

Aus der Klinik für Herzchirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. H.-H. Sievers

---

# **Untersuchungen des Gens *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) bei Patienten mit bikuspidaler Aortenklappe**

---

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der medizinischen Fakultät -**



vorgelegt von  
**Carolin Hagemann**  
aus Berlin

Lübeck 2011

Dekan: Prof. Dr. W. Solbach

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hans-Hinrich Sievers

2. Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.12.2011

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Mit der BAV assoziierte Gene</b>	<b>9</b>
1.1.1. NOTCH1	9
1.1.2. UFD1L	11
1.1.3. Endotheliale Nitrit Oxidase Synthase	11
1.1.3.1. Struktur	12
1.1.3.2. eNOS: Funktionen	14
1.1.3.3. NO und der „L-arginine-nitric oxide pathway“	15
1.1.3.4. Regulation von eNOS	16
<b>1.2. SNP Untersuchungen der eNOS</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Patienten</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Material</b>	<b>24</b>
2.2.1. Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	24
2.2.2. Chemikalien	24
2.2.3. Medien und Stammlösungen	25
2.2.4. Primer	25
<b>2.3. Methoden</b>	<b>26</b>
2.3.1. RNA Isolierung	26
2.3.3. Real-Time PCR	28
2.3.4. DNA Isolierung	33
2.3.5. DNA-Sequenzierung	34

<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
3.1. Statistische Auswertung der Patientendaten	37
3.2. NOTCH1-Sequenzierung	41
3.2. eNOS-Gen RNA-Expression (schematische Darstellung BAV vs. TAV)	43
3.4. eNOS-Sequenzierung	44
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>47</b>
4.1. Patientencharakterisierung	47
4.2. Notch1-Sequenzierung	48
4.3. eNOS-Genexpression	49
4.4. eNOS-Sequenzierung	50
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>53</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>56</b>
Patientendaten	56
Real-Time PCR	57
eNOS-Sequenzierung	57
Sequenzierungsergebnisse der Pilotprojektpatienten	58
Quellenverzeichnis	59
Danksagung	63

## **Abkürzungsverzeichnis**

A.	Arteria
BAV	Bikuspide Aortenklappe
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
CaM	Calmodulin
CVM	Kardiovaskuläre Malformation
d.h.	das heißt
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
Häm	Hämoglobin
i. R.	im Rahmen
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Nitrit Oxid
NOTCH1	Ein Transmembranrezeptor
OP	Operation
PCR	Polymerase Kettenreaktion
dsRNA	Doppelstrang-RNA
mRNA	Messenger RNA
SDS	Sequenz Detection Systems
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAV	Trikuspidale Aortenklappe
UFD1L	Ubiquitin fusion degradation 1-like
z. B.	zum Beispiel

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Mögliche Formen der BAV mit Angabe ihrer Häufigkeit.	8
Abbildung 2a-c: Grundlegende Struktur eNOS und schematische Darstellung NOS Katalyseweges	13
Abbildung 3: NO vermittelte vaskuläre Relaxation	16
Abbildung 4: eNOS Regulation	18
Abbildung 5: Einfluss der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde; Extensionsphase einer TaqMan™ PCR.	31
Abbildung 6: Prinzip der On-Line PCR Detektion-Strahlengang im Abi Prism Gerät	32
Abbildung 7: Prinzip der DNA-Sequenzierung nach Sanger	35
Abbildung 8: Statistische Testverfahren – Hintergrund & Bewandtnis	37
Abbildung 9: Boxplot Vergleich Alter und Aortenklappenveränderung	38
Abbildung 10: Boxplot Vergleich BAV / TAV und Aorta ascendens	40
Abbildung 11: eNOS Expression	43
Abbildung 12: Genotypverteilung	44
Abbildung 13: Vergleich der BAV-Patienten mit Kontrollpatienten von „entrez SNP“	46

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht Patientendaten	23
Tabelle 2: Patienten Daten	24
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	24
Tabelle 4: Chemikalien	24
Tabelle 5: Medien und Stammlösungen	25
Tabelle 6: cDNA Primer	25
Tabelle 7: NOS3-Sequenz Primer	25
Tabelle 8: NOTCH1-Sequenz Primer	26
Tabelle 9: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	28
Tabelle 10: Reverse Transkriptase Reaktion	28
Tabelle 11: Real-Time PCR mit iQ™ SYBR® Green Supermix	29
Tabelle 12: RT PCR mit iQ™ SYBR® Green Supermix im ABI Prism 7000 SDS	30
Tabelle 13: Real Time quantitative PCR mit TaqMan™ im ABI Prism 7000 SDS	31
Tabelle 14: RT PCR mit TaqMan™ Reaktionsbedingungen	31
Tabelle 15: Genetische Varianten innerhalb des menschlichen NOTCH1-Gens	42
Tabelle 16: Allelhäufigkeiten von vier Missense-Varianten im NOTCH1-Gen	43
Tabelle 17: Relative eNOS-Expression bei Patienten mit BAV/TAV	43
Tabelle 18: Genotypverteilung der Kontrollpatienten von „entrez SNP“	45
Tabelle 19: Ergebnisse des exakten Tests nach Fisher für die eNOS SNPs	46
Tabelle 20: Patientendaten	56
Tabelle 21: Auswertung siRNA Versuch	57
Tabelle 22: Allelverteilung der eNOS Risiko-SNPs	57
Tabelle 23: Sequenzierungsergebnisse der Pilotprojekt	58

## I. Einleitung

Mit einer Prävalenz von 1-2% aller Neugeborenen handelt es sich bei der bikuspiden Aortenklappe (BAV), die ein kongenitaler struktureller Klappenfehler ist, um die häufigste Anomalie am menschlichen Herzen. [1] So trägt sie auf besondere Weise zu den kardiovaskulären Gesundheitsrisiken bei und stellt des Weiteren eine technische Herausforderung im Rahmen von Herzoperationen dar. Die Aortenklappe wird definiert als eine so genannte Taschenklappe und besteht normalerweise aus drei halbmondförmigen Taschen, den Semilunarklappen, und wird daher trikuspide Aortenklappe (TAV) genannt. [2] Bei der bikuspiden oder auch bikuspidalisierten Aortenklappe hingegen sind definitionsgemäß statt drei lediglich zwei dieser Taschenklappen vorhanden. Der Begriff der bikuspiden Aortenklappe beinhaltet jedoch unterschiedliche morphologische Phänotypen mit verschiedenen hämodynamischen Konditionen. [3] Es gibt verschieden BAV Arten, abhängig welche zwei der drei angelegten Taschenklappen fusionieren (Abbildung 1). Diese BAV Formen können entlang der Linie, an der die Klappen zusammengewachsen sind, eine Verdickung aufweisen, die Raphe genannt wird. So wurde diese Einteilung in einem Kollektiv von 304 Patienten von Sievers et al. publiziert. [3]

	0 raphe - <b>Type 0</b>		1 raphe - <b>Type 1</b>			2 raphes - <b>Type 2</b>
<b>main category:</b> number of raphes						
	21 (7)		269 (88)			14 (5)
<b>1. subcategory:</b> spatial position of cusps in Type 0 and raphes in Types 1 and 2	lat 13 (4)	ap 7 (2)	L - R 216 (71)	R - N 45 (15)	N - L 8 (3)	L - R / R - N 14 (5)

**Abbildung 1: Mögliche Formen der BAV mit Angabe ihrer Häufigkeit.**

Die hervorgehobenen Linien repräsentieren die Raphe. Die Kodierung für die Hauptkategorie ist der Typ: Typ 0 für eine Klappe ohne Raphe, Typ 1 für eine Klappe mit 1 Raphe und Typ 2 für eine Klappe mit 2 Raphen. Kodierung 1.Subkategorie: ap – anterior-posterior; lat. – lateral; L – linkskoronarer Sinus; R – rechtskoronarer Sinus; N – nichtkoronarer Sinus. Die Modelle zeigen zwischen welchen Segeln sich die Verwachsung befindet und in wie vielen Patienten (bzw. Prozentanteil) diese Art der Klappe gefunden wurde. (modifiziert nach *Sievers et al.*, 2007)



Die Pathogenese der BAV, deren Kenntnis über die Entscheidung einer OP bzw. deren folgende Nachbehandlung von äußerster Bedeutsamkeit wäre, ist jedoch noch nicht vollends geklärt und weitere genetische Analysen sind noch in Erforschung.

Insbesondere die Frage, ob es sich um eine genetisch bestimmte Krankheit handelt oder sich die BAV als Folge von hämodynamischen Verläufen innerhalb der Embryogenese entwickelt, spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Neuere Studien haben in diesem Zusammenhang schon zeigen können, dass die BAV eine Missbildung ist, die sich bereits im Laufe der Embryogenese ausbildet. [4]

### **1.1. Mit der BAV assoziierte Gene**

Bikuspide Aortenklappen sind das Ergebnis eines komplexen Entwicklungsprozesses. Familiäre Häufungen und Vererbungsanalysen der BAV unterstützen den Verdacht einer signifikanten ursprünglichen Vererbungskomponente. Frühere Untersuchungen ließen einen autosomal-dominanten Erbgang vermuten, diese schlossen jedoch keine Familien mit ein, in denen lediglich ein Familienmitglied betroffen war. Das Vorhandensein beider Erkrankungsmuster, d. h. sowohl Familien mit nur einem erkrankten Mitglied als auch mit mehreren Betroffenen, deutet auf einen multifaktoriellen Vererbungsmodus hin. Kürzliche Studien haben bereits statistische, genetische Modelle getestet, um zu zeigen, dass der Phänotyp der BAV und / oder der assoziierten kardiovaskulären Malformationen eine genetische Basis hat. Sie deuten an, dass eine oder mehrere Regionen des Genoms Gene kodieren, die für diesen Effekt (Entwicklung der Herzmissbildung) verantwortlich sind. [8] Überdies hat die Suche nach denkbaren Kandidatengenen erste Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Gene ergeben. So scheinen unter anderen das *NOTCH1*-, das *UFD1L*- und das *eNOS*-Gen auf die Entwicklung der Aortenklappe bzw. der BAV Einfluss zu nehmen. [1], [5]

#### **1.1.1. NOTCH1**

Eines der Gene, welches identifiziert wurde, ist das *NOTCH1*-Gen auf Chromosom 9q34.3. Es wurden Mutationen dieses Gens bei Patienten mit einer BAV gefunden, so z.B. eine heterozygote C zu T Transition auf Nukleotid 3322. [9] Es spielt nicht nur eine Rolle in der familiären BAV, sondern konnte auch in etwa 4% der sporadischen Fälle nachgewiesen werden. In Säugetieren existieren vier Mitglieder der NOTCH Familie,

NOTCH1-4, und jedes hat sein eigenes Expressionsmuster innerhalb der Embryogenese. [10]

Die NOTCH Signalkette ist ein hoch konservierter und sehr verbreiteter Mechanismus mit weitreichenden Effekten auf die Differenzierung der unterschiedlichsten Organe, wie z. B. die Muskulatur, das ZNS, das Pankreas und das Gefäßsystem. Analysen von Mäusen und Zebrafischen ließen erkennen, dass NOTCH eine entscheidende Rolle in der Förderung der Umgestaltung von Endothel in Mesenchym spielt. [1]

Das *NOTCH1*-Gen codiert einen „single-pass“ Transmembranrezeptor und es wurde beschrieben, dass es entscheidend für die Zellbestimmung innerhalb der Organogenese ist. [10] Des Weiteren wird NOTCH1 während der Entwicklung der Aortenklappe von Mäusen hoch exprimiert. [1] Der NOTCH1 Signalweg nimmt Einfluss auf die Embryogenese des Herzens, einschließlich der Aorten- und Pulmonalklappe, sowie der Entwicklung und Erhaltung der Aorta und anderer großer Gefäße. [11]

NOTCH1 unterdrückt die Aktivität von Runx2, einem zentralen Transkriptionsfaktor der Osteoblastenzelllinie. In Studien führte eine gezielte Unterbrechung von *NOTCH1* in Mäusen zu einer Sterblichkeit der Embryonen nach 9,5 Tagen. Außerdem verursachte die Ausschaltung des *NOTCH1* solch starke vaskuläre Defekte, dass weitere Studien der kardialen Valvulogenese ausgeschlossen waren. In Versuchen an Mausembryonen konnte an Tag 11,5 sowohl im Mesenchym des Ausflusstraktes, aus dem sich die Klappen entwickeln, als auch im Endokard reichlich *NOTCH1* mRNA abgeleitet werden. An Tag 13,5, an dem sich das Septum des gemeinsamen arteriellen Traktes entwickelt, wurde NOTCH1 in großen Mengen innerhalb des Endothelmantels und des Mesenchyms der Aortenklappensegel nachgewiesen. [9]

NOTCH1 wird nicht nur im Endokard exprimiert, sondern auch im Mesenchym von Endokardkissen des Ausflusstraktes, dessen Aortenklappenphänotyp dem von betroffenen Familienmitgliedern entspricht. [1] Eine besondere Rolle spielt NOTCH1 in der Migration von Zellen der Herzkissen und der Herzgalerie in die Kissen des Konotrunkes, aus dem die Aorten- und die Pulmonalklappe gebildet werden. [11] Diese Befunde zeigen, dass der NOTCH1 Signalweg für die morphologische Entwicklung der Aortenklappe entscheidend ist. [9]

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer BAV, sei es innerhalb von Familien oder in sporadischen Fällen, eine erhöhte Auftreten von Mutation im *NOTCH1*-Gen aufwiesen. Ferner ließen sich bei Patienten mit einer Mutation in *NOTCH1* eine erhöhte Inzidenz einer Kalzifikation der Aortenklappe feststellen. [10] Diese Kalzifi-

zierung ist Ergebnis einer inadäquaten Aktivierung einer osteoblasten spezifischen Genexpression, deren Mechanismus jedoch noch zu klären ist. [9] Es wurden sowohl Frameshift und Missense als auch Nonsense Mutationen bei Patienten mit einer BAV gefunden. [1], [9], [10]

### **1.1.2. UFD1L**

Die Suche nach möglichen Kandidatengenen bei der Untersuchung der Semilunarklappenmorphogenese wies ferner auf eine Mitbeteiligung des Gens „*Ubiquitin Fusion Degradation 1-Like*“ (*UFD1L*) hin. Während der Embryonalentwicklung ist das *UFD1L*-Gen in den mesodermalen Zellen hochreguliert. Diese sind nach ihrer Wanderung aus der Neuralleiste in die konotrunkale Herzregion, an der Bildung der Klappentaschen beteiligt. Das Gen befindet sich in der so benannten „CATCH“ Region des menschlichen Chromosoms 22. Das durch das *UFD1L*-Gen kodierte Protein spielt beim Abbau von ubiquinierten Proteinen eine Rolle. Bei einer Vergleichsstudie von an einer BAV erkrankten Patienten mit einer Kontrollgruppe wurde gezeigt, dass die Genexpression des *UFD1L*-Gens in den fusionierten Klappentaschen der BAV-Patienten im Gegensatz zur Kontrollgruppe verringert war. Ebenso konnte eine Verminderung des *UFD1L*-Proteins in den Patienten mit BAV festgestellt werden. Aus diesen Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der BAV um eine genetische Störung handelt, bei der das *UFD1L*-Gen eine zentrale Rolle spielt. [5]

### **1.1.3. Endotheliale Nitrit Oxidase Synthase**

Das Endothel ist die Zellschicht, die die innere Struktur des gesamten Zirkulationssystems bildet. Weiterhin dient das Endothel als eine anatomische Barriere zwischen Blut und Interstitium sowohl auf kapillarer Ebene, als auch innerhalb des Gefäßbaums. 1980 zeigten Furchgott und Zawadzki, dass die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur als Antwort auf Acetylcholin von einem anatomisch intakten Endothel abhängig ist. An der Regulation der Vasomotion ist neben weiteren Mediatoren besonders das Gas NO beteiligt, das unter anderem innerhalb des Endothelgewebes gebildet wird. Zuerst von Furchgott und Zawadzki beschrieben und als „vom Endothel abgeleiteter Relaxationsfaktor“ definiert, wurde NO erst in den späten Achtzigern als freies, radikales Gas NO erkannt. Eine Reduktion der basalen NO-Freisetzung könnte zu Hypertonus, Vasospasmus,

Thrombose und Arteriosklerose führen. Die Wiederherstellung der NO-Aktivität kann jedoch eine Regression von bevorstehenden Intimaläsionen induzieren. Ein Defekt innerhalb der endothelabhängigen Vasodilatation wird durch verschiedenste Risikofaktoren wie zum Beispiel Rauchen, Diabetes oder Hypercholesterinämie begünstigt und tritt außerdem als Konsequenz aus Atheromen in den Gefäßwänden auf.

In Säugetiergeweben wird NO aus der Guanidin Gruppe der Aminosäure L-Arginin freigesetzt. Es handelt sich hierbei um eine oxidative, NADPH abhängige Reaktion, dem „L-arginine-nitric oxide pathway“. Als Katalysator für diese Reaktion dienen Enzyme der Familie der so genannten NO Synthasen (NOS). Es existieren die folgenden drei Isoformen: die endotheliale, die neuronale und die induzierbare NOS. [12]

#### **1.1.3.1. Struktur**

Die drei verschiedenen NOS haben eine ähnliche genetische Struktur und jede der Isoformen existiert mit einer einzelnen Kopie auf dem menschlichen haploiden Genom. Die NOS sind aus zwei großen Untereinheiten aufgebaut: eine N-terminale Oxygenase- und eine C-terminale Reduktasedomäne. Während die Oxygenaseuntereinheit Bindungsstellen für Häm, BH<sub>4</sub> und L-Arginin enthält, verfügt die Reduktasedomäne über Bindungsarme für FAD, FMN und NADPH. Beide Domänen sind durch einen Bereich gekoppelt, an dem CaM (Calmodulin) gebunden werden kann. [13]

Die NOS Enzyme werden als Monomer synthetisiert. Die Monomere und auch die isolierten Reduktasedomänen können Elektronen von NADPH auf FAD und FMN übertragen. Des Weiteren haben sie eine eingeschränkte Funktion um molekularen Sauerstoff in O<sub>2</sub><sup>(-)</sup> zu reduzieren und können CaM binden. Dieser Kofaktor stimuliert den Transfer der Elektronen innerhalb der Reduktaseuntereinheit. Dennoch sind Monomere unfähig die Kofaktoren BH<sub>4</sub> oder das Substrat L-Arginin zu binden und somit die NO Produktion zu katalysieren. Aus diesem Grund bilden NOS Dimere; sie haben in dieser Form eine viel höhere enzymatische Aktivität als im Vergleich zum Monomer (Abb. 2a). Für die Bildung von aktiven NOS Dimeren ist die Mitwirkung von Häm notwendig. Ferner ist Häm erforderlich für die Interaktion zwischen der Reduktase- und der Oxygenaseuntereinheit und für die Übertragung der Elektronen der Flavine auf die Hämgruppe des gegenüberstehenden Monomers. Die Oxidationsrate von NADPH ist deutlich erhöht in substratfreien NOS Dimeren, die Häm enthalten, im Gegensatz zu Monomeren. Passend dazu ist auch die O<sub>2</sub><sup>(-)</sup> Produktion in diesen Dimeren viel effektiver (Abb. 2b).

