

Aus der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Lichtenberg

*Etablierung dreidimensionaler Zellkulturmodelle zur
Untersuchung des Differenzierungs- und
Kalzifizierungsverhaltens valvulärer Interstitialzellen unter
Zytokinstimulation*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Hof

2018

*Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

gez.: Alexander Hof

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. A. Lichtenberg

Zweitgutachter: PD Dr. med. F. Simon

Publikationen und Kongressbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Hof A, Raschke S, Baier K, Nehrenheim L, Selig JI, Schomaker M, Lichtenberg A, Meyer H, Akhyari
P - Challenges in developing a reseeded, tissue-engineered aortic valve prosthesis Eur J Cardiothorac
Surg. 2016 Sep;50(3):446-55. doi: 10.1093/ejcts/ezw057

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

Hof A, Raschke S, Baier K, Nehrenheim L, Selig JI, Schomaker M, Lichtenberg A, Meyer H, Akhyari
P - Challenges in developing a reseeded, tissue-engineered aortic valve prosthesis; Vortrag auf dem
EACTS 29th annual meeting, Basic Science Session II, 2015 Oct. 05, Amsterdam

Abstract

Background: The development of aortic valve degeneration is becoming increasingly understood as a complex pathomechanism, in which peptides of the extracellular matrix (ECM) as well as signal molecules and valvular interstitial cells (VIC) are involved. VIC can influence the composition of valvular ECM and by this control growth and regeneration processes of the native aortic valve. Both, mechanical and biological aortic valve prostheses consist of avital tissue and do therefore not have these properties. This makes valvular growth impossible and contributes to a relatively short durability of biological valve prostheses so that re-operations with an increased risk of complications or – in case of mechanical valve prostheses - a lifelong anticoagulation might be needed.

Objective: Aim of the present study was to establish ECM-based 3D cell culture models for primary ovine VIC. Subsequently, the effect of cytokines on VIC phenotype as well as different target-proteins playing a substantial role in aortic valve degeneration should be analysed. Furthermore, various approaches for interstitial repopulation of decellularized aortic valve leaflets with VIC should be evaluated. Interstitially repopulated, tissue-engineered heart valves might provide new perspectives in the development of improved heart valve prostheses with the potential of growth and regeneration.

Methods: Two types of 3D cell culture models were established. VIC were cultured in matrigel-based ECM (mECM) and stimulated with procalcifying agents, TGF β or VEGF. Culture shrinking was measured macroscopically indicating the extent of matrix compaction. 3D culture morphology and cell distribution were examined by histological analysis and indicators of matrix calcification and apoptosis were scrutinized. In addition, expression of α smooth muscle actin (α SMA), osteopontin (OPN), cluster of differentiation 73 (CD73) und matrix metalloproteases (MMP) were analyzed as well as the activity of tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) and MMP2 and MMP9 in stimulated mECM cultures. Different approaches for VIC cultivation in decellularized, ovine aortic valve leaflets (dECM) were applied evaluating the influence of dECM surface manipulation by Femto second Laser (FsL), enzymatic digestion with trypsin or variation of nutrient supply and number of cells seeded on quality of interstitial dECM repopulation.

Results and discussion: TGF β -treated mECM cultures showed a significantly increased degree of matrix compaction and a higher rate of apoptosis compared to other conditions. In VEGF-treated mECM cultures, α SMA-expression was reduced in comparison to TGF β -treatment. There were neither significant effects on MMP-, CD73- or OPN-expression, nor proper matrix calcification of mECM cultures. A possible explanation for this could be the absence of additional mechanical stimuli or the mechanical properties of mECM cultures themselves, which have been shown to have synergistic effects on VIC transdifferentiation combined with TGF β . Furthermore, cultivation time could have an impact on calcification and transdifferentiation of mECM cultures. For dECM cultures, best reseeding results were seen in trypsin-treated dECM with a high number of seeded cells and improved nutrient supply. Photomanipulation of dECM has been shown for the first time to facilitate interstitial dECM repopulation with VIC, however matrix repopulation was limited to perifocal and superficial areas around the disruption sides. In untreated dECM, interstitial repopulation could not be observed. These findings suggest a barrier function of the basement membrane inhibiting VIC migration into the valvular matrix, which can be overcome by trypsinisation or photomanipulation with FsL.

Conclusion: VEGF as well as TGF β affect the expression pattern of VIC, but cytokine effects were revealed to be mitigated in the established mECM culture model compared to 2D VIC cultures. Interstitial repopulation of dECM is not compatible with an intact basement membrane. By additional manipulation of the matrix surface and modifications of the reseeding protocol, quality of interstitial dECM repopulation can be optimized.

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Aortenklappendegeneration wird zunehmend als komplexer Pathomechanismus verstanden, in welchen sowohl Matrixbestandteile als auch Signalmoleküle und Zellen der Herzklappe eingebunden sind. Darüberhinaus können die Zellen des Klappeninterstitiums Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) nehmen und sind so an valvulären Wachstums- und Regenerationsprozessen beteiligt. Da sowohl mechanische als auch biologische Klappenprothesen avital sind, weisen sie diese Eigenschaften nicht auf, wodurch die Haltbarkeit biologischer Klappenprothesen stark eingeschränkt wird und ein Wachstum der Klappenprothese unmöglich ist. Diesem Umstand ist es geschuldet, dass Re-Operationen an der Herzklappe unter erhöhtem Risiko durchgeführt werden müssen.

Ziele der Arbeit: Im Rahmen der vorliegenden Studie sollen dreidimensionale (3D), ECM-basierte Zellkulturmodelle zur Anzucht primärer, oviner valvulärer Interstitialen (VIC) etabliert werden. Ausgehend von diesen Modellen soll zum einen das phänotypische Verhalten der VIC unter Zytokinstimulation sowie verschiedene *target*-Proteine, welche im Rahmen der Aortenklappendegeneration eine Rolle spielen untersucht werden. Zudem könnten interstitiell rebesiedelte, *tissue engierte* Herzklappen die Grundlage für die Entwicklung verbesserter Herzklappenprothesen darstellen, weshalb es Möglichkeiten der interstitiellen Rebesiedlung dezellularisierter Klappensegel zu eruieren gilt.

Methodik: Es wurden zwei Arten von 3D-Kulturmodellen entwickelt. VIC wurden in matrigelbasierten Kulturen (mECM) unter Zytokinstimulation herangezüchtet, wobei der Einfluss von prokalzifizierenden Substanzen, *transforming growth factor* β (TGF β) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untersucht wurde. Hierzu wurden die makroskopische Kulturgröße, die histologische Morphologie sowie Indikatoren der Matrixkalzifizierung untersucht. Zudem wurde die Expression von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) als Apoptosemarker, α -smooth muscle actin (α SMA), Osteopontin (OPN), cluster of differentiation 73 (CD73) und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) analysiert. Die Aktivität der tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) und der MMP2 und 9 wurden ebenfalls beurteilt. Weiterhin wurden Ansätze zur Kultivierung von VIC in dezellularisierten, ovinen Aortenklappensegeln (dECM) erprobt. Dabei wurde der Einfluss einer Photomanipulation der dECM-Oberfläche mittels Femto second Laser (FsL), einer enzymatischen Behandlung der dECM mit Trypsin sowie der Variation von Zellzahl und Nährstoffangebot auf die Qualität der interstitiellen Rebesiedlung analysiert.

Ergebnisse und Diskussion: TGF β bewirkte in den mECM-Kulturen eine starke Matrixkompaktion im Verlauf der Kultivierung sowie eine Apoptoseinduktion, welche sich signifikant von den anderen Konditionen unterschied. Unter VEGF-Stimulation hingegen konnte eine deutliche Reduktion der α SMA-Expression gegenüber TGF β gezeigt werden. Signifikante Effekte auf die Expression von MMPs, CD73 oder OPN konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig konnte eine manifeste Kalzifizierung der Matrix gesehen werden. Möglicher Grund könnte das Fehlen zusätzlicher, mechanischer Reize, die Matrixbeschaffenheit und eine zu kurze Kultivierungsdauer sein. Im Falle der dECM-Modelle zeigten sich die qualitativ und quantitativ besten Rebesiedlungsergebnisse bei enzymbehandelten dECM, hoher ausgesäter Zellzahl und verbessertem Angebot an Nährstoffen. Photomanipulierte dECM wiesen teils perifokale, oberflächliche Matrixbesiedlungen um die Disruptionsstellen auf. Demgegenüber war bei unbehandelten dECM keine Matrixbesiedlung mit VIC zu beobachten. So ist eine Barrierefunktion der Basalmembran für die Migration von VIC naheliegend, welche durch enzymatische Behandlung oder Photomanipulation mittels FsL überwunden werden kann.

Schlussfolgerung: VEGF und TGF β nehmen Einfluss auf das Expressionsmuster von VIC, jedoch zeigen sich Zytokineffekte im etablierten 3D-Modell verglichen mit Ergebnissen aus 2D-Zellkulturen abgeschwächt. Eine intakte Basalmembran ist mit der interstitiellen Besiedlung von dECM nicht vereinbar. Durch additive Manipulation der dECM-Oberfläche sowie Modifikationen des Besiedlungsprotokolls lässt sich die Qualität der interstitiellen Rebesiedlung optimieren.

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -smooth muscle actin
(c)PARP	(cleaved) Poly-ADP-Ribose-Polymerase
2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
Aqua _{dest}	destilliertes Wasser
ASARM	aspartat and serin acid rich motive
aVIC	activated valvular interstitial cells
β -GP	β -Glycerolphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
BMP	bone morphogenic protein
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
Calcein AM	Calcein-Acethoxymethyl
CD73	cluster of differentiation 73
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCA	Desoxycholsäure
dECM	dezellularisierte Extrazellulärmatrix
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EECD	ECM evaluation culture device
EndoMT	Endothelial-mesenchymale Transdifferenzierung
ER	endoplasmatisches Retikulum
EthD	Ethidiumhomodimer
ECM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetal calf serum
(F)IH	(Fluoreszenz-) Immunhistochemie
FsL	Femto second Laser
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
ISZ	<i>in situ</i> Zymographie
LSM	laser scanning microscope
mECM	matrigelbasierte Extrazellulärmatrix
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
obVIC	osteoblastic valvular interstitial cells
OPN	Osteopontin

P	Passage
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PPi	anorganisches Pyrophosphat
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
qVIC	quiescent valvular interstitial cells
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SIBLING	small integrine-binding ligand N-linked glycoprotein
sog.	sogenannt
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TGF β	transforming growth factor β
TNAP	tissue non-specific alkaline phosphatase
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIC	valvular interstitial cell
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinischer Hintergrund der Aortenklappendegeneration	1
1.2	Pathomechanismus der Aortenklappendegeneration	2
1.2.1	Matrixbasierte Mechanismen	2
1.2.2	Zellbasierte Mechanismen	4
1.3	Der Einfluss von Zytokinen auf Zellen der Herzklappe	7
1.3.1	Transforming growth factor β	7
1.3.2	Vascular endothelial growth factor	8
1.4	Dreidimensionale Zellkulturmodelle und valvuläres tissue engineering	8
1.4.1	Matrigel-basierte Extrazellulärmatrix	9
1.4.2	Herzklappenprothetik und valvuläres tissue engineering	9
2	Ziele der Arbeit	11
3	Materialien	12
3.1	Verbrauchsmaterialien	12
3.2	Chemikalien	13
3.3	Laborgeräte	15
3.4	Kits	16
3.5	Zellkulturmedien und -zubehör	17
3.6	Antikörper	18
3.6.1	Primäre Antikörper	18
3.6.2	Sekundäre Antikörper	19
3.7	Primer	19
3.8	Puffer und Lösungen	20
4	Methoden	22
4.1	Zellkultur	22
4.1.1	Sterilbank	22
4.1.2	Zellgewinnung und Zellpassagierung	22
4.1.3	Einfrieren und Auftauen von VIC	22
4.1.4	Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer	23
4.1.5	VIC Kultivierung in mECM	23
4.1.6	VIC-Kultivierung in dECM	25
4.2	Proteinanalyse mittels Westernblot	30
4.2.1	Probenaufbereitung	30
4.2.2	Gelherstellung	30
4.2.3	Gelelektrophorese/SDS-PAGE	31
4.2.4	Western-Blotting und Antikörperbindung	31
4.2.5	Bandenvisualisierung und Auswertung	31
4.3	Histologie und Immunhistochemie	32
4.3.1	Kryoschnitte	32
4.3.2	Hämatoxylin/Eosin Färbung	32
4.3.3	Von Kossa Färbung	32
4.3.4	Movat's Pentachrom Färbung	33
4.3.5	Immunhistochemische Färbungen	33
4.4	In situ Zymographie	35
4.5	Picro-Sirius Red/ Fast Green-Färbung und relative Kollagenquantifizierung	35

