäuse über sechs Wochen untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Abfälle der EF und somit auch keine Zeichen für eine linksventrikuläre Dysfunktion (siehe Abb. 19). In Tabelle 3 sind die verschiedenen Parameter, die bei der Echokardiographie erhoben wurden noch einmal genau aufgeführt.



**Abb. 17:** Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C) - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



**Abb. 18:** Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C) - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



**Abb. 19:** EF bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C) (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

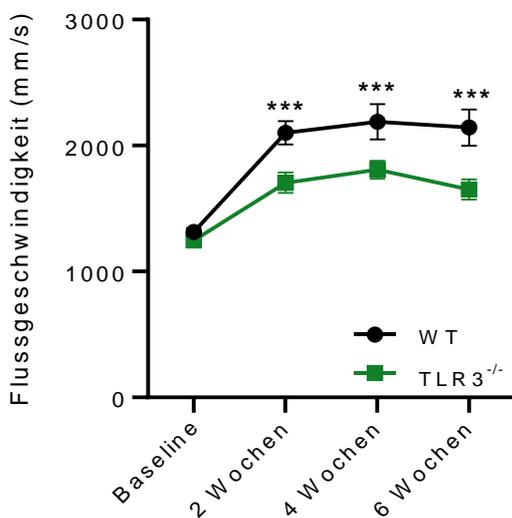
**Tab. 3:** Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C) zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen

Parameter	Einheit	Baseline		Woche 6		p-Wert
		NaCl	Poly(I:C)	NaCl	Poly(I:C)	
Suprasternale Achse						
Mittlere Flussgeschwindigkeit	mm/s	731,52	729,53	907,71	1079,54	0,093
Mittlerer Druckgradient	mmHg	2,20	2,16	3,41	4,78	0,086
Flussgeschwindigkeit transaortal	mm/s	1525,40	1571,04	2078,12	2301,75	0,246
Parasternal kurze Achse						
Herzfrequenz	/min	451,94	427,10	481,02	490,74	0,625
Schlagvolumen	µl	36,24	33,99	41,39	37,48	0,132
Ejektionsfraktion	%	51,18	47,50	52,49	56,01	0,204
Herzzeitvolumen	ml/min	16,40	14,61	19,87	18,38	0,271
LV-Masse	mg	119,11	115,46	133,54	121,95	0,277
Parasternal lange Achse						
Herzfrequenz	/min	457,60	437,90	490,07	488,22	0,915
Volumen	µl	34,07	42,28	33,35	36,13	0,627
Schlagvolumen	µl	38,33	40,06	42,22	29,64	<b>0,027</b>
Ejektionsfraktion	%	52,90	51,47	55,73	45,46	0,064
Herzzeitvolumen	ml/min	17,48	17,57	20,89	14,47	<b>0,035</b>

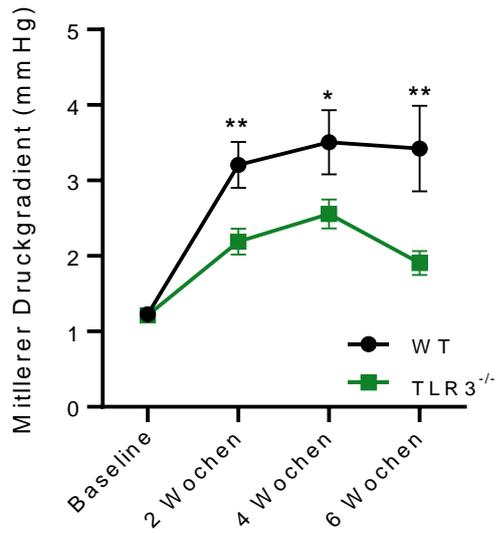
### 3.2 TLR3 Knockout

Dieser Versuch diente zur Untersuchung der Relevanz eines TLR3 Knockouts für die Ausbildung einer AS. Im Vergleich zwischen TLR3 Knockout Tieren und Wildtypen zeigte sich nach sechs Wochen in der suprasternalen Achse im Herzultraschall, dass die Tiere mit TLR3 Knockout deutlich geringere Flussgeschwindigkeiten über der Aortenklappe

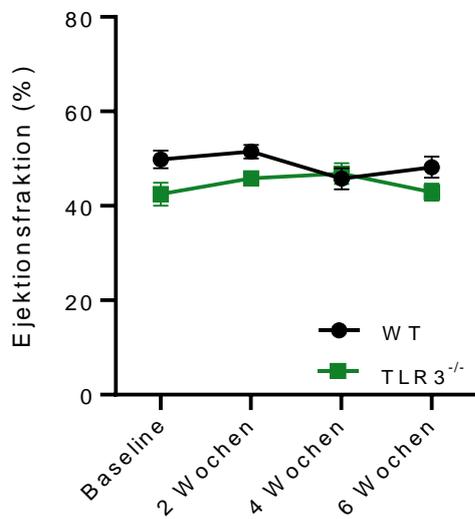
aufwiesen als die WT Mäuse (siehe Abb. 20). Mit einem p-Wert von 0,0048 zeigte sich eine deutliche Signifikanz im Unterschied zwischen WT und TLR3 Knockout. Die WT Mäuse entwickelten nach sechs Wochen mit einem Mittelwert von 2124,457 mm/s zuverlässig eine AS, während die TLR3 Knockout Tiere im Schnitt deutlich unter der Grenze zur Diagnose der AS lagen (Mittelwert: 1636,839 mm/s). Auch die Untersuchung des mittleren transaortalen Druckgradienten spiegelte diese Ergebnisse wider (siehe Abb. 21). Es ist also davon auszugehen, dass ein TLR3 Knockout mit resultierend fehlender TLR3 abhängiger Immunantwort die Mäuse vor der Entwicklung der AS geschützt hat. Auch in diesem Versuch war keine Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion zu beobachten. Es gab keine erkennbare Verschlechterung der Pumpfunktion der Mäuseherzen (siehe Abb. 22). Insofern wurde dadurch das Ergebnis der Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe nicht verfälscht. Die gesamten mittels Echokardiographie erhobenen Parameter aus Woche 0 und Woche 6 finden sich in Tabelle 4.



**Abb. 20:** Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT und TLR3 Knockout Tieren - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



**Abb. 21:** Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT und TLR3 Knockout Tieren - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



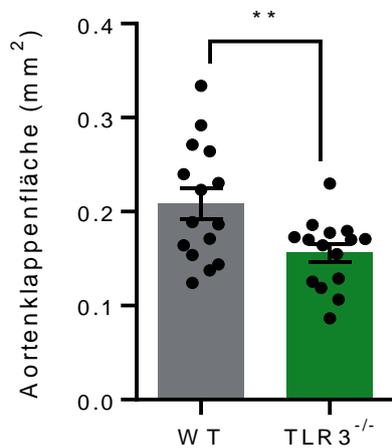
**Abb. 22:** EF bei WT und TLR3 Knockout Tieren (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

**Tab. 4:** Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT und TLR3 Knockout Tieren, zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen

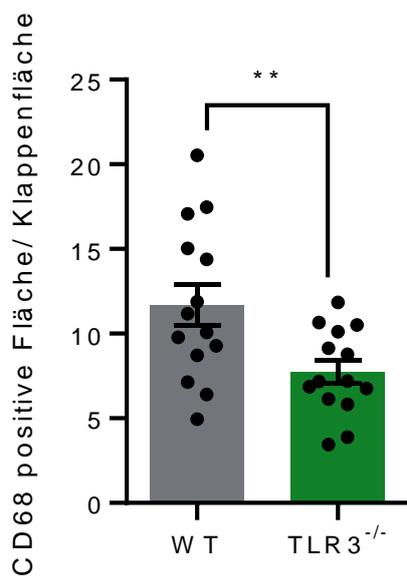
Parameter	Einheit	Woche 0		Woche 6		p-Wert
		WT	TLR3 -/-	WT	TLR3 -/-	
Suprasternale Achse						
Mittlere Flusgeschw.	mm/s	549,83	547,77	890,10	681,42	<b>0,008</b>
Mittlerer Druckgradient	mmHg	1,23	1,21	3,42	1,91	<b>0,016</b>
Flussgeschw. transaortal	mm/s	1314,06	1246,24	2124,46	1636,84	<b>0,005</b>
Parasternal kurze Achse						
Herzfrequenz	/min	414,03	425,38	426,23	466,50	<b>0,013</b>
Schlagvolumen	µl	35,89	33,25	34,93	30,11	0,029
Ejektionsfraktion	%	49,82	42,48	47,24	42,63	0,116
Herzzeitvolumen	ml/min	14,86	14,17	14,91	14,02	0,401
LV-Masse	mg	126,15	133,92	144,97	152,62	0,590
Parasternal lange Achse						
Herzfrequenz	/min	416,68	424,91	432,38	458,17	0,136
Volumen	µl	30,81	36,11	34,52	33,13	0,704
Schlagvolumen	µl	33,87	33,89	31,98	28,21	0,143
Ejektionsfraktion	%	52,36	50,10	48,97	46,07	0,395

Zur histologischen Untersuchung erfolgte die Färbung der geschnittenen Herzen in der H.E. sowie der CD68 Färbung. Die Aortenklappenfläche der WT Mäuse zeigte sich in der H.E. Färbung signifikant vergrößert im Vergleich zu den TLR3 Knockout Mäusen (p-Wert: 0,008). Es bestätigte sich also das Ergebnis aus der Bildgebung (siehe Abb. 23). Auch in der CD68 Färbung spiegeln sich diese Erkenntnisse wider (siehe Abb. 24). Tiere vom WT zeigten eine signifikant ausgeprägtere Einwanderung von Makrophagen ins