Sind sowohl hinreichend L-Arginin als Substrat und BH<sub>4</sub> als Kofaktor vorhanden, vernetzen vollständige NOS Dimere ihre Hämgruppen und ihre O<sub>2</sub> Reduktion, um NO zu synthetisieren. Über das Zwischenprodukt N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginin entsteht zusätzlich zum NO das Nebenprodukt L-Citrullin (Abb. 2c). [14]

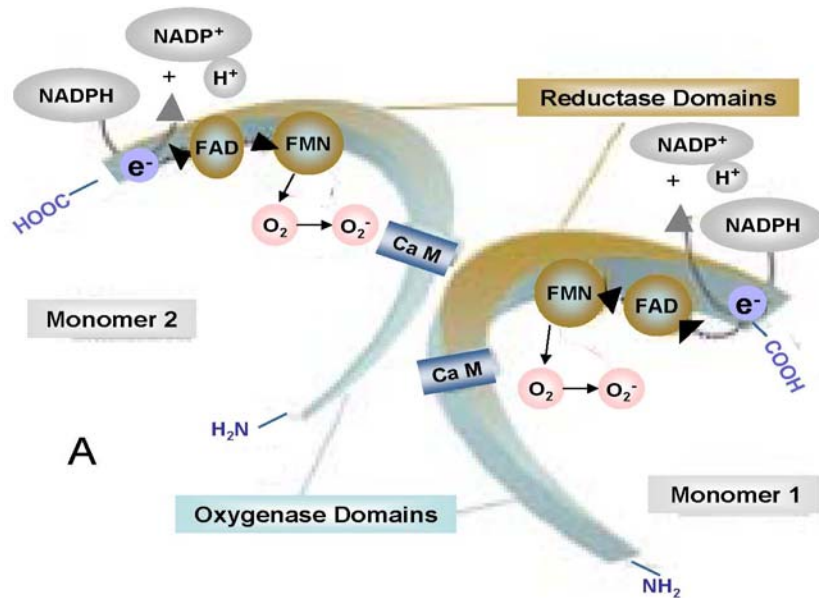


Abbildung 2a: Grundlegende Struktur eNOS und schematische Darstellung NOS Katalyseweges

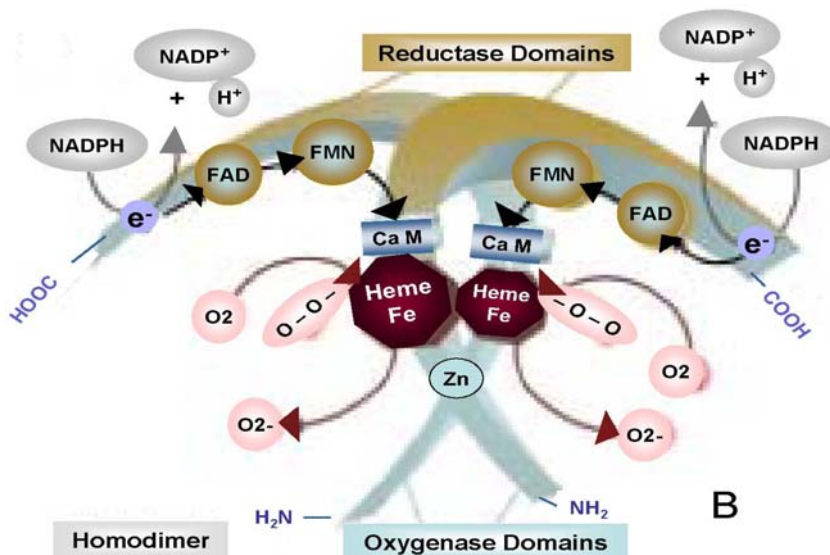
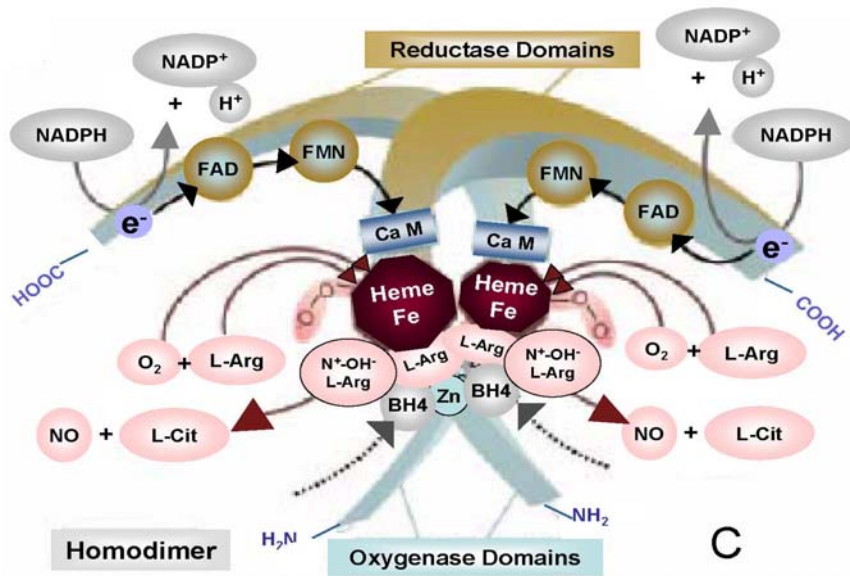


Abbildung 2b: Grundlegende Struktur eNOS und schematische Darstellung NOS Katalyseweges



**Abbildung 2c: Grundlegende Struktur eNOS und schematische Darstellung NOS Katalyseweges**  
 (Abbildung 2a-c: modifiziert nach Förstermann und Münzel, 2006)

### 1.1.3.2. eNOS: Funktionen

Die eNOS wird hauptsächlich in Endothelgewebe produziert und ist im besonderen Maße entscheidend für die Regulation des Zellwachstums und deren Apoptose. Fast ebenso wichtig ist der Einfluss der eNOS auf den Organismus in ihrer Eigenschaft als Vasodilatator und antithrombotisches Agens, denn als Reaktion auf Agonisten wie Bradykinin oder auch bei Scherstress der Intima, produziert sie eine geringe Menge von NO. Außerdem wurde gezeigt, dass Kardiomyozyten bereits in frühen embryonalen Stadien beginnen, konstitutiv eNOS zu exprimieren und so unter normalen physiologischen Gegebenheiten NO zu produzieren. Man vermutet, dass NO die Relaxation des Herzmuskels steigert und nicht nur die Kontraktilität, sondern auch die Koronarperfusion bestimmt. Neueste Erkenntnisse zeigten, dass die eNOS an der vaskulären Umgestaltung und Angiogenese nach Entwicklungsabschluss beteiligt ist, sowie an der Kardiomyogenese und der Bildung und Anordnung der Extremitätengefäße innerhalb der Embryogenese. [15]

Das NO, welches von eNOS produziert wird, schützt Zellen vor der Apoptose. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Apoptose von Leber- und Endothelzellen durch Kontakt mit einer geringen Konzentration von NO-Donatoren oder durch die Stimulation der endogenen NO-Abgabe reduziert werden konnte. Diese Regulation wird auf die Hemmung der Kaspase-3-Aktivität zurückgeführt. Die Apoptose ist ein hoch regulierter Prozess in der normalen Entstehung des Herzens. Innerhalb der embryonalen und postnata-

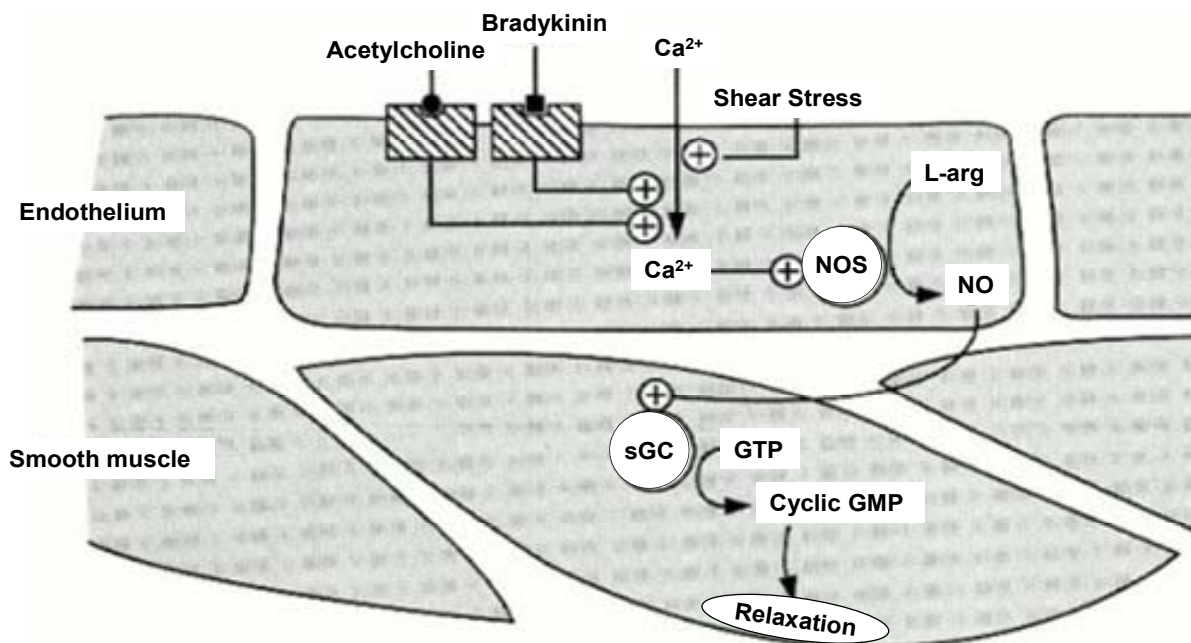
len Herzentwicklung konnte Apoptose in verschiedenen Regionen des Herzens nachgewiesen werden. Ein Anstieg der Apoptoserate innerhalb des Myokards während der embryonalen Entwicklung führt zu kongenitalen Herzfehlern und kardialer Dysfunktion. [16] Weiterhin wurde gezeigt, dass eine starke Assoziation zwischen dem Mangel von eNOS und dem Auftreten einer bikuspiden Aortenklappe bei Mäusen besteht. [15] Für das erste Mausmodell der BAV dienten Mäuse mit einer gezielten Deletion des eNOS-Gens und wies darauf hin, dass dieser Signalweg eine entscheidende Rolle in der Valvulogenese der Aorta spielt [7], da eNOS „knock out“-Mäuse eine hohe Prävalenz kongenitaler BAVs hatten. Ferner zeigten neueste Forschungsansätze, dass die eNOS Expression Einfluss auf die Aortenklappenanatomie und Dilatation der menschlichen Aortenwand hat. [10]

### **1.1.3.3. NO und der „L-arginine-nitric oxide pathway“**

Die Synthese von NO ist für die Vasodilatation der Gefäße verantwortlich bzw. bestimmt deren Tonus und nimmt auf diese Weise einen wesentlichen Einfluss auf den Blutdruck. Eine ebenfalls entscheidende Rolle übernimmt das NO im ZNS. Dort fungiert es als Neurotransmitter und unterstützt verschiedenste Funktionen einschließlich der Gedächtnisbildung. In der Peripherie existiert ein weit gefächertes Netzwerk von Nerven, die in nicht-adrenerge und nicht-cholinerge unterschieden werden. Diese Nerven agieren untereinander über einen NO abhängigen Mechanismus und steuern diverse Funktionen innerhalb des Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakts. Einen weiteren Beitrag leistet NO in der Kontrolle der Blutplättchenaggregation und Regulation der Herzkontraktilität. Außerdem wird NO im Rahmen der Immunabwehr in großen Mengen produziert: gebildet von Makrophagen kommt es wahrscheinlich auf Grund seiner zytotoxischen Eigenschaften innerhalb der nichtspezifischen Immunantwort zum Einsatz. Studien lassen erkennen, dass die Bildung des benötigten NO innerhalb der unspezifischen Immunantwort mit der induzierbaren Isoform aus der bereits oben genannten Enzymfamilie der NOS verbunden ist. [17] So wird die induzierbare NOS in vielerlei Zellen in erster Linie als Antwort auf inflammatorische Zytokine exprimiert. Hierzu zählen Makrophagen sowie Zellen der glatten Muskulatur. Diese NOS-Isoform kann, wenn sie aktiviert wurde, auf kontinuierliche Weise einen Überschuss von NO produzieren. [18]

Die neuronale NOS dagegen findet man in unterschiedlicher Menge in allen Teilen des Gehirns von Mensch und Tier. Weiterhin wurde mit Hilfe von Inhibitoren der NOS gezeigt, dass sie z. B. auch im Auerbachschen und Meissnerschen Plexus (Plexus myentericus und submucosus) des menschlichen Colons vorkommt. Alle oben genannten Mechanis-

men werden durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und dem daraus folgenden Anstieg von zyklischem Guanosinmonophosphat als Antwort der Zielzellen auf diverse Mediatoren geregelt. Dies lässt sich am Beispiel der vaskulären Relaxation durch NO als Reaktion auf Scherstress oder Bradykinin erklären (Abb. 3). Zur Freisetzung von NO aus L-Arginin werden mehrere Kofaktoren benötigt, die diese ungewöhnliche „Fünf Elektronen“ Oxidation eines Stickstoffmoleküls der Guanidingruppe des L-Arginin bewirken. [12] Zu diesen Kofaktoren gehören neben weiteren Kalzium und Calmodulin. [17]



**Abbildung 3: NO vermittelte vaskuläre Relaxation**

(modifiziert nach *Moncada und Higgs, 1993*).

Scherstress oder Agonisten wie Bradykinin und Acetylcholin bewirken Einstrom von  $Ca^{2+}$  in die Zelle.  $Ca^{2+}$  stimuliert die konstitutive NOS und führt zur Produktion von NO aus L-Arginin (L-arg). NO wiederum aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC), indem es an ihrer Hämgruppe bindet. So aktiviert, wandelt sie Guanosintri-phosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (Cyclic GMP) um. Eine Erhöhung des zyklischen GMP bewirkt eine Relaxation der glatten Muskelzellen (Smooth muscle)

#### 1.1.3.4. Regulation von eNOS

Die Expression des eNOS-Gens wird durch diverse Faktoren beeinflusst, auf die im Folgenden beispielhaft eingegangen wird. Studien haben gezeigt, dass Scherstress, Training und Hypoxie zu einer Erhöhung der eNOS Transkription führen. Auch eine Regulation durch Östrogene wird noch debattiert. Zellwachstum bewirkt einen Anstieg der eNOS mRNA und des Proteindurchsatzes. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  dagegen verringert die Expression von eNOS durch eine Abnahme in der mRNA Stabilität. Unter diesen genannten Faktoren scheinen Scherstress und Proliferation der Endothelzellen quantitativ zu den



Hauptregulationsfaktoren innerhalb der eNOS Expression zu zählen. [12] Obwohl man zunächst davon ausging, dass eNOS lediglich durch Calmodulin reguliert sei, konnte gezeigt werden, dass eNOS durch co- und posttranslationale Modifizierung mit Lipiden, Phosphorylierung an mehreren Proteinresten und geregelten Interaktionen von Proteinen kontrolliert wird.

Physiologisch sind Endothelzellen hämodynamischen Kräften des Blutes wie beispielsweise laminarem Scherstress ausgesetzt. Scherstress aktiviert über G-Proteine (Gs) mehrere Wege der Signaltransduktion, z. B. die der Adenylatcyclase (AC) und der Phosphorinosid-3-Kinase (PI3K). Diese führen über eine Phosphorylierung an Serinresten des eNOS-Proteins (S617 und S1179 für Akt, S635 und S1179 für PKA) zu einer Aktivierung von eNOS bzw. ermöglichen einen erhöhten Elektronenfluss durch die Reduktasedomäne von eNOS und somit eine gesteigerte NO Produktion. Weitere Stimuli der PI3K/Akt sind der Gefäßendothel Wachstumsfaktor (VEGF), Östrogen, Shpingosin 1-Phosphat (S-1-P) und Bradykinin, die an ihren jeweiligen Rezeptor binden. Allerdings aktivieren diese zusätzlich die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), die eine Erhöhung des Kalzium- und Diacylglycerolspiegels (DAG) innerhalb des Zytoplasmas auslöst. Der Anstieg des Kalziumlevels ( $Ca^{2+}$ ) wiederum regt Calmodulin (CaM) an, es bindet an die CaM-Bindungsdomäne von eNOS, um die Ausrichtung der Oxygenase- und Reduktasedomäne des Proteins zu unterstützen. Eine effiziente Produktion von NO ist von einer regelgerechten Organisation dieser beiden letzten Domänen abhängig. Außerdem kann CaM die CaMKinase II (CaMKII) aktivieren, die eNOS an S1179 phosporliert.

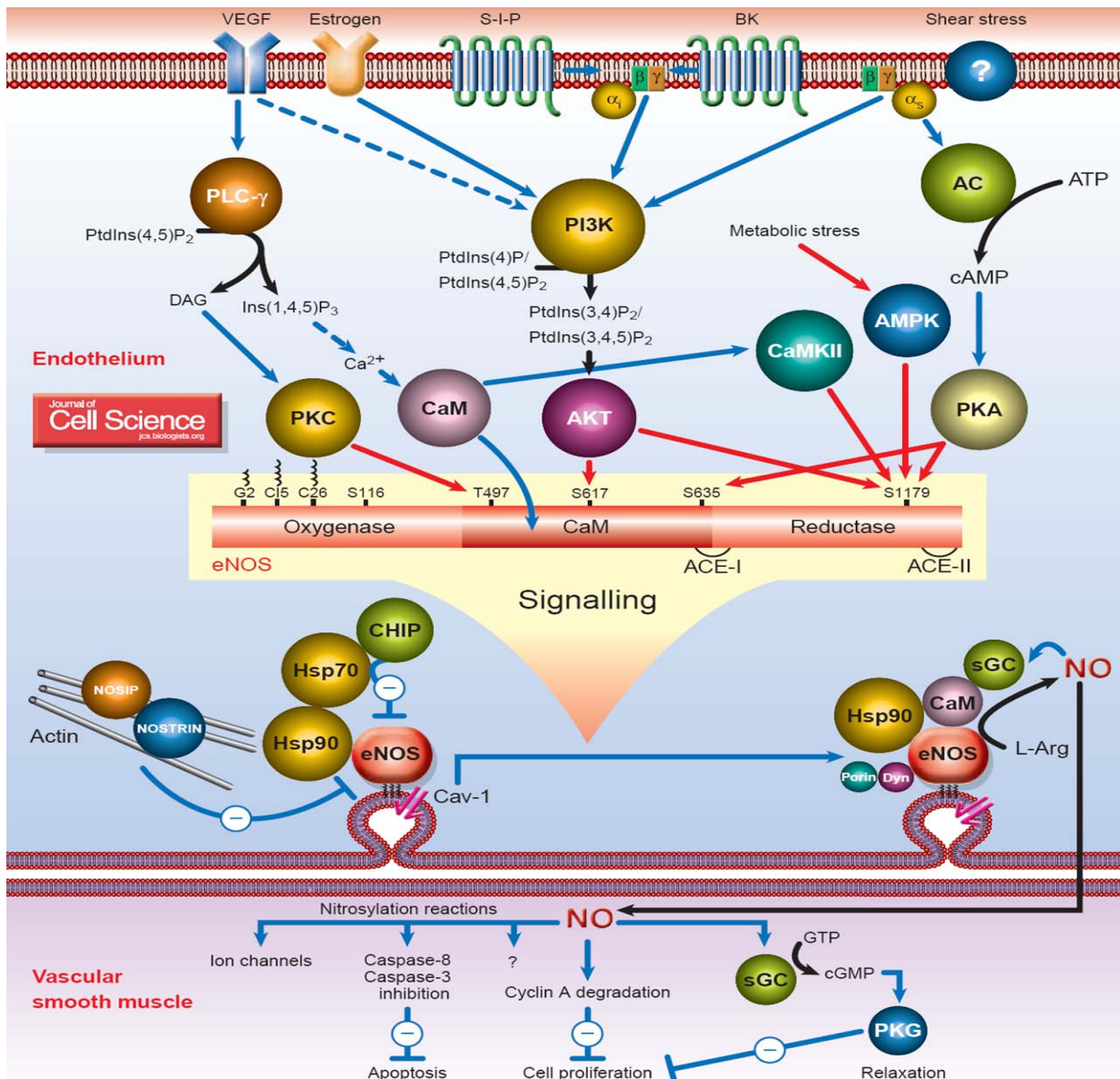


Abbildung 4: eNOS Regulation (modifiziert nach Sessa, 2004 )

Zwei autoinhibierende Kotrollelemente (AVE-I und ACE-II) hemmen die Aktivität von eNOS und beeinflussen die Sensitivität des Enzyms für Kalzium bzw. CaM. Wahrscheinlich ist, dass die sterische Hinderung durch diese nichtkatalytischen Einschübe mittels Phosphorylierung beseitigt werden kann. So wird der exakte Elektronenfluss von der Reduktase- zur Oxygenasedomäne und somit die NO Produktion gewährleistet. [18]

Obwohl eNOS keine hydrophoben, transmembranen Domänen enthält, ist es dennoch auf einen subzellulären Teil ausgerichtet, auf die Caveolae in der Plasmamembran. Caveolae sind kleine Einbuchtungen der Plasmamembran, die durch das Transmembranprotein Caveolin gekennzeichnet sind. In vielen Geweben dienen Caveole als

Anlagestelle für Moleküle wie Rezeptoren und G-Proteine oder eNOS. Das Vorkommen dieser Rezeptoren innerhalb der Caveolae könnte die Aktivierung von eNOS erleichtern, indem lokale Caveolae gebildet werden, in denen NOS-gekoppelte Signalmoleküle nah beieinander liegen. Caveolin-1 interagiert in Endothelzellen unmittelbar mit eNOS und hat auf diese Weise unter basalen Bedingungen einen inhibierenden Effekt auf eNOS. Diese Inhibition der eNOS-Aktivität kann jedoch durch  $Ca^{2+}$  / Calmodulin vollkommen aufgehoben werden. Dieser eNOS-Calmodulin Komplex wird durch verschiedene Agonisten ausgelöst. Der aktivierte Komplex synthetisiert NO bis die Konzentration des freien  $Ca^{2+}$  soweit sinkt, dass das Calmodulin vom eNOS dissoziiert und Caveolin-1 wieder an eNOS bindet. [12]

## **1.2. SNP Untersuchungen der eNOS**

Das humane eNOS Gen befindet sich auf der Region 7q35 → 7q36 des Chromosom 7 und enthält 26 Exons und 25 Introns, die etwa 21 Kilobasen der genomischen DNA umfassen. Das Gen erscheint als einzelne Kopie im haploiden humanen Genom und codiert eine mRNA von 4052 Nukleotiden. [19]