4.6	<i>BCIP/NBT-Assay</i>	36
4.7	<i>Quantitative Genanalyse</i>	37
4.7.1	RNA-Isolation	37
4.7.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	37
4.7.3	Reverse Transkription	38
4.7.4	Quantitative reverse transcriptase PCR	38
4.8	<i>Kalzium-Assay</i>	40
4.9	<i>Live/Dead Assay</i>	40
4.10	<i>Software und statistische Auswertung</i>	41
5	<i>Ergebnisse</i>	42
5.1	<i>Untersuchungen zur VIC-Kultivierung in mECM</i>	42
5.1.1	Morphologische Charakterisierung der besiedelten mECM	42
5.1.2	Histologische Charakterisierung	43
5.2	<i>Viabilität und Apoptose der VIC in mECM</i>	45
5.2.1	Life/Dead Assay	45
5.2.2	Quantitative Analyse der Apoptoserate	46
5.3	<i>Matrixkalzifizierung</i>	47
5.3.1	Von Kossa Färbung	47
5.3.2	Kalzium-Assay	48
5.4	<i>Myofibroblastische Transdifferenzierung</i>	49
5.4.1	Immunhistologischer Nachweis von α -SMA	49
5.4.2	Quantitative Analyse von α -SMA auf Protein- und Genexpressionsebene	50
5.5	<i>Expression und Aktivität von MMP2 und MMP9</i>	51
5.5.1	In situ Zymographie	51
5.5.2	In situ Zymographie mit immunhistologischer Vimentin-Gegenfärbung	52
5.5.3	Quantitative Analyse von MMP2 auf Protein- und Genexpressionsebene	53
5.6	<i>Expression von OPN und CD73</i>	54
5.6.1	Quantitative Analyse der OPN-Expression auf Proteinebene	54
5.6.2	PCR-Analyse der OPN- und CD73-Expression	55
5.7	<i>BCIP/NBT-Assay</i>	56
5.8	<i>Matrixcharakterisierung der dECM</i>	57
5.8.1	Gegenüberstellung verschiedener Dezellularisierungsverfahren	57
5.8.2	Trypsinbehandlung der dECM	58
5.8.3	Perforation mittels Photodisruption	60
5.9	<i>Evaluierung der interstitiellen dECM-Rebesiedlung</i>	61
5.9.1	Qualitative Analyse der dECM-Rebesiedlung	61
5.9.2	Quantifizierung der interstitiellen Rebesiedlung von dECM	63
5.9.3	Untersuchung der Zellaktivität innerhalb der dECM	65
5.9.4	Die Aktivität der Matrix-Metalloproteasen MMP2 und MMP9	66
6	<i>Diskussion</i>	67
6.1	<i>Charakterisierung der mECM-Kulturen und Zellverhalten im drei-dimensionalen Kultivierungsmodell unter Zytokineinfluss</i>	67
6.1.1	Kulturmorphologie und Zellviabilität	67
6.1.2	Myofibroblastische Transdifferenzierung der VIC und Matrix-remodeling in mECM-Kulturen	68
6.1.3	Osteoblastische Transdifferenzierung und Matrixkalzifizierung	71
6.2	<i>Die interstitielle Rebesiedlung von dECM</i>	74
7	<i>Schlussfolgerungen</i>	79
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	80

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund der Aortenklappendegeneration

Die Aortenklappendegeneration ist in der westlichen Welt eine der häufigsten pathologischen Veränderungen des Alters. Rund 30% der westlichen Weltbevölkerung über dem 65. Lebensjahr leiden an einer Aortenklappensklerose. Dabei handelt es sich um eine auf fibrosierende Prozesse zurückgehende Verdickung der Aortenklappe, welche mit einer chronischen Inflammation einhergeht. Eine Funktionseinschränkung der Klappe ist jedoch nicht automatisch impliziert. Bei voranschreitendem Krankheitsprozess kann sich die Aortenklappendegeneration im Spätstadium durch verstärkte Biomineralisation der Klappenmatrix zu einer klinisch manifesten Aortenklappenstenose entwickeln. Diese maximale Ausprägung der Aortenklappensklerose ist mit einer erhöhten Druckbelastung des linken Ventrikels und einem progredienten Funktionsverlust der Aortenklappe vergesellschaftet und kann zu einer verminderten Ejektionsfraktion führen sowie schließlich in einer Herzinsuffizienz kumulieren¹⁻³. Etwa 3% aller über 75-Jährigen sind von einer Aortenklappenstenose betroffen⁴. Hieraus ergibt sich eine hohe sozioökonomische Relevanz für das Verständnis und die Therapie dieser Erkrankung. Aktuell besteht die einzige kurative Therapieoption im operativen oder interventionellen Klappenersatz. Pharmakotherapeutische Ansätze waren demgegenüber bislang nicht zielführend und können die invasive Therapie bestenfalls hinauszögern⁵. Bei Patienten ohne Klappenersatztherapie liegt die 1-Jahresmortalität nach erstmaliger klinischer Symptomatik bei 37% und bereits bei einer hämodynamisch nicht relevanten Aortenklappensklerose steigt das Mortalitätsrisiko um 50% an^{6,7}. Dabei unterliegen biologische Herzklappenprothesen ebenso dem Prozess der Klappendegeneration wie native Herzklappen. Der Pathomechanismus einer Aortenklappendegeneration ist bis heute nur ansatzweise verstanden. Die involvierten Risikofaktoren ähneln jenen der Arteriosklerose, wenngleich der Entstehungsmechanismus aus heutiger Sicht nicht identisch ist. Während man bis vor einigen Jahren davon ausging, dass es sich bei der Entstehung der Aortenklappendegeneration um ein rein passives Geschehen durch langjährige mechanische Klappenbelastung handelt, weiß man heute, dass valvuläre Interstitialzellen (VIC) wesentlich in diesen Prozess mit eingebunden und somit aktiv an der Entstehung einer Aortenklappendegeneration beteiligt sind. Ebenso scheinen verschiedene Moleküle der Extrazellulärmatrix (ECM), insbesondere Glykoproteine und Wachstumsfaktoren eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Aortenklappensklerose zu spielen⁸⁻¹³. Diese Erkenntnisse könnten entweder pharmakotherapeutisch über eine Beeinflussung des zellvermittelten Pathomechanismus genutzt werden oder aber die Herzklappenprothetik um Einsichten aus der valvulären Zellbiologie ergänzen und zeigen somit Möglichkeiten neuer Therapieoptionen für Patienten mit einer degenerativen Veränderung der Aortenklappe auf.

1.2 Pathomechanismus der Aortenklappendegeneration

1.2.1 Matrixbasierte Mechanismen

Die Aortenklappe weist histomorphologisch eine trilamelläre Struktur auf und wird an ihrer Oberfläche von einer Endothelschicht bedeckt. Kammerwärts liegt die *lamina ventricularis*, welche vor allem aus Kollagen I und radiär angeordnetem Elastin besteht. Darüber liegen die *lamina spongiosa*, welche vor allem locker gepacktes Kollagen und Glykosaminoglykane enthält, sowie die aus kompaktem Kollagen bestehende *lamina fibrosa* ¹⁴. In degenerativ veränderten Aortenklappen kommt es zu einer abnormen Verteilung der ECM-Bestandteile. Dabei sind sowohl die Lokalisation als auch die Degradations- und die Syntheserate der ECM-Komponenten in der Herzklappe verändert. An diesen extrazellulären Umbauprozessen sind im Wesentlichen Matrix-Metalloproteasen (MMPs) beteiligt, welche in sklerosierten Aortenklappen vermehrt exprimiert werden ¹⁵. Zusätzlich zum Strukturverlust der Klappe hat dies auch biologische Auswirkungen, da VIC sowohl über die mechanischen Eigenschaften ihrer Umgebung, als auch rezeptorvermittelt von ECM-Bestandteilen beeinflusst werden.

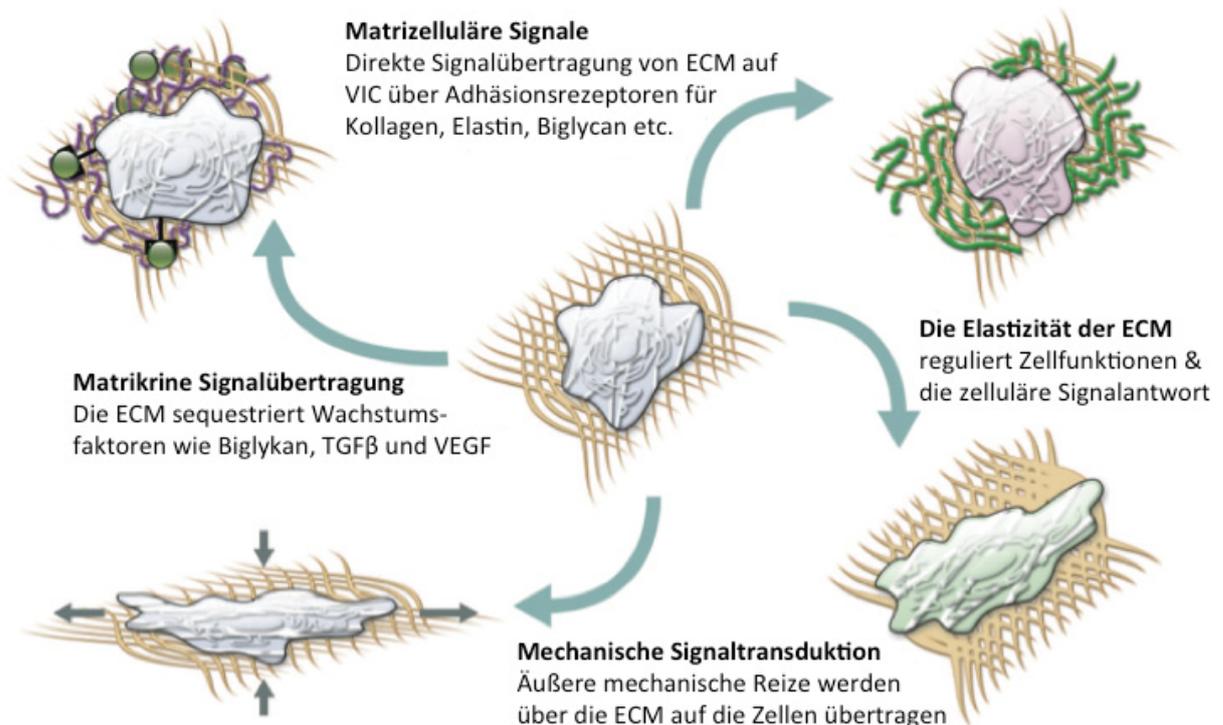


Abb. 1: Die Beeinflussung von VIC durch Komponenten der ECM. Die ECM überträgt mechanische Reize der Umgebung auf die VIC. Durch die Sequestration von Signalmolekülen beeinflusst sie deren Konzentration im Milieu und in der Konsequenz auch das Zellverhalten. Weiterhin besitzen VIC Rezeptoren für verschiedene Matrixkomponenten, deren Aktivierung eine direkte intrazelluläre Signalweiterleitung bewirken kann. Die Elastizität bzw. Steifigkeit der ECM kann ebenfalls zelluläre Vorgänge und Regulationsmechanismen beeinflussen (modifiziert nach *Chen et al., Circ Res. 2011* ¹⁶).