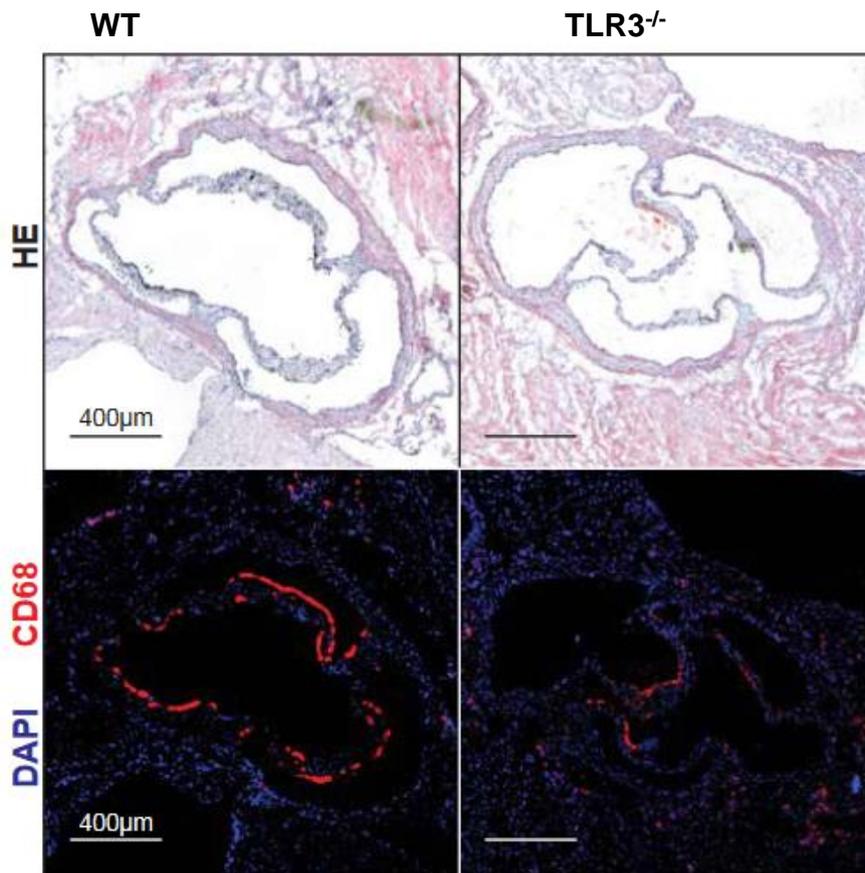
Klappengewebe als Tiere mit TLR3 Knockout (p-Wert: 0,009). In Abbildung 25 sind zur Veranschaulichung der Ergebnisse Aortenklappen der WT denen der Knockout Tiere in den Färbungen gegenübergestellt.



**Abb. 23:** H.E. Färbung bei WT und TLR3 Knockout Tieren - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



**Abb. 24:** CD68 Färbung bei WT und TLR3 Knockout Tieren - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



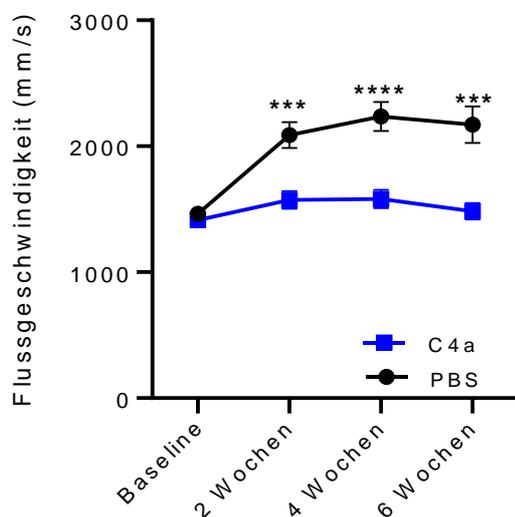
**Abb. 25:** Aortenklappen von WT (links) und TLR3 Knockout Tieren (rechts) in H.E. (oben) und CD68 Färbung (unten) (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

### 3.3 TLR3 Antagonisierung mittels C4a

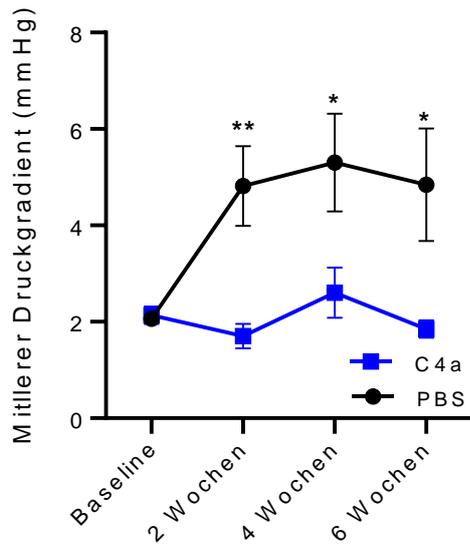
Um die vorherigen Effekte durch Knockout des TLR3 weiter zu bestätigen, wurde in diesem Versuch der Einfluss pharmakologischer Inhibierung durch C4a untersucht. C4a als TLR3-dsRNA-Komplex-Inhibitor verhindert die physiologisch ausgelöste Wirkung des Immunsystems am TLR3 durch dsRNA. Im postoperativen Ultraschall nach sechs Wochen ließen sich hier ähnliche Ergebnisse wie in 3.3 erkennen. Die Entwicklung einer AS fand konsequent nur bei der mit PBS behandelten Kontrollgruppe statt. Hier ergab sich nach sechs Wochen ein Mittelwert von 2294,928 mm/s. Die postoperativen Flussgeschwindigkeiten über der Aortenklappe waren im Vergleich zur Versuchsgruppe der mit C4a behandelten Tiere signifikant höher (p-Wert: 0,001). Die Tiere der Versuchsgruppe zeigten keine relevante Veränderung bezüglich der transaortalen Flussgeschwindigkeit. Vor der Operation lag diese im Mittelwert bei 1477,204 mm/s,

sechs Wochen später bei 1510,385 mm/s (siehe Abb.26). Der Vergleich des mittleren transaortalen Druckgradienten zeigte sich mit einem p-Wert von 0,005 nach sechs Wochen zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe ebenfalls signifikant (siehe Abb. 27). Auch durch pharmakologische Beeinflussung des TLR3 konnten die Tiere vor der Entwicklung der AS geschützt werden.

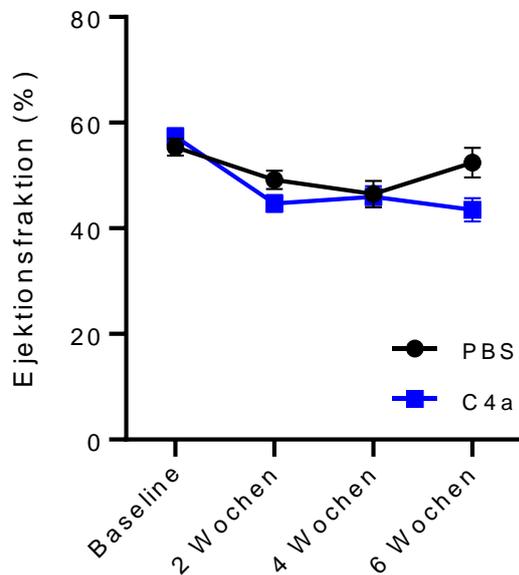
Bei dieser Methode der TLR3 Ausschaltung gab es bei der Versuchsgruppe keine Fehlerquellen bezüglich der Darstellung einer AS durch entstandene linksventrikuläre Dysfunktionen (siehe Abb. 28) und die verschiedenen Herzultraschall-Parameter finden sich in Tabelle 5.



**Abb. 26:** Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT behandelt mit PBS und C4a - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



**Abb. 27:** Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT behandelt mit PBS und C4a - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



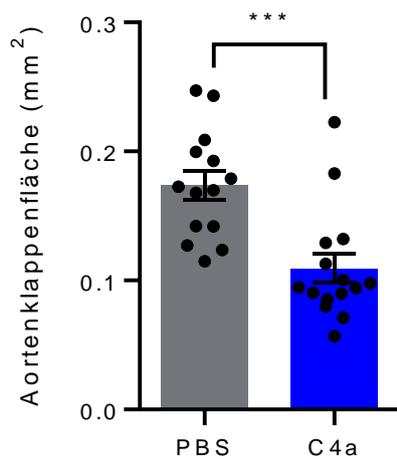
**Abb. 28:** EF bei WT behandelt mit PBS und C4a (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

**Tab. 5:** Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT behandelt mit PBS und C4a, zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen

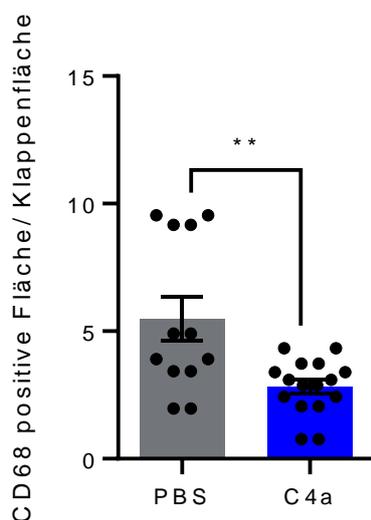
Parameter	Einheit	Woche 0		Woche 6		p-Wert
		PBS	C4a	PBS	C4a	
Suprasternale Achse						
Mittlere Flussgeschwindigkeit	mm/s	743,97	648,38	1137,89	680,87	<b>0,001</b>
Mittlerer Druckgradient	mmHg	2,61	1,80	5,93	1,96	<b>0,005</b>
Flussgeschwindigkeit transaortal	mm/s	1638,64	1472,36	2294,93	1510,39	<b>0,001</b>
Parasternal kurze Achse						
Herzfrequenz	/min	400,90	408,53	475,54	456,62	0,133
Schlagvolumen	µl	33,06	34,04	36,19	31,76	0,116
Ejektionsfraktion	%	55,34	57,34	52,71	43,67	<b>0,010</b>
Herzzeitvolumen	ml/min	13,29	13,98	17,40	14,51	0,065
LV-Masse	mg	111,10	109,37	121,94	117,12	0,476
Parasternal lange Achse						
Herzfrequenz	/min	375,95	474,90	478,05	458,70	0,12
Volumen	µl	33,56	29,48	39,94	35,87	0,104
Schlagvolumen	µl	32,13	35,83	31,21	33,54	0,347
Ejektionsfraktion	%	49,64	54,68	43,71	48,36	0,073
Herzzeitvolumen	ml/min	12,68	16,89	14,90	15,43	0,673

Die histologische Färbung der entnommenen und geschnittenen Herzen konnte die im Ultraschall erkannten Effekte bestätigen. In der H.E. Färbung wurde deutlich, dass die mit PBS behandelte Gruppe mit einem p-Wert von 0,001 eine signifikant größere Aortenklappenfläche aufweist. Bei diesen Tieren befand sich dort deutlich mehr Gewebe, da es zu einer Inflammation inklusive Zelleinwanderung gekommen war. Bei den mit C4a