Für eNOS existieren drei verschiedene „Splice-Varianten“, die beim Herausschneiden der Introns aus der Prä mRNA entstehen. Diese Varianten mit neuen 3' Spleißstellen innerhalb des Intron 13 werden bezeichnet als eNOS13A, eNOS13B und eNOS13C. Sie enthalten alle die ersten 13 Exons des eNOS Gens und den gleichen Poly(A)-Schwanz am Ende des neuen Exons. Werden die „Splice-Varianten“ translatiert, entstehen gekürzte Proteine, denen die eNOS Aktivität bzw. die Reduktasedomäne der vollständigen eNOS fehlt und die Einfluss auf die Regulation der eNOS Aktivität und die NO Produktion im kardiovaskulären System nehmen. [20]

Innerhalb der Genstruktur lassen sich auf dem gesamten Gen verteilt verschiedenste SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) finden, d. h. einen Austausch von einzelnen Basen in der DNA. Sowohl im Bereich der Promoterregion und der Exons als auch in den Introns existieren SNPs, von denen jedoch lediglich einige wenige eine funktionelle Relevanz besitzen. Bis jetzt wurden zwei SNPs für das eNOS-Gen beschrieben, die sich auf die Funktion des eNOS-Proteins auswirken: Glu298Asp ( $G^{894}T$ ) auf Exon 7 und  $T^{-786}C$  im Bereich der Promoterregion von eNOS. [21]

Der einzelne Basenaustausch G894T auf Exon 7 des *eNOS*-Gen bedingt einen Wechsel von Glutamat zu Aspartat an Position 298 im eNOS-Protein. Das 894T Allel konnte mit Hypertonus, Herzinfarkt, acetylcholininduziertem Koronarspasmus und einem erhöhten Blutdruck als Antwort auf eine systemische  $\alpha_1$ -Adrenozeptor Aktivierung in Verbindung gebracht werden. Außerdem konnte der Trend für eine herabgesetzte eNOS Enzymaktivität in Personen mit dem eNOS 894T Allel im Vergleich zu Personen, die 894G homozygot sind, gezeigt werden. Eine Studie konnte darstellen, dass der Austausch von Glutamat und Aspartat an Stelle 298 zu einer engeren Drehung der  $\alpha$ -Helix und somit zu einer Anfälligkeit für einen Zerfall an dieser Stelle führt. Es ergeben sich dann zwei Produkte mit 100- bzw. 35-kDa. Dies könnte der Grund für einen funktionellen Effekt auf das eNOS-Protein sein. [21]

Der T<sup>-786</sup>C SNP dagegen ist in der Promoterregion des *eNOS*-Gens lokalisiert und Querschnittsstudien zeigten, dass es mit einer in vivo abgestumpften NO Bioaktivität assoziiert ist. Dies gilt für Patienten mit Hypertonus und für kaukasische und japanische Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit in mehreren Gefäßen. Eine verminderte Bioaktivität von NO, die zumindest zu einem gewissen Teil genetisch determiniert ist, kann Ursache für kardiovaskuläre Ereignisse sein und spielt sowohl eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von Artherosklerose, als auch bei der Erosion bzw. Ruptur von Artheroskleroseplaques, die kardiovaskulären Ereignissen zu Grunde liegen. Innerhalb des Gefäßsystems wird NO hauptsächlich von der eNOS gebildet. [22], [23]

Außerdem konnte in Studien mit Reporter Genen nachgewiesen werden, dass dieser Polymorphismus die Transkription von *eNOS* um bis zu 50% senken kann, sowohl unter Grundbedingungen als auch unter Hypoxie. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, dass das mutierte Allel das Replikationsprotein A1 binden kann, das als Genrepressorprotein wirkt. Auf diese Weise steht die T<sup>-786</sup>C Substitution in Verbindung mit Koronarspasmus und einer erhöhten koronaren Vasokonstriktion als Antwort auf Acetylcholin. [24]

### **1.3. Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit**

Bei der Entwicklung des menschlichen Herzens konnte bereits eine genetische Komponente nachgewiesen werden. So zeigten Studien, dass die Beteiligung von bestimmten Genen wie das *Ubiquitin fusion degradation 1-like* Gen (*UFD1L*) und das *NOTCH1*-Gen einen großen Einfluss auf die Ausbildung des menschlichen Herzens bzw. auf die der Aortenklappen nehmen. [1], [5] Interessanterweise wiesen weitere Forschungsergebnisse auf, dass besonders das Enzym „endothelial nitric oxide synthase“ (eNOS) an der Entwicklung des Herzens in Mäusen beteiligt und für die Ausbildung einer bikuspiden Aortenklappe verantwortlich ist. [6]

Da es bei Mäusen durch eine Subpression des eNOS-Gen in einer prägnanten Anzahl zur Entwicklung einer bikuspiden Aortenklappe kam und eNOS ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit zu den Genen, die an der Entstehung des menschlichen Herzens einen entscheidenden Anteil haben, zählt, stellt sich die Frage, in welcher Weise eNOS an der Herausbildung einer bikuspiden Aortenklappe beteiligt ist.

Auch ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen einer BAV, der Dilatation der Aortenwand und einer eNOS-Dysregulation wird diskutiert. In der Arbeit der Forschergruppe Aicher et al. konnte gezeigt werden, dass die Expression von eNOS in Endothelzellen der Aorta in BAV Patienten deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe mit einer TAV. Außerdem konnte eine hohe Korrelation zwischen der Expression von eNOS und des maximalen Aortendurchmessers in Patienten mit BAV nachgewiesen werden. In der TAV Kontrollgruppe konnte keine solche Korrelation gefunden werden. Die eNOS-Expression hat somit nicht nur eine Verbindung zur Entwicklung der Klappen, sondern auch zur Formation eines Aortenaneurysmas. [7]

Vor dem Hintergrund aktueller Forschungsarbeiten möchte die vorliegende Arbeit folgenden Fragen nachgehen:

1. Weisen Patienten mit BAV und mit dilatierter Aortenwand eine Dysregulation der eNOS auf?
2. Ist es zu erwarten, dass Patienten mit Mutationen des *NOCH1*-Gens ebenfalls eine Dysregulation des eNOS-Gens vorweisen?

Hierfür untersuchte die vorliegende Arbeit, wie sich das eNOS-Expressionsmuster dilatierter Aortenwände bei Patienten mit BAV im Vergleich zu Patienten mit TAV unterscheidet.

## **2. Material und Methoden**

Der folgende Abschnitt der Arbeit umfasst eine Auswahl von 58 Patienten, die zum größten Teil an einer BAV leiden.

Die *NOTCH1*-Untersuchungen wurden an einem Kollektiv von 48 Patienten mit BAV (mittleres Alter  $53,4 \pm 13,9$  Jahre, 40 Männer, 8 Frauen) durchgeführt und die Mutationshäufigkeit im *NOTCH1*-Gen untersucht. Hierbei wurden die gesamte kodierende Region (15 Kb), die Intron / Exon-Übergänge (34 Exons) sowie die 5' und 3'UTR des *NOTCH1*-Gens analysiert.

Außerdem wurde bei 8 Patienten (6 Patienten mit BAV und 2 Patienten mit TAV) das eNOS-Gen vollständig sequenziert, um nach bekannten, neuen oder gehäuft auftretenden SNPs zu fahnden.

### **2.1. Patienten**

Diese Arbeit umfasst insgesamt 58 Patienten (Durchschnittsalter  $51,8 \pm 12,6$  Jahre, 49 Männer, 9 Frauen). 46 Patienten hatten eine BAV (Durchschnittsalter  $50,1 \pm 12,7$  Jahre, 39 Männer, 7 Frauen). Diese Patienten wiesen einen BMI von durchschnittlich  $26,3 \pm 4,2$  und zeigten neben der BAV zusätzliche CVM. 18 Patienten zeigten eine Aortenstenose, 16 eine Aorteninsuffizienz und 12 Patienten mit BAV eine Stenose sowie eine Insuffizienz. Außerdem wurde bei 6 Patienten eine KHK nachgewiesen. 21 litten ferner an einer arteriellen, ein weiterer an einer pulmonalen Hypertonie und 5 sowohl an einem arteriellen als auch an einem pulmonalen Hypertonus. Von 46 Patienten mit BAV hatten 31 ein Aneurysma der thorakalen Aorta.

12 Patienten hatten eine normale Aortenklappe (TAV) in Kombination oder ohne eine andere CVM (Durchschnittsalter  $58,5 \pm 9,7$  Jahre, 10 Männer, 2 Frauen). Diese Patienten wiesen einen Durchschnitts-BMI von  $27,4 \pm 3,8$  auf. Alle Patienten zeigten eine Aorteninsuffizienz. Ansonsten konnte bei 3 Patienten eine KHK nachgewiesen werden. 9 litten dazu an einer arteriellen, ein Patient an einer pulmonalen Hypertonie und ein weiterer an beidem. Von 12 Patienten mit TAV zeigten 10 ein thorakales Aortenaneurysma (siehe Tabelle unten). Die genomische DNA wurde aus Gewebe extrahiert, das in operativen Eingriffen zum Klappen- oder Aortenersatz gewonnen wurde. Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie lag nach Aufklärung von jedem Patienten vor, ebenso die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission (Medizinische Fakultät der Universität Lübeck).

Patienten	Gesamt	BAV	TAV
<b>Anzahl</b>	58	46	12
<b>Frauen</b>	9	7	2
<b>Männer</b>	49	39	10
<b>Alter</b>	51,8 ± 12,6	50,1 ± 12,7	58,5 ± 9,7
<b>BMI</b>	26,6 ± 4,2	26,3 ± 4,2	27,4 ± 3,8
<b>Aortenstenose</b>	18	18	0
- Patienten ≤ 60	11	11	0
- Patienten > 60	7	7	0
<b>Aorteninsuffizienz</b>	28	16	12
- Patienten ≤ 60	20	14	6
- Patienten > 60	8	2	6
<b>Stenose &amp; Insuffizienz</b>	12	12	0
- Patienten ≤ 60	10	10	0
- Patienten > 60	2	2	0
<b>mit art. Hypertonus</b>	30	21	9
<b>mit pulm. Hypertonus</b>	2	1	1
<b>art. &amp; pulm. Hypertonus</b>	6	5	1
<b>mit KHK</b>	9	6	3
<b>Aorta Asc. &gt;35mm)</b>	41	31	10
- Aorta Asc. >35 – 40mm	10	10	0
- Aorta Asc. >40 – 50mm	12	10	2
- Aorta Asc. >50 – 60mm	16	10	6
- Aorta Asc. >60mm	3	1	2

**Tabelle 1:** Übersicht Patientendaten

Zusätzlich wurde ein Großteil der Proben der BAV Patienten ebenfalls für die Sequenzierung des *NOTCH1* genutzt. Auch hierfür wurden die Patienten nach ihren Eigenschaften bzw. Erkrankungen unterteilt. Bei 31 Patienten (Durchschnittsalter  $59.6 \pm 9.3$  Jahre, 24 männlich, 7 weiblich) ließ sich eine Kalzifikation der Aortenklappe nachweisen, bei 17 Patienten (Durchschnittsalter  $42.1 \pm 14$ , 16 männlich, 1 weiblich) dagegen nicht. Außerdem wurde die Aortenklappe nach ihrer Pathologie unterteilt. 5 Patienten mit kalzifizierter Aortenklappe und 14 ohne Kalzifikation litten an einer Aorteninsuffizienz. An einer Aortenstenose waren 18 Patienten mit Aortenklappenkalzifikation erkrankt. Systemische Erkrankungen konnten ebenfalls gezeigt werden. 16 Patienten mit kalzifizierter Aortenklappe und 9 ohne Kalzifikation hatten einen Hypertonus. Ein Aneurysma der Aorta ascendens zeigten 12 Patienten mit und 6 ohne Kalzifikation. Die Morphologie der BAV wurde aufgezeichnet: 23 Patienten mit Kalzifikation wiesen eine Raphe zwischen rechtem und linken, 1 Patient eine Raphe zwischen rechtem und nicht koronarem Segel und 7 keine Raphe auf. Bei Patienten ohne Klappenkalzifikation zeigten 14 eine Raphe zwischen rechtem und linken, 1 Patient eine Raphe zwischen rechtem und nicht koronarem Segel und 2 keine Raphe auf.

<b>Kalzifikation</b>	<b>vorhanden (n=31)</b>	<b>fehlend (n=17)</b>
<b>Demographie</b>		
Alter (Jahre)	59.6 ± 9.3	42.1 ± 14.0
Geschlecht (male/female)	24m/7f	16m/1f
<b>Aortenklappenpathologie</b>		
Überwiegend Aorteninsuffizienz	5	14
Überwiegend Aortenstenose	18	-
Ausgeglichen	8	3
<b>Systemische Erkrankung</b>		
Hypertonus	16	9
Endokarditis	1	2
Diabetes	2	-
Aneurysma der Aorta ascendens	12	6
<b>Morphologie der BAV</b>		
Raphe: rechtes und linkes Segel	23	14
Raphe: rechtes und nicht koronares Segel	1	1
Raphe: fehlend	7	2

**Tabelle 2:** Patienten Daten der *Notch1* Patienten

## 2.2. Material

### 2.2.1. Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
MagnaRack™ Catalog No. CS15000	Invitrogen
Steril 1,5ml Mikrozentrifugen-Tubes	Eppendorf
Justierbare Pipetten	Eppendorf
Gestopfte, sterilisierte Pipettenspitzen	Fischer Scientific
Vortexer	OMNILAB
Hitzeblock	Eppendorf
Tischzentrifuge	Heraeus
7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
6-Well-Platten	Applied Biosystems

**Tabelle 3:** Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

### 2.2.2. Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
0,5 M Dithiothreitol (DTT)	Sigma
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Gibco
75% Ethanol	J T – Baker
RNase-freies Wasser	Invitrogen
Chloroform	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen
100% Isopropanol	Sigma

**Tabelle 4:** Chemikalien



## 2.2.3. Medien und Stammlösungen

Name	Hersteller
Purgene® Genomic DNA Purification Kit	Gentra Systems
QIAmp DNA Mini Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit	Invitrogen™life technologies
TRIzol® Reagent	Invitrogen™life technologies

**Tabelle 5:** Medien und Stammlösungen

## 2.2.4. Primer

### 2.2.4.1. cDNA

Forward Primer	Reverse Primer
eNOSF: ACT TCC gAA TCT ggA ACA gC	eNOSR: gAg TTC Tgg ggg ATC ATC Tg
eNOS2F: TGA TGC ATT GGA TCT TTG G	eNOS2R: CCA TGT TAC TGT GCG TCC A
eNOS3F: GAC GCT ACG AGG AGT G	eNOS3R: CCT GTA TGC CAG CAC A

**Tabelle 6:** cDNA Primer (Hersteller: Invitrogen)

### 2.2.4.2. NOS3-Sequenz: Genome screening

Forward Primer	Reverse Primer
eNOSF1-EX1: CTCAGGTCAGAGCAGGTGA	eNOSR1-EX1: ATGAAAATCTTTTTCTTCCTTGAG
eNOSF2-EX2: TCCCATTGTGTATGGGATAGG	eNOSR2-EX2: CCGACTCAGCTACAAGTTCCA
eNOSF3-EX3: CAGCTCGCCTCTAGCTCCTA	eNOSR3-EX3: TTTTGGAAACAAGGGACCAA
eNOSF4-EX4: CTCCCTCTCCCCCTGTTC	eNOSR4-EX4: CCGCTCCCCTTTTGGTAG
eNOSF5-EX5: AGTGTGGCTGCCAATGGT	eNOSR5-EX5: CCCTCCTTTGGTGTTTTTCA
eNOSF6-EX6: ATGAAGGCAGGAGACAGTGG	eNOSR6-EX6: GCATTTTGGGGATGGAGTG
eNOSF7-EX7: AGCCATGTACGGGAAACAGA	eNOSR7-EX7: TGTCCAATCCTGCCCTAGT
eNOSF8-EX8: GGGGACACAGGGTGTGTTAG	eNOSR8-EX8: CAGGGTGTGTGTGGGAGAG
eNOSF9-EX9: CCAAAAACCTGTTGTGAGG	eNOSR9-EX9: AGCCCCTTTCTGGAAGTT
eNOSF10-EX10: TGAGGATCAGCTGGTACAGTTT	eNOSR10-EX10: CTTGAGGCACAGAGGGAGAG
eNOSF11-EX11: CAGAGGCAGAGACCCTGAAG	eNOSR11-EX11: AGGGACCAAAGAACCAAACA
eNOSF12-EX12: AGGAGCAAGACGCAGTGAAG	eNOSR12-EX12: GTCGGGTCTGAGCTCCT
eNOSF13-EX13: CTCAAGGGCAGGCTCTCTAA	eNOSR13-EX13: GTCGGCCAGGAGAAGAAAGT
eNOSF14-EX14: TGAGCAGGGAGAAACCCTAA	eNOSR14-EX14: GCTCCTTCTGTTTCCAGTG
eNOSF15-EX15: GAGAATGGTGGAGCAGGAAA	eNOSR15-EX15: CCACCCCTCTGTCCCTAGAT
eNOSF16-EX16: GCCAAAGTAATGGTGGTTTCA	eNOSR16-EX16: AGGGGTGGCTGAGTGGTC
eNOSF17-EX17: CGGAGACTTTCACGTCCAG	eNOSR17-EX17: CAGTGGATCAGAACCCGACT
eNOSF18-EX18: GGGTCTGATCCACTGTGCT	eNOSR18-EX18: ATCACGCCACTGCACTCC

**Tabelle 7:** NOS3-Sequenz Primer (Hersteller: Invitrogen)

### 2.2.4.3. NOTCH1-Sequenz: Genome screening

Fragment	Forward primer	Reverse primer
Notch1-2	AGAGTGCCTCCGGGGTAG	CCTCGACAAAGCAACAGGTC
Notch1-3	ACTAACTGCCCTGGCACATC	CGCCAAGTACCTCAAGTTGC
Notch1-4	CCAGCACGACCCTCTTGT	CAGCGGGCAGCACTACCT
Notch1-5	GTGTCCAGAGCAGTGTGTCTG	CCCCATCATGTTGTCTTCT
Notch1-6-1	TGTTCCGGGAATTACCCTCTG	ACTGACACCCAGGAGGAG
Notch1-7	CTCCTCCTGGGGTGTCTAGT	GTCCCATCCCCACTACT
Notch1-8	GTGGTGTGCAGTGAGGTGTT	AAGCAACCCACAGATGTTCC
Notch1-9	GCAGTGCTAGGCAGATGAGG	GGCAGGGGACACAACCTAC
Notch1-10	AGAGCTGGAGCTGGCTGAG	AGACCAAGGTGTCCATGACC
Notch1-11	CGCCAGTCCTAAGTCTTCC	CTCTGACCGGAGACAAGAGG

Notch1-12	GACAGGGAAATCGAGGTTGA	TCTGACTGAGGACCCAGAGG
Notch1-13/13-1	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA	TCATCTCCAAGAGCCAGAGG
Notch1-13-1/13	GAGCTGGAGACACAGGATCG	CACCACTTTACCCTCCAGTCA
Notch1-14	GGACCAGCAGACGGCACT	ACCCACCAGCTCCTCTTCA
Notch1-15	AGGCCAAAATTAGGGGAGAG	ACTGAGGCCTGAGAGCTTCC
Notch1-16	AACGAAAGGCTGGGCTGT	AGGGACAGGTTCGGTACAATG
Notch1-17	CCCCTAGGGTTGAGCAGAAG	AGTGGGACCTGGGGTGAC
Notch1-18	TTCTGAGCTACCGGGGAAAT	TGGGCCTATCAGGTTCACTT
Notch1-19	AGTGGGGTGTGGGAGCAC	GGTTCCTGGATGCCTCTG
Notch1-20	CCTTGACACCTGCCTCTCC	AGGGTGAGGAGGAGGATGA
Notch1-21	ACCGTCCTGTCTTCCCTCTC	CAAGTTCAGTCCCTCCCTCA
Notch1-22	ACTGCAAGGACCACCTCAGC	GAGAGTTGCGGGGATTGAC
Notch1-23	GTCCTGACTGTGGCGTCAT	TAGCAACTGGCACAAACAGC
Notch1-24	CGGTGTCATGTGAAGTGTTG	AGACTCCCGGTGAGGATG
Notch1-25	ATCCTCACCGGGAGTCTG	AAGCTCTCACCCCCAATTCT
Notch1-26	AAGTGCTGGGTGGTGCAT	CACGTAAGCCTGGCCACT
Notch1-27	AGGCATCGGTGTACGTCTG	TTTGGCCCTCACTTCTCTGT
Notch1-28	GCTTCCTCTGGTGATGGAAC	CATCCCAGGCAGGTGGTT
Notch1-29	ATGGCTACCTGTCAGACGTG	GCTCTCCACTCAGGAAGCTC
Notch1-30/30-1	ACATCCAGCAGCAGCAAAG	ACCACTGGTCAGGGGACTC
Notch1-30-1/30	CACAGCTACTCCTCGCCTGT	CTGGGGCCAGATAAAACAGT
Notch1-31	CAGAGGAGCCTTTTTAAAACACA	TCCGAGAACACATTTTCACAA
Notch1-32	TGCCATGTGTTTTAGATGGTTT	CACTGGCATGACACACAACA

**Tabelle 8:** NOTCH1-Sequenz Primer

## 2.3. Methoden

### 2.3.1. RNA Isolierung

#### 2.3.1.1. Trizol-Methode

Zunächst werden die Proben von ca. 50µg mit 1ml TRIzol Reagenz versetzt und mit Hilfe eines Power Homogenisator homogenisiert. Anschließend werden die Proben bis zur Weiterbehandlung bei -70°C aufbewahrt.