Somit kann eine veränderte ECM auch eine Alteration der Genexpression von VIC zur Folge haben. Darüberhinaus nimmt die ECM über die Sequestration von Signalmolekülen Einfluss auf VIC (Abb. 1) ¹⁶.

Ein für die Pathogenese der Aortenklappendegeneration besonders interessantes Molekül der ECM, welches der extrazellulären Sequestration unterliegt, ist Osteopontin (OPN). OPN ist ein elektronegatives, ca. 300 Aminosäuren großes Molekül, welches physiologischerweise in Knochengewebe vorkommt und von Osteoblasten produziert wird ¹⁷. Außerdem wird es in ektopt kalzifiziertem Gewebe wie in degenerativ veränderten Herzklappen vermehrt vorgefunden ¹⁸. Bereits bei einer leichten Klappenkalzifizierung lassen sich peripher erhöhte OPN-Konzentrationen messen, was die Einflussnahme von OPN auf den Entstehungsprozess vermuten und OPN eine potentielle Markerrolle zukommen lässt. Topographisch ist OPN in verkalkten Herzklappen mit Kalziumablagerungen in der Matrix kolokalisiert ¹⁹. OPN gehört zur Glykophosphoproteinfamilie der *small integrine-binding ligand N-linked glycoproteins* (SIBLINGs) ²⁰. Ihnen allen ist die sogenannte ASARM-Region gemeinsam (*acidic serine- and aspartate-rich motif*), eine serin- und aspartatreiche Region, welche mehrfach phosphoryliert werden kann. Alle SIBLINGs können im phosphorylierten Zustand über die ASARM-Region Hydroxyapatit-Kristalle binden und somit den ektopten Kalzifizierungsprozessen entgegenwirken ²¹. Diese Eigenschaft verliert OPN jedoch im nicht- oder wenig phosphorylierten Zustand ²². Das humane OPN besitzt 36 sogenannte *phosphorylation sites*. Im Knochengewebe werden hierüber Osteoklasten im Hydroxyapatit der knöchernen ECM verankert, sodass das OPN als eine Art Brücke zwischen beiden Komponenten fungiert („osteo-pontin“) ²³. Weiterhin von funktioneller Bedeutung sind die multiplen RGD-Sequenzen des OPN-Moleküls, bestehend aus einer Aminosäureabfolge von Arginin, Glycin und Aspartat. Über diese Sequenz können Integrine und andere zelluläre Oberflächenmoleküle gebunden und intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst werden ²⁴. Besonders gut differenziert ist hier die Signaltransduktion von OPN über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Kostimulation mit CD44, welche durch die Aktivierung des NF κ B-Signalweges Zelladhäsion, Zellüberleben, Migration sowie Immunreaktionen beeinflusst ²⁵⁻²⁸. Zudem kann OPN hierüber den intrazellulären *Akt*-Signalweg kontrollieren und auf diese Weise einer Matrixkalzifizierung entgegenwirken ²⁹. Abgesehen von seiner Bedeutung für die Biomineralisation ist OPN auch in inflammatorische Prozesse involviert ^{17,20}. Seine genaue Rolle im Entstehungsprozess der Klappendegeneration ist jedoch nicht abschließend geklärt. Neben dem OPN werden eine Reihe weiterer Moleküle vermehrt in ektopt kalzifizierenden Geweben exprimiert. So weist auch die membranständige, gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (engl. *tissue non-specific alkaline phosphatase*, TNAP) im Rahmen des Degenerationsprozesses der Aortenklappe eine temporäre Hochregulierung auf ³⁰.

1.2.2 Zellbasierte Mechanismen

VIC sind der prädominante Zelltyp in der valvulären Matrix und wesentlich für die Matrixstruktur und Funktionalität verantwortlich³¹. Sie kommen in allen drei Schichten der Herzklappe vor, weisen in der *lamina spongiosa* allerdings eine niedrigere Zelldichte auf. VIC nehmen über Sekretion und Abbau von Matrixbestandteilen Einfluss auf die Struktur der Herzklappe und sind maßgeblich an Umbauprozessen der ECM (*remodeling*) beteiligt. Umgekehrt können jedoch auch einige Bestandteile der ECM Effekte auf die VIC zeigen. Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass VIC abhängig von den Wachstumsstimuli und Umgebungsfaktoren, die auf sie einwirken, unterschiedliche phänotypische Merkmale ausbilden können, anhand derer sich verschiedene Funktionszustände der Zelle kategorisieren lassen. Dabei ist der Phänotyp einer Zelle versatil, sodass die Zelle optimal auf die Konditionen ihres Milieus reagieren kann. Embryogenetisch entstehen VIC aktuellen Studien zufolge aus Endothelzellen, welche angeregt durch verschiedene Wachstumsfaktoren eine endothelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EndoMT) vollziehen und daraufhin die Bildung der Herzklappe initiieren. Man unterscheidet weiterhin ruhende (*quiescent, qVIC*), aktivierte (*aVIC*) und osteoblastische VIC (*obVIC*, Abb. 2)^{16,32,33}.

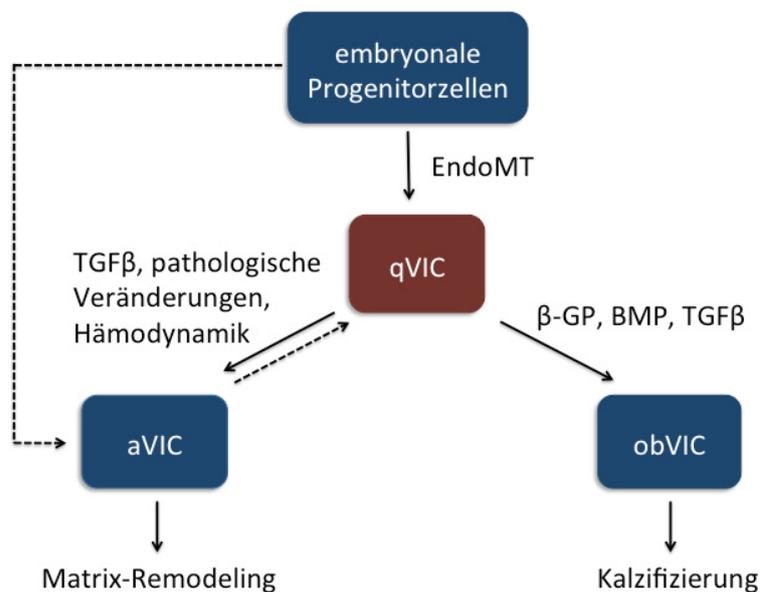


Abb. 2: Phänotypische Funktionszustände der VIC. qVIC entwickeln sich durch endothelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EndoMT) aus embryonalen Progenitorzellen, welche sich von Klappenendothelzellen ableiten. Die Möglichkeit der direkten Entwicklung von aVIC aus Progenitorzellen wird ebenfalls angenommen. Pathologische Veränderungen des Gewebes, hämodynamische Einflüsse sowie Wachstumsfaktoren, insbesondere *transforming growth factor β* (TGFβ) führen zu einer Aktivierung von qVIC zu aVIC. Diese sind essentiell am Matrix-remodeling der Herzklappe beteiligt. β-Glycerolphosphat (β-GP), TGFβ und *bone morphogenic protein* (BMP) fördern eine Transdifferenzierung von qVIC zu obVIC, welche in Kalzifizierungsprozesse der Herzklappe involviert sind. In der Regel wandeln sich obVIC und aVIC nicht in qVIC zurück sondern unterlaufen anschließend der Apoptose (adaptiert nach Liu et al., Am J Pathol. 2007³³).

In der gesunden, adulten Aortenklappe liegen VIC überwiegend als qVIC vor, welche sowohl über *adhesion junctions* als auch über *gap junctions* miteinander in Verbindung stehen. Über letztere ist es ihnen möglich, untereinander zu kommunizieren³⁴. Zu ihren Funktionen gehört der Erhalt der Klappenstruktur sowie das Verhindern von Angiogeneese und konsekutiver Gefäßeinsprossung in die Herzklappenmatrix³³. Kommt es zu pathologischen Prozessen an der Herzklappe oder erhöhter mechanischer Beanspruchung, so verändern die VIC ihr Expressionsmuster und werden zu aVIC. In der aktivierten Form sind VIC in die Wundheilungs- und Regenerationsprozesse eingebunden, welche sich einer Herzklappenschädigung anschließen. Die Zellen unterlaufen dabei einer myofibroblastischen Transdifferenzierung und zeigen eine vermehrte Expression kontraktile Filamente wie α -SMA oder Schwerkettenmyosin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass aVIC im Vergleich zur ruhenden Form einen höheren Zellumsatz aufweisen; sowohl die Zellproliferation als auch die Zellapoptoserate ist gesteigert^{31,35,36}. Für das *remodeling* der ECM sind aVIC essentiell. Sie sind entscheidend beteiligt an einer gesteigerten Matrixdegradation und -neusynthese. Maßgeblich ist hierbei eine erhöhte Expression der beiden Gelatinasen Matrixmetalloproteinase (MMP) 2 und 9, welche von aVIC gebildet und in die ECM sezerniert werden, sowie ein gesteigertes Migrationsverhalten der Zellen^{15,31}. Weiterhin sezernieren aVIC unterschiedliche Zytokine wie den *transforming growth factor* β (TGF β), welche autokrin wirksam sind, den aktivierten Phänotypen der VIC weiter begünstigen und somit die Reparationsmechanismen in pathologisch veränderten Klappen unterhalten^{37,38}. In der Regel wandeln sich aVIC nicht zurück in qVIC sondern unterlaufen der Apoptose. Es wird angenommen, dass eine Dysregulation bzw. Dysfunktion von aVIC über eine zunehmende Klappenfibrosierung zu einer Aortenklappensklerose führen kann und somit in letzter Konsequenz an der Initiierung einer Aortenklappendegeneration beteiligt ist^{33,39,40}. Bei Exposition gegenüber β -Glycerolphosphat (β -GP), TGF β oder Vertretern der *bone morphogenic protein* (BMP) Subgruppe, welche z.T. ebenfalls der TGF β -Proteinfamilie zugerechnet werden, unterlaufen die qVIC einer osteogenen Transformation und differenzieren sich zu obVIC^{19,33,41}. In 2D-Kulturen zeichnet sich dieser Phänotyp durch die Bildung kalzifizierender Zellnoduli aus⁴². Dabei scheint der extrazelluläre Nukleotidkatabolismus eine entscheidende Rolle für die Bildung der Zellaggregate zu spielen. So stimuliert ATP insbesondere über den PY2-Rezeptor sowohl prodegenerative als auch proinflammatorische Prozesse im kardiovaskulären System⁴³. ATP-Spaltprodukte hingegen, allen voran das inorganische Pyrophosphat (PP_i) weisen dem ATP entgegengesetzte Effekte auf und wirken sowohl antiinflammatorisch als auch antikalzifizierend an der Aortenklappe⁴⁴. PP_i inhibiert Mineralisationsvorgänge, indem es zum einen direkt die Bildung extrazellulärer Kristalle verhindert, zum anderen aber auch die OPN-Expression steigert und die Aktivität der TNAP reduziert^{45,46}. Somit stehen ATP und seine Metabolite in einer für den Funktionserhalt der Aortenklappe essentiellen Homöostase. Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren VIC die Enzyme TNAP sowie *cluster of differentiation* 73 (CD73). Beide Enzyme sind

membranständige Phosphatasen, welche am Nukleotid-Stoffwechsel beteiligt sind und somit entscheidend in das zuvor beschriebene Phosphat-Gleichgewicht eingreifen können. Die TNAP kommt in verschiedenen Geweben vor und katalysiert unspezifisch diverse hydrolytische Phosphatabspaltungsreaktionen – so auch den Abbau von protektiv wirkendem PP_i – und begünstigt auf diesem Wege eine ektope Gewebekalkifizierung⁴⁷. Neben den extrazellulären Nukleotiden wird auch das OPN als Substrat der TNAP diskutiert. So liegt es nahe, dass die TNAP über eine Dephosphorylierung des OPN dessen antikalzifizierende Wirkung aufhebt und auf diese Weise zusätzlich zu einem degenerativen Phänotyp der Aortenklappe beitragen kann (Abb. 3)^{23,43,44}. Mathieu *et al.* konnten zeigen, dass eine Suppression der TNAP das Entstehen kalkifizierender VIC-Zellaggregate *in vitro* verhindert.