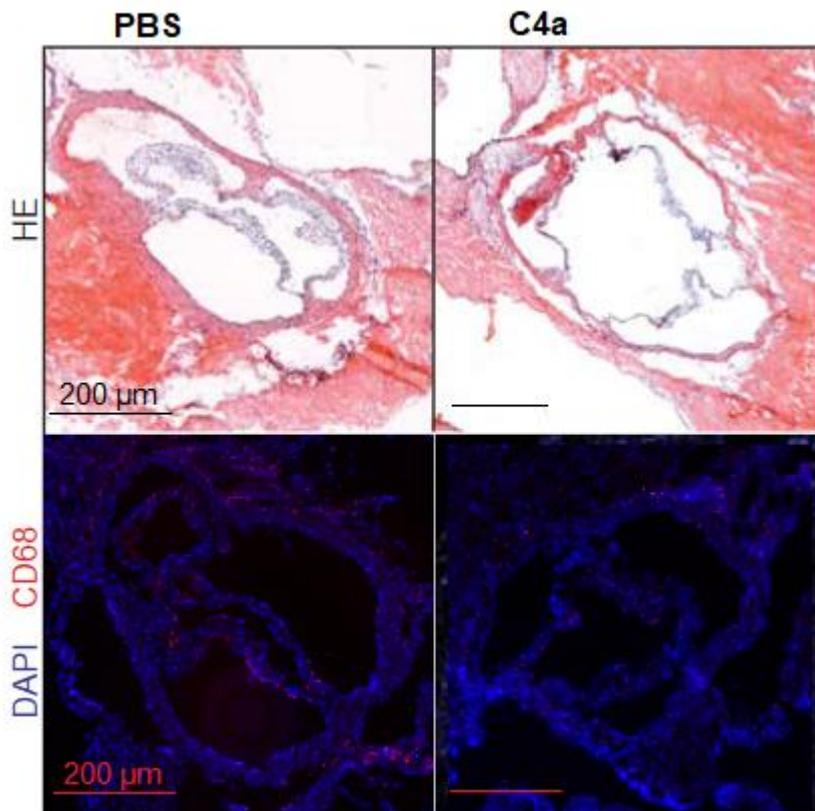
behandelten Tieren war dies weniger der Fall, die Klappenfläche war kleiner (siehe Abb. 29). Ebenfalls signifikant mit einem p-Wert von 0,003 zeigte sich der Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil an Makrophagen im Klappengewebe der Aortenklappe bei Kontroll- und Versuchsgruppe (siehe Abb. 30). Anhand der CD68 Färbung war erkennbar, dass die Aktivierung und Einwanderung von Makrophagen bei den Tieren, denen im Ultraschall eine AS diagnostiziert wurde, höher war.



**Abb. 29:** H.E. Färbung bei WT behandelt mit PBS und C4a - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)



**Abb. 30:** CD68 Färbung bei WT behandelt mit PBS und C4a - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

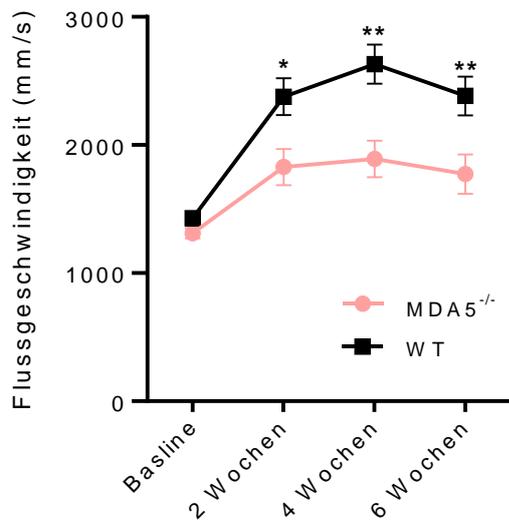


**Abb. 31:** Aortenklappen von WT behandelt mit PBS (links) und C4a (rechts) in H.E. (oben) und CD68 Färbung (unten) (in Anlehnung an Niepmann et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

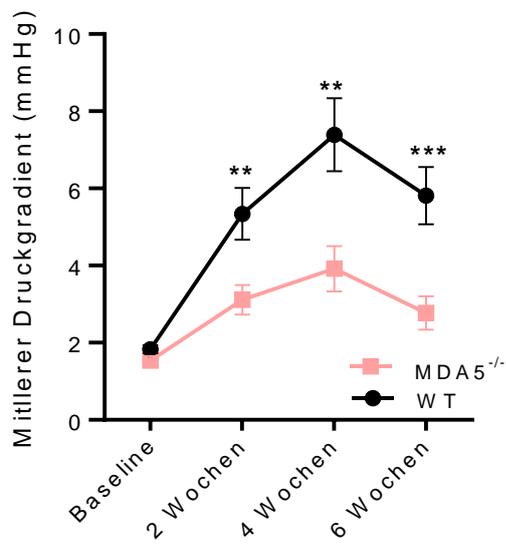
### 3.4 MDA5 Knockout

Zur Untersuchung eines anderen RNA-Rezeptors erfolgte der Versuchsablauf bei MDA5 Knockout Mäusen. Tiere mit einem MDA5 Knockout wiesen zwar eine signifikante Zunahme der transaortalen Flussgeschwindigkeit auf, sechs Wochen nach der Operation lag deren Mittelwert jedoch bei 1773,545 mm/s, was unter der Grenze zur Diagnose der Stenose liegt. Die Kontrollgruppe entwickelte auch hier zuverlässig eine AS mit einem Mittelwert von 2382,543 mm/s (siehe Abb. 32). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nach sechs Wochen signifikant (p-Wert: 0,009).

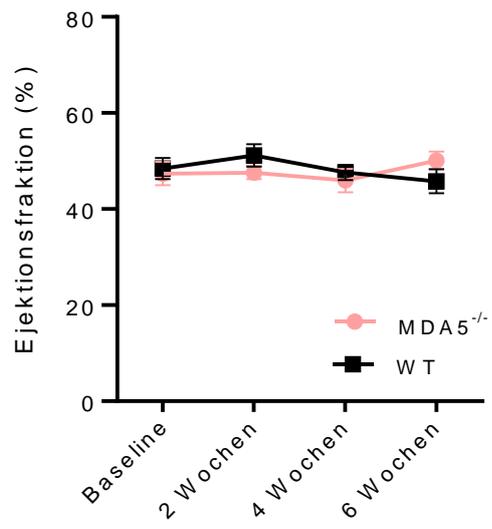
Es zeigte sich bei keiner der beiden Gruppen eine signifikante Verringerung der EF (siehe Abb. 34), die genauen Werte finden sich erneut tabellarisch aufgelistet (siehe Tab. 6).



**Abb. 32:** Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT und MDA5 Knockout Tieren - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$



**Abb. 33:** Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT und MDA5 Knockout Tieren - \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$



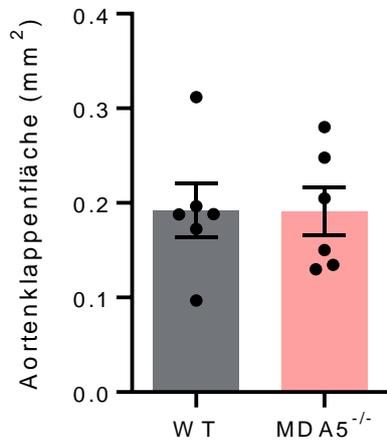
**Abb. 34:** EF bei WT und MDA5 Knockout Tieren

**Tab. 6:** Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT behandelt mit PBS und C4a, zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen

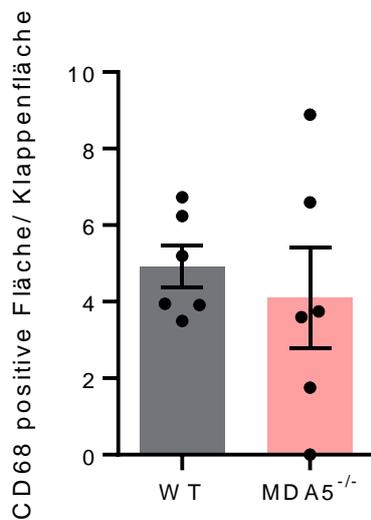
Parameter	Einheit	Woche 0		Woche 6		p-Wert
		WT	MDA5 -/-	WT	MDA5 -/-	
<b>Suprasternale Achse</b>						
Mittlere Flussgeschwindigkeit	mm/s	672,26	596,82	1167,83	795,16	<b>0,001</b>
Mittlerer Druckgradient	mmHg	1,83	1,45	5,81	2,77	<b>0,001</b>
Flussgeschwindigkeit transaortal	mm/s	1444,23	1284,67	2382,54	1773,54	<b>0,009</b>
<b>Parasternal kurze Achse</b>						
Herzfrequenz	/min	456,12	448,23	471,77	463,78	0,554
Schlagvolumen	µl	39,61	36,47	39,58	39,58	0,998
Ejektionsfraktion	%	44,30	48,38	44,28	46,18	0,554
Herzzeitvolumen	ml/min	38,28	16,38	18,61	18,41	0,880
LV-Masse	mg	116,32	124,16	140,27	125,85	0,231
<b>Parasternal lange Achse</b>						
Herzfrequenz	/min	459,82	448,32	480,62	467,88	0,341
Volumen	µl	39,44	40,8	46,68	42,70	0,541
Schlagvolumen	µl	35,64	33,29	40,19	38,73	0,634
Ejektionsfraktion	%	47,18	45,11	48,19	47,95	0,940
Herzzeitvolumen	ml/min	16,38	14,84	19,33	18,15	0,461

In den histologischen Untersuchungen zeigten sich im Kontrast zu den Ultraschalluntersuchungen keine signifikanten Ergebnisse. Weder die H.E. Färbung noch die CD68 Färbung zeigten einen Unterschied bezüglich der Klappenfläche oder dem