Den zuvor homogenisierten Proben wurden nach dem Auftauen je 200µl Chloroform beigefügt, für 15 Sekunden per Hand kräftig geschüttelt und anschließend für 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12,000 g und 4°C, bei der sich der Inhalt der Tubes in 3 Phasen unterteilte und die oberste, wässrige Phase die RNA enthielt. Diese Phase wurde jeweils mit einer Pipette abgenommen und in neue, saubere Tubes überführt. Es wurde stets die gleiche Menge der wässrigen Phase genommen, um die Behandlung der Proben stets gleich zu gestalten. Für eine spätere DNA Isolierung wurden auch die 2. Phase (Interphase) und die 3. Phase (Phenolphase) mit einer Pipette abgenommen und in neuen Tubes bei -70°C aufbewahrt. Die wässrige Phase wurde mit 500µl Isopropyl Alkohol versetzt und bei Raumtemperatur für 10min inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut für 10min bei 4°C und 12,000 g zentrifu-

giert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Pellets je mit 0,5ml 75% Ethanol gewaschen und erneut mit 7,500 g für 5min bei 4°C abzentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde abgenommen und die Pellets 10min bei Raumtemperatur getrocknet. Der letzte Schritt bestand darin die Pellets mit 50µl DEPC-Wasser zu lösen, für 10min bei 55°C zu inkubieren und anschließend bei -70°C aufzubewahren.

### **2.3.1.2. ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit-Methode**

Zunächst wurde die benötigte Menge an Master Lysis Mix hergestellt. Die Zellen wurden im ersten Schritt mit 1xPBS gewaschen, zentrifugiert und der PBS abgenommen. Jedes Probepellet wurde mit 500µl Master Lysis Mix versetzt und für 15min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben gevortext und für 1min auf Eis gekühlt. Zu jeder Probe bzw. Lysat wurden nun 100µl „Magnetic Beads“ und 200µl Bindungspuffer gegeben, gemischt und 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden nun im Magna-Rack™ Tube Ständer aufgestellt und für die gesamte restliche Reinigung der RNA dort belassen. Der Ständer selbst wurde ab diesem Schritt vor jeder Zugabe eines Mediums bzw. einer Chemikalie vom Magneten heruntergenommen und nach Abschluss des Mischen und der Inkubationszeit wieder auf den Magneten gestellt. Im folgenden Text wird dieser Ablauf ausgelassen.

Im nächsten Schritt wurde der Überstand, der sich in den Tubes gebildet hatte, verworfen und die Pellets je mit 500µl Wasch-Puffer (W14) gewaschen. Zu jeder Probe wurde anschließend 250µl Master DNase I Digestion Mix gegeben, vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für 10min inkubiert. Die Proben wurden jetzt mit je 80µl Bindungspuffer versetzt und für 1min inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben wie oben beschrieben zunächst mit 750µl Wasch-Puffer (W13) und dann mit 500µl Wasch-Puffer (W14) gereinigt. Nach Vorwärmen des Elution-Puffers bei 60-70°C wurde je Probe 150µl Elution-Puffer zugefügt und bei Raumtemperatur für 5min inkubiert. Die Eluate mit der darin enthalten gereinigten RNA wurden vorsichtig aspiriert und je in einen neuen Tube bei -80°C gelagert.

## 2.3.2. cDNA Herstellung

Die cDNA kann man mit Hilfe des Enzyms „reverse Transkriptase“ und eines Primers herstellen. Dieses Enzym nutzt einen RNA Strang als Matrize und synthetisiert den dazu komplementären cDNA Strang. Die Amplifikation dieser cDNA kann dann in einer Standard-PCR erfolgen.

### 2.3.2.1. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Es wurde zunächst ein „Master Mix“ erstellt, dessen Menge auf die Anzahl der Proben hochgerechnet wurde. Für jede Probe RNA wurden folgende Komponenten benötigt:

Komponente	Volumen/Tube (µl)
steriles H <sub>2</sub> O	3,35
TaqMan RT-Puffer	1
MgCl <sub>2</sub>	2,2
dNTPs Mix	2
Random Hexamers	0,5
RNase Inhibitor	0,2
Multiscript Reverse Transkriptase	0,25

**Tabelle 9:** Master Mix Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Jede Probe besteht aus 0,5µl RNA (50ng), so dass jeder Tube ein Gesamtvolumen von 10µl enthält.

Zunächst wurden alle nicht-enzymatischen Komponenten vermischt und gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe der Multiscript RT und der RNA Proben pro Tube. Die Proben wurden anschließend auf eine PCR Reaktionsplatte verteilt, diese mit einer adhäsiven Folie verschlossen und kurz geschüttelt, um Luftblasen zu entfernen. Die Platte wurde im nächsten Schritt auf den Heizblock platziert und die Reverse Transkriptase Reaktion gestartet.

Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurde folgender Erhitzungszyklus angewandt:

Schritt	Inkubieren	Reverse Transkription	Reverse Transkription Inaktivieren
Zeit	Anhalten 10min	Anhalten 30min	Anhalten 5min
Temperatur	25°C	48°C	95°C

**Tabelle 10:** Erhitzungszyklus Reverse Transkriptase Reaktion

## 2.3.3. Real-Time PCR

Die Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, mit der Nukleinsäuren vervielfältigt werden können, und gestattet außerdem

die Quantifizierung der gewonnenen DNA mittels Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus aufgezeichnet werden. Proportional zur Anzahl der PCR Produkte steigt die Fluoreszenz und somit das zu messende Signal.

Zur Quantifizierung werden unterschiedliche Sonden genutzt. Dazu gehören unter anderem interkalierende DNA-Farbstoffe wie SYBR® Green oder Hydrolyse-Sonden wie die TaqMan®-Sonde.

### 2.3.3.1. Real-Time PCR mit iQ™ SYBR® Green Supermix

Interkalierende DNA-Farbstoffe wie SYBR® Green binden an die doppelsträngige DNA und die Fluoreszenz des Farbstoffs nimmt zu. Der Zuwachs der Target-DNA korreliert mit der Steigerung der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Am Ende der Elongation findet die Messung in jedem Zyklus statt.

Nach Ablauf der PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um eine Aussage über die Menge der PCR Produkte zu treffen. Die DNA wird hierzu durch eine langsame und stetige Temperaturerhöhung (50 °C → 95 °C) aufgeschmolzen. Der DNA Doppelstrang des PCR Produkts denaturiert bei einer charakteristischen Schmelztemperatur zu zwei Einzelstrangmolekülen. Der Farbstoff SYBR® Green wird hierbei freigesetzt und eine Abnahme der Fluoreszenz wird registriert. Da der Schmelzpunkt der PCR Produkte höher ist als der von unspezifischen Primerdimeren, die innerhalb der PCR entstehen, ist eine Unterscheidung möglich. Auf Grund der Höhe des Peaks in der Schmelzkurve lässt sich eine Aussage über die Menge der entstandenen PCR Produkte treffen.

Das SYBR® Green Supermix Reagenz besteht aus folgenden Bestandteilen:

100mM KCl, 40mM Tris-HCl, pH8.4, 0.4mM eines jeden dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iTaq DNA Polymerase, 50 Units/ml, 6mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR® Green I, 20nM Fluorescein und Stabilisator.

Zunächst wurde ein „Master Mix“ entsprechend der Menge an Proben hergestellt:

Komponente	Volumen/Tube (µl)
Steriles H <sub>2</sub> O	9,5
Primer 1	1
Primer 2	1
iQ SyBR Green Supermix	12,5

**Tabelle 11:** Master Mix Real-Time PCR mit iQ™ SYBR® Green Supermix

Jede Probe besteht aus 1µl DNA, so dass jeder Tube der PCR-Reaktionsplatte ein Gesamtvolumen von 25µl enthält.

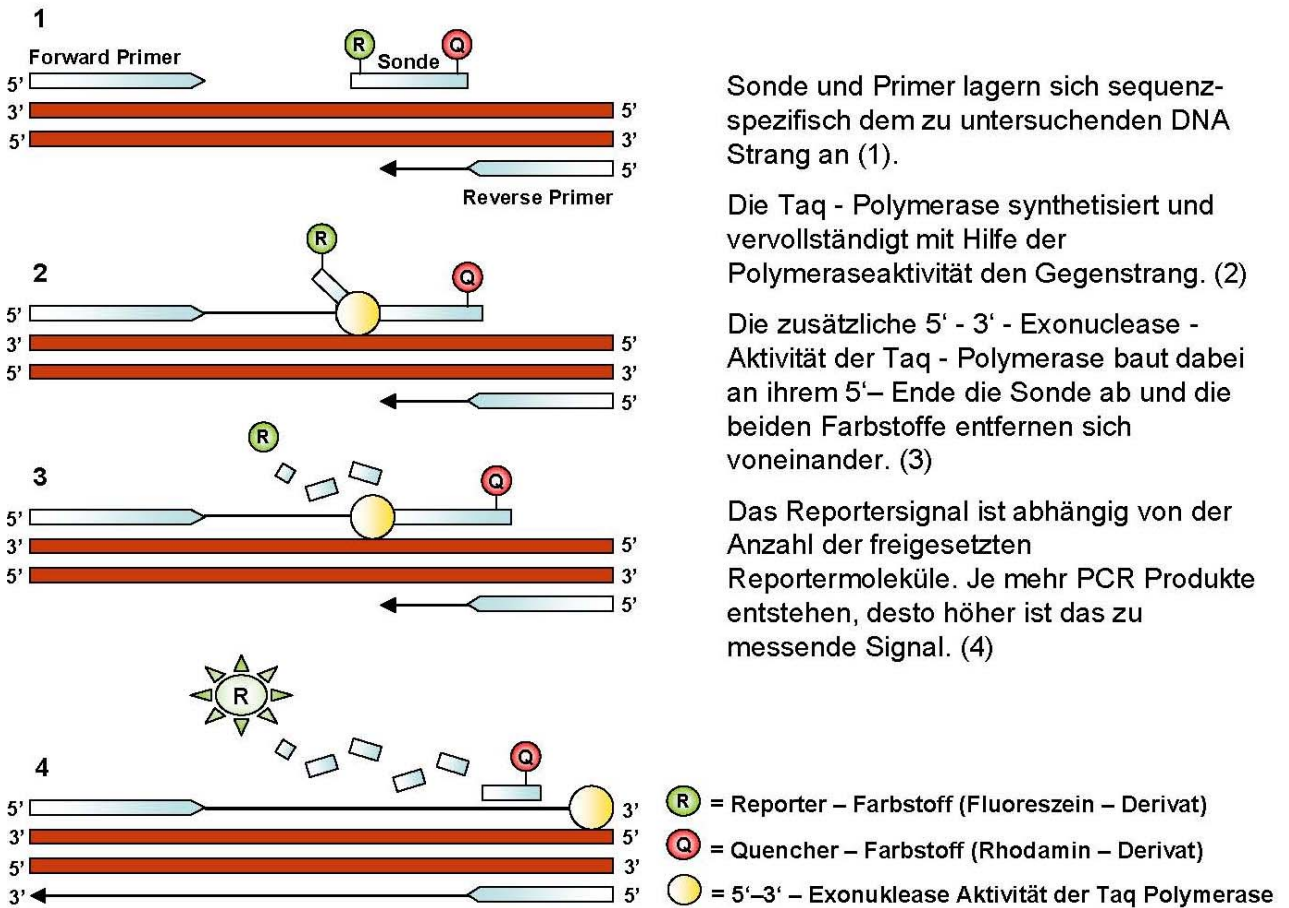
Die Real-Time PCR fand im ABI Prism 7000 Sequence Detection System unter folgenden Reaktionsbedingungen statt:

Phase	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholungen	Anstiegsrate
1	50.0	2:00	1	100
2	95.0	10:00	1	100
3	95.0	0:15	40	100
	60.0	1:00		100
	60.0 → 95.0	20:00		Dissoziation

**Tabelle 12:** Reaktionsbedingungen RT PCR mit iQ™ SYBR® Green Supermix im ABI Prism 7000 SDS

### 2.3.3.2. Real Time quantitative PCR mit TaqMan™

Eine weitere Methode der Real Time PCR macht sich den „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) zu Nutzen (Abbildung 5). Dafür wird eine besondere Sonde angewendet, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) gekennzeichnet ist. Das 3'-Ende ist dagegen mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) markiert und mit einem Phosphatrest blockiert. Wird die intakte Sonde durch eine spezifische Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs auf Grund der räumlichen Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung unterdrückt. Innerhalb eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde ebenso wie der Primer an den DNA-Matrizenstrang und die Reporter-Fluoreszenz bleibt weiterhin unterdrückt. Die Taq Polymerase trifft in der Extensionsphase auf die Sonde und fängt an diese vom Matrizenstrang zu trennen. Im Rahmen dieser Trennung wird die 5'-3'-Exonuclease Eigenschaft der Taq-Polymerase aktiviert und die Sonde wird durch die Exonuclease geschnitten bzw. hydrolysiert. Freie Sonden, die nicht am komplementären DNA-Strang gebunden sind, bleiben intakt und werden nicht abgebaut. Die Hydrolyse der Sonde bewirkt einen Aufbruch der räumlichen Nähe und somit auch des Fluoreszenz-Energietransfer (FET) zwischen Quencher und Reporter. Auf diese Weise steigt die Fluoreszenz des Reporters und korreliert mit der Akkumulation von PCR Produkten von Zyklus zu Zyklus. Das gebildete Signal ist absolut sequenzspezifisch und die verschiedenen Änderungen der Fluoreszenz der unterschiedlichen Farbstoffe werden mit Hilfe des ABI Prism 7000 SDS (Sequenz Detection Systems) für jeden Zyklus erfasst (siehe unten).



**Abbildung 5: Einfluss der 5' – 3' – Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan™ PCR.**  
(modifiziert nach Schild)

Zunächst wurde ein „Master Mix“ entsprechend der Menge an Proben hergestellt:

Komponente	Volumen / Tube (µl)
Steriles H <sub>2</sub> O	7
TaqMan Universal Master Mix	10
Primer Mix (Forward / Reverse)	1
Sonde 1 (FAM)	0,5
Sonde 2 (VIC)	0,5

**Tabelle 13: Master Mix Real Time quantitative PCR mit TaqMan™ im ABI Prism 7000 SDS**

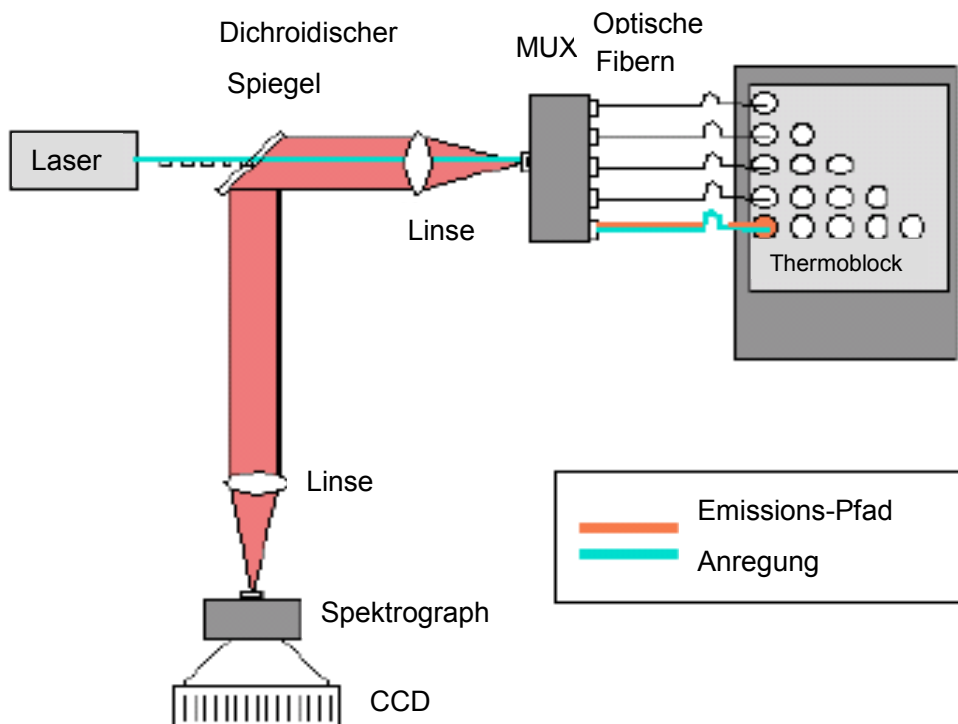
Jede Probe besteht aus 1µl DNA, so dass jeder Tube der PCR-Reaktionsplatte ein Gesamtvolumen von 20µl enthält. Die PCR fand im ABI Prism 7000 Sequence Detection System unter folgenden Reaktionsbedingungen statt:

Phase	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholungen	Anstiegsrate
1	50.0	2:00	1	100
2	95.0	10:00	1	100
3	95.0	0:15	40	100
	60.0	1:00		100
	60.0 → 95.0	20:00		Dissoziation

**Tabelle 14: RT PCR mit TaqMan™ Reaktionsbedingungen**

### 2.3.3.3. ABI Prism 7000 SDS (Sequenz Detection Systems)

Das Abi Prism Gerät ermöglicht es den Ablauf einer PCR On-Line zu verfolgen und von Anfang bis Ende aufzunehmen. Die gewonnenen Daten können abschließend ausgewertet werden. Bei diesem System handelt es sich um ein komplettes Real-Time PCR System, das Nukleinsäuresequenzen detektieren und quantifizieren kann. Die Messung kumulierter PCR Produkte von Zyklus zu Zyklus wird in der Real-Time PCR ermöglicht durch die Verbindung eines Thermocyclers, einer Laser- und Detektionstechnologie und einer anwenderspezifischen Software in einem Gerät. Quantitative Ergebnisse sind sofort nach der PCR ohne weitere Analyse oder Reinigung verfügbar. Auch eine Post-PCR Detektion für nicht-quantitative Untersuchungen wie SNP-Detektionen sind möglich.



**Abbildung 6: Prinzip der On-Line PCR Detektion → Strahlengang im Abi Prism Gerät**  
(modifiziert nach Schild)

Der Thermocycler besitzt einen optischen Heizdeckel, d.h. oberhalb jeder Thermocycler-Position befindet sich eine Linse, die den Lichtstrahl in das jeweilige Reaktionsgefäß überträgt. Die Fluoreszenzanregung entsteht mit Hilfe eines Argonlasers (488nm), dessen Strahl über einen dichroiden Spiegel zunächst auf einen Multiplexer (MUX) geleitet wird. Der optische Heizdeckel des Thermocyclers ist über 96 Lichtleiter, die jeweils über



einer der Linsen enden, mit dem MUX verbunden. Der Laserstrahl des Argonlasers wird mittels des MUX auf die 96 Positionen verteilt. Der Scan einer kompletten Mikrotiterplatte dauert ca. 7 Sekunden. Die Linse fokussiert den Laserstrahl und dieser dringt in das geschlossene Reaktionsgefäß ein. Hier wird die Fluoreszenzemission durch den Strahl angeregt und verlässt den Cycler wieder über den selben optischen Leiter. Die Fluoreszenz verfügt über eine andere Wellenlänge als der Laserstrahl und wird daher vom dichroiden Spiegel reflektiert, durch eine weitere Linse fokussiert und auf einen Spektrographen geleitet. Anschließend wird die auf dem Spektrographen eingefallen Fluoreszenz mit Hilfe einer CCD-Kamera in ein digitales Signal umgewandelt. Die CCD-Kamera sammelt so alle 7 Sekunden die Emissionsdaten von 500-660nm für jede Probe.

Vorteile der Analyse im geschlossenen Reaktionsgefäß sind einerseits die Reduktion der Carry-Over Kontamination, andererseits die Vergrößerung der erreichbaren Genauigkeit, da eine zusätzliche Standardabweichung von ca. 2% durch jeden weiteren Pipettierschritt im Anschluss an die PCR entfällt. [25]

### **2.3.4. DNA Isolierung**

Bei der Nukleinsäureisolierung ist ein sauberes Arbeiten (Tragen von Handschuhen, Benutzung spezieller Pipetten, Cups etc.) dringend erforderlich.