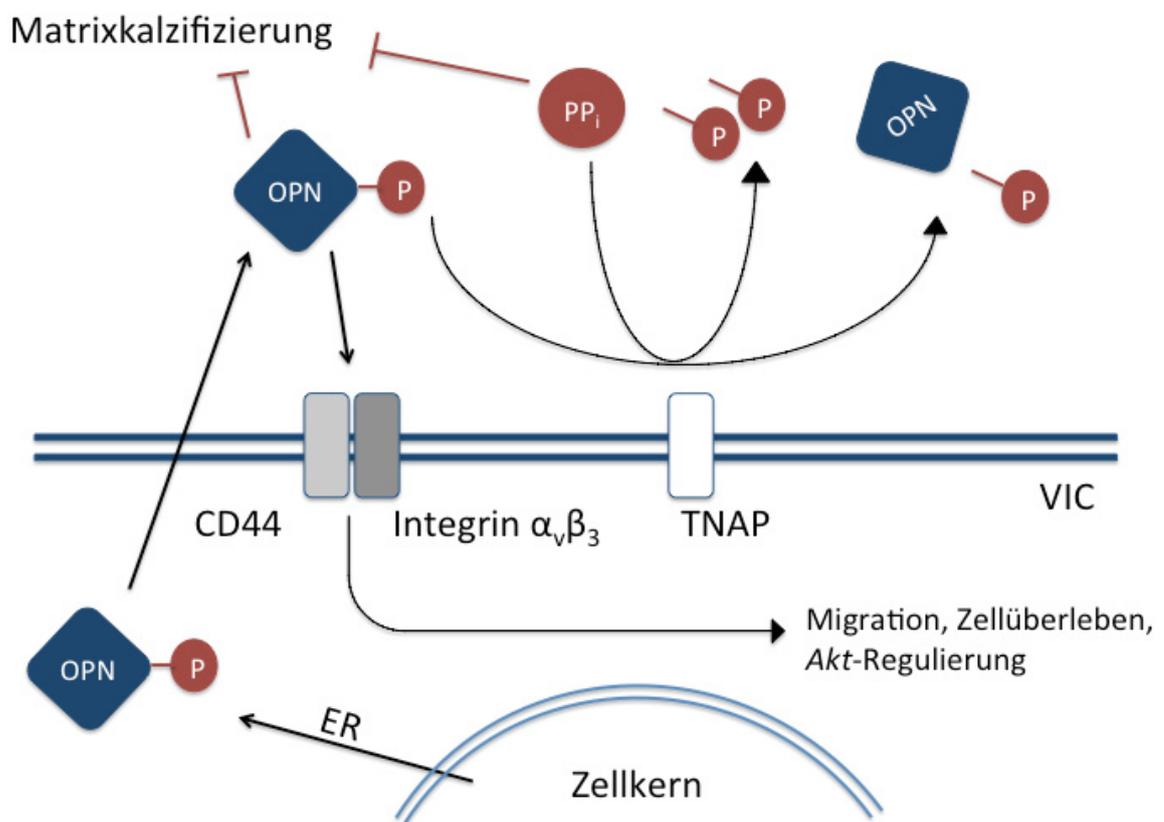


Abb. 3: Interaktionen von OPN und TNAP an der VIC. VIC sind in der Lage, OPN zu exprimieren und dieses im Rahmen von posttranslationalen Modifikationen zu phosphorylieren. Phosphoryliertes OPN kann neben seiner direkten inhibitorischen Wirkung auf Kalkifizierungsprozesse der ECM auch über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen. So reguliert es durch eine Phosphorylierung der *Akt*-Gene die Expression der Proteinkinase B in VIC und antagonisiert auf diese Weise zelluläre, prokalkifizierende Prozesse. Desweiteren nimmt phosphoryliertes OPN über die Interaktion mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ Einfluss auf die Zellmigration und das Zellüberleben. Kostimulatorische Signale durch CD44 sind für die Signaltransduktion über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ essentiell. Die TNAP dephosphoryliert OPN und spaltet anorganisches Pyrophosphat, wodurch beide Substrate ihre direkten antikalzifizierenden Eigenschaften verlieren. Die zellvermittelten Effekte von OPN demgegenüber sind unabhängig vom Phosphorylierungsstatus, da sie über die RGD-Sequenz des Moleküls vermittelt werden^{23,24,29,44,48,49}.

ObVIC weisen eine erhöhte Expression der TNAP auf, was einen Zusammenhang zwischen osteogener Transdifferenzierung von VIC, TNAP-Expression und der Entstehung einer valvulären Matrixkalzifizierung vermuten lässt⁵⁰.

CD73 hingegen ist eine ekto-5'-Nukleotidase welche hochspezifisch die Reaktion von AMP zu Adenosin katalysiert. Die Wirkung von Adenosin ist abhängig von seinem Rezeptortyp. Während der A1R einen antikalzifizierenden Effekt zu haben scheint, verstärkt eine Aktivierung des an der Herzklappe vorwiegend exprimierten A2aR die Mineralisation der Klappenmatrix. Somit wird von einem insgesamt prodegenerativen Effekt des Adenosin und indirekt auch von CD73 auf die Herzklappe ausgegangen. Dafür spricht, dass degenerativ veränderte Aortenklappen eine erhöhte enzymatische Aktivität von CD73 aufweisen, wodurch vermehrt Adenosin entsteht^{51,52}.

1.3 Der Einfluss von Zytokinen auf Zellen der Herzklappe

1.3.1 Transforming growth factor β

TGF β ist ein Wachstumsfaktor, dessen biologisch aktive Form beim Menschen als 25 kDa großes Homodimer vorliegt und durch die Bindung an eine der beiden TGF β -Rezeptor-Subtypen die SMAD-Signalkaskade aktiviert. Diese wiederum kann über die Induktion von Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Proteine beeinflussen und ist so an der Regulierung von Zellumsatz und Matrixumbauprozessen beteiligt^{53,54}. TGF β wirkt auto- und parakrin sowohl auf das Klappenendothel als auch auf die Zellen des valvulären Interstitiums³⁶. Eine Stimulation der TGF β -Rezeptoren des Klappenendothels führt zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und zur Gefäßeinsprossung. In 2D-Kultur konnte gezeigt werden, dass TGF β in VIC zu einer erhöhten Proliferations- und Apoptoserate führt. Außerdem bewirkt TGF β eine myofibroblastische Differenzierung der VIC, was sowohl eine vermehrte α -SMA-Expression als auch eine Hochregulierung der MMPs impliziert^{37,55,56}. Hieraus lässt sich schließen, dass TGF β ein potenter Aktivator der qVIC ist. Zudem kann TGF β wie auch BMP über SMAD den Transkriptionsfaktor Runx2 induzieren und somit zu einer osteogenen Transdifferenzierung beitragen⁵³. Durch die Inkubation mit TGF β -haltigem Medium konnten VIC *in vitro* zur Bildung kalzifizierender Noduli stimuliert werden. Diese wiederum werden als Pendant zu frühen zellulären Prozessen der Aortenklappenkalzifizierung betrachtet^{30,57}. In degenerativ veränderten Aortenklappen konnte eine stark erhöhte Konzentration von TGF β gezeigt werden⁴⁰. Auch *in vitro* wird die Expression von TGF β durch die mechanische Schädigung von VIC hochreguliert³⁶. Dies alles weist darauf hin, dass TGF β eine wichtige Rolle in der Entwicklung von degenerativen Aortenklappenerkrankungen einnimmt.

1.3.2 *Vascular endothelial growth factor*

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ist ein dimeres Glykoprotein, welches der *platelet derived growth factor*- (PDGF)/ VEGF-Familie angehört. Diese Gruppe von Signalmolekülen, die funktionell als Wachstumsfaktoren agieren, ist sehr stark sowohl in die embryonale als auch in die postnatale Angiogenese involviert und zählt als potentester Aktivator der Neovaskularisation⁵⁸. Darunter ist VEGF der am längsten bekannte und am weitesten verbreitete Vertreter dieser Gruppe. Seine Expression wird unter hypoxischen Bedingungen durch den *hypoxia inducible factor HIF-1 α* gesteigert und ist somit abhängig vom Sauerstoffgehalt⁵⁹. VEGF aktiviert über die Rezeptoren VEGFR 1/2 die Inositoltriphosphat-3-Kinase sowie die Phospholipase C und führt hierüber zu einer veränderten zellulären Genexpression. VEGF wirkt in physiologischen Mengen protektiv im kardiovaskulären System und ist essentiell für die vaskuläre Homöostase, indem er das Überleben von Endothelzellen fördert, die Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäßwand inhibiert und ferner über die Stimulation der NO- und Prostazyklinsynthese zur Vasodilatation führt^{58,60}. *In vitro* Versuche mit primären VIC haben gezeigt, dass VEGF die Bildung von kalzifizierenden Zellaggregaten, wie sie unter TGF β -Stimulation entstehen inhibiert. Zusätzlich reduziert VEGF die Apoptoserate in VIC-Kulturen, sodass ein insgesamt protektiver Einfluss durch VEGF auch auf VIC angenommen wird⁵⁷. In Fibroblasten der Adventitia führt VEGF über den VEGFR-1 zu einer Zunahme der Osteopontinexpression und könnte über diesen Mechanismus antikalzifizierend wirken⁶¹. Insgesamt betrachtet geht man davon aus, dass in den gängigen *in vitro* Modellen VEGF eine dem TGF β entgegengesetzte Wirkung auf VIC ausübt⁵⁷.

1.4 *Dreidimensionale Zellkulturmodelle und valvuläres tissue engineering*

Die meisten *in vitro*-Untersuchungen an VIC werden in zweidimensionaler (2D) Zellkultur durchgeführt. Unter physiologischen Bedingungen werden VIC jedoch von einer Vielzahl an Faktoren beeinflusst, welche in der 2D-Zellkultur nicht berücksichtigt werden können. So spielen Komponenten der ECM eine wesentliche Rolle in der zellulären Signaltransduktion von VIC. Durch Rezeptoraktivierung, Sequestration von Signalmolekülen, elastische Eigenschaften oder die Übertragung äußerer mechanischer Einflüsse kann die ECM auf VIC einwirken (Fig. 2)¹⁶. *In vivo* wirken während der Herzaktionen alternierende Drücke permanent auf die Aortenklappentaschen und ihre Zellen ein, woraus eine starke mechanische Beanspruchung der VIC resultiert. Diese Aspekte bleiben in 2D-Kulturmodellen jedoch völlig unbeachtet⁶². Weiterhin erhält die einzelne VIC in 2D-Kultur eine unphysiologische Polarität, da hier lediglich das Wachstum in einer Ebene möglich ist. *In vivo* hingegen können die VIC in mehreren Ebenen wachsen und migrieren. Es bestehen verschiedene Ansätze der Zellkultivierung in einer dreidimensionalen (3D) Matrix, um einigen dieser Ansprüche gerecht zu werden.

1.4.1 Matrigel-basierte Extrazellulärmatrix

Matrigel ist ein aus murinen Engelberth-Holm-Swarm-Sarkomen gewonnenes Basalmembranextrakt. Es besteht im Wesentlichen aus verschiedenen Proteinen der ECM wie Laminin, Kollagen IV, Entactin oder dem Proteoglykan Heparansulfat ⁶³. Weiterhin enthält es auch unterschiedliche Wachstumsfaktoren wie den *basic fibroblast growth factor*, den *epidermal growth factor* oder den *insulin-like growth factor*. Besonders in der Stamm- und Tumorzellforschung wird Matrigel verwendet, da es der physiologischen ECM ähnelt und gleichzeitig durch seine biophysikalischen Eigenschaften die Untersuchung von Zell-Matrix-Interaktionen ermöglicht ⁶⁴. Obwohl die ECM – wie zuvor dargelegt – einen entscheidenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Zellproliferation haben kann und damit als eine gesonderte Variable im Prozess der Aortenklappendegeneration zu betrachten ist, existieren nur wenige Untersuchungen des Zellverhaltens von VIC in einem der physiologischen ECM ähnlichen, matrigelbasierten 3D-Gerüst (mECM).