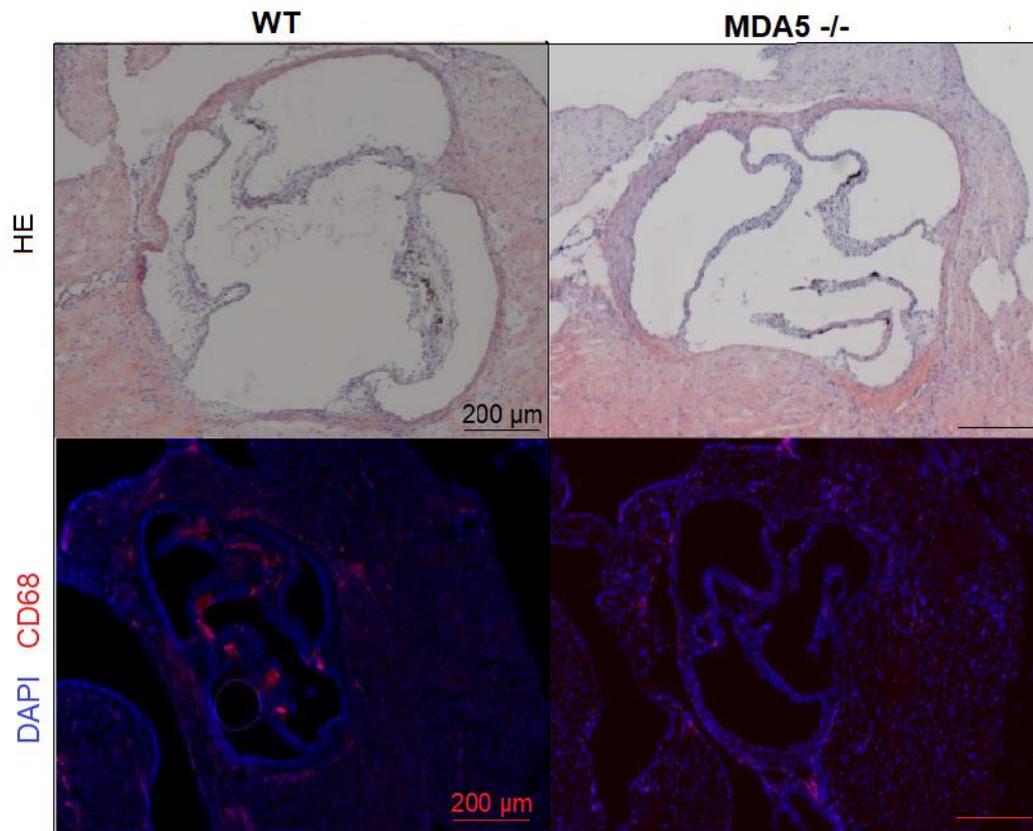
prozentualen Anteil an Makrophagen im Klappengewebe (siehe Abb. 35 und 36). Eine beispielhafte Darstellung von angefärbten Aortenklappen ist in Abb.37 zu finden.



**Abb. 35:** HE Färbung bei WT und MDA5 Knockout Tieren



**Abb. 36:** CD68 Färbung bei WT und MDA5 Knockout Tieren



**Abb. 37:** Aortenklappen von WT (links) und MDA5 Knockout Tieren (rechts) in H.E. (oben) und CD68 Färbung (unten)

## 4. Diskussion

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass im Mausmodell die beiden PRR TLR3 und MDA5 eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Aortenklappenstenose spielen. Wir konnten demonstrieren, dass TLR3 defiziente Mäuse und Tiere, die mit einem pharmakologischen TLR3-Inhibitor behandelt wurden, vor der Entwicklung einer AS geschützt sind. Dies bestätigte sich versuchsübergreifend sowohl in der echokardiographischen Kontrolle in Form einer nicht erhöhten transvalvulären Flussgeschwindigkeit, als auch in der histologischen Untersuchung der anschließend explantierten Aortenklappen. Die Mäuse ohne Aktivität des TLR3 zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Tieren keine Verdickung der Klappentaschen und weniger Infiltration von Makrophagen. Ähnliche Ergebnisse erzielten wir bei Mäusen mit MDA5 Knockout, auch hier waren die Tiere vor ausgeprägter Entwicklung einer AS geschützt.

Eine Stimulierung des TLR3 mittels Poly(I:C) zeigte keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse, Tiere mit und ohne Stimulierung entwickelten tendenziell ähnlich stark ausgeprägte AS.

Bei der AS handelt es sich um ein insbesondere im Alter häufiges Krankheitsbild, welches bislang medikamentös weder präventiv noch therapeutisch moduliert werden kann. Die einzige Option zur Therapie ist der Ersatz der Aortenklappe, interventionell oder chirurgisch. Dies ist jedoch häufig mit Risiken verbunden (Vahanian et al., 2022).

Die Pathogenese der AS ist Gegenstand intensiver Forschung. Nach wie vor ist nicht gänzlich geklärt, welche genauen Prozesse zur Stenosierung führen. Nach anfänglichen Theorien, es handle sich lediglich um einen rein degenerativen Prozess, konnte in den letzten Jahren immer deutlicher nachgewiesen werden, dass viel mehr eine inflammatorische Reaktion auf Endothelreizung die Stenosierung begünstigt (Rajamannan et al., 2011).

Durch den demographischen Wandel mit einer immer älter werdenden Gesellschaft kann von einer ausgeprägten Zunahme und Relevanz des Krankheitsbildes ausgegangen werden (Lindman et al., 2016; Osnabrugge et al., 2013). Das weitere Verständnis genauer Abläufe ist essenziell, um präventive und weniger risikobehaftete medikamentöse Therapieansätze etablieren zu können. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit dem TLR3 einen Bestandteil der inflammatorischen Reaktion am Endothel näher zu untersuchen. Es

konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass die Aktivierung des TLR3 eine entscheidende Rolle im Prozess der Stenosierung der AK spielt und auch weitere RNA-Rezeptoren wie MDA5 von Bedeutung sind.

#### 4.1 Induktion der Aortenklappenstenose

Das Maus Modell zur mechanischen Induktion einer AS wurde erstmals 2014 von Honda et al. publiziert (Honda et al., 2014). Die Weiterentwicklung und Modifikation erfolgten 2019. Die Methode wurde insofern ausgeweitet, als durch verschiedene Art und Ausprägung der mechanischen Endothelschädigung eine Unterscheidung in milde, moderate und ausgeprägte AS ermöglicht wurde (Niepmann et al., 2019).

Darüber hinaus gibt es verschiedene weitere Modelle zur Untersuchung der AS. Genetische Faktoren, die die Ausbildung einer bikuspiden Aortenklappe und somit eine frühe Neigung zur AS begünstigen, sind zum Beispiel eNOS und NOTCH1. Bei Knockout Mäusen dieser Art ist also von der Entwicklung einer AS auszugehen (Nigam und Srivastava, 2009). Ein anderes Modell mit ähnlichem Ansatz untersucht Mäuse ohne das Protein Periostin, welches im Endeffekt ebenfalls die Expression von NOTCH1 hemmt und somit auch zur Ausbildung bikuspider Aortenklappen führt (Tkatchenko et al., 2009). Diese beiden Modelle enden zwar in der frühzeitigen Entwicklung einer AS bei den Mäusen, jedoch ist die Ausgangslage mit bikuspider Klappe eine andere, als bei der klassischen kalzifizierenden AS beim Menschen im hohen Alter und der Grund für die Entwicklung nicht direkt vergleichbar.

Weitere Modelle arbeiten mit der Verfütterung bestimmter Diäten, zum Beispiel einer fett- bzw. kohlenhydratreichen Diät über einen längeren Zeitraum. Die dabei entwickelten AS waren jedoch nicht stark ausgeprägt (Drolet et al., 2006).

Die mechanische Induktion der AS scheint aktuell die realistischste Darstellung des tatsächlich stattfindenden Prozesses bestehend aus verdickten Klappentaschen, Fibrosierung, Infiltration von Makrophagen und Kalzium Ablagerung zu sein. Wie auch beim Menschen, der im Alter oft ein kombiniertes Klappenvitium bestehend aus AS und Aortenklappeninsuffizienz aufweist, entwickeln auch die Mäuse bei dieser Methode im Verlauf des Versuchs, insbesondere bei ausgeprägter Klappenverletzung eine moderate Insuffizienz. Ein weiterer großer Vorteil besteht darin, dass die Methode in einem

moderaten Zeitfenster vergleichsweise einfach durchzuführen ist und bei jeder Art von Maus, egal ob genetisch verändert oder nicht, angewandt werden kann.

Aufgrund der augenscheinlich realistischsten Darstellung des Prozesses der Entwicklung der AS wurde für diese Arbeit die mechanische Endothelschädigung als Methode gewählt. Es muss jedoch festgestellt werden, dass es sich bei der Induktion um eine einmalige, plötzliche und einzig mechanische Schädigung des Klappenendothels handelt, während der Mensch über Jahre hinweg und mit verschiedenen Risikofaktoren und Vorerkrankungen einem chronischen Prozess unterliegt. Man sollte sich dessen bewusst sein, dass auch diese Methode nicht uneingeschränkt auf die tatsächliche Pathogenese beim Menschen zu übertragen ist.

#### 4.2 Übertragung des Mausmodells auf die humane Situation

Wie in 4.1 erwähnt sind die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse im Rahmen eines Mausversuchs entstanden. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen ist also begrenzt.

Ein wichtiger Unterschied ist zunächst, dass es sich bei den Versuchsmäusen um junge Tiere handelt, welche in der Regel an keinerlei Erkrankungen leiden. Der Mensch bei dem eine AS vorliegt ist in der Regel bereits älter und bringt mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere Erkrankungen mit sich. Die Limitierungen des Mausmodells werden in 4.1 dargestellt, insbesondere der zeitliche Ablauf der Entstehung der AS ist bei der in unseren Versuchen genutzten OP ein ganz anderer als beim Menschen, der die AS jahrelang entwickelt.

Weiterhin leidet die Vergleichbarkeit unter der unterschiedlichen Physiologie von Maus und Mensch. Das Genom der Maus wurde 2002 aufgeschlüsselt und ähnelt dem des Menschen, insbesondere umfasst es ebenfalls ungefähr drei Milliarden Basenpaare (Waterson et al. 2002). Auch wenn es beim anatomischen Aufbau des Herzens und der Erregungsleitungsbahnen strukturelle Ähnlichkeiten zu geben scheint (Rentschler et al. 2011), fällt auf, dass das Herz der Maus mit einer Frequenz von 550-650 Schlägen pro Minute deutlich schneller schlägt als das des Menschen. Es ist nicht davon auszugehen, dass eine normale WT Maus mit einer Lebenserwartung von zwei bis drei Jahren jemals ein Krankheitsbild wie die AS entwickeln würde. Um einen realistischen Rückschluss auf die Beteiligung von TLR3 und MDA5 an der Pathogenese der AS beim Menschen ziehen

zu können müssen zunächst viele weitere Tierversuche stattfinden. Insbesondere Großtierversuche, beispielsweise am Schwein, wären sicherlich notwendig, um die Vergleichbarkeit mit dem Menschen wahrscheinlicher zu machen.

Weiterhin gibt es bislang keinerlei Erfahrung mit der Anwendung von bspw. C4a im Menschen. Auch dieses Molekül müsste also zunächst besser verstanden werden. Toxizitätsstudien müssten erfolgen, bevor daran gedacht werden kann, es als Medikament einzusetzen. Insbesondere die immunsupprimierende Wirkung stellt hier ein potentiell Hindernis dar.