#### **2.3.4.1. DNA Isolierung aus Gewebepulver: Purgene® Genomic DNA Purification Kit**

Zunächst wurden 10mg Gewebepulver mit 300µl Cell Lysis Solution versetzt und gut vermischt. Als nächstes wurden 1,5µl Proteinase K Solution dem Lysat beigelegt, gut gemischt und bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5µl RNase A Solution hinzugegeben und nach gutem Mischen bei 37°C für 15min inkubiert. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur gekühlt worden ist, wurden 100µl Protein Precipitation Solution zugefügt und für 20sek gevortext. Anschließend wurde die Probe für 3min bei 13,000g zentrifugiert. Hierbei entstanden ein Überstand, welcher die DNA enthielt, und ein Pellet aus abgelagerten Proteinen. Der Überstand wurde in einen Tube mit 300µl 100% Isopropanol überführt und nach gutem Mischen für 1min bei 13,000g zentrifugiert. Die DNA war hiernach als weißen Pellet im Tube sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und der Tube auf sauberem, saugfähigem Papier abgetropft. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 300µl 70% Ethanol gewaschen, erneut für 1min bei 13,000g zentrifugiert und das Ethanol sehr vorsichtig abgegossen. Der Tube wurde danach zum

Abtropfen und Lufttrocknen für 15min umgedreht auf saugfähigem Papier abgestellt. Im nächsten Schritt wurden zur Probe 50µl DNA Hydration Solution beigefügt und durch Inkubation bei 65°C für 1h und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht rehydriert. Der Tube konnte nun bei -70°C gelagert werden.

#### **2.3.4.2. DNA Isolierung aus Blut: Purgene® Genomic DNA Purification Kit**

Zunächst wurden 300µl Blut mit 900µl RBC Lysis Solution versetzt und für 10min unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13,000g für 12sek und die Abtragung des entstehenden Überstandes. Dabei musste beachtet werden, dass neben dem weißen, sichtbaren Pellet ca. 10-20µl Restflüssigkeit im Tube zurück blieben. Nun wurde für 10sek gevortext, um das Pellet im Restüberstand zu resuspendieren. Die Probe wurde nun mit 300µl Cell Lysis Solution versetzt und gut vermischt. Im nächsten Schritt wurden 1,5µl RNase A Solution hinzu gegeben und nach gutem Mischen bei 37°C für 15min inkubiert. Nachdem die Probe für 1min auf Eis gekühlt worden ist, wurden 100µl Protein Precipitation Solution zugefügt und für 20sek gevortext. Anschließend wurde die Probe für 1min bei 13,000g zentrifugiert. Hierbei entstanden ein Überstand, welcher die DNA enthält, und ein festes, dunkel braunes Pellet aus abgelagerten Proteinen. Der Überstand wurde in einen Tube mit 300µl 100% Isopropanol überführt und nach gutem Mischen für 1min bei 13,000g zentrifugiert. Die DNA war hiernach als weißen Pellet innerhalb des Tubes sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und der Tube auf sauberem, saugfähigem Papier abgetropft. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 300µl 70% Ethanol gewaschen, erneut für 1min bei 13,000g zentrifugiert und das Ethanol sehr vorsichtig abgegossen. Der Tube wurde danach zum Abtropfen und Lufttrocknen für 15min umgedreht auf saugfähigem Papier abgestellt. Im nächsten Schritt wurden zur Probe 100µl DNA Hydration Solution beigefügt und zunächst bei 65°C für 5min und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Der Tube konnte nun bei -70°C gelagert werden.

#### **2.3.5. DNA-Sequenzierung**

Für die DNA-Sequenzierung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Häufig genutzt ist die Methode der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger, ein enzymatisches Verfahren bei dem mittels eines Primers und einer DNA-Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert wird. Hierzu wird der DNA-Doppelstrang durch Er-

wärmung denaturiert und so in Einzelstränge getrennt. In vier Ansätzen, in denen sich alle vier Nukleotide befinden, wird jeweils eine der vier Basen teils als ein Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) hinzugefügt. Bei den ddNTPs handelt es sich um Kettenabbruch-Basen, die keine 3'-Hydroxygruppe besitzen. Werden diese Basen in den während der Reaktion neu synthetisierten Strang eingebaut, kann die DNA-Polymerase diesen nicht weiter verlängern. Grund dafür ist, dass die OH-Gruppe am 3'-C-Atom fehlt. Auf diese stützt sich die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids stützt. So entstehen DNA-Fragmente verschiedenster Länge, die alle pro Ansatz jeweils mit dem ddNTP enden, der vorher hinzu gegeben wurde. Es gibt weiterhin die Möglichkeiten entweder die ddNTPs oder den Primer radioaktiv zu markieren. Mittels Gelelektrophorese werden für jeden Ansatz die DNA-Fragmente der Länge nach aufgeteilt. Dann vergleicht man die Ansätze und kann, nachdem das Gel mit den radioaktiv markierten Fragmenten auf einem Fotofilm entwickelt wurde, die Sequenz ablesen (Abbildung 7). Die entsprechende komplementäre Sequenz entspricht der als Matrize verwendeten einsträngigen DNA.

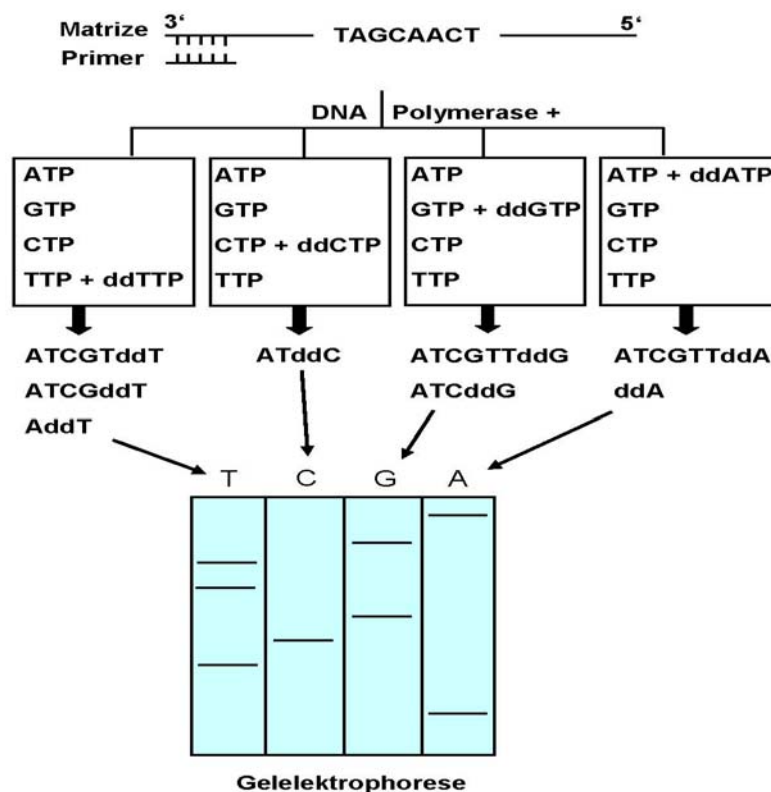


Abbildung 7: Prinzip der DNA – Sequenzierung nach Sanger (modifiziert nach Sanger, 2004)

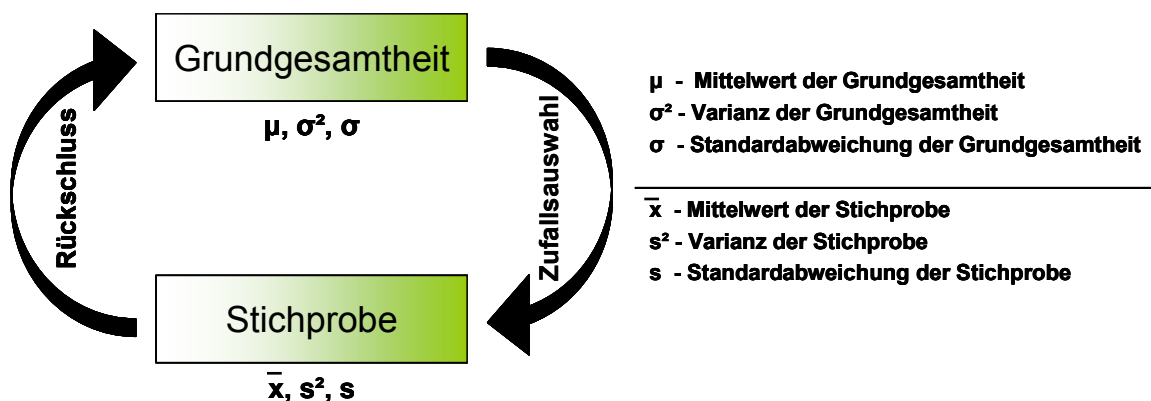
Diese ursprüngliche DNA-Sequenzierung wurde dahingehend modifiziert, dass man statt einer radioaktiven Markierung, Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet, um die ddNTPs zu markieren. Die vier ddNTPs werden jeweils mit einem anderen Farbstoff verknüpft. Der Vorteil dieser Abwandlung besteht darin, dass alle vier ddNTPs in einem Reaktionsgefäß zusammen gefügt werden können, statt vier Ansätze herstellen zu müssen. Die durch Kettenabbruch entstehenden Fragmente werden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Da jedes der vier ddNTPs mit einem anderen Farbstoff gekoppelt ist, zeigt jedes DNA-Kettenabbruchprodukt am Fragmentende eine andere Fluoreszenz. Ein Detektor kann auf diese Weise jedes Fragment erkennen. Die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Strangs wird direkt durch ein Chromatogramm - eine Abfolge der im Detektor erschienen Farbsignale - wiedergegeben. [26]

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Statistische Auswertung der Patientendaten

Die Auswertung der Patientendaten erfolgt mit Hilfe des Programms MINITAB®. Für die statistischen Hypothesentests wird ein t-Test (1 Stichprobe) verwendet.

Die Stichprobe bzw. deren Auswertung soll dazu dienen, einen Rückschluss auf die Grundgesamtheit zu schließen.



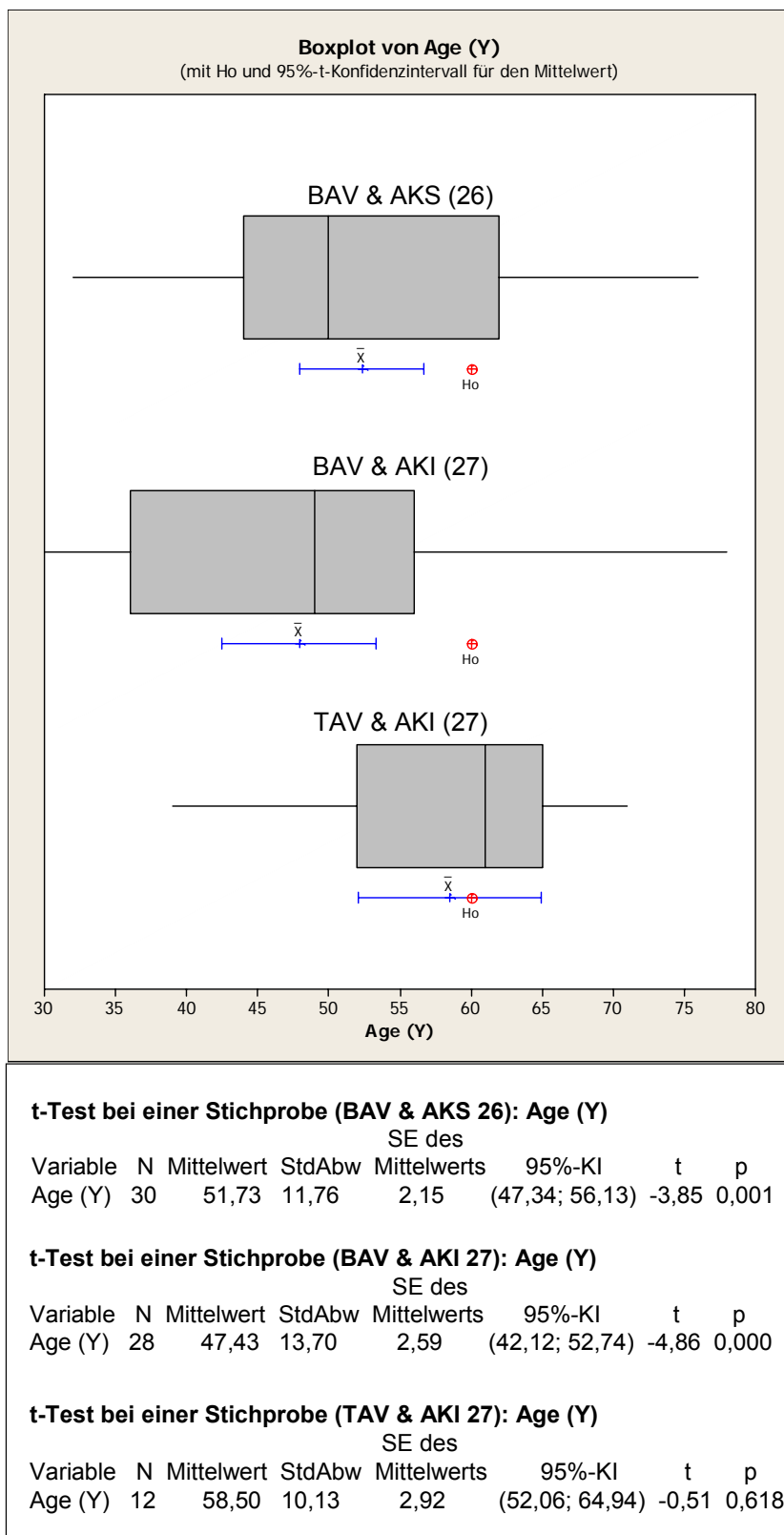
**Abbildung 8: Statistische Testverfahren – Hintergrund & Bewandnis** (umgezeichnet nach Lohninger H. „Grundlagen der Statistik" [http://www.statistics4u.info/fundstat\\_germ/](http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/))

Zuerst werden die Nullhypothese  $H_0$  und die Alternativhypothese  $H_1$  aufgestellt. Die Nullhypothese beinhaltet die Aussage, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied gibt, während die Alternativhypothese davon ausgeht, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zu erkennen ist. Zur Interpretation des Ergebnisses der Hypothesentests wird der sogenannte p-Wert hinzugezogen. Wenn sich das Resultat des p-Werts auf weniger als 0,05 beläuft, kann man davon ausgehen, dass man die Nullhypothese verwerfen kann. Der Wert 0,05 ermittelt sich aus dem Konfidenzintervalls von 95%.

Die Auswertung der Patienten wurde unter den folgenden Hypothesen durchgeführt:

$$H_0 : \mu = \mu_{\text{Ziel}} = 60 \text{ Jahre} \quad H_1 : \mu \neq \mu_{\text{Ziel}} = 60 \text{ Jahre}$$

Des Weiteren wurden die Begleiterkrankungen wie die Aortenklappenstenose- und insuffizienz in den Gruppen der BAV- und TAV-Patienten verglichen. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Auftreten eines Aneurysmas der Aorta ascendens wurde geprüft.



**Abbildung 9: Boxplot Vergleich Alter und Aortenklappenveränderung**  
Boxplot-Diagramme mit dazugehöriger t-Test Analyse

Die Abbildung 9 zeigt, dass im ersten Boxplot-Diagramm die  $H_0$  außerhalb des 95% Konfidenzintervalls des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt. Das grafische Resultat wird

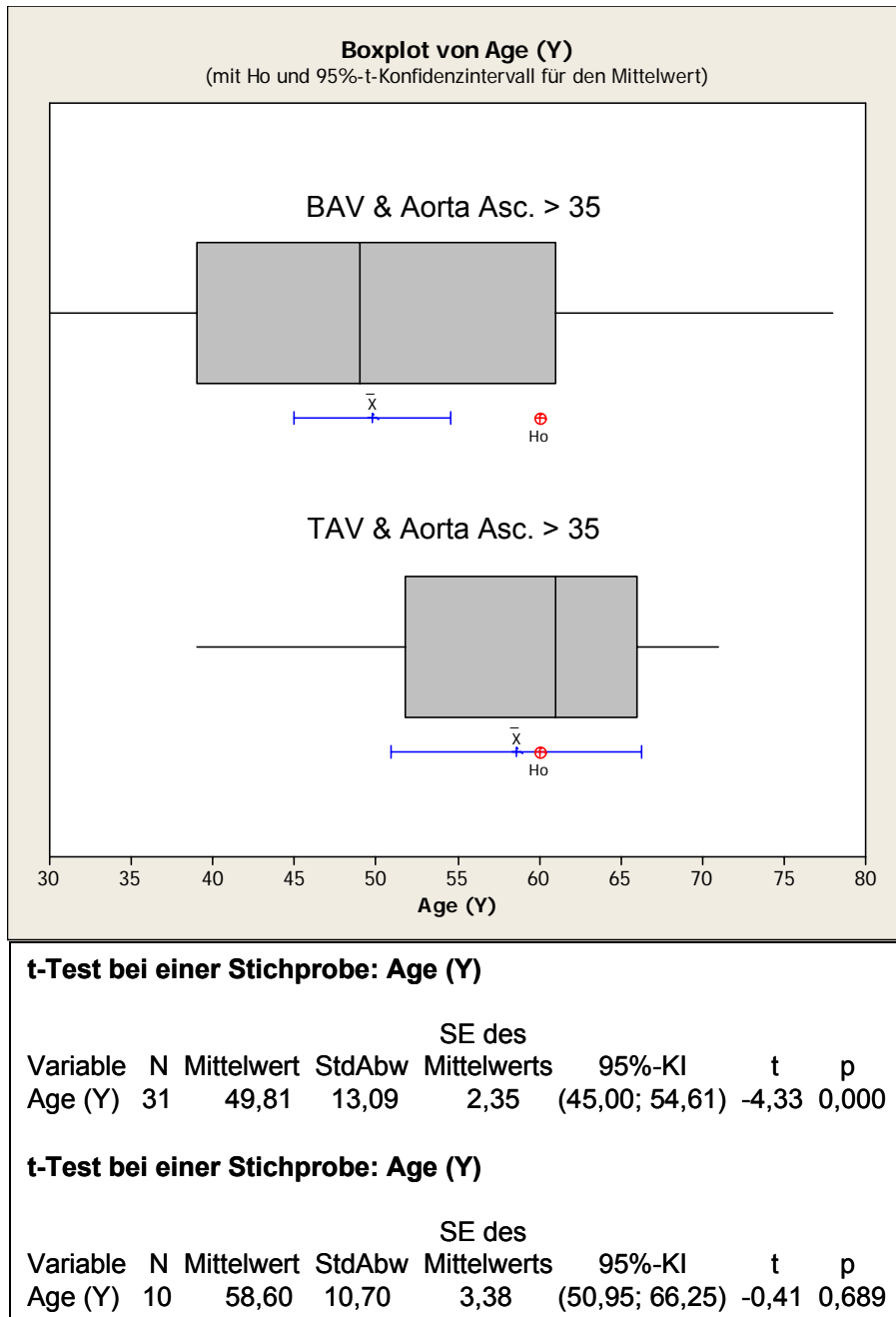
durch den t-Test bestätigt, da der p-Wert bei 0,001 liegt. Somit kann die  $H_0$ -Hypothese statistisch zurückgewiesen werden. Das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt zwischen 47,34 und 56,13 Jahren und damit deutlich unter 60 Jahren. Daraus lässt sich schließen, dass Patienten mit einer BAV wahrscheinlich schon in einem Alter unter 60 Jahren an einer Stenose der Aortenklappe erkranken.

Im zweiten Boxplot-Diagramm der Abbildung 9 liegt die  $H_0$  außerhalb des 95% Konfidenzintervalls des Mittelwerts der Grundgesamtheit. Das grafische Resultat wird durch den t-Test bestätigt, da der p-Wert bei 0,0001 liegt. Somit kann die  $H_0$ -Hypothese statistisch zurückgewiesen werden. Das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt zwischen 42,12 und 52,74 Jahren und damit deutlich unter 60 Jahren. Daraus lässt sich schließen, dass Patienten mit einer BAV wahrscheinlich schon in einem Alter unter 60 Jahren an einer Insuffizienz der Aortenklappe erkranken. (12 Patienten der Stichprobe sind sowohl an einer Stenose als auch an einer Insuffizienz erkrankt 26/27, siehe auch Patiententabelle im Anhang)

Fasst man das erste und zweite Boxplot zusammen, liegt das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts der Grundgesamtheit zwischen 42,12 und 56,13 Jahren. Daraus lässt sich schließen, dass die Diagnose BAV wahrscheinlich schon in einem Alter unter 60 Jahren gestellt wird, da diese Patienten auch früher an Erkrankungen des Herzens bzw. der Herzklappe leiden.

Das dritte Boxplot-Diagramm der Abbildung 9 zeigt, dass die  $H_0$  innerhalb des 95% Konfidenzintervalls des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt. Das grafische Resultat wird durch den t-Test bestätigt, da der p-Wert bei 0,618 liegt. Somit kann die  $H_0$ -Hypothese statistisch nicht zurückgewiesen werden. Das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt zwischen 52,06 und 64,94 Jahren und damit um 60 Jahre. Daraus lässt sich schließen, dass bei Patienten mit einer TAV im Vergleich zu den BAV Patienten Erkrankungen wie eine Stenose oder Insuffizienz der Aortenklappe wahrscheinlich nicht deutlich unter 60 Jahren auftreten. (Bei einem TAV Patienten gab es keine Angabe über eine Stenose oder eine Insuffizienz, siehe auch Patiententabelle im Anhang)

Bei den Ergebnissen der ersten drei Boxplot-Diagramme ist das Alter der BAV Patienten mit Aortenklappenstenose und -insuffizienz signifikant niedriger als der Patienten mit TAV.