1.4.2 Herzklappenprothetik und valvuläres tissue engineering

Bei behandlungsbedürftigen, degenerativ veränderten Aortenklappen ist der Aortenklappenersatz die einzige therapeutische Option mit kurativem Ansatz ⁶⁵. Der erste operative Aortenklappenersatz mit einer künstlichen Herzklappe wurde 1960 von Dwight Emary Harken durchgeführt ⁶⁶. Heutzutage stehen verschiedene Möglichkeiten des Aortenklappenersatzes zur Verfügung. Zum einen werden mechanische Herzklappenimplantate verwendet. Sie zeichnen sich durch eine lange Haltbarkeit aus, haben jedoch ein hohes thrombogenes Risiko und erfordern somit eine lebenslange Antikoagulation, wodurch wiederum das Blutungsrisiko der Patienten steigt ⁶⁷. Alternativ werden biologische Herzklappenprothesen zum Aortenklappenersatz verwendet. Hier werden Allo- von Xenografts unterschieden, welche aus menschlichen bzw. tierischen Herzklappen oder aus tierischem Perikard hergestellt werden. Die biologischen Prothesen erfordern keine lebenslange Antikoagulation. Durch physikalische und chemische Verfahren wie der Behandlung mit Glutaraldehyd wird das Risiko immunologischer Reaktionen gegen das Implantat reduziert. Dies allerdings impliziert eine Avitalisierung des Klappengewebes, sodass Zellproliferation und Matrixregeneration nichtmehr möglich sind ⁶⁸. Da ihre Haltbarkeit durch degenerative und kalzifizierende Prozesse limitiert ist und keine Möglichkeit der zellulär gesteuerten Matrixregeneration besteht, würden biologische Klappenprothesen bei jungen Patienten erneute Interventionen an der Aortenklappe erfordern und sind somit bei diesem Patientenkollektiv nicht indiziert ⁶⁹. Trotz Behandlung mit Glutaraldehyd scheinen zudem auch immunologische Prozesse eine Rolle bei der Degeneration biologischer Herzklappenprothesen zu spielen ⁷⁰. Insbesondere junge Patienten würden daher von Herzklappenprothesen

profitieren, welche erstens eine hohe Biokompatibilität mit dem Empfängerorganismus aufweisen und somit keine immunologischen Reaktionen hervorrufen, zweitens das Potenzial zur Zellproliferation, aktiven Matrixdegradation und -erneuerung besitzen und zudem drittens keine antikoagulatorische Behandlung erfordern. Ansätze zur Entwicklung neuer Herzklappenprothesen, welche diese Eigenschaften erfüllen bietet das *tissue engineering*. Hierbei wird synthetisches oder biologisches Gewebe verwendet, um einen funktionellen Klappenersatz zu ermöglichen. Im Falle der Herzklappenprothetik ist das Dezellarisieren xenogener Herzklappen ein vielversprechendes Konzept ⁷¹. Mit dieser Technik werden durch enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse Zellen des ursprünglichen Gewebes zerstört und ausgewaschen, sodass ein azelluläres Matrixgerüst entsteht, welches in seinem Aufbau der physiologischen Matrix sehr ähnlich ist ⁷². Anschließend gewährleistet eine Rebesiedlung der dezellulierten ECM (dECM) mit vitalen, herzklappenspezifischen Zellen die Funktionalität der Klappenprothese. Dabei werden verschiedene Ansätze zur Rebesiedlung verfolgt. Zum einen konnte nach *in vivo* Implantation dezellularisierter, re-endothelialisierter Herzklappen eine Rebesiedlung des Klappeninterstitiums durch gerichtete Migration von VIC des Empfängerorganismus aus der Peripherie nachgewiesen werden – ein Prozess, der auch als *guided tissue regeneration* bezeichnet wird. Alternativ können dezellulierte Herzklappen, z.B. unter Zuhilfenahme von Bioreaktoren *in vitro* rebesiedelt werden ^{73,74}. Für eine endotheliale Besiedlung von dECM ist die Entwicklung schon weit fortgeschritten, sodass bereits die ersten klinischen Anwendungen von endothelial rebesiedelten Herzklappenprothesen durchgeführt werden konnten ⁷⁵. Weniger etabliert ist hingegen die *in vitro*-Besiedlung des Klappeninterstitiums. Neuerdings stehen spezielle Besiedlungsvorrichtungen für dECM-Modelle zur Verfügung, welche die Evaluation von *in vitro* durchgeführten Rebesiedlungsversuchen unter streng definierten, experimentellen Bedingungen ermöglichen. Bisherige Arbeiten, die dieses Modell verwenden beschäftigen sich jedoch ausschließlich mit der endothelialen Rebesiedlung ⁷⁶.

2 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll das Zellverhalten von VIC unter Kultivierung in einer 3D Matrix analysiert werden. Dabei sollen zwei verschiedene 3D Kulturmodelle entwickelt und erprobt werden: zum einen soll, ausgehend von früher publizierten Arbeiten zu 3D-Zellkulturen mit Herzmuskelzellen, ein 3D-Kulturmodell unter Verwendung von Matrigel für primäre, ovine VIC etabliert werden (mECM) ⁷⁷. In einem zweiten Modell soll die native ECM der Herzklappentasche als extrazelluläres Gerüst dienen, welches mit ovinen VIC besiedelt wird (dECM). Im Falle der dECM soll zunächst ein Verfahren etabliert werden, welches eine *in vitro* Besiedlung der Matrix ohne Bioreaktor und unter Zuhilfenahme der zuvor beschriebenen Besiedlungsrichtungen ermöglicht. Eigene Vorarbeiten haben gezeigt, dass konventionelles Aussäen von VIC auf der dECM zu keiner Matrixbesiedlung führt. Dementsprechend müssen Methoden zur Modifizierung der dECM und des Besiedlungsprotokolls entwickelt werden, um eine Matrixbesiedlung durch VIC zu ermöglichen. Die Basalmembran auf der valvulären Oberfläche sowie das nutritive Angebot in der Klappenmatrix sind hierbei mögliche Faktoren, welche die Migration von VIC in die Matrix der dECM beeinflussen könnten. Eine enzymatische Behandlung der Basalmembran mit Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA), die Photodisruption der Basalmembran mit Hilfe eines Femto second Lasers (FsL) sowie die Variation des Angebots nutritiver Faktoren innerhalb der Matrix und der ausgesäten Zellzahl sollen hinsichtlich einer verbesserten dECM-Besiedlung erprobt werden. Die Besiedlungsqualität soll durch Hämatoxylin/Eosin-Färbungen (H&E-Färbungen) evaluiert und die Eindringtiefe der VIC in die Matrix bewertet werden. Weiterhin soll die Aktivität von MMPs mit Hilfe der *in situ* Zymographie sowie die myofibroblastische Transdifferenzierung der VIC nach Matrixbesiedlung anhand immunhistologischer Färbungen untersucht werden.

Im Falle des matrigelbasierten 3D-Zellkulturmodells soll die ECM mit VIC besiedelt werden. Die Kulturen sollen anschließend makroskopisch, histomorphologisch sowie molekularbiologisch analysiert und die VIC hinsichtlich ihrer Entwicklung innerhalb der mECM beurteilt werden. Über die reine Beobachtung der Zelldistribution und das Zellüberleben von VIC in dem hier etablierten 3D-Kulturmodell hinaus soll der Einfluss von kalzifizierungsfördernden Botenstoffen wie β -Glycerolphosphat (β -GP) und Calciumchlorid (CaCl_2) sowie der Zytokine TGF β und VEGF auf die VIC beurteilt werden. Die Untersuchung von Markern der myofibroblastischen bzw. osteoblastischen Transdifferenzierung der VIC soll hierbei Aufschluss über das Differenzierungs- und Kalzifizierungsverhalten von VIC geben.

3 Materialien

Zur Versuchsdurchführung wurden die im Folgenden aufgelisteten Materialien und Laborgeräte benutzt:

3.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Artikelnr.
Amersham Membran	GE Healthcare, Chalfont St. Giles	10600023
Cryovials	VWR Chemicals, Radnor	479-1262
Einbetttschalen	Medite, Burgdorf	48-6302-00
Einschweiß-Folie	Carl Roth, Karlsruhe	E706.1
Falcon 15 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster	188271
Falcon 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.559.001
Falcon 50 ml, konvex	Greiner Bio One, Kremsmünster	227261
Gelkämme 1,5 mm	Life Technologies, Kalifornien	NC3510
Gelkassette 1,5 mm	Life Technologies, Kalifornien	NC2015
12-Well Inserts	Greiner Bio One, Kremsmünster	665641
24-Well Inserts	Becton Dickinson, Franklin Lakes	353095
KP-CryoCompound	VWR Chemicals, Radnor	1620C
Zellkulturflasche T25	Greiner Bio One, Kremsmünster	690175
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio One, Kremsmünster	658175
Zellkulturflasche T225	Corning, New York	353138
Nitrocellulose Membran	BIO RAD, Kalifornien	162-0115
Stripetten 5 ml	Corning, New York	4487
Stripetten 10 ml	Corning, New York	4488
Stripetten 25 ml	Corning, New York	4489
Blottingpapiere 1,5 mm	Carl Roth, Karlsruhe	CL75.1
Sterile Pipettenspitzen		
10 µl kurz	STARLAB, Hamburg	S1121-3810
10 µl lang	STARLAB, Hamburg	S1120-3810
20 µl	STARLAB, Hamburg	S1120-1810
200 µl	STARLAB, Hamburg	S1120-8810
1000 µl	STARLAB, Hamburg	S1122-1830
12-Well Plate	Greiner Bio One, Kremsmünster	665180
24-Well Plate	Greiner Bio One, Kremsmünster	662160
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen	03-0060

Sterilfilter	MERCK, Darmstadt	SCGPU05RE
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde	k12450
Microcentrifuge Tubes 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf	711080
Microcentrifuge Tubes 0,5 ml	Sorenson BioScience, Saltake City	16890
Microcentrifuge Tubes 1,5 ml	Kisker, Steinfurt	G052BP
Microcentrifuge Tubes 2,0 ml	Kisker, Steinfurt	G053BP
Spritze	B. Braun, Melsungen	9161309V
Kanüle	Becton Dickinson, Franklin Lakes	301300
Shreddersäulen	QIAgen, Hilden	79656
MicroAmp 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Kalifornien	4346906
MicroAmp Optical Adhesive Film Kit	Life Technologies, Kalifornien	4313663
Soft tissues	Tapira, Heidenheim	07730012
Prolene 7-0	Johnson & Johnson, New Jersey	KHH5643H

3.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller	Artikelnr.
3,3'-Diaminobenzidin	ZytomedSystems, Berlin	DAB5000plus
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	5025.5
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe	A515.1
Alcianblau	Sigma Aldrich, St. Louis	A5268
Ammoniumhydroxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe	CP17.1
Ammoniumperoxosulfat	Sigma Aldrich, St. Louis	A3678-25G
Betaisodona	Mundipharma, Limburg	
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe	8076.3
Brillant Crocein R	Waldeck GmbH, Münster	1B-109
Calciumchlorid-Dihydrat	MERCK, Darmstadt	1.02382.1000
Chloroform	VWR Chemicals, Radnor	22711
Desoxycholsäure	MERCK, Darmstadt	1065040250
Diamidin-2-phenylindol	Carl Roth, Karlsruhe	6335.1
Direct Red 80	Sigma Aldrich, St. Louis	365548
DNase	QIAgen, Hilden	79254
EDTA Titriplex III	MERCK, Darmstadt	1.08418.100
Eisenchlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich, St. Louis	236489
Eosin B	Sigma Aldrich, St. Louis	861006
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe	6755.2
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, St. Louis	34852
Fast Green FCF	MERCK, Darmstadt	1.04022.0025