Daher basieren die folgend geschilderten Schlussfolgerungen und diskutierten Ansätze zur Anwendung der erlangten Ergebnisse (insb. in 4.5 und 4.6) oft auf der theoretischen Annahme, dass die Ergebnisse sich auch in weiteren Versuchen bestätigen und eines Tages auch auf den Menschen anwendbar sein könnten.

#### 4.3 TLR3 bei kardiovaskulären Erkrankungen

Dass der TLR3 bei vaskulären Erkrankungen von Bedeutung ist, konnte bereits bewiesen werden. Insbesondere bei der Ausbildung atherosklerotischer Plaques spielt er eine Rolle. Zimmer et al. untersuchten den TLR3 und seine Funktion bei der Pathogenese der Atherosklerose sowohl in vivo als auch in vitro und nutzen ebenfalls Poly(I:C) zur Stimulation. Es konnte bewiesen werden, dass die Aktivierung von TLR3 mittels Poly(I:C) zu erhöhter Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies, erhöhter endothelabhängiger Vasodilatation und verminderter Re-Endothelialisierung nach Schädigung führt. Dass Poly(I:C) in diesem Versuch durch seine Wirkung am TLR3 für die Veränderungen verantwortlich ist, zeigte sich insofern, als sich bei TLR3 Knockout Mäusen trotz gleicher Stimulation die genannten Effekte nicht provozieren ließen. In vitro konnte dann untersucht werden, welche proinflammatorischen Auswirkungen durch Stimulierung des TLR3 erzielt wurden. Die Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und Interferon- $\gamma$ -induced protein 10 (IP-10) wurden vermehrt produziert. Die Dosierung von Poly(I:C) war hier mit Injektionen von 100  $\mu$ g alle 48 Stunden gewählt (Zimmer et al., 2011).

Da die Krankheitsbilder Atherosklerose und AS ähnliche Risikofaktoren aufweisen, lässt sich eine zumindest ähnliche Genese vermuten. Das Vorkommen von TLR3 in Endothelzellen in Gefäßen generell, wie auch an der Aortenklappe, in Kombination mit

den 2011 erzielten Ergebnissen spricht für eine Beteiligung an sämtlichen Erkrankungen mit Endothelschädigung.

Um die Beteiligung an der Genese der AS nachzuweisen, führten wir zur Stimulation des TLR3 in unserem Mausversuch ebenfalls ein Experiment mit Poly(I:C) durch. Wir wählten hier im Hinblick auf die Ergebnisse von Zimmer et al. zunächst dieselbe Dosierung mit 100 µg Poly(I:C) alle 48 Stunden. Dieser Versuch zeigte jedoch keinerlei Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, weshalb wir die Dosierung insofern erhöhten, als die Injektion alle 24 Stunden durchgeführt wurde. Auch hier konnte kein besonders ausgeprägtes Ergebnis in Form einer zusätzlich verstärkten AS bei Stimulierung erzielt werden, bis auf marginal signifikante Unterschiede nach 4 Wochen, bildeten alle Tiere im Versuch ähnlich ausgeprägte AS aus (siehe 3.1). Gründe hierfür könnten nach wie vor eine nicht ausreichend starke Dosierung oder eine nicht adäquate Applikation sein. Da jedoch genau diese Form der Applikation auch bei Zimmer et al. 2011 gewählt wurde und die Ergebnisse in dieser Studie eine ausgeprägte Stimulation und Zytokin-Ausschüttung zeigten, welche die Endothelfunktion der Mäuse eindeutig beeinflusste, halten wir andere Gründe für wahrscheinlicher. Zunächst stellt die mechanische Schädigung der Aortenklappe in dem durchgeführten Modell selbst bereits einen starken Stimulus zur Immunsystemaktivierung dar. Die Verletzung des Gewebes hat das Ziel eine Endothelschädigung hervorzurufen. Diese Endothelschädigung führt zur endogenen Stimulation der PRR und durch freiwerdende RNA insbesondere auch zur Stimulation des TLR3. Wir postulieren, dass die endogene Stimulation bereits so ausgeprägt ist, dass eine externe Stimulation kaum weitere Effekte auslösen kann. Des Weiteren führt die hoch dosierte Applikation von Poly(I:C) zu einer chronischen Aktivierung des Immunsystems, auch extrakardial, was die Vergleichbarkeit mit der menschlichen Genese der AS einschränkt.

Im Gegensatz dazu konnten wir den Effekt des TLR3 bei Knockout Tieren deutlich darstellen. Es lässt sich also schlussfolgern, dass die Ausschaltung des Rezeptors zu einem Schutz vor AS führt und er ansonsten bei durchgeführter Operation bereits nahezu vollständig stimuliert wird.

Auch die Antagonisierung zeigte klare Ergebnisse. C4a als Antagonist am TLR3 schützt ebenfalls vor der Ausbildung einer AS. Insgesamt wirkt die Antagonisierung sogar noch effektiver als das Knockout, die Ergebnisse nach 6 Wochen postoperativ waren im

Vergleich stärker signifikant. Dies legt die Vermutung nahe, dass C4a auch an anderen Rezeptoren als nur dem TLR3 antagonistisch wirken könnte und dadurch weitere Komponenten des angeborenen Immunsystems gehemmt werden und eine verringerte Inflamationsreaktion auf mechanische Reizung stattfindet. Jedoch scheinen davon zumindest die anderen TLR ausgenommen zu sein, denn wie Cheng et al. nach ihrer Untersuchung des Moleküls 2011 erklärten, hat C4a auf diese keine Wirkung (Cheng et al., 2011).

#### 4.4 MDA5 als weiterer RNA Rezeptor

Da die Pathogenese der AS sicherlich multifaktoriell ist und viele verschiedene Rezeptoren des angeborenen Immunsystems von Bedeutung sind, untersuchten wir zum besseren Verständnis MDA5 als PRR, welcher ebenfalls langkettige dsRNA erkennt. MDA5 und vor allem sein Vorkommen und seine Rolle bei Erkrankungen sind bislang noch nicht so effektiv erforscht wie andere PRR. Außerdem handelt es sich trotz ähnlichem Liganden um eine andere Erkennungsweise der Pathogene. Während zum Beispiel TLR3 membrangebunden vorliegt, befindet sich MDA5 frei im Zytosol. So lässt sich zunächst nicht nachvollziehen, wie der genaue Mechanismus des Zusammentreffens mit Pathogenen abläuft. Es ist bekannt, dass MDA5 vor allem dsRNA erkennt, welche im menschlichen Körper so nicht vorkommt und lediglich in Viren zu finden ist (Wu et al., 2013). Ob DAMPs, die bspw. für TLR3 auch als wichtige Liganden fungieren, bei MDA5 ebenfalls als Liganden von Bedeutung sind oder nur eine untergeordnete Rolle spielen, ist fraglich.

In unserem Versuch mit MDA5 Knockout Mäusen zeigten sich sechs Wochen postoperativ signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Allerdings waren diese Unterschiede im Vergleich mit den TLR3 Knockout bzw. Antagonisierungs- Versuchen deutlich weniger ausgeprägt. Dies lässt sich eventuell dadurch erklären, dass MDA5 durch die bei mechanischer Induktion der AS freiwerdenden DAMPs weniger stimuliert wird als TLR3 und somit eine geringere Rolle im Prozess der Immunaktivierung durch Endothelreizung im Rahmen der Pathogenese der AS spielt. So zeigen auch die histologischen Untersuchungen nach MDA5 Knockout keine so eindrucklichen Ergebnisse, wie es bei TLR3 Knockout der Fall war.

Johnstone et al. publizierten 2012 eine Studie, die den Zusammenhang zwischen Influenza Impfung und kardiovaskulären Ereignissen inklusive Myokardinfarkt und Schlaganfall über vier Grippe Saisons bei kardiovaskulär vorerkrankten Probanden 2003-2007 untersuchte. Es stellte sich heraus, dass in den Jahren, in denen der verabreichte Influenza Impfstoff mit den tatsächlich zirkulierenden Influenza Varianten übereinstimmte, das Outcome der geimpften Probanden besser war, als in den Jahren, in denen die zirkulierenden Varianten weniger mit dem Impfstoff übereinstimmten (Johnstone et al., 2012). Der Schutz vor viraler Infektion scheint also das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse zu reduzieren. Hier lässt sich nun diskutieren, ob virale Infektionen im Verlauf des Lebens auch ein Risikofaktor für die Entwicklung der AS sein könnten. Durch die Virämie werden Rezeptoren wie der MDA5 und viele mehr aktiviert und stimuliert, potenziell auch im Bereich der Aortenklappe. Die Aktivierung führt nachweislich zu einer Inflammation, welche die Ausbildung einer AS wie oben beschrieben begünstigt. Eventuell könnte also die Impfung gegen bestimmte virale Erreger und dadurch weniger Kontakt mit viraler dsRNA die Progression der AS verringern.

#### 4.5 Klinische Anwendbarkeit

Da nachgewiesen werden konnte, dass Ausschaltung bzw. Inhibierung des TLR3 mittels C4a die Mäuse vor der Ausbildung einer AS schützt, lässt sich mit der Applikation von C4a ein erster potenzieller Ansatz zur medikamentösen therapeutischen Anwendung diskutieren.

Tendenziell überprüft das genutzte Tiermodell jedoch vor allem die präventive Komponente des TLR3 Antagonisten. Die Tiere im Versuch weisen alle keinerlei Vorerkrankungen oder Risikofaktoren auf, es handelt sich um junge gesunde Mäuse. Es wird also lediglich gezeigt, dass C4a den initialen Reiz zur Entwicklung der AS und somit die klinische Ausbildung verhindert, indem die Immunreaktion und somit Inflammation bei Endothelschädigung verringert wird, ohne dass vorher je eine Schädigung stattfand. Zunächst leidet hier wie oben erwähnt die Vergleichbarkeit, da ein Tiermodell nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar ist. Es bedarf weiterer und größer angelegter Tierstudien, um die Ergebnisse zu bestätigen und zu vertiefen, bevor Rückschlüsse auf die menschliche Pathogenese gezogen werden können.