**Abbildung 10: Boxplot Vergleich BAV / TAV und Aorta ascendens**  
Boxplot-Diagramme mit dazugehöriger t-Test Analyse

Die Abbildung 10 zeigt, dass im ersten Boxplot-Diagramm die  $H_0$  außerhalb des 95% Konfidenzintervalls des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt. Das grafische Resultat wird durch den t-Test bestätigt, da der p-Wert bei 0,0001 liegt. Somit kann die  $H_0$ -Hypothese statistisch zurückgewiesen werden. Das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt zwischen 45,00 und 54,61 Jahren und damit deutlich unter 60 Jahren. Daraus lässt sich schließen, dass Patienten mit einer BAV wahrschein-



lich schon in einem Alter unter 60 Jahren an einem Aneurysma bzw. einer Ektasie der Aorta ascendens leiden.

Das zweite Boxplot-Diagramm der Abbildung 10 zeigt, dass die  $H_0$  innerhalb des 95% Konfidenzintervalls des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt. Das grafische Resultat wird durch den t-Test bestätigt, da der p-Wert bei 0,689 liegt. Somit kann die  $H_0$ -Hypothese statistisch nicht zurückgewiesen werden. Das 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts der Grundgesamtheit liegt zwischen 50,95 und 66,25 Jahren und damit um 60 Jahre. Daraus lässt sich schließen, dass bei Patienten mit einer TAV ein Aneurysma bzw. eine Ektasie der Aorta ascendens wahrscheinlich nicht deutlich unter 60 Jahren auftritt im Vergleich zu den BAV Patienten. (Ein Patient mit Aneurysma ohne Größenangabe wurde bei der statistischen Auswertung ausgeschlossen, siehe Patiententabelle im Anhang)

### **3.2. NOTCH1-Sequenzierung**

Es wurden alle 34 Exons des menschlichen *NOTCH1*-Gens von 48 BAV Patienten sequenziert, einschließlich der Introns und der nicht translatierten 5' und 3' Sequenzen. Zielsetzung war die Suche nach *NOTCH1* Varianten, die Ursache für die Entstehung einer BAV sein könnten. Insgesamt wurden 57 heterozygote Varianten gefunden (siehe Tabelle 15), wobei 21 Varianten auf Exons und 36 innerhalb eines Introns oder einer 5'UTR Sequenz lokalisiert waren. 35 dieser Varianten wurden bereits zuvor in öffentlichen SNP Datenbanken aufgelistet, 22 dagegen konnten nicht in Datenbanken oder weiterer Literatur gefunden werden und wurden daher als neue SNPs bewertet.

Vier der 22 „neuen“ identifizierten SNPs führten zu einem Aminosäureaustausch: g.40264C>T auf Exon 11 (p.T596M), g.53777A>C auf Exon 29 (p.P1797H), g.50096 C>T auf Exon 25 (p.P1377S) und g.58977 A>G auf Exon 34 (p.V2285I).

Der Austausch der Aminosäuren an den Positionen p.P1377S und p.V2285I konnten in weiteren Untersuchungen auch bei Personen einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden, so dass lediglich der Austausch an den Positionen p.T596M und p.P1797H als Mutation und vermutliche Ursache einer Erkrankung angesehen werden.

Genomic position NM-017617	Position NOTCH1 gene	cDNA position NM-017617	Protein position NM-017617	MAF	Status
g.9925 T>C	5'UTR -76 T/C			0.10	rs7028061
g.32055 C>T	Exon 3	c.388 C>T	p.N104N	0.47	rs4489420
g.36250 C>T	Intron 4 – 48 C/T			0.01	New
g.36407 A>G	Exon 5	c.928 A>G	p.P284P	0.09	rs11145768
g.36513 A>G	Intron 5 + 93 A/G			0.01	new
g.37431 A>G	Intron 6 + 159 A/G			0.39	rs3125009
g.38118 C>T	Intron 8 + 7 C/T			0.49	rs9411208
g.38435 C>T	Intron 8 – 43 C/T			0.49	rs9411254
g.38601 A>G	Intron 9 + 10 A/G			0.34	rs11145767
g.38651 G>T	Intron 9 + 60 G/T			0.02	rs11574886
g.38693 C>T	Intron 9 + 102 C/T			0.50	rs10781498
g.38696 C>T	Intron 9 + 105 C/T			0.14	rs11574887
g.38836 C>T	Intron 9 + 245 C/T			0.46	rs3124605
g.39726 C>T	Intron 9 – 43 C/T			0.40	rs9411254
g.39848 C>T	Exon 10	c.1711 C>T	p.D545D	0.02	rs11574889
g.39878 A>G	Exon 10	c.1741 A>G	p.T555T	0.01	new
g.39891 C>T	Intron 10 + 9 C/T			0.15	rs3125006
g.40138 A>G	Intron 10 – 9 A/G			0.47	rs3124603
<b>g.40264 C&gt;T</b>	<b>Exon 11</b>	<b>c.1963 C&gt;T</b>	<b>p.T596M</b>	<b>0.01</b>	<b>new</b>
g.40667 C>T	Intron 12 + 94 C/T			0.17	new
g.40743 C>T	Intron 12 + 170 C/T			0.03	rs12001048
g.41363 A>G	Intron 13 + 10 A/G			0.01	new
g.41423 A>G	Intron 13 + 70 A/G			0.09	rs3812609
g.41443 A>G	Intron 13 + 90 A/G			0.01	new
g.42383 C>T	Exon 14	c.2341 C>T	N755N	0.34	rs3125004
g.44731 A>G	Intron 16 + 20			0.01	new
g.44785 A>G	Intron 16 + 73			0.02	rs11574894
g.44954 C>T	Intron 16 – 100 C/T			0.48	rs3125002
g.44965 C>T	Intron 16 – 89 C/T			0.04	new
g.45054 A>G	Intron 16 – 4 A/G			0.41	rs3125001
g.45134 C>T	Exon 17	c.2740 C>T	p.H888H	0.02	new
g.45161 C>T	Exon 17	c.2767 C>T	p.A897A	0.02	rs11574895
g.45222 C>T	Intron 17 +12 C/T			0.07	new
g.46761 A>G	Intron 18 – 31 A/G			0.19	rs3124598
g.47035 A>G	Intron 19 + 42 A/G			0.02	rs11145765
g.47047 A>G	Intron 19 + 54 A/G			0.20	rs3125000
g.47600 C>T	Exon 20	c.3370 C>T	p.S1098S	0.01	new
g.47652 A>G	Intron 20 + 21			0.45	rs3124597
g.50096 C>T	Exon 25	c.4205 C>T	p.P1377S	0.03	new
g.50503 C>T	Exon 25	c.4612 C>T	p.A1512A	0.01	new
g.52587 A>G	Exon 27	c.5149 A>G	p.Q1691Q	0.02	new
g.52608 C>T	Exon 27	c.5170 C>T	p.D1698D	0.31	rs10521
g.53171 C>T	Intron 27 – 204 C/T			0.01	new
g.53332 C>T	Intron 27 – 43 C/T			0.01	rs12344155
g.53382 C>T	Exon 28	c.5251 C>T	p.T1725T	0.01	new
<b>g.53777 A&gt;C</b>	<b>Exon 29</b>	<b>c.5463 A&gt;C</b>	<b>p.P1797H</b>	<b>0.01</b>	<b>new</b>
g.53907 C>T	Intron 29 + 40 C/T			0.35	rs3124594
g.54202 A>T	Intron 30 + 87 A/T			0.02	rs11574906
g.55004 C>T	Intron 30 – 12 C/T			0.09	rs11574908
g.55356 A>G	Intron 31 + 45 A/G			0.01	rs11574909
g.56657 A>G	Exon 32	c.6064 A>G	p.T1996T	0.01	New
g.57008 C>T	Intron 33 + 44 C/T			0.02	rs9632944
g.58679 C>T	Exon 34	c.6631 A>G	p.D2185D	0.45	rs2229974
g.58977 A>G	Exon 34	c.6929 A>G	p.V2285I	0.01	New
g.59084 A>G	Exon 34	c.7036 A>G	p.P2320P	0.01	New
g.59918 A>G	Exon 34	c.7870 A>G		0.38	rs3124591
g.60601 A>C	Exon 34	c.8553 A>C		0.01	New

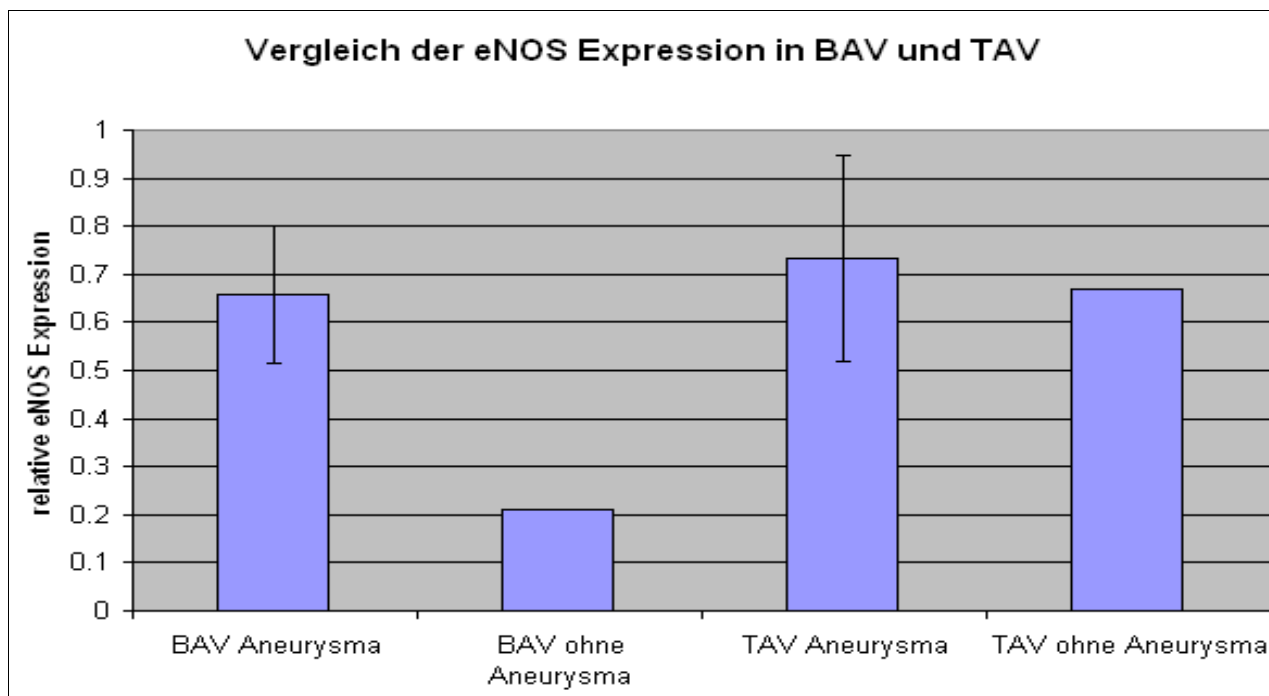
**Tabelle 15:** Genetische Varianten innerhalb des menschlichen *NOTCH1*-Gens. Diese wurden in BAV Patienten identifiziert. Mutationen, die vermutlich eine Krankheit verursachen, sind fett gedruckt.

Varianten	Restriktionsenzyme	BAV Patienten	Gesunde Kontrolle
p.T596M	Hin1 II	1/48	0/335
p.P1377S	PspOM I	1/48	4/90
p.P1797H	Hae III	1/48	0/327
p.V2285I	Bcc I	1/48	6/177

**Tabelle 16:** Allelhäufigkeiten von vier Missense-Varianten im *NOTCH1*-Gen bei BAV- und gesunden Kontrollpatienten. Beide Mutationen, die vermutlich eine Krankheit verursachen, sind grau unterlegt.

### 3.2. eNOS-Gen RNA-Expression (schematische Darstellung BAV vs. TAV)

Die Versuchsproben sind Gewebeproben aus Patienten mit einer BAV oder einer TAV.



**Abbildung 11:** eNOS Expression aus Proben der Aorta ascendens von BAV und TAV Patienten

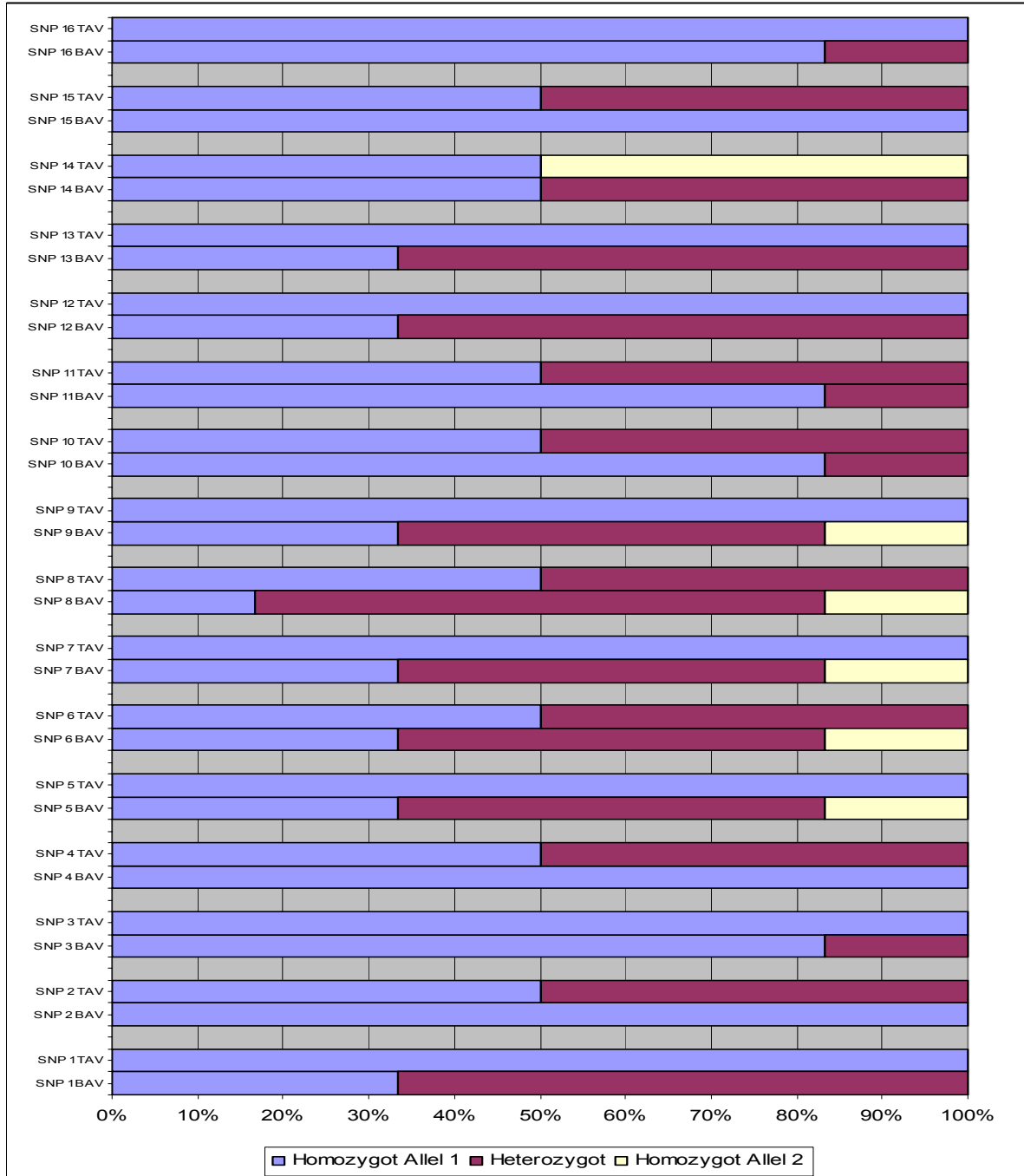
Anzahl	BAV Aneurysma	BAV ohne Aneurysma	TAV Aneurysma	TAV ohne Aneurysma
Patienten N =	4	1	3	1
Mittelwert	0.66	0.212	0.73	0.67
Standardabweichung	0.14	-	0.21	-

**Tabelle 17:** Relative eNOS-Expression bei Patienten mit BAV/TAV mit oder ohne Aneurysma  
Messwerte der quantitativen Real-Time-PCR

In Abbildung 11 ist die eNOS-Expression in BAV and TAV Patienten mit und ohne Aneurysma dargestellt. Bei TAV Patienten ist die eNOS-Expression aus aneurysmatischen und nicht-aneurysmatischen Gewebeproben vergleichbar ( $0.73 \pm 0.21$  versus  $0.67$ ). Bei Patienten mit einer bikuspiden Aortenklappe wird eNOS dagegen in aneurysmatischen Berei-

chen sehr viel stärker exprimiert als in normalen Geweben ( $0.66 \pm 0.14$  versus 0.21). Die eNOS-Expression aus Proben von BAV-Patienten mit Aneurysma entspricht dabei der Expression in TAV-Geweben mit und ohne Aneurysma.

### 3.4. eNOS-Sequenzierung



**Abbildung 12: Genotypverteilung der untersuchten eNOS SNPs bei BAV- und TAV Patienten**  
Die Genotypverteilung der 16 SNPs sind für BAV- (n = 6) und TAV- (n = 2) Patienten gegenübergestellt

In Abbildung 12 ist die Verteilung der verschiedenen eNOS Genotypen in BAV und TAV Patienten dargestellt. Dabei zeigen sich Unterschiede zwischen den Patientengruppen, die allerdings wenig aussagekräftig sind, da der Stichprobenumfang in der Kontrollgruppe mit  $n = 2$  zu gering ist.

Aus diesem Grund wurden weitere Kontrollpatientendaten aus der „entrez SNP“ Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) verwendet. Diese Daten waren nur für die SNPs 1 und 2, 5 bis 9 und 12 bis 14 verfügbar. Außerdem wurden nur Daten von Patienten mit europäischer Herkunft verwendet, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Patientenkollektiven zu gewährleisten. Tabelle 18 fasst die Kontrollpatientendaten von „entrez SNP“ zusammen.

SNP	Homozygot Allel 1	Heterozygot	Homozygot Allel 2	n =
SNP 1	37	54	21	112
SNP 2	23	12	1	36
SNP 5	33	21	11	65
SNP 6	7	19	16	42
SNP 7	54	54	16	124
SNP 8	8	17	26	51
SNP 9	26	29	12	67
SNP 12	5	28	51	84
SNP 13	67	30	4	101
SNP 14	75	47	21	143

**Tabelle 18:** Genotypverteilung der Kontrollpatienten von „entrez SNP“

Diese Daten wurden mit den zwei TAV-Patienten zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst und mit der Genotypverteilung der BAV-Patienten verglichen, was in Abbildung 13 dargestellt ist. Bei einigen SNPs (z.B. SNP 5 und SNP 7) zeigt sich eine annähernd gleiche Verteilung der Genotypen, bei anderen (z.B. SNP 12) scheinen sich die BAV- und die Kontrollgruppe zu unterscheiden. Um die Signifikanz dieser Unterschiede zu bewerten wurden die Genotypverteilungen der SNPs 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13 und 14 mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher bewertet. Dieser Verteilungstest liefert auch bei kleinen Stichprobenumfängen exakte Ergebnisse, die p-Werte sind in Tabelle 19 gezeigt. Die Genotypverteilung der BAV- und der Kontrollgruppe unterscheidet sich bei den SNPs 8 und 12 signifikant, d.h. mit einem p-Wert unter 0,05. Besonders hervor zu heben ist SNP 12, dessen Genotypverteilung sich mit einem p-Wert von 0,0012 hochsignifikant zwischen den beiden Kollektiven unterscheidet.