Fetales Kälberserum	Biochrom	S 0615
Fluoresceint gelatin	Life Technologies, Kalifornien	D12054
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe	4979.1
Glycin	MERCK, Darmstadt	1041691000
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis	G-9012
Hämatoxylin	ThermoScientific, Waltham	6765009
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis	I9516
Jod	Carl Roth, Karlsruhe	7935.1
Kaliumiodid	Carl Roth, Karlsruhe	8491.1
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe	N069.1
Methanol	MERCK, Darmstadt	1060092511
Meyer's Hämalaun	MERCK, Darmstadt	1092490500
M-PER-Puffer	ThermoScientific, Waltham	78501
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Karlsruhe	K305.2
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK, Darmstadt	1064041000
Natriumhydroxid (NaOH)	MERCK, Darmstadt	106498
Natriumkarbonat	MERCK, Darmstadt	1063931000
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich, St. Louis	72049
OP-Abdecktuch	L&R, Rengsdorf	33010
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	ThermoScientific, Waltham	26619
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis	P4417
Phosphotungstic Acid	Sigma Aldrich, St. Louis	P4006
PhosStop	Roche Diagnostics, Rotkreuz	04906837001
Picrinsäure	VWR Chemicals, Radnor	84512.260
Propanol	MERCK, Darmstadt	1096342511
Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Rotkreuz	04693124001
Restore™-Westernblot-Stripping-Buffer	ThermoScientific, Waltham	21059
RNase-Away	VWR Chemicals, Radnor	7003
Roti HistoClear	Carl Roth, Karlsruhe	A538.1
Roti HistoKit II	Carl Roth, Karlsruhe	T160.1
Runningbuffer	ThermoScientific, Waltham	28362
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH, Münster	5A-394
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe	2607.1
Säurefuchsin	Carl Roth, Karlsruhe	T128.1
Shandon Gill 3 Hematoxylin	ThermoScientific, Waltham	6765009

Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe	9370.1
Skalpell	VWR Chemicals, Radnor	02.001.30.010
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich, St. Louis	70166-500G
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe	CN30.4
Sterile Handschuhe	Semperit, Wien	822751721
SuperSignal Protein Ladder	ThermoScientific, Waltham	84785
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoScientific, Waltham	34095
TEMED	BIO RAD, Kalifornien	161-0801
Tris Base	Sigma Aldrich, St. Louis	T1503-1KG
Tris HCl	Carl Roth, Karlsruhe	9090.3
Triton X	Sigma Aldrich, St. Louis	T9284
TRizol	Life Technologies, Kalifornien	15596026
Tween	MERCK, Darmstadt	655205
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe	9681.1
Western Blot Stripping Buffer	ThermoScientific, Waltham	21059
WesternBright Quantum	Advansta, Kalifornien	K-12042-D20
Xylol	VWR Chemicals, Radnor	28975
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis	M7154

3.3 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Abzug maXXima	WRT Laborbau, Stadtlohn
Autoklav VX-95	Systemec, Wetttenberg
Biophotometer plus	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator HERACell 240i	ThermoScientific, Waltham
Cryostat CM 1950	LEICA, Wetzlar
Einschweißgerät Folio	Severin, Sundern
Eismaschine AF80	Scotsman, Illinois
EpiChemie-II-Darkroom	UVP Laboratory Products, Kalifornien
Fluoreszenzlampe	LEICA, Wetzlar
Gefriertruhen und Kühlschränke	
4°C (NUNC)	ThermoScientific, Waltham
4°C	Lovibond, Dortmund
-20°C	BOSCH, Stuttgart
-20°C (GS54NAW30)	SIEMENS, München
-20°C (Premium NoFrost)	LIEBHERR, Bulle

-80°C (REVCO)	ThermoScientific, Waltham
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen
Homogenisator BRAUN-SONIC 125	Quigley-Rochester Inc.
Kamera	LEICA, Wetzlar
Microplate-Reader	ThermoScientific, Waltham
Mikroskop DM2000	LEICA, Wetzlar
Mikroskop DMIL LED	LEICA, Wetzlar
Mini-Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe
NanoDrop 1000	ThermoScientific, Waltham
Netzgerät PowerPac 200	BIO RAD, Kalifornien
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipettierhelfer accu-jet pro	BRAND, Wertheim
RT-PCR System StepOne Plus	Life Technologies, Kalifornien
Saugpumpe Laboport	KNF Lab, New Jersey
Schüttler KS-15 Control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schüttler Vibrax-VXR	IKA, Staufen
Semidry Trans-Blot SD Cell	BIO RAD, Kalifornien
Sterilbank HERASafe KS	ThermoScientific, Waltham
Stickstofftank 35VHC	Taylor Wharton, Minnesota
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Waage BP 110 S	Sartorius, Göttingen
Wärmebad 1092	GFL, Hannover
Wärmeschrank Function line	ThermoScientific, Waltham
Zentrifugen Universal 16	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Labofuge 300	ThermoScientific, Waltham
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

3.4 Kits

Produkt	Hersteller	Artikelnr.
BCIP/NBT Liquid Substrate	Sigma Aldrich, St. Louis	B1911
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega, Wisconsin	A6002
Kalziumassay	Cayman, Michigan	700550
Live/Dead Kit	Life Technologies, Kalifornien	L3224
QuantiTect Kit	QIAGEN, Hilden	205313
Qiagen RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden	74106

3.5 Zellkulturmedien und -zubehör

Produkt	Hersteller	Artikelnr.
0,25% Trypsin-EDTA	Life Technologies, Kalifornien	25200-114
10xDMEM	Sigma Aldrich, St. Louis	D2429
Amphotericin B	Gilead Sciences, Kalifornien	4684857
BD Matrigel™	Becton Dickinson, Franklin Lakes	356237
Collagen Typ I	Becton Dickinson, Franklin Lakes	354236
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich, St. Louis	D6546
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Kalifornien	14190-169
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin	S0615
Gelatine	Sigma Aldrich, St. Louis	G9391
Incidur-Spray	ECOLAB, Minnesota	YD12/P301137
L-Glutamine 200 mM	Life Technologies, Kalifornien	25030-024
Kalziumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis	C4901
Nicht essentielle Aminosäuren	Sigma Aldrich, St. Louis	M7145
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Kalifornien	15140-163
Recombinant Human TGFβ	R&D Systems, Minnesota	240-B-0027CF
Recombinant Human VEGF	R&D Systems, Minnesota	293-VE
β-Glycerolphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis	G9422

	<i>Basalmedium</i>	<i>Vollmedium</i>	<i>CaCl₂-Medium</i>
<i>DMEM</i>	500 ml	500 ml	500 ml
<i>FCS</i>	0,5%	10%	0,5%
<i>nicht essentielle Aminosäuren</i>	1%	1%	1%
<i>L-Glutamin</i>	1%	1%	1%
<i>Penicillin/Streptomycin</i>	1%	1%	1%
<i>Amphotericin</i>	1%	1%	1%
<i>β-Glycerolphosphat</i>	-	-	1 mM
<i>Kalziumchlorid</i>	-	-	1 mM

Tabelle 1: Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellmedien. Basal- und Vollmedium unterscheiden sich in ihrem FCS-Gehalt. Das CaCl₂-Medium basiert auf Basalmedium und enthält zusätzlich die prokalzifizierenden Substanzen β-Glycerolphosphat und Kalziumchlorid.

3.6 Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen sowie für das Westernblot-Verfahren wurden folgende Antikörper verwendet:

3.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
<i>anti-MMP2</i>	<i>rabbit</i>	1:1000 (BSA)	ABCAM ab37150 polyklonal
<i>anti-PARP</i>	<i>rabbit</i>	1:250 (TBST)	Cell Signaling (46D11) #9532 monoklonal
<i>anti-β-Aktin</i>	<i>rabbit</i>	1:1000 (BSA)	Cell Signaling #4967 polyklonal
<i>anti-OPN</i>	<i>mouse</i>	1:100 (BSA)	Novus Biologicals (1B20) NB110-89062 monoklonal
<i>anti-α-SMA</i>	<i>mouse</i>	1:100 (PBS) 1:500 (BSA)	Sigma A5228 monoklonal
<i>anti-Vimentin</i>	<i>mouse</i>	1:10 (PBS)	PROGEN 10515 V9 monoklonal

Die primären Antikörper wurden für immunhistochemische Färbungen in PBS, für Westernblots in 5% BSA/TBST oder im Falle von *anti-PARP* in reinem TBST verdünnt. *Anti-α-SMA* wurde für die Immunhistochemie im Verhältnis 1:100 bzw. für die Westernblot-Analyse im Verhältnis 1:500 verdünnt.

3.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
<i>anti-mouse</i>	<i>goat</i>	1:5000	Jackson ImmunoResearch 115-035-044 HRP-gekoppelt
<i>anti-rabbit</i>	<i>goat</i>	1:5000	Dianova 111-035-003 HRP-gekoppelt
<i>anti-mouse</i>	<i>goat</i>	1:200 (IH)	Santa Cruz Biotechnology sc-2005 HRP-gekoppelt
<i>anti-mouse</i>	<i>goat</i>	1:300 (FIH)	Dianova Cy3 115-165-062 Indocarbocyanin- gekoppelt

Sekundärantikörper wurden für die Westernblot-Verfahren in 5% Milchpulver/TBST oder BSA, für die Immunhistochemie mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Fluoreszenzfärbungen in PBS verdünnt.

3.7 Primer

	Vorwärts (5' → 3')	Rückwärts (5' → 3')
<i>18S</i>	GCA-ATT-ATT-CCC-CAT-GAA-CG	GGC-CTC-ACT-AAA-CCA-TCC-AA
<i>ACTA2</i>	GAT-AGA-GCA-CGG-CAT-CAT-CA	GAA-GGG-TTG-GAT-GCT-CTT-CA
<i>MMP2</i>	TGA-CAA-GGA-CGG-CAA-GTA-TG	GTA-AGA-TGT-GCC-CTG-GAA-GC
<i>OPN</i>	GAT-GGC-CGA-GGT-GAT-AGT-GT	TCG-TCT-TCT-TAG-GTG-CGT-CA
<i>NT5E</i>	TCT-TCT-CAA-CAG-CAG-CAT-CC	CCC-AAT-TCC-TGG-GTT-GAA-TA

Tabelle 2: Verwendete Primer und ihre Nukleotidsequenzen.

3.8 Puffer und Lösungen

	Anodenpuffer 1	Anodenpuffer 2	Kathodenpuffer	Runningbuffer
<i>Tris Base</i>	-	25 mM	25 mM	25 mM
<i>Methanol</i>	10%	10%	10%	-
<i>Glycin</i>	-	-	40 mM	192 mM
<i>SDS</i>	-	-	-	3,5 mM
<i>pH</i>	10,4	10,4	9,4	-

Tabelle 3: Zusammensetzung der Anoden-, Kathoden- und Runningbuffer für die Gelelektrophorese sowie die Westernblot-Analyse.

<i>Lämmli-Puffer</i>	<i>MPER-Lösung</i>
9 ml H ₂ O	10 ml MPER-Puffer
18,2 ml 1,5M Tris	1 Tablette PhosStop
9 ml 20% SDS	1 Tablette Phosphatase-Inhibitor
36,8 ml Glycerol	-
27 ml β -Mercaptoethanol	-

Tabelle 4: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers sowie der MPER-Lösung zur Probenaufbereitung für die Westernblot-Analyse.