Des Weiteren sind Menschen im hohen Alter in der Regel vorerkrankt. Die AS entwickelt sich mit den Risikofaktoren über Jahrzehnte und äußert sich oft erst in späteren Stadien symptomatisch (Bonow et al., 2008). Die präventive Wirksamkeit von C4a bei den Mäusen lässt sich hier also nicht auf den realen Krankheitsverlauf übertragen. Es stellt sich die Frage, bis zu welchem Zeitpunkt C4a als präventives Medikament noch wirkt und wann es appliziert werden müsste, bzw. ab welchem Krankheitsstadium die AS bereits zu weit fortgeschritten ist, um die Progression zu verhindern. Hier könnte eine Art Risikoscreening einen Ansatz darstellen. Patienten, denen eine noch milde AS diagnostiziert wird, entwickeln daraus mit deutlich geringerer Wahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten Jahre eine moderate AS, als diejenigen mit moderater AS eine ausgeprägte AS entwickeln. Das Risiko einer ausgeprägten, mit starken Symptomen verbundenen AS steigt also ab dem moderaten Stadium extrem, was die regelmäßige Kontrolle von Patienten mit milder AS rechtfertigt (Bonow et al., 2008). Sinnvoll erscheint es hier daher, bereits das weniger wahrscheinliche Fortschreiten der milden in die moderate AS und damit die die Lebensqualität einschränkende und generell lebensverkürzende Symptomatik zu verhindern. Es stellt sich die Frage, ob eine medikamentöse Behandlung mit C4a diesen Fortschritt von mild zu moderat beeinflussen kann, indem die immer wiederkehrende Endothelreizung durch dauerhafte Inflammation mittels TLR3 Hemmung zumindest teilweise unterbrochen wird. Auch um diese Theorie überprüfen zu können, bedarf es zunächst erweiterter Tiermodelle.

C4a als Medikament ist bisher kaum erforscht. Um es als therapeutisches Mittel zur Prävention der AS nutzen zu können, sollte zunächst genauer untersucht werden, welche extrakardialen Auswirkungen das Molekül mit sich bringt. In jedem Fall wirkt C4a stark immunsupprimierend. Die hemmende Wirkung auf den TLR3 zeigt sich natürlich nicht nur an der Aortenklappe. Eine systemische Immunsuppression bei systemischer Applikation stellt – insbesondere für sowieso schon im Sinne von kardiovaskulären Risikofaktoren vorerkrankte Patienten – eine große gesundheitliche Gefahr dar. Vermehrtes Erkranken an bspw. bakteriellen oder auch viralen Erregern verschlechtert gesamtheitlich die Lebenserwartung. Hinzu kommt, dass wie in 4.3 erwähnt, virale Erkrankungen, zu denen immunsupprimierte Menschen vermehrt neigen, potenziell sogar die Entwicklung der AS begünstigen könnten, was den Effekt des Medikaments wiederum vermindern würde. Ein

tiefergehendes pharmakologisches Verständnis von C4a ist hier unabdingbar, bevor es zur Therapie oder Prävention genutzt werden kann.

Im Jahr 2021 wurde eine Studie veröffentlicht, die in regelmäßigen Abständen Patienten nach TAVI bzw. chirurgischem Aortenklappenersatz mit biologischer Klappe untersuchte. Als Bildgebung wurde hier neben der Echokardiographie das  $^{18}\text{F}$ -NaF PET/CT ( $^{18}\text{F}$ -Natriumfluorid Positronen-Emissions-Tomografie/ Computer-Tomografie) genutzt. Die Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -NaF an der biologischen Klappe und dem nativen Klappenring, welcher nach TAVI verbleibt, wurde als Marker für persistierendes entzündliches Geschehen verwendet. Ein Ergebnis der Studie war, dass im Sinne der Degeneration und damit Haltbarkeit der Klappenprothese kein Unterschied zwischen TAVI und chirurgischem Ersatz besteht. Außerdem zeigte sich, dass in dem zurückbleibenden nativen Klappengewebe nach TAVI die Inflammation ohne weitere mechanische Belastung fortschreitet. Dies bestärkt, dass es sich bei der Ausbildung der AS viel mehr um einen inflammatorischen Prozess handelt als lediglich um Degeneration durch mechanische Belastung. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Inflammation nach therapeutischer Intervention durch Klappenersatz am Rand der Klappenprothese im nativen Gewebe fortschreitet und somit nach gewisser Zeit auch zu weiterer Degeneration der neuen Klappe führt und eine Restenosierung begünstigt. Die vermehrte Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -NaF korreliert mit den später in der Echokardiographie erhobenen Verschlechterungen der transaortalen Flussgeschwindigkeit, diese lassen sich dadurch adäquater vorhersagen als durch vorhandene Risikofaktoren (Kwiecinski et al., 2021).

In Bezug auf die therapeutische Anwendung von C4a lässt sich hier ein weiterer Ansatz diskutieren. Aufgrund der mangelnden Erfahrung mit systemischer Applikation von C4a beim Menschen, könnte nach ausgedehnten weiteren Studien die lokale Applikation an und um die Klappenprothese nach Aortenklappenersatz eine Option darstellen. Die lokale Applikation brächte weniger unerwünschte Nebenwirkungen im Rahmen der Immunsuppression mit sich, als eine systemische Applikation es täte. Außerdem könnte gegebenenfalls der Fortschritt der Inflammation direkt am Ort des Geschehens inhibiert oder zumindest verlangsamt werden, sodass es erst später zu einem Übertreten der Inflammation auf die Klappenprothese kommt und diese somit eine längere Haltbarkeit und verzögerte Restenosierung aufweist. Ob die lokale Applikation jedoch überhaupt die

gewünschten Effekte erzielt, sollte in weiteren Studien zunächst im Tiermodell überprüft werden.

#### 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Dass die PRR und insbesondere TLR3 und MDA5 eine entscheidende Rolle im Prozess der Pathogenese der AS spielen, konnte in dieser Dissertation in vivo bewiesen werden. Die Modulation am TLR3 führt zu einem ausgeprägten Schutz vor der Entwicklung der AS und die Antagonisierung mittels C4a ist ein vielversprechender Ansatz zur medikamentösen Therapie oder zumindest Prävention des Krankheitsfortschritts. Um C4a jedoch tatsächlich dem Menschen verabreichen zu können, sind nach wie vor viele genauere Studien notwendig. Die pharmakologischen Eigenschaften von C4a müssen detaillierter verstanden, die potenziellen unerwünschten Nebenwirkungen erforscht und eine mögliche lokale Applikation als Option verifiziert werden. Zunächst bedarf es hier noch einiger Tierversuche, bevor das Medikament in diesem Kontext dem Menschen verabreicht werden kann.

Insgesamt handelt es sich bei der Entwicklung der AS sicherlich um einen multifaktoriellen Prozess. Neben TLR3 und MDA5 sind zahlreiche weitere Komponenten des angeborenen Immunsystems beteiligt. Forschung im Hinblick auf weitere beteiligte Rezeptoren lässt sich anhand des hier genutzten Mausmodells zur Induktion der AS durchführen.

## 5 Zusammenfassung

Die Aortenklappenstenose ist eine Erkrankung von großer Relevanz für die Weltbevölkerung, da bislang keinerlei präventive oder medikamentös kurative Behandlungsansätze existieren.

Die Pathogenese des Erkrankungsbildes ist Gegenstand aktueller Forschung. Bekannt ist bisher, dass es sich nicht nur um degenerative Abnutzung, sondern vor allem um einen inflammatorischen und zellulär regulierten Prozess handelt. Durch endotheliale Schädigung kommt es über die Einwanderung von Lipoproteinen zu oxidativem Stress und Freisetzung von Damage Associated Molecular Pattern, welche wiederum über Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren zur Rekrutierung verschiedenster Zellen des angeborenen Immunsystems und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führen. Dieser Immunsystemaktivierung folgen fibrotischer Umbau und Kalzifizierung des Klappengewebes.

Der Toll-like Rezeptor 3 und auch das Melanom-Differenzierungsantigen 5 als Bestandteil der Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems scheinen Teil dieses Prozesses zu sein, wie sich in verschiedenen Vorarbeiten bereits zeigte. In vitro konnte bei der Stimulation des TLR3 in VICs aus entnommenen Aortenklappen eine Aktivierung der inflammatorischen Signalwege und eine zunehmende Kalzifizierung detektiert werden. Zur Erweiterung dieser Versuche wird in dieser Arbeit ein Mausversuch genutzt, in dem den Tieren operativ eine Aortenklappenstenose induziert wird. In anschließenden echokardiographischen Kontrollen wird anhand von Parametern wie der transaortalen Flussgeschwindigkeit und der Ejektionsfraktion die postoperative Entwicklung der Aortenklappe untersucht. Dabei wird zwischen Mäusen unterschieden, bei denen entweder genetisch die besagten Rezeptoren ausgeschaltet wurden oder Agonisten (Poly(I:C)), bzw. Antagonisten (Compound4a) am TLR3 verabreicht wurden.

Diese Versuche dienen dem Verständnis der Relevanz der beiden Rezeptoren für die Entstehung des Krankheitsbildes.

Durch die postoperative Stimulierung von Wildtyp Tieren mit dem TLR3 Liganden Poly(I:C) konnten wir feststellen, dass eine Aggravierung der Aortenklappenstenose mit dem Rezeptor Liganden im Vergleich zu den nicht stimulierten Tieren unter unseren Gegebenheiten nur geringgradig möglich war. Ein potentieller Grund dafür ist, dass die

Endothelschädigung durch die Operation endogen bereits die TLR3 aufsättigt und eine Überstimulation entsprechend nicht erfolgen kann.

Der Versuch mit TLR3 Knockout Mäusen zeigte im Vergleich mit Wildtyp Tieren jedoch signifikante Ergebnisse. Tiere ohne TLR3 Funktion entwickelten trotz drahtinduzierter Induktion keine Aortenklappenstenose, waren also davor geschützt. Auch die potentielle Verfälschung der Ergebnisse durch Entstehung einer Herzinsuffizienz wurde echokardiographisch ausgeschlossen.

Dies bestätigte sich auch bei Inhibition des Rezeptor-Liganden Komplexes (TLR3-dsRNA-Komplex) mit dem Molekül Compound4a. Antagonisierte Tiere entwickelten trotz Operation keine Aortenklappenstenose. Auch histologisch zeigten sich in der H.E. Färbung sowie der CD68 Färbung signifikant geringere Klappenöffnungsflächen und vermehrte Einwanderung von Makrophagen bei den Wildtyp Tieren, welche regulär eine Aortenklappenstenose entwickelten. Es lässt sich also vermuten, dass der TLR3 im Mausmodell an der Entstehung des Krankheitsbildes beteiligt ist.

Auch MDA5 Knockout Tiere entwickelten im Vergleich mit Wildtypen weniger ausgeprägte Aortenklappenstenose, wenn auch die Ergebnisse etwas weniger signifikant waren als bei TLR3 Knockout.