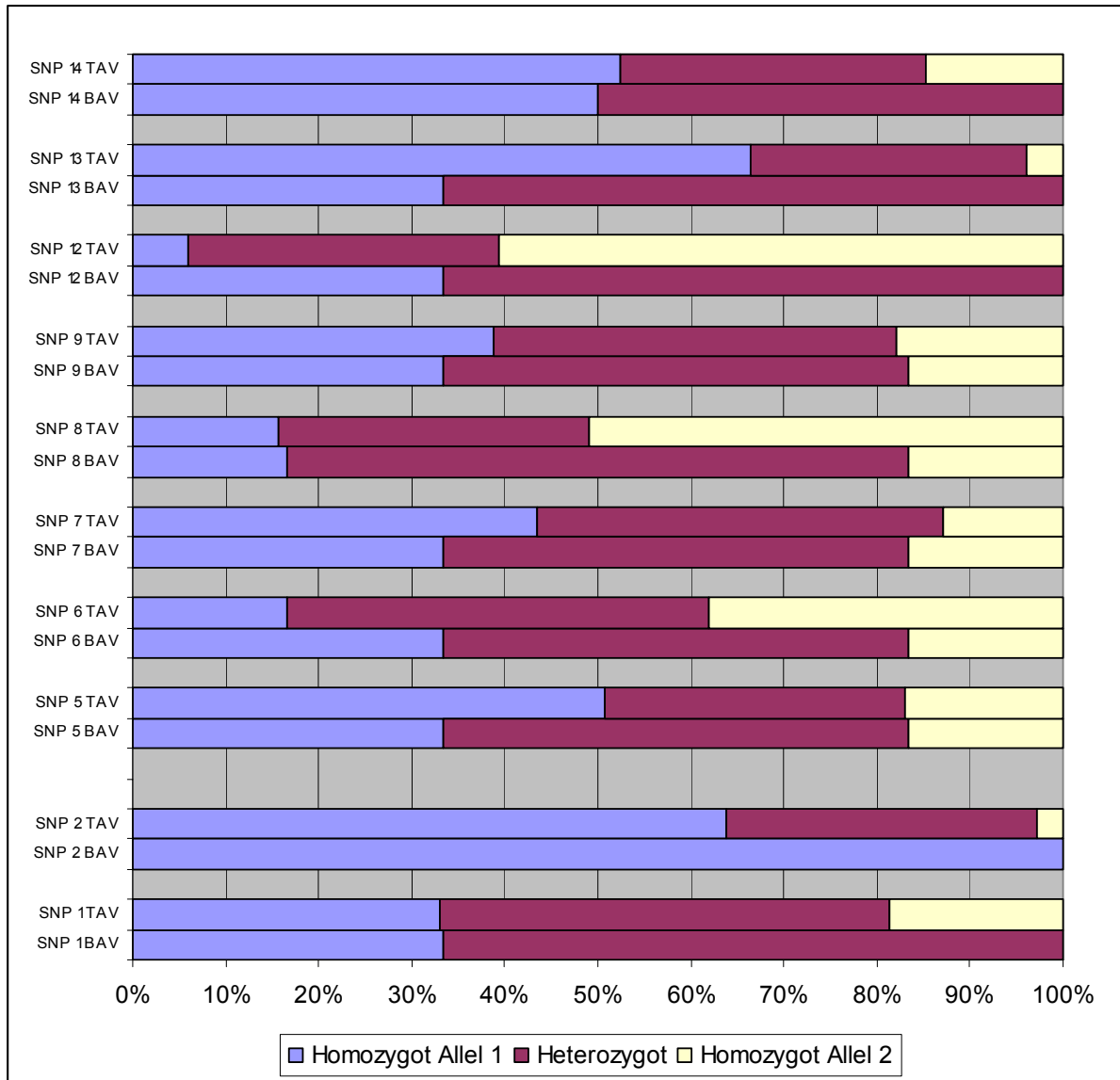


Abbildung 13: Vergleich der BAV-Patienten mit den Kontrollpatienten von „entrez SNP“

Die Genotypverteilung der BAV Patienten (n = 6) wird mit einer Kontrollgruppe, bestehend aus den Patientendaten von „entrez SNP“ (n = siehe Tabelle 18) und den TAV Patienten (n = 2), verglichen.

SNP	p-Wert	α-Niveau in %
SNP 1	0,0972	9,72
SNP 2	0,0906	9,06
SNP 5	0,1009	10,09
SNP 6	0,0768	7,68
SNP 7	0,1355	13,55
SNP 8	0,0401	4,01
SNP 9	0,1432	14,32
SNP 12	0,0012	0,12
SNP 13	0,0602	6,02
SNP 14	0,1083	10,83

Tabelle 19: Ergebnisse des exakten Tests nach Fisher für die eNOS SNPs

## 4. Diskussion

### 4.1. Patientencharakterisierung

Bei der statistischen Auswertung ergibt sich, dass die Patienten mit der Diagnose einer BAV im Durchschnitt mit  $50,1 \pm 12,7$  Jahren unter der Grenze von 60 Jahren lagen, im Vergleich zu den Patienten mit einer TAV mit einem Durchschnittsalter von  $58,5 \pm 9,7$  Jahren.

In der Auswertung der Ergebnisse der Patienten in den Boxplots zeigte sich, dass das Alter der BAV Patienten mit einer Aortensklerose und -insuffizienz signifikant niedriger war als bei den Patienten der TAV. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte sein, dass Patienten mit einer BAV früher an einer Erkrankung wie einer Aortenklappeninsuffizienz oder -stenose leiden und somit bereits in jüngeren Jahren einer Diagnostik unterzogen werden.

In den Literaturangaben lag als Beispiel die Arbeit von Bauer vor. [27] Es wurden in dieser Studie 2570 Patienten untersucht und BAV gegen TAV Patienten verglichen. Auch hier zeigte sich, dass die BAV Patienten durchschnittlich jünger waren als die TAV Patienten.

Eine frühzeitige Erkrankung an Komplikationen wie einer Aortenklappenstenose oder einer -insuffizienz der BAV Patienten könnte eine Erklärung dafür sein.

Dies zeigten auch die Ergebnisse der Vergleiche zwischen Patienten mit BAV und einer Aortenklappeninsuffizienz und den Patienten mit TAV und Insuffizienz der Aortenklappe. Hier waren die Patienten mit BAV ebenfalls deutlich jünger mit durchschnittlich 47,93 Jahren im Gegensatz zu 58,5 Jahren bei den TAV Patienten. In der Gruppe der BAV Patienten befanden sich 18 mit einer Aortenklappenstenose. Auch hier lag der Mittelwert des Alters bei 52,77 Jahre und somit ebenfalls unter 60 Jahre.

Als Folge der mechanischen Veränderungen im Bereich der Klappe wird eine Kalzifizierung der Klappentaschen in Betracht gezogen, da diese häufig mit einer BAV assoziiert ist. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass sich eine Kalzifizierung bei BAV Patienten bereits durch Symptome im Alter zwischen 50-60 Jahren klinisch manifestiert. [1]

In der Literatur findet sich eine Studie von Beppu et al. [30], in der sich die Forschergruppe unter anderem mit der Verbindung zwischen einer BAV und der Entwicklung einer Aortensklerose und den daraus entstehenden Komplikation einer Aortenstenose auseinandersetzten. Hier ergab sich, dass eine Sklerose und eine Kalzifikation bei BAV Patienten

in jüngeren Jahren beginnt und somit früher Komplikationen auftreten, als bei TAV Patienten. Auch die Forschergruppe Collins et al. [31] zeigte Ergebnisse, die aufwiesen, dass Komplikationen wie eine Aortenstenose oder eine -insuffizienz bei BAV Patienten deutlich früher auftreten im Vergleich zu Patienten mit einer TAV.

Im Vergleich von BAV Patienten, die als Begleiterkrankung ein Aortenaneurysma im Bereich der Aorta ascendens hatten, mit TAV Patienten mit der gleichen Begleiterkrankung wiesen die Patienten mit BAV ein Durchschnittsalter von 49,22 Jahre auf. Die Patienten mit TAV dagegen hatten durchschnittlich ein Alter von 58,64 Jahre. Auch hier zeigte sich, dass die BAV Patienten deutlich jünger waren als die TAV Patienten. Dazu ließen sich innerhalb der Literatur ebenfalls Arbeiten finden, die dieses Ergebnis bestätigten. So beispielsweise die Studie von Wilton und Jahangiri [32], in der unter anderem ein Zusammenhang zwischen einer Aortenstenose und einer poststenotischen Dilatation der Aorta diskutiert wurde. Dieses Phänomen trat besonders in Patienten mit einer BAV auf. Die Arbeit von Ward [33] bestätigte ebenfalls, dass eine Kombination zwischen einer Aortenstenose bzw. -insuffizienz und einer Dilatation der Aorta besteht und in jüngeren Jahren auftritt als bei Patienten mit einer TAV.

Ebenso besteht der Verdacht, dass die durch die Klappenfehlanlage entstehenden hämodynamischen Turbulenzen mit der Entwicklung eines Aneurysma im Bereich der Aorta ascendens einhergehen können, welches zur Insuffizienz der krankhaften Segel führen kann. [28]

Zusammenfassend ergibt sich aus der Auswertung, dass Patienten, die eine BAV besitzen, frühzeitiger an Begleiterkrankungen bzw. Komplikationen wie z.B. einer Aorteninsuffizienz oder einer Dilatation der Aorta erkranken.

## **4.2. Notch1-Sequenzierung**

Neben den mechanischen Ursachen, die bei der BAV als wichtiger Faktor für die Entstehung einer Kalzifikaktion der Klappe gezählt werden, werden auch Mutationen im *NOTCH1*-Gen für die Entstehung der BAV oder auch für die stärkere Kalzifikation der Klappe in BAV Patienten verantwortlich gemacht. Die Mutationen im *NOTCH1*-Gen sollen sowohl schon in die frühe embryonale Entwicklung der BAV eingreifen als auch durch eine inadäquaten Aktivierung einer osteoblasten spezifischen Genexpression, deren Mechanismus jedoch noch zu klären ist, die Kalzifizierung der Aortenklappe verursachen. [9]



In der vorliegenden Arbeit wurde das *NOTCH1*-Gen in 48 Patienten mit BAV sequenziert und dabei wurden neben 35 bereits bekannten auch 22 neue Sequenzvarianten entdeckt (publiziert als Mohamed et al. „Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in *NOTCH1* in patients with bicuspid aortic valve“). Unter diesen befanden sich 4 Varianten, die zu einem Aminosäureaustausch führten. Zwei dieser Basenwechsel konnten auch in einer gesunden Kontrollgruppe gefunden werden, so dass lediglich die Auswechslungen p.T596M und p.P1797H als Mutation angesehen wurden. Die Mutation p.T596M liegt auf Exon11, g.40264C>T und die Mutation p.P1797H liegt auf Exon 29, g.53777A>C. Die p.T596M Mutation ersetzt einen ungeladenen, polaren, sauren Aminosäurerest durch einen aliphatischen, nicht-geladenen Rest innerhalb der EGF-like Domäne des N-terminalen Ende des *NOTCH1*-Gens. Die EGF-like Domäne wurde in Sequenzen der epidermalen Wachstumsfaktoren gefunden (EGF). Proteine mit dieser Domäne haben die Funktion verschiedenster biologischer Prozesse.

Die p.P1797H Mutation vertauscht einen aliphatischen, nicht-geladenen Rest mit einem positiv-geladenen Rest innerhalb der intrazellulären Domäne. Bei den Patienten, deren *NOTCH1* diese Mutationen aufwies, konnten ein Aortenaneurysma  $\geq 47\text{mm}$  sowie eine Kalzifikation der Aortenklappe gefunden werden. Beide Patienten hatten sowohl eine Insuffizienz als auch eine Stenose der Aortenklappe. Auch konnte bei beiden eine Fusion der linken und rechten Taschenklappe gezeigt werden.

Mit der Entdeckung neuer *NOTCH1* Mutationen konnte das Spektrum der bekannten *NOTCH1* Mutationen erweitert werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen im *NOTCH1*-Gen die Begleitmechanismen, die zur Klappenkalzifikation führen, auslösen können. [1] So konnte die Forschungsgruppe Garg et al. Anzeichen dafür ableiten, dass Mutationen im *NOTCH1*-Gen neben einer Entzündungsreaktion eine Dysfunktion des Endothels prädisponieren, die zu krankhaften kardiovaskulären Kalzifikationen führen können. [9]

### **4.3. eNOS-Genexpression**

Die Analyse der eNOS RNA Expression durch quantitative Real-Time PCR ergab eine beträchtliche Differenz zwischen der Expression in BAV Patienten mit und ohne Aneurysma. Zur Erlernung der Real-Time PCR Methode wurde die eNOS Genexpression in dieser Arbeit untersucht, jedoch nur in einer geringer Anzahl von Patienten, da bereits Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Aicher et. al. vorlagen.

Es ist bekannt, dass das durch eNOS synthetisierte NO vasoprotektive Eigenschaften hat und der Aneurysmabildung entgegenwirkt. [15] Ferner scheint eine verringerte eNOS-Expression im Zusammenhang mit einem Aneurysma der Aorta ascendens zu stehen. [7] Dabei muss unterschieden werden zwischen der Messung der eNOS Protein Expression und der eNOS mRNA Expression. In dieser Arbeit wurde die mRNA Expression gemessen. Die daraus entstehenden Proteine können jedoch durch weitere Faktoren stabilisiert und destabilisiert werden, bei eNOS z.B. Scherstress, Zellwachstum, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  etc. [12]

Die Ergebnisse der Arbeit der Forschergruppe Aicher et al. belegten, einen Zusammenhang zwischen der Aortenklappenanatomie und dem Durchmesser der Aorta ascendens. Die Expression des eNOS-Proteins war deutlich geringer in Patienten mit einer BAV als bei TAV Patienten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass es eine signifikante Korrelation zwischen der eNOS Expression und dem maximalen Durchmesser der Aorta ascendens gibt. Die Ergebnisse konnten eine Assoziation zwischen der eNOS Expressionsstärke und der Aortenklappenanatomie sowie der Ausbildung eines Aneurysmas der Aorta in BAV Patienten zeigen. [7] Allerdings wurde in dieser Arbeit die eNOS Proteinexpression genutzt, wodurch die unterschiedlichen Ergebnisse zustanden kommen könnten. Außerdem ist in beiden Untersuchungen die Patientenzahl sehr gering. Eine höhere Probandenzahl wäre zur endgültigen Festigung eines Ergebnisses notwendig. Des Weiteren sind die Proben der meisten Probanden nur aus dem Klappenbereich entnommen worden. Es bleibt zu untersuchen, ob sich die Expression der mRNA bzw. des Proteins in den unterschiedlichen Regionen der Aorta ascendens mit oder ohne Aneurysma ändert. [7]

#### **4.4. eNOS-Sequenzierung**

In 8 Patienten, 6 mit BAV und 2 mit TAV, erfolgte im Rahmen eines ersten Pilotprojekts die Sequenzierung des gesamten eNOS-Gens (7q35-7q36). Da die Anzahl der untersuchten TAV-Patienten zu gering war, um statistisch relevante Ergebnisse zu liefern, wurden weitere Patientendaten aus der „entrez SNP“ Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) hinzugezogen. Der Vergleich dieser größeren Kontrollgruppe mit den untersuchten 6 BAV Patienten ergab, dass sich die Genotypverteilung bei zwei eNOS SNPs signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschied. Bei diesen beiden SNPs handelt es sich um die SNPs 8 (rs1800780) und 12 (rs753482). Beide

SNPs sind in Introns des Gens lokalisiert, SNP 8 liegt in Intron 12 und SNP 12 liegt in Intron 19. Diese Tatsache spricht nicht für eine physiologische Relevanz, allerdings liegen beide SNPs nahe an der Grenze zu den Exons 13, bzw. 19, was einen möglichen Einfluss auf das Splicing von eNOS nahe legt.

Aus der Literatur sind zwei eNOS SNPs bekannt, die einen Einfluss auf die Expression des Gens haben, T<sup>-786</sup>C und Glu298Asp (G<sup>894</sup>T). Der in dieser Arbeit untersuchte SNP 7 G<sup>894</sup>T (rs1799983) ist auf dem Exon 7 lokalisiert und führt zu einem Austausch der Aminosäure Glutamat gegen Aspartat, was zur Spaltung des eNOS Enzyms in ein 100 kDa und ein 35 kDa Fragment führt. [21] Die untersuchten Patientenkollektive zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Genotypverteilung dieses SNPs ( $P = 0,136$ ), so dass davon auszugehen ist, dass dieser SNP vermutlich keine Rolle bei bikuspiden Aortenklappen spielt. Die Forschergruppe Rossi et al. spricht beim SNP auf Exon 7 von einem genetischen Marker. [24]

Der untersuchte SNP 1 T<sup>-786</sup>C (rs2070744) liegt im Promotorbereich von eNOS und wird mit einer abgeschwächten Stickstoffmonoxidproduktion assoziiert. [21] Rossi und Kollegen konnten zeigen, dass die Genotypverteilung dieses SNPs mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zusammenhängt, wobei der TT-Genotyp eine schlechtere Prognose aufwies. [22] Die Genotypverteilung zwischen den untersuchten BAV- und Kontrollpatienten unterschied sich in dieser Untersuchung nicht signifikant, war mit einem p-Wert von 0,097 allerdings nahe am signifikanten Bereich. Durch größere Patientenkollektive könnte ein definitiver Zusammenhang dieses SNPs mit der BAV bestätigt oder ausgeschlossen werden.

Für die Expressionsstärke des eNOS-Gens scheinen insbesondere „single nucleotide polymorphism“ (SNP) innerhalb der Promoterregion in der Position -786 T/C verantwortlich zu sein. Ferner zeigen noch andere SNPs in dieser Genregion zusätzliche Effekte, diese SNPs liegen jedoch in einem „linkage disequilibrium“.

Gorchakova et al. publizierten hierhin gehend einen äußerst interessanten Artikel. [29] Die Forschergruppe untersuchte, ob eine kaukasische Patientengruppe, die den TT-Genotyp des SNP im Exon 7 des eNOS-Gens trug, an einem erhöhten Mortalitäts- oder Myokardinfarkttrisiko binnen eines Jahres nach Stenting der Koronararterien litten. Die Autoren implizierten, dass vorhergehende Untersuchungen bezüglich funktioneller Effekte des SNP 894 G/T auf Exon 7, gleichbedeutend dem Austausch von Glu zu Asp (Glutaminsäure zu Asparaginsäure), ihre eigenen Ergebnisse erklären könnten. Unter Betrachtung

tung stand die erhöhte Anfälligkeit des eNOS-Proteins mit Asp298 statt mit Glu298 für eine proteolytische Spaltung, die die eNOS Funktion schädigen würde. Allerdings zeigten die Forschungsergebnisse, dass die früheren Ergebnisse bezüglich der verstärkten Spaltung des eNOS-Proteins mit Asp298 eher auf die Probenaufbereitung zurückzuführen waren und nicht die gesteigerte Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen in Trägern der oben genannten genetischen Variante des eNOS-Gens erklären können. Die Forschergruppe berücksichtigte ebenfalls nicht, dass unlängst durch Rossi et al. in Kaukasiern ein „linkage disequilibrium“ zwischen der genetischen Variante in Exon 7 und der genetischen Variante in der Promoterregion -786 T/C des eNOS-Gens nachgewiesen wurde. Diese Koppelung hat zur Folge, dass die seltenen Varianten beider Polymorphismen des eNOS-Gens zusammen übermmittelt werden.

Aufgrund der starken Suppression der eNOS-Gen Transkription von ungefähr 50% bei Ausprägung der spärlicheren Variante -786 C in der Promoterregion des eNOS-Gens, nahmen sie an, dass der SNP in Exon 7 lediglich ein genetischer Marker für das funktionell nachteilige Allel ist, welches auch das eNOS-Protein mit Asp298 codiert.

In der Tat konnte einerseits nachgewiesen werden, dass in Kaukasiern die Ausprägung einer von beiden Varianten entweder in der Promoterregion oder in Exon 7 zu einer Reduktion des aus Blutplättchen stammenden NO um etwa 50% führt. Andererseits wurde ein Nachweis erbracht, dass Träger beider Varianten eine verminderte bzw. gestörte Freisetzung von NO zeigten. [24]

Bei der Sequenzierung des gesamten eNOS-Gens in 8 Patienten handelte es sich um eine Art Pilotprojekt. Da die Sequenzierung eines gesamten Gens sehr aufwendig ist, handelt es sich um eine sehr kostspielige Untersuchung, deren monetärer Aufwand den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte. Dennoch sollten die oben genannten Ergebnisse und Diskussion erneut in einer sehr viel größeren Studie geprüft und getestet werden. Erst dann könnte eine endgültige Aussage getroffen werden, in welcher Weise sich die SNPs in verschiedenen Regionen des eNOS-Gens auswirken und ob sich eine Häufung bestimmter SNPs in BAV Patienten finden lässt. Hierzu muss auch die Kontrollgruppe sehr genau ausgewählt bzw. klinisch gut dokumentiert sein. Ferner sollte sich in der Kontrollgruppe kein BAV Patient befinden, sondern nur Patienten mit einer TAV, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Ebenso sollten beide Gruppen ungefähr aus der gleichen Umgebung stammen z.B. Norddeutschland oder in größeren Maßstäben Nordeuropa, da man dann Einflüsse wie Umwelt, Nahrung etc. minimieren kann.