	<i>10xTBS</i>	<i>10xTBST</i>	<i>Blockierlösung (Immunhistologie)</i>
<i>Tris Base</i>	0,5 M	0,5 M	0,05 M
<i>NaCl</i>	1,5 M	1,5 M	0,15 M
<i>Tween 20</i>	-	0,1%	-
<i>FCS</i>	-	-	10%
<i>BSA</i>	-	-	0,15 mM
<i>pH</i>	7,5	7,5	7,6

Tabelle 5: Lösungsansätze für 10xTBS und 10xTBST für die Westernblot-Analyse sowie für die Blockierlösung zur immunhistologischen Färbung.

<i>Eosin-Lösung</i>	<i>Natriumkarbonat-Formaldehyd</i>
1,5 g Eosinpulver	10 g Natriumkaronat
150 ml Aqua _{dest}	50 ml Formaldehyd
150 ml 100% Ethanol	150 ml Aqua _{dest}
300 µl pure Essigsäure	

Tabelle 6: Zusammensetzung der Eosinlösung für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie der Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung zur Von Kossa Färbung.

<i>Jodidlösung</i>	<i>Eisenchlorid</i>	<i>Weigert's Eisenhämatoxylin</i>
10 g Jod	12,4 g Eisenchlorid-Hexahydrat	60 ml Hämatoxylin (2%)
20 g Kaliumiodid	500 ml Aqua _{dest}	40 ml Eisenchlorid
500 ml Aqua _{dest}	5 ml Salzsäure (37%)	20 ml Jodlösung

Tabelle 7: Erstellung von Weigert's Eisenhämatoxylin.

<i>Säurefuchsin-Stock-Lsg.</i>	<i>Brillant Crocein R-Stock-Lsg.</i>	<i>Crocein-Säurefuchsin-Lsg.</i>
0,5 g Säurefuchsin	4 g Brillant Crocein R	20 ml Säurefuchsin-Stock
497,5 ml Aqua _{dest}	398 ml Aqua _{dest}	80 ml Brillant-Crocein-Stock
2,5 ml Essigsäure (100%)	-	-

Tabelle 8: Herstellung von Crocein-Säurefuchsin-Lösung.

<i>In situ Zymographie Puffer</i>	<i>Hannoveraner Dezellularisierungslösung</i>
7,6 mM Tris-HCl	Aqua _{dest}
2 mM Kalziumchlorid-Dihydrat	0,05% NaN ₃
30,8 mM NaCl	0,5% SDS
5% Triton X	0,5% DCA

Tabelle 9: Zusammensetzung des *in situ* Zymographie-Puffers sowie der Hannoveraner Dezellularisierungslösung.

<i>Bouin'sche Lösung</i>
300 ml Pikrinsäure
100 ml Formaldehyd (37%)
20 ml Essigsäure (100%)

Tabelle 10: Herstellung von Bouin'scher Lösung.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Sterilbank

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Verwendete Materialien wurden, sofern nicht steril verpackt, zur Sterilisation autoklaviert oder alternativ mit Ethanol bzw. Desinfektionsmittel gründlich gereinigt. Es wurde auf eine sterile Arbeitsweise geachtet.

4.1.2 Zellgewinnung und Zellpassagierung

Zur Gewinnung oviner aortaler VIC wurden ovine Herzen von einem lokal ansässigen Schlachthof bezogen. Die Herzklappen wurden steril herauspräpariert, in PBS gewaschen und die Segel anschließend mittels Schere zerkleinert. Nun wurden die Gewebestücke in Vollmedium suspendiert und in eine mit Gelatine vorbeschichtete t25 Kultivierungsflasche gegeben. Bei einer Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde der Zellrasen in der Kultivierungsflasche zunächst zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Dann wurde zur Zellablösung Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und die Kulturflasche für 3 min bei 37°C und einem pCO₂ von 5% inkubiert, wodurch die VIC aus ihrem Zellverband herausgelöst wurden und dabei ihre charakteristische dendritische Form verloren. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von mindestens der doppelten Menge Vollmedium nach 3 min abgestoppt. Im Anschluss wurden die abgelösten Zellen in ein Falcon überführt und mittels Zentrifugation abpelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Vollmedium resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf 3-5 neue Kulturflaschen aufgeteilt und diese mit Medium aufgefüllt. Von Passage 0 (P0) auf P1 und von P1 auf P2 wurden die Zellen in größere Kultursflaschen überführt, sodass sie ab P2 in t225-Flaschen ausgesät wurden. Die Zellen wurden bis P3 herangezogen und zwischen P3 und P6 für die Besiedlung von ECM verwendet.

4.1.3 Einfrieren und Auftauen von VIC

Zellen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt benötigt wurden, wurden bei -80°C weggefroren. Hierzu wurden sie wie oben beschrieben abtrypsiniert, pelletiert, in DMSO-basiertem Einfriermedium (FCS, 10% DMSO) suspendiert und schließlich in *cryovials* bei -80°C oder in Flüssigstickstoff weggefroren. Bei Bedarf wurden die Zellen durch eine möglichst rasche Zugabe von vorgewärmtem Vollmedium aufgetaut. Dabei wurde 1 ml DMSO-Zellsuspension in 6 ml Vollmedium aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in frischem Vollmedium suspendiert und in eine mit Gelatine vorbeschichtete Kultivierungsflasche gegeben.

4.1.4 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Um eine definierte Zellzahl in der Matrix aussäen zu können, wurde die in einer Zellsuspension enthaltene Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

Die Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben abtrypsiniert und durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml frischem Vollmedium vollständig gelöst. Es wurden 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau – einem dunkelblauen, anionischen Azofarbstoff, welcher die Zellmembran abgestorbener Zellen passieren kann und diese so gegenüber den lebendigen Zellen mikroskopisch abgrenzbar macht – vermischt. Anschließend wurde die Anzahl vitaler Zellen in der Probe lichtmikroskopisch ausgezählt und hieraus die Gesamtzellzahl errechnet.

4.1.5 VIC Kultivierung in mECM

Um eine möglichst natürliche Umgebung für die VIC zu schaffen, wurden diese in einem matrigelbasierten 3D-Gerüst kultiviert, welches in seiner Zusammensetzung der valvulären ECM ähnelt. Diese mECM wurde aus den zwei Hauptkomponenten Kollagen und BD Matrigel™ gebildet, welche in der fertigen mECM-Konfiguration ein Verhältnis von etwa 1:2 zueinander aufwiesen. Kollagen Typ I wurde auf 1 mg/ml verdünnt, mit 10xDMEM im Verhältnis 5:2 vermischt und anschließend mit 0,1 M NaOH neutralisiert, bis ein Farbumschlag zu erkennen war. VIC wurden mittels Trypsin aus der 2D-Zellkultur geerntet, mit Hilfe der Neubauerkammer ausgezählt und im Anschluss in auf 4°C gekühltem, purem DMEM in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml suspendiert. Abhängig vom Endvolumen der mECM wurde soviel Zellsuspension ins Matrigel gegeben, dass die Zellkonzentration in der fertigen mECM 2×10^6 Zellen/ml entsprach. Anschließend wurde zügig die Kollagenkomponente zur Matrigelkomponente hinzugegeben und eine homogene Verteilung angestrebt. Es wurden mECM-Volumina zwischen 150 µl und 300 µl verwendet, welche in die vorgekühlten *well-inserts* pipettiert und für 45 min bei 37°C im Inkubator ausgehärtet wurden. Im Anschluss wurde in das *well* 1,5 ml und auf die mECM im *insert* 750 µl Vollmedium gegeben, sodass die VIC in der mECM durch Diffusion sowohl von oben als auch von unten über eine permeable Membran am Boden des *transwells* ernährt werden konnten (Abb. 4). Der Tag der Matrixbesiedlung wird im Folgenden als Tag 0 (d0) bezeichnet. Ab Kulturtag 1 wurden die mECM-Kulturen unter den vier verschiedenen Konditionen: Basalmedium, CaCl₂-Medium sowie CaCl₂-Medium ergänzt um die Wachstumsfaktoren TGFβ (2,5 ng/ml) bzw. VEGF (5 ng/ml) über 8 Tage kultiviert. Das Medium wurde an Tag 4 und 7 gewechselt. An Tag 8 wurden die mECM-Kulturen geerntet und zur weiteren Prozessierung aufbereitet.

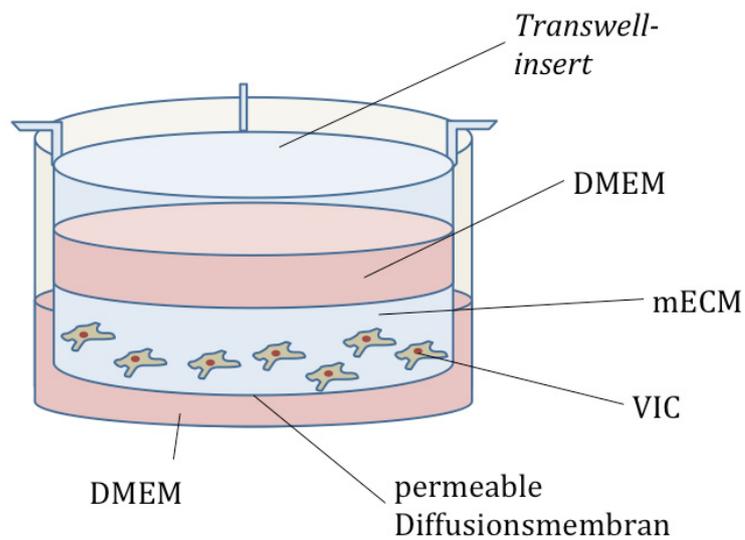


Abb. 4: Dreidimensionale mECM mit VIC im *transwell-insert*. Auf die mECM wurde Vollmedium gegeben, ebenso in das *well*, welches das *insert* umgibt. Die Ernährung der vitalen Zellen erfolgt per Diffusion durch die Matrix sowohl von oben als auch von unten über eine permeable Membran (adaptiert nach Hof *et al.*, *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016 ⁷⁸).

4.1.5.1 Kulturgrößenbestimmung

Zur makroskopischen Charakterisierung wurden die besiedelten mECM an den Tagen 1, 4 und 7 der Kultivierung photographisch dokumentiert. Unter Zuhilfenahme einer Leuchtquelle (*light pad*) konnten die Konturen der mECM gut abgegrenzt werden. Zur Quantifizierung der Größenentwicklung wurde mittels *ImageJ* die Fläche der Kultur (im Folgenden als Kulturgröße bezeichnet) als Korrelat bestimmt und in Relation zur Grundfläche des *inserts* gesetzt.

4.1.6 VIC-Kultivierung in dECM

4.1.6.1 Präparation oviner Aortenklappen

Zur Herstellung von dezellularisierter Extrazellulärmatrix (dECM) wurden ovine Herzen von lokal ansässigen Schlachthöfen bezogen. Zum Zeitpunkt der Präparation lag die Explantation der Herzen nicht länger als 6 Stunden zurück. In dieser Zeit wurden die Herzen auf Eis gekühlt aufbewahrt. Zunächst wurde das Perikard entfernt und der *apex cordis* abgetrennt, sodass man von apikal einen Blick in das Kammersystem des Herzens erhielt. Hiervon ausgehend wurde das gesamte rechte Herz sowie das linke *atrium* entfernt. Nun wurde das verbleibende interatriale Septum bis kurz vor die Klappenebene herunterpräpariert, sodass nur noch der *truncus aortae* samt Aortenklappe erhalten blieb. Die *aorta ascendens* wurde soweit proximal wie möglich abgetrennt, ohne dabei die Segel der Aortenklappe zu beschädigen. Schließlich wurde der *truncus aortae* gründlich von Myokardresten freipräpariert (Abb. 5).