Die Mustererkennungsrezeptoren und insbesondere TLR3 scheinen also im murinen Modell maßgeblich an der Pathogenese der Aortenklappenstenose beteiligt zu sein. Um diese Erkenntnis therapeutisch anwenden zu können, bedarf es noch weiterer Versuche. Untersuchungen im Hinblick auf die Auswirkungen und die vielversprechende therapeutisch bzw. präventiv mögliche Nutzbarkeit von C4a können interessante Erkenntnisse liefern.

## 6 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Darstellung einer AS in der Echokardiographie	12
<b>Abb. 2:</b> Sicht auf die aufgeklappte Aorta ascendens	14
<b>Abb. 3:</b> Die verschiedenen Lokalisationen und Adaptermoleküle der TLR	23
<b>Abb. 4:</b> Aufbau von MDA5	27
<b>Abb. 5:</b> Zeitstrahl genereller Versuchsablauf	28
<b>Abb. 6:</b> Parasternal lange Achse in der Echokardiographie der Maus	29
<b>Abb. 7:</b> Parasternal kurze Achse in der Echokardiographie der Maus	30
<b>Abb. 8:</b> Apikaler vier Kammer Blick in der Echokardiographie der Maus	31
<b>Abb. 9:</b> Linkslaterale Achse in der Echokardiographie der Maus	31
<b>Abb. 10:</b> Aortenklappen-Aufsicht in der Echokardiographie der Maus	32
<b>Abb. 11:</b> Suprasternale Achse in der Echokardiographie der Maus	33
<b>Abb. 12:</b> Drahtinduzierte Endothelschädigung an der Aortenklappe	34
<b>Abb. 13:</b> Zeitstrahl Versuchsablauf 2.2.1	35
<b>Abb. 14:</b> Zeitstrahl Versuchsablauf 2.2.2	36
<b>Abb. 15:</b> Zeitstrahl Versuchsablauf 2.2.3	36
<b>Abb. 16:</b> Zeitstrahl Versuchsablauf 2.2.4	37
<b>Abb. 17:</b> Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C)	39
<b>Abb. 18:</b> Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C)	40
<b>Abb. 19:</b> EF bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C)	40
<b>Abb. 20:</b> Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT und TLR3 Knockout Tieren	42
<b>Abb. 21:</b> Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT und TLR3 Knockout Tieren	43
<b>Abb. 22:</b> EF bei WT und TLR3 Knockout Tieren	43
<b>Abb. 23:</b> H.E. Färbung bei WT und TLR3 Knockout Tieren	45
<b>Abb. 24:</b> CD68 Färbung bei WT und TLR3 Knockout Tieren	45
<b>Abb. 25:</b> Aortenklappen von WT (links) und TLR3 Knockout Tieren (rechts) in H.E. (oben) und CD68 Färbung (unten)	46
<b>Abb. 26:</b> Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT behandelt mit PBS und C4a - * = $p < 0.05$ , ** = $p \leq 0.01$ , *** = $p \leq 0.001$	47
<b>Abb. 27:</b> Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT behandelt mit PBS und C4a	48
<b>Abb. 28:</b> EF bei WT behandelt mit PBS und C4a	48
<b>Abb. 29:</b> H.E. Färbung bei WT behandelt mit PBS und C4a	50
<b>Abb. 30:</b> CD68 Färbung bei WT behandelt mit PBS und C4a	50
<b>Abb. 31:</b> Aortenklappen von WT behandelt mit PBS (links) und C4a (rechts) in H.E. (oben) und CD68 Färbung (unten)	51
<b>Abb. 32:</b> Transaortale Flussgeschwindigkeit bei WT und MDA5 Knockout Tieren	52
<b>Abb. 33:</b> Mittlerer transaortaler Druckgradient bei WT und MDA5 Knockout Tieren	52
<b>Abb. 34:</b> EF bei WT und MDA5 Knockout Tieren	53
<b>Abb. 35:</b> HE Färbung bei WT und MDA5 Knockout Tieren	55

- Abb. 36:** CD68 Färbung bei WT und MDA5 Knockout Tieren 55
- Abb. 37:** Aortenklappen von WT (links) und MDA5 Knockout Tieren (rechts) in H.E. (oben) und CD68 Färbung (unten) 56

## 7 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Diagnosekriterien AS im Herzultraschall (Vahanian et al., 2022; Herold, 2021)	13
<b>Tab. 2:</b> Übersicht Toll-like Rezeptoren des Menschen, eine Auswahl ihrer zugehörigen PAMPs und Adaptermoleküle (Luo et al., 2019)	22
<b>Tab. 3:</b> Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT behandelt mit NaCl und Poly(I:C) zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen	41
<b>Tab. 4:</b> Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT und TLR3 Knockout Tieren, zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen	44
<b>Tab. 5:</b> Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT behandelt mit PBS und C4a, zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen	49
<b>Tab. 6:</b> Übersicht über die in der Echokardiographie erhobenen Parameter bei WT behandelt mit PBS und C4a, zu Beginn und nach sechs Wochen sowie der p-Wert im Vergleich zwischen den beiden Gruppen nach sechs Wochen	54

## 8. Literaturverzeichnis

Akira S. Toll-like receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 38105–38108

Asdonk T, Steinmetz M, Krogmann A, Ströcker C, Lahrmann C, Motz I, Paul-Krahe K, Flender A, Schmitz T, Barchet W, Hartmann G, Nickenig G, Zimmer S. MDA-5 activation by cytoplasmic double-stranded RNA impairs endothelial function and aggravates atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2016; 20: 1696–1705

Bar-On L, Jung S. Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation. *Immunological reviews* 2010; 234: 76–89

Bax JJ, Delgado V, Bapat V, Baumgartner H, Collet JP, Erbel R, Hamm C, Kappetein AP, Leipsic J, Leon MB, MacCarthy P, Piazza N, Pibarot P, Roberts WC, Rodés-Cabau J, Serruys PW, Thomas M, Vahanian A, Webb J, Zamorano JL, Windecker S. Open issues in transcatheter aortic valve implantation. Part 1: patient selection and treatment strategy for transcatheter aortic valve implantation. *European heart journal* 2014; 35: 2627–2638

Bell JK, Askins J, Hall PR, Davies DR, Segal DM. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 8792–8797

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004a; 430: 257–263

Beutler B. Innate immunity: an overview. *Molecular immunology* 2004b; 40: 845–859

Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon, Antonio C Jr, Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS. 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for

the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* 2008; 118: e523-661

Capoulade R, Chan KL, Yeang C, Mathieu P, Bossé Y, Dumesnil JG, Tam JW, Teo KK, Mahmut A, Yang X, Witztum JL, Arsenault BJ, Després J-P, Pibarot P, Tsimikas S. Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 66: 1236–1246

Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation* 2010; 121: 306–314

Chaplin DD. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; 125: S3-23

Cheng K, Wang X, Yin H. Small-molecule inhibitors of the TLR3/dsRNA complex. *Journal of the American Chemical Society* 2011; 133: 3764–3767

Chui MC, Newby DE, Panarelli M, Bloomfield P, Boon NA. Association between calcific aortic stenosis and hypercholesterolemia: is there a need for a randomized controlled trial of cholesterol-lowering therapy? *Clinical cardiology* 2001; 24: 52–55

Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *The New England journal of medicine* 2005; 352: 2389–2397

Drolet M-C, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 47: 850–855

Field AK, Tytell AA, Lampson GP, Hilleman MR. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1967; 58: 1004–1010

Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005; 111: 3316–3326

Fukuda K, Tsujita T, Matsumoto M, Seya T, Sakiyama H, Nishikawa F, Nishikawa S, Hasegawa T. Analysis of the interaction between human TLR3 ectodomain and nucleic acids. *Nucleic acids symposium series (2004)* 2006: 249–250

Galeone A, Brunetti G, Oranger A, Greco G, Di Benedetto A, Mori G, Colucci S, Zallone A, Paparella D, Grano M. Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand. *International journal of cardiology* 2013; 169: 296–304

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 8459–8464

Goettsch C, Hutcheson JD, Aikawa M, Iwata H, Pham T, Nykjaer A, Kjolby M, Rogers M, Michel T, Shibasaki M, Hagita S, Kramann R, Rader DJ, Libby P, Singh SA, Aikawa E. Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *The Journal of clinical investigation* 2016; 126: 1323–1336

Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, Bönner F, Zimmer S, Nickenig G, Jansen F. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel

Therapeutic Targets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2020; 40: 885–900

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111: 927–930

Anatomy of the human body. Gray H, Lewis WH, Reg. Philadelphia: Lea & Febiger 2000  
Grover FL, Vemulapalli S, Carroll JD, Edwards FH, Mack MJ, Thourani VH, Brindis RG, Shahian DM, Ruiz CE, Jacobs JP, Hanzel G, Bavaria JE, Tuzcu EM, Peterson ED, Fitzgerald S, Kourtis M, Michaels J, Christensen B, Seward WF, Hewitt K, Holmes DR, JR. 2016 Annual Report of The Society of Thoracic Surgeons/American College of Cardiology Transcatheter Valve Therapy Registry. *The Annals of thoracic surgery* 2017; 103: 1021–1035

Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mäyränpää M, Werkkala K, Lommi J, Turto H, Kupari M, Kovanen PT. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44: 1859–1866

Herold G. Herold G. *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung*; 2016; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold, Gerd; 2016.: De Gruyter 2021

Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, Otaki Y, Hasegawa H, Netsu S, Funayama A, Ishino M, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyashita T, Kubota I. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014; 34: 270–278

Hu J, Lei H, Liu L, Xu D. Lipoprotein(a), a Lethal Player in Calcific Aortic Valve Disease. *Frontiers in cell and developmental biology* 2022; 10: 812368

Isoda K, Matsuki T, Kondo H, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010; 30: 708–715

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* 2004; 5: 987–995

Janeway CA, JR, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 2002; 20: 197–216

Johnstone J, Loeb M, Teo KK, Gao P, Dyal L, Liu L, Avezum A, Cardona-Munoz E, Sleight P, Fagard R, Yusuf S. Influenza vaccination and major adverse vascular events in high-risk patients. *Circulation* 2012; 126: 278–286

Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends in immunology* 2001; 22: 78–83

Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 63: 470–477

Kanwar A, Thaden JJ, Nkomo VT. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis. *Mayo Clinic proceedings* 2018; 93: 488–508

Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 12542–12550

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 2010; 11: 373–384

Kim KM. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Federation proceedings* 1976; 35: 156–162

Kuck K-H, Bleiziffer S, Eggebrecht H, Ensminger S, Frerker C, Möllmann H, Nef H, Thiele H, Treede H, Wimmer-Greinecker G, Walther T. Konsensuspapier der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) und der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) zur kathetergestützten Aortenklappenimplantation (TAVI) 2020. *Kardiologie* 2020; 14: 182–204