## 5. Zusammenfassung

Die bikuspidale Aortenklappe ist mit einer Prävalenz von 1-2% aller Neugeborenen die häufigste Anomalie am menschlichen Herzen. Es wurden unterschiedliche morphologische Phänotypen gefunden und nach Form und Häufigkeit eingeteilt. Auch wurden bei der Erforschung von Ursachen für die Entstehung der BAV verschiedene Ansätze in Betracht gezogen. Neben hämodynamischen Verläufen während der Embryogenese, hat man ebenso genetische Komponenten untersucht. Hier zeigten sich im Besonderen drei Kandidatengene: *eNOS*, *NOTCH1* und *UFD1L*. Bei genauerer Betrachtung aller drei Gene zeigte sich ein Zusammenhang mit dem Auftreten einer BAV.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich das eNOS-Expressionsmuster dilatierter Aortenwände bei Patienten mit BAV im Vergleich zu Patienten mit TAV unterscheidet. Von Interesse war weiterhin, die Mutationshäufigkeit im *NOTCH1*-Gen in einem Kollektiv von Patienten mit einer sporadischen Form der bikuspiden Aortenklappe zu untersuchen und ferner eine Assoziation zwischen dem eNOS-Gen und der BAV aufzuzeigen.

Die Daten der Patienten, deren Proben für diese Arbeit genutzt wurden, wurden einerseits nach den Kriterien Alter und Begleiterkrankungen wie einer Aortenklappenstenose und / oder einer -insuffizienz ausgewertet. Andererseits erfolgte eine statistische Auswertung bezüglich der Aortenklappenkonfiguration (BAV vs. TAV) im Zusammenhang mit einer Aortendilatation. Hierzu wurden unter anderen die Grundlagen für die bekannte Herunterregulation des eNOS-Gens betrachtet und diskutiert.

Die Auswertung der 58 untersuchten Patienten, von denen 46 Patienten an einer BAV litten und bei 12 eine TAV vorlag, ergab, dass die Patienten mit einer BAV im Durchschnitt unter 60 Jahren waren und somit durchschnittlich deutlich jünger als die Patienten der TAV Gruppe. Ebenfalls zeigte sich, dass das Alter der Patienten der BAV Gruppe, die an einer begleitenden Erkrankung des Herzens z.B. einem Aneurysma der Aorta ascendens oder einer Aortenstenose bzw. -insuffizienz litten, ebenfalls deutlich unter 60 Jahren lag.

Die Ergebnisse der Patientenauswertung lassen vermuten, dass Patienten mit einer BAV deutlich früher an einer begleitenden Erkrankung des Herzens leiden als Patienten mit einer TAV und somit auch früher einer Diagnostik unterzogen werden. Dieses Ergebnis ließ sich nicht nur bei Patienten mit einer Aortenstenose oder -insuffizienz zeigen, son-

dern auch bei Patienten mit einem Aneurysma, die ebenfalls in früheren Jahren bereits an einer Dilatation der Aorta leiden und somit frühzeitiger mit Komplikationen rechnen müssen.

Ein Zusammenhang zwischen den gefunden Mutationen des *NOTCH1*-Gens und einer eNOS Dysregulation konnte nicht festgestellt werden. Die Anwendung der Methoden der RNA-Isolierung sowie der cDNA-Herstellung waren notwendig, um die Expressionsmuster von eNOS zu messen. Die Real-Time PCR ist zusätzlich mit einer sogenannten Sonde versehen, um die erzielten Ergebnisse zu verifizieren. Um sowohl die Mutationen von *NOTCH1* als auch von *eNOS* zu finden, waren DNA-Isolierungen und DNA-Sequenzierungen erforderlich.

Die *NOTCH1*-Sequenzierung zeigte 22 neue Sequenzvarianten, unter denen 4 einen Basenaustausch verursachten. Nur 2 dieser Varianten wurden nicht in der Kontrollgruppe gefunden, so dass nur die Auswechslung p.T596M und p.P1797H als Mutationen angesehen wurden. Weiterhin konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine Mutation des *NOTCH1*-Gens die Begleitmechanismen, die zu einer Kalzifizierung der Aortenklappe führen, auslösen kann.

Die Analyse der eNOS-RNA-Expression der Patientenproben ergab, dass Patienten mit einer BAV aber ohne eine Dilatation der Aorta ein verringertes eNOS-Expressionsmuster im Vergleich zu Patienten mit TAV aufweisen, während die eNOS-Expression in BAV-Patienten mit Aneurysma mit der von TAV-Patienten vergleichbar war. Dennoch war die Streubreite der Expression sehr auffällig. Das spricht dafür, dass die tatsächliche Expression abhängig ist von den Arealen, aus denen die Proben entnommen wurden. Außerdem muss zwischen Messungen der eNOS Protein und der eNOS mRNA Expression unterschieden werden, wobei in dieser Arbeit die mRNA Expression gemessen wurde. Dies könnte ursächlich sein für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dieser Arbeit und den Ergebnissen der Arbeit von Aicher et al. Die Arbeitsgruppe belegte einen Zusammenhang zwischen dem maximalen Durchmesser der Aorta ascendens und der Aortenklappenanatomie. Außerdem wurde eine Assoziation zwischen der eNOS-Expressionsstärke, der Aortenklappenanatomie und der Ausbildung eines Aneurysmas der Aorta in BAV-Patienten gezeigt. In zukünftigen Studien bleibt zu untersuchen, ob eine Änderung der Probenentnahmestellen aus der Aorta ascendens mit oder ohne Aneurysma einen Unterschied der Protein oder mRNA Expression bewirkt.

Im Rahmen eines Pilotprojektes erfolgte die vollständige Sequenzierung des gesamten eNOS Gens in 8 Patienten europäischer Abstammung, 6 BAV- und 2 TAV-Patienten. Die

Genotypenverteilung zweier eNOS SNPs unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe der „entrez SNP“ Datenbank des „NCBI“. Dabei wurden ausschließlich Daten von Patienten verwendet, die europäischer Abstammung sind, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

Es handelt sich um die SNPs 8 (rs1800780) und 12 (rs753482). Beide SNPs liegen in Introns, SNP 8 in Intron 12 und SNP 12 in Intron 19, so dass eine physiologische Relevanz zunächst nicht in Betracht kommt. Allerdings befinden sich die Introns nahe den Exons 12, bzw. 19. Auf diese Weise könnten sie einen möglichen Einfluss auf das Slicing von eNOS haben.

Ferner wurden auch die bereits aus der Literatur bekannten SNP1 T<sup>-786</sup>C und SNP 7 G<sup>894</sup>T in den DNA-Sequenzierungen gefunden. SNP 7 führt zwar zu einem Basenaustausch, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Genotypenverteilung, so dass dieser SNP keine Rolle in der Entstehung der BAV zu spielen scheint. Es wird diskutiert, ob es sich um eine Art genetischen Marker handeln könnte.

Der untersuchte SNP 1 dagegen liegt auf der Promoterregion von eNOS und ist assoziiert mit einer verringerten NO-Produktion. Es konnte in diese Arbeit zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den BAV- und den Kontrollpatienten erhoben werden, aber der p-Wert lag mit 0,097 sehr nahe der Signifikanz. Die Untersuchung einer größeren Patientengruppe wäre erforderlich, um den Zusammenhang zwischen dem SNP 1 und einer BAV endgültig zu klären.

## 6. Anhang

### Patientendaten

Nr.	Age (Y)	Sex (f/m)	BMI	Aneurys- ma (8 ja/ 9 nein)	Aorta asc. (mm)	LDH (U/L)	BAV/ TAV (1/2)	AKS / AKI (26/27)	KHK/ Norm (3/4)	art.HTN/ +pulm./ nur pulm. (5/6/7)
1	68	M	27,6	9		178	1	27	3	5
2	40	F	23,5	8	40	165	1	26/27	4	0
3	52	M	22,5	8	38	201	1	26	4	7
4	53	M	21	9	28	221	1	26	4	0
5	36	M	20	8	44	313	1	26	4	0
6	49	F	24	8	50	96	1	26/27	4	0
7	48	F	25	9		160	1	26	4	5
8	49	M	28	9		210	1	26	4	0
9	71	M	29	8	49	177	1	26	3	6
10	32	M	20	8	40	175	1	26/27	4	0
11	33	M	30	8	38	169	1	26/27	4	0
12	43	M	24	8	39	172	1	26/27	4	0
13	39	M	23	8	55	135	1	27	4	5
14	65	M	34	8	58	287	1	26	4	5
15	67	M	25	8	52	162	1	26	4	5
16	49	M	26	8	36	166	1	26	3	5
17	39	F	19	8	51		2	27	0	
18	56	M	26	8	52	120	1	27	4	5
19	50	M	23	9	34	174	1	27	4	5
20	53	M	33	8	45	175	1	26	4	5
21	41	M	33	9	30	265	1	26	4	0
22	58	M	26	8	52	141	2	27	4	5
23	31	M	29	9	30	209	1	27	4	5
24	65	M	28	8	72		2	27	0	5
25	51	M	32	9		172	2	27	4	5
26	69	M	24,7	8	64x59	137	2	27	4	5
27	38	M	21	8	58	148	1	27	4	0
28	65	M	28	8	49	139	2	27	4	5
29	58	M	27,7	9		161	1	27	4	0
30	40	M	24,5	8	52	278	1	26	4	0
31	71	M	30	8	55	188	2	27	3	5
32	32	M	25	8	39	143	1	27	4	5
33	62	M	24,5	8	53-57	138	2	27	3	5
34	36	M	30	9		185	1	27	4	0
35	30	M	25	8	36	183	1	27	4	5
36	42	F	31	8	44	182	2	27	4	5
37	65	M	31	9		126	2	27	3	5
38	31	M	38	9	35	169	1	27	4	6
39	55	M	23	8	60	138	2	27	4	6
40	61	M	28	8	40	174	1	26	4	0
41	69	M	32	8	55	156	1	26	4	5
42	64	M	24	8	55x52	134	1	26/27	3	5
43	58	M	27	8	53		1	27	0	
44	54	F	25	8	38	161	1	26/27	4	6
45	78	M	22	8	70		1	27	0	5
46	76	M	26	9		284	1	26/27	4	6
47	49	M	26	8	42	181	1	26	4	0
48	63	M	25	8	50	179	1	26	4	5
49	41	M	37	8	48	183	1	27	4	5
50	61	F	33	9		243	1	26	3	6
51	53	M	23,5	9	34	248	1	27	4	0
52	54	M	29	8	58	165	1	27	3	5
53	50	F	23,4	9		229	1	26	4	5
54	60	M	31	8	57	179	2	27	4	7
55	56	F	21	9		195	1	26/27	4	5
56	49	M	25	8	47	167	1	26/27	4	0
57	45	M	25	8	50	226	1	26/27	4	5
58	34	M	22	8	49		1	26/27		

Tabelle 20: Patientendaten



## Real-Time PCR

Sample	ddCt	RQ	RQ min	RQ max	Abweichung min	Abweichung max
Herz 01	0,956	0,516	0,403	0,66	0,113	0,144
Herz 02	0,644	0,64	0,587	0,697	0,053	0,057
Herz 04	0,433	0,741	0,615	0,893	0,126	0,152
Herz 09	0,209	0,865	0,633	1,183	0,232	0,318
Herz 15	2,239	0,212	0,196	0,229	0,016	0,017
Herz 16	0,873	0,546	0,457	0,653	0,089	0,107
Herz 17	-0,211	1,157	0,953	1,405	0,204	0,248
Herz 21	0,789	0,579	0,428	0,783	0,151	0,204
Herz 30	0	1	0,791	1,265	0,209	0,265
Herz 40	0,578	0,67	0,599	0,749	0,071	0,079
Herz 41	0,083	0,944	0,757	1,177	0,187	0,233

**Tabelle 21:** Auswertung siRNA Versuch

## eNOS-Sequenzierung

Risiko SNPs	Homozygot Allel1	Heterozygot	Homozygot Allel2	Allel 1
1	3	4	1	T
2	7	0	1	G
3	7	1	0	C
4	5	1	0	G
5	4	3	1	C
6	3	4	1	G
7	4	3	1	G
8	2	5	1	G
9	4	3	1	G
10	6	2	0	C
11	6	2	0	G
12	3	4	1	C
13	4	4	0	G
14	3	4	1	G
15	7	1	0	A
16	7	1	0	C

**Tabelle 22:** Allelverteilung der eNOS Risiko-SNPs

Die Tabelle zeigt die Allelverteilung der 8 sequenzierten Patienten. In der letzten Spalte ist das Allel angegeben, dass als Allel 1 bezeichnet wurde (Vergleich mit NCBI SNP Datenbank)

### Sequenzierungsergebnisse der Pilotprojektpatienten

Mutationen, Polymorphismen	DNA 1	2	DNA 2	2	DNA 3	2	DNA 4	2	DNA 5	3	DNA 6	3	DNA 7	2	DNA 9	2
Pos.-786 C->T (HGMD T-786C), rs2070744	Homogen	TT	Heterogen	CT	Heterogen	CT	Heterogen	CT		CC	Homogen	TT	Heterogen	CT	Homogen	TT
IVS2, ds+42, G->A		GG		GG		GG		GG		GG	Heterogen	AA		GG		GG
IVS4, as-20, C->T		CC		CC		CC		CC		CC		CC		CC	Heterogen	CT
IVS5, ds+50, G->C						GG		GG		GG	Heterogen	GC		GG		GG
Ex.6, Cd.258, GAT->GAC, Asp	Homogen	CC		TT	Heterogen	TC	Heterogen	TC	Homogen	CC	Homogen	CC	Heterogen	TC	Homogen	CC
IVS6,as-26, A->G	Homogen	GG		AA	Heterogen	AG	Heterogen	AG	Homogen	GG	Heterogen	AG	Heterogen	AG	Homogen	GG
Ex.7,Cd.298, GAT->GAG, Asp->Glu (HGMD GAG298GAT, Glu298Asp), rs1799983	Homogen	GG		TT	Heterogen	TG	Heterogen	TG	Homogen	GG	Homogen	GG	Heterogen	TG	Homogen	GG
IVS11, as-30, A->G	Heterogen	AG		AA	Heterogen	AG	Heterogen	AG	Homogen	GG	Heterogen	AG	Heterogen	AG	Homogen	GG
IVS14,as-62, G->T	Heterogen	GT		GG	Heterogen	GT		GG		GG		GG	Heterogen	GT	Homogen	TT
Ex.16,Cd.666, GCC->GCG, Ala		CC		CC		CC		CC		CC	Heterogen	CG		CC	Heterogen	CG
IVS17, ds+40, G->T		GG		GG		GG		GG	Heterogen	GT		GG		GG	Heterogen	GT
IVS18,ds+28, C->A (HGMD IVS18, ds+27, A->C)	Homogen	AA	Heterogen	CA	Heterogen	CA	Heterogen	CA	Homogen	CC	Homogen	CC	Heterogen	CA	Homogen	CC
IVS22, ds+15, A->G	Homogen	GG	Heterogen	AG	Heterogen	AG	Heterogen	AG	Homogen	GG	Homogen	GG	Heterogen	AG	Homogen	GG
IVS23, ds+11, G->T		GG	Heterogen	GT	Heterogen	GT		GG		GG	Homogen	TT		GT	Heterogen	GT
IVS4, ds+320, A->G		AA		AA		AA		AA		AA	Heterogen	AG		AA		AA
IVS4, ds+370, C->T		CC		CC	Heterogen	CT		CC		CC		CC		CC		CC
IVS4, 27bp Del.		II		II		II		II		II	Heterogen	ID		II		II
Repeat (CA) <sub>n</sub> IVS13	29/32		34/36		31/34		32/35		27/34		32/33		33/35		29/31	

**Tabelle 23:** Patienten-DNA 1-4, 7 und 9 aus BAV Patienten, Patienten-DNA 5 und 6 aus TAV Patienten

## Quellenverzeichnis

1. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J: *Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2006; 345; 1460-1465
2. Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann HJ, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, Van der Zypen E, Zilles K. Schiebler TH, Schmidt W: *Organe des Kreislaufs*. Anatomie 8. Auflage Springer 1999; 516-526
3. Sievers HH, Schmidtke C: *A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens*. J Thorac Cardiovasc Surg 2007; 133; 1226-1233
4. Mohamed SA, Techel D, Li L, Erasmi AW, Sievers HH: *Molekulargenetische Studien bikuspidaler Aortenklappen*. Z Herz- Thorax- Gefäßschir 2005; 19; 227-233
5. Mohamed SA, Hanke T, Schlueter C, Bullerdiek J, Sievers HH: *Ubiquitin fusion degradation 1-like gene dysregulation in bicuspid aortic valve*. J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 130; 1531-1536
6. Tony C. Lee, Yidan D. Zhao, David W. Courtman and Duncan J. Stewart: *Abnormal Aortic Valve Development in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase*. Circulation 2000; 101; 2345-2348
7. Aicher D, Urbich C, Zeiher A, Dimmeler S, and Schäfers HJ: *Endothelial Nitric Oxide Synthase in Bicuspid Aortic Valve Disease*. Ann Thorac Surg 2007; 83; 1290-1294
8. Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, Shooner K, Benson DW: *Bicuspid Aortic Valve Is Heritable*. J Am Coll Cardiol 2004; 44; 138-143
9. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D: *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease*. Nature 2005; 437; 270-274

10. Garg V: *Molecular genetics of aortic valve disease*. Curr Opin Cardiol 2006; 21; 180-184
11. McKellar SH, Tester DJ, Yagubyan M, Majumdar R, Ackerman MJ, Sundt TM 3rd: *Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms*. J Thorac Cardiovasc Surg 2007;134; 290-296
12. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J: *Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology*. Cell Mol Life Sci 1999; 55; 1078-1087
13. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J 2001 ;357; 593-615
14. Förstermann U, Münzel T: *Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace*. Circulation 2006; 113; 1708-1714
15. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ: *Abnormal Aortic Valve Development in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide*. Circulation 2000; 101; 2345-2348
16. Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee SP.: *Development of Heart Failure and Congenital Septal Defects in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase*. Circulation 2002; 106; 873-9
17. Moncada S, Higgs A: *L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med 1993; 329; 2002-2012
18. Sessa WC: *eNOS at glance*. J Cell Sci 2004; 117; 2427-2429
19. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT: *Structure and Chromosomal Localization of the Human Constitutive Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene*. J Biol Chem 1993; 268; 17478-17488
20. Lorenz M, Hewing B, Hui J, Zepp A, Baumann G, Bindereif A, Stangl V, Stangl K: *Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulation eNOS activity*. FASEB J 2007; 1556-1564

21. Kelm M: *Significance of Vascular Nitric Oxide Synthase Pathways in Coronary Artery Disease: a multiple-level biomarker strategy.* J Am Coll Cardiol 2006; 48; 1175-1176
22. Rossi GP, Maiolino G, Zanchetta M, Sticchi D, Pedon L, Cesari M, Montemurro D, De Toni R, Zavattiero S, Pessina AC: *The T-786C Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype Predicts Cardiovascular Mortality in High-Risk Patients.* J Am Coll Cardiol 2006; 48; 1166-1174
23. Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, Cavallin M, Maiolino P, Pessina AC: *The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study.* J Am Coll Cardiol 2003; 41; 930-937
24. Rossi GP, Taddei S, Viridis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A: *The T-786C and Glu298Asp Polymorphisms of the Endothelial Nitric Oxide Gene Affect the Forearm Blood Flow Responses of Caucasian Hypertensive Patients.* J Am Coll Cardiol 2003; 41; 938-945
25. Schild, T, Dr.: *Einführung in die Real-Time TaqMan<sup>a</sup> PCR-Technologie.*
26. Sanger, F: *Determination of Nucleotide Sequences in DNA.* Bioscience Reports 2004; 24; 237-253
27. Bauer: *Bikuspide Aortenklappe und Dilatation der Aorta ascendens.* Habilitationsschrift Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin 2004
28. Schäfers HJ, Aicher D, Langer F, Lausberg HF: *Preservation of the bicuspid aortic valve.* Ann Thorac Surg 2007; 83; 740-745
29. Gorchakova O, Koch W, von Beckerath N, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A: *Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement.* Eur Heart J 2003; 24; 820-827

30. Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K: *Rapidity of Progression of Aortic Stenosis in Patients with Congenital Bicuspid Aortic Valves*. Am J Cardiol 1993; 71; 322-327
31. Collins M, Butany J, Borger M et al.: *Implications of a congenitally abnormal valve: a study of 1025 consecutively excised aortic valves*. J Clin Pathol 2008; 61; 530-536
32. Wilton E, Jahangiri M: *Post-stenotic aortic dilatation*. Journal of Cardiothoracic Surgery 2006; 1; 7
33. Ward C: *Clinical significance of the bicuspid aortic valve*. Heart 2000; 83; 81-85

## ***Danksagung***

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Mohamed für die aktive Unterstützung, Ermutigung und die Anregungen bei der Abfassung dieser Arbeit.

Auch möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Sievers, Direktor der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie, für die freundliche Unterstützung, die Vergabe des Themas und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bei meinen Eltern Carola und Rüdiger Hagemann bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht während der Dauer meines Studiums unterstützten und mich stets bei der Bearbeitung meiner Arbeit bestärkt haben. Meinem Mann Arne Jessen möchte ich danken unter anderem für seine Unterstützung bei der Formatierung, dem Korrektur lesen und der Hilfe bei der Auswertung der Statistiken dieser Arbeit.