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical journal* 2009; 420: 1–16

Kwieceński J, Tzolos E, Carlidge TRG, Fletcher A, Doris MK, Bing R, Tarkin JM, Seidman MA, Gulsin GS, Cruden NL, Barton AK, Uren NG, Williams MC, van Beek, Edwin J R, Leipsic J, Dey D, Makkar RR, Slomka PJ, Rudd JHF, Newby DE, Sellers SL, Berman DS, Dweck MR. Native Aortic Valve Disease Progression and Bioprosthetic Valve Degeneration in Patients With Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Circulation* 2021; 144: 1396–1408

Ladich E, Nakano M, Carter-Monroe N, Virmani R. Pathology of calcific aortic stenosis. *Future cardiology* 2011; 7: 629–642

Lee H-K, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* 2006; 24: 153–163

Lee H-L, Woo KM, Ryoo H-M, Baek J-H. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 391: 1087–1092

Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR, Brown DL, Block PC, Guyton RA, Pichard AD, Bavaria JE, Herrmann HC, Douglas PS, Petersen JL, Akin JJ, Anderson WN, Wang D, Pocock S. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *The New England journal of medicine* 2010; 363: 1597–1607

Leon MB, Smith CR, Mack MJ, Makkar RR, Svensson LG, Kodali SK, Thourani VH, Tuzcu EM, Miller DC, Herrmann HC, Doshi D, Cohen DJ, Pichard AD, Kapadia S, Dewey T, Babaliaros V, Szeto WY, Williams MR, Kereiakes D, Zajarias A, Greason KL, Whisenant BK, Hodson RW, Moses JW, Trento A, Brown DL, Fearon WF, Pibarot P, Hahn RT, Jaber WA, Anderson WN, Alu MC, Webb JG. Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. *The New England journal of medicine* 2016; 374: 1609–1620

Lewin MB, Otto CM. The bicuspid aortic valve: adverse outcomes from infancy to old age. *Circulation* 2005; 111: 832–834

Lindman BR, Clavel M-A, Mathieu P, Lung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nature reviews. Disease primers* 2016; 2: 16006

Luo L, Lucas RM, Liu L, Stow JL. Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors. *Journal of cell science* 2019; 133

Makkar RR, Fontana GP, Jilaihawi H, Kapadia S, Pichard AD, Douglas PS, Thourani VH, Babaliaros VC, Webb JG, Herrmann HC, Bavaria JE, Kodali S, Brown DL, Bowers B, Dewey TM, Svensson LG, Tuzcu M, Moses JW, Williams MR, Siegel RJ, Akin JJ, Anderson WN, Pocock S, Smith CR, Leon MB. Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis. *The New England journal of medicine* 2012; 366: 1696–1704

Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 2009; 30: 766–775  
Medzhitov R, Janeway C, JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews* 2000; 173: 89–97

Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nature immunology* 2004; 5: 503–507

Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Gonçalves F, Rajamannan NM. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 49: 554–561

Neumann J. *Immunbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer 2008

New SEP, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, Libby P, Shanahan CM, Croce K, Aikawa E. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circulation research* 2013; 113: 72–77

Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, Adam M, Nordsiek J, Gyamfi-Poku I, Piayda K, Sinning J-M, Baldus S, Kelm M, Nickenig G, Zimmer S, Quast C. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2019; 108: 847–856

Niepmann S, Willemsen N, Boucher A, Stei M, Goody P, Zietzer A, Bulic M, Billig H, Odainic A, Weisheit C, Quast C, Adam M, Schmidt S, Bakhtiary F, Jansen F, Nickenig G, Latz E, Zimmer S. Toll-like receptor-3 contributes to the development of aortic valve stenosis. *Basic research in cardiology* 2023; 118: 13-28

Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2009; 47: 828–834

O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1996; 16: 523–532

Osnabrugge RLJ, Mylotte D, Head SJ, van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, Bogers, Ad J J C, Piazza N, Kappetein AP. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62: 1002–1012

Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP3, Gentile F, Jneid H, Krieger EV, Mack M, McLeod C, O'Gara PT, Rigolin VH, Sundt TM3, Thompson A, Toly C. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2021; 143: e35-e71

Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag 2018

Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1997; 17: 680–687

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

Reinöhl J, Kaier K, Reinecke H, Schmoor C, Frankenstein L, Vach W, Cribier A, Beyersdorf F, Bode C, Zehender M. Effect of Availability of Transcatheter Aortic-Valve

Replacement on Clinical Practice. *The New England journal of medicine* 2015; 373: 2438–2447

Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, Jalife J, Fishman GI. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction. *Development (Cambridge, England)* 2011; 10: 1785-1792

Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, Gerds E, Gohlke-Bärwolf C, Holme I, Kesäniemi YA, Malbecq W, Nienaber CA, Ray S, Skjaerpe T, Wachtell K, Willenheimer R. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *The New England journal of medicine* 2008; 359: 1343–1356

Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stensløkken K-O, Fiane A, Vaage J. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *Journal of the American Heart Association* 2017; 6

Saito T, Hirai R, Loo Y-M, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M, JR. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 582–587

Seong S-Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature reviews. Immunology* 2004; 4: 469–478

Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122: 669–682

Shen M, Tastet L, Capoulade R, Larose É, Bédard É, Arsenault M, Chetaille P, Dumesnil JG, Mathieu P, Clavel M-A, Pibarot P. Effect of age and aortic valve anatomy on

calcification and haemodynamic severity of aortic stenosis. *Heart (British Cardiac Society)* 2017; 103: 32–39

Simard L, Côté N, Dagenais F, Mathieu P, Couture C, Trahan S, Bossé Y, Mohammadi S, Pagé S, Joubert P, Clavel M-A. Sex-Related Discordance Between Aortic Valve Calcification and Hemodynamic Severity of Aortic Stenosis: Is Valvular Fibrosis the Explanation? *Circulation research* 2017; 120: 681–691

Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology* 1997; 29: 630–634

Thaden JJ, Nkomo VT, Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis. *Progress in cardiovascular diseases* 2014; 56: 565–571

Thanassoulis G, Massaro JM, Cury R, Manders E, Benjamin EJ, Vasan RS, Cupple LA, Hoffmann U, O'Donnell CJ, Kathiresan S. Associations of long-term and early adult atherosclerosis risk factors with aortic and mitral valve calcium. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 55: 2491–2498

Tkatchenko TV, Moreno-Rodriguez RA, Conway SJ, Molkentin JD, Markwald RR, Tkatchenko AV. Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease. *Physiological genomics* 2009; 39: 160–168

Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, Capodanno D, Conradi L, Bonis M de, Paulis R de, Delgado V, Freemantle N, Gilard M, Haugaa KH, Jeppsson A, Jüni P, Pierard L, Prendergast BD, Sádaba JR, Tribouilloy C, Wojakowski W. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European heart journal* 2022; 43: 561–632

Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clinical microbiology reviews* 2008; 21: 13–25

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril J, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis S, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent M, Brown D, Brown S, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell R, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla A, Church D, Clamp M, Clee C, Collins F, Cook L, Copley R, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty K, Deri J, Dermitzakis E, Dewey C, Dickens N, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn D, Eddy S, Elnitski L, Emes R, Eswara P, Eyraes E, Felsenfeld A, Fewell G, Flicek P, Foley K, Frankel W, Fulton L, Fulton R, Furey T, Gage D, Gibbs R, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves T, Green E, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison R, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier L, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe D, Johnson LS, Jones M, Jones T, Joy A, Kamal, M Karlsson E, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe D, Korf I, Kucherlapati R, Kulbokas E, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott D, Mardis E, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson J, Meldrim J, Meredith B, Mesirov J, Miller W, Miner T, Mongin E, Montgomery K, Morgan M, Mott R, Mullikin J, Muzny D, Nash W, Nelson J, Nhan M, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor M, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin K, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl C, Poliakov A, Ponce T, Ponting C, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe B, Roskin K, Rubin E, Rust A, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz M, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520-562

Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 2013; 152: 276–289

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 2004; 5: 730–737

Yutzey KE, Demer LL, Body SC, Huggins GS, Towler DA, Giachelli CM, Hofmann-Bowman MA, Mortlock DP, Rogers MB, Sadeghi MM, Aikawa E. Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014; 34: 2387–2393

Zeng Q, Song R, Fullerton DA, Ao L, Zhai Y, Li S, Ballak DB, Cleveland JC, JR, Reece TB, McKinsey TA, Xu D, Dinarello CA, Meng X. Interleukin-37 suppresses the osteogenic responses of human aortic valve interstitial cells in vitro and alleviates valve lesions in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017; 114: 1631–1636

Zhan Q, Song R, Li F, Ao L, Zeng Q, Xu D, Fullerton DA, Meng X. Double-stranded RNA upregulates the expression of inflammatory mediators in human aortic valve cells through the TLR3-TRIF-noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *American journal of physiology. Cell physiology* 2017; 312: C407-C417

Zhan Q, Song R, Zeng Q, Yao Q, Ao L, Xu D, Fullerton DA, Meng X. Activation of TLR3 induces osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells through the NF- $\kappa$ B and ERK1/2 pathways. *International journal of biological sciences* 2015; 11: 482–493

Zheng KH, Tzolos E, Dweck MR. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy. *Cardiology clinics* 2020; 38: 1–12

Zimmer S, Steinmetz M, Asdonk T, Motz I, Coch C, Hartmann E, Barchet W, Wassmann S, Hartmann G, Nickenig G. Activation of endothelial toll-like receptor 3 impairs endothelial function. *Circulation research* 2011; 108: 1358–1366

## 9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Sebastian Zimmer, für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die ausgezeichnete Betreuung.

Auch Herrn Dr. Sven Niepmann gilt ein großer Dank für seine tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung über viele Jahre hinweg.

Außerdem bedanke ich mich bei dem gesamten Team der Arbeitsgruppe.

Eine große Hilfe war mir meine Cousine Julia Schröfel durch das Korrekturlesen dieser Dissertation und die Unterstützung bei der formalen Gestaltung.

Weiterhin danke ich meinem Freund Philipp Könemann, der mir immer zur Seite steht, mich motiviert und in meinem Selbstvertrauen bestärkt.

Zu guter Letzt gilt mein großer Dank meinen Eltern Anja Storch-Boucher und Alain Boucher, meinem Bruder Erik, sowie meinen Großeltern Sigrid und Hans-Günter Schröfel, die mich jederzeit bedingungslos unterstützen und mir alles ermöglicht haben.