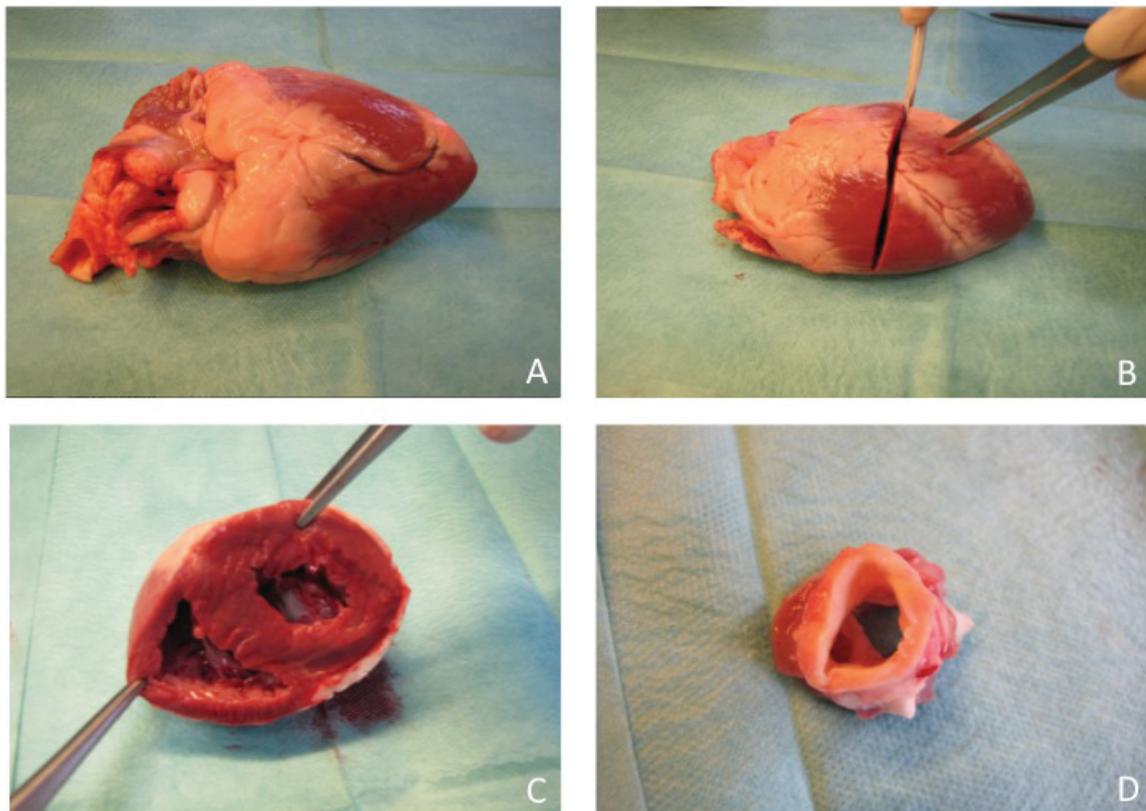


Abb. 5: Präparation der Aortenklappe. Ovines Herz wenige Stunden nach Explantation (A). Abtrennen des *apex cordis* (B) und Ansicht von apikal auf linken und rechten Ventrikel (C). Freipräparierter *truncus aortae* mit Aortenklappe (D).

4.1.6.2 Dezellularisierung oviner Aortenklappen

Nach einer initialen antibiotischen Behandlung der Aortenklappen erfolgte ein detergenzienbasiertes Dezellularisierungsverfahren („Hannoveraner Protokoll“) mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und Desoxycholsäure (DCA) (Tabelle 11). SDS und DCA wirken als Detergenzien an der Zellmembran und zerstören auf diese Weise die Zellen der Herzklappenmatrix. NaN_3 wurde dem Dezellularisierungsprotokoll als antimikrobieller Zusatz hinzugefügt und unterstützt die antibiotische Dekontamination des Präparates, indem es die Cytochrom-c-Oxidase der mitochondrialen Atmungskette inhibiert.⁷⁹ Hierdurch reduziert es die Konzentration des lebensnotwendigen ATP in Mikroorganismen, sodass diese absterben⁸⁰. Durch Waschschritte mit PBS wurden die Zellreste aus der Matrix herausgewaschen.

Im Anschluss an den Dezellularisierungsprozess wurden die dECM auf unterschiedliche Weise weiterbehandelt und das Ergebnis der Dezellularisierung und Matrixbesiedlung vergleichend gegenübergestellt. Die ventrikuläre Seite der Klappensegel wurde zur besseren Orientierung mit Prolene 7-0 und einem chirurgischen Knoten gekennzeichnet. Dann wurden die einzelnen Segel möglichst großzügig aus dem Klappenring herausgetrennt, ohne dabei Myokardanteile einzubeziehen (Abb. 6).

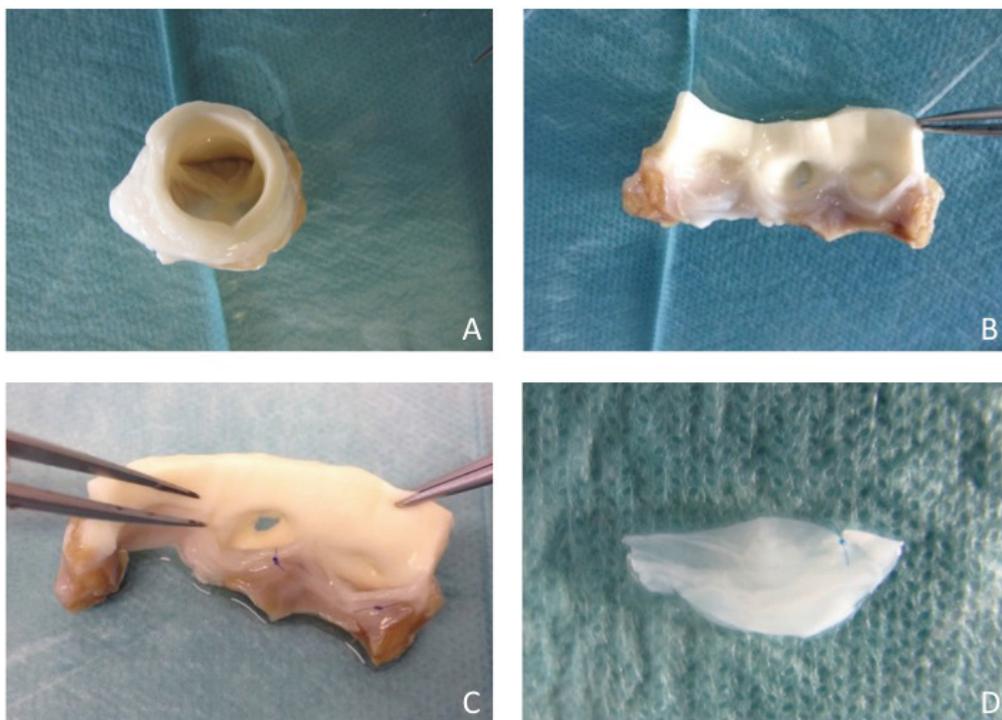


Abb. 6: Dezellularisierte Herzklappe. (A) Dezellularisierter *truncus aortae*, welcher zwischen zwei Segeln eröffnet wird, sodass alle drei Segel erhalten bleiben (B). Der Schnitt wird dabei genau in der Klappenkommissur gesetzt. Zur Orientierung werden die Segel durch einen chirurgischen Knoten an der ventrikulären Seite markiert (C). Anschließend werden sie möglichst großflächig aus dem Klappenring herausgeschnitten, ohne dabei Myokardstücke mit abzutrennen (D).

<i>Substanzen</i>	<i>Zeitdauer</i>
<i>Betaisodona</i>	1 h
<i>2% Penicillin/ Streptomycin auf PBS</i>	1 h
<i>Hannoveraner Lösung</i>	4x12 h
<i>0,05% NaN₃ auf Aqua_{dest} (7,7 mM)</i>	24 h
<i>1% Penicillin/ Streptomycin auf PBS</i>	3x48 h

Tabelle 11: Hannoveraner Dezellularisierungsprotokoll. Dargestellt sind die einzelnen Dezellularisierungsschritte mit Inkubationszeiten. Abgesehen von der antibiotischen Behandlung mit Betaisodona wurden alle Inkubationsschritte unter permanenter Bewegung auf einem Schüttler (220/min) durchgeführt. Der Lösungswechsel fand ab dem Einsatz der Hannoveraner Dezellularisierungslösung unter sterilen Bedingungen statt (adaptiert nach Akhyari *et al.*, *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 ⁷⁹).

4.1.6.3 Weitere Prozessierung und Rebesiedlung der dECM

Die herauspräparierten, dezellularisierten Klappensegel wurden wie in Tabelle 12 dargestellt entweder mittels laservermittelter Photomanipulation oder enzymatisch mit Trypsin weiterbehandelt. Als Kontrollen wurden jeweils unbehandelte dECM verwendet. Um die Basalmembran auf der valvulären Oberfläche zu durchbrechen und somit den Eintritt von VIC in die Klappenmatrix zu ermöglichen, wurde die dECM mit einem FsL behandelt. Die FsL-vermittelte Manipulation der dECM fand im Rahmen einer Kooperation mit dem Laserzentrum Hannover durch die Mitarbeiter der AG Biophotonic Imaging and Manipulation, Abteilung Biomedical Optics (Leiter: Dr.-Ing. Heiko Meyer) statt. Dabei wurden verschiedene Laserleistungen in einem Bereich zwischen 400 mW und 1000 mW angewendet. Alternativ wurden die dECM über 30 min mit Trypsin inkubiert und anschließend in beiden Fällen mit VIC besiedelt.

Die Rebesiedlung der dECM fand unter sterilen Bedingungen statt. Dabei kam eine spezielle Besiedlungsvorrichtung, das *ECM evaluation culture device (EECD)* zur Anwendung. Dieses besteht im Wesentlichen aus einer Bodenplatte, einem Schraubverschluss sowie einem Zylinder, welcher dicht mit der Bodenplatte abschließt und über dessen oberes Ende ein Zugang zum Besiedlungsmilieu ermöglicht wird (Abb. 7A und 7B). Die dezellularisierten, aus dem Klappenring herauspräparierten und gegebenenfalls weiterbehandelten Aortenklappensegel wurden gründlich in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die dECM mit der ventrikulären bzw. perforierten Seite nach oben auf die Bodenplatte der Besiedlungsvorrichtung gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass die mechanische Manipulation der dECM durch das Instrumentarium möglichst gering gehalten und auf den Segelrand beschränkt wurde. Der Zylinder wurde so auf die dECM aufgesetzt, dass er diese lückenlos bedeckte und mit Hilfe des Schraubverschlusses feste angedrückt. Die besiedelte Fläche der dECM entsprach somit der ca. 50 mm² messenden

Grundfläche des Zylinders. Zur Matrixbesiedlung wurden VIC wie unter 4.1.2 und 4.1.4 beschrieben aus dem 2D-Zellrasen gelöst und mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zellen in der Zellsuspension wurden anschließend erneut pelletiert und in Vollmedium resuspendiert. Nun wurden über den oberen Zugang des Zylinders die VIC auf den dECM ausgesät. Die dECM wurden über 7 Tage bei 37°C und 5% pCO₂ inkubiert und das Medium an den Kulturtagen 1, 3 und 5 gewechselt. Darüberhinaus wurde zur Besiedlungsoptimierung ein modifiziertes Besiedlungsprotokoll entwickelt. Dabei wurden die besiedelten dECM bereits nach 24-stündiger Zellanhaftung in den EECD in ein *transwell* transferiert und für die restliche Dauer hierin kultiviert, wobei der Algorithmus des Mediumwechsels beibehalten wurde (Tabelle 12). Im Unterschied zur Besiedlung in den EECD wird auf diese Weise die dECM von beiden Seiten mit Nährmedium umspült, was ein Austrocknen der Matrix auf der abgewandten Seite verhindert und zusätzlich ein höheres Nährstoffangebot innerhalb der Matrix gewährleistet (Abb. 7C). An Tag 7 wurden die dECM aus der Besiedlungsvorrichtung herausgenommen, erneut mit PBS gewaschen und anschließend zur histologischen Analyse mittels CryoCompound eingebettet (Abb. 7D).

	dECM, FSL	dECM, Trypsin	dECM, Trypsin, <i>transwell</i>
Zellen/ ECM	0,3x10 ⁶ /50 mm ²	0,3x10 ⁶ /50 mm ²	10 ⁶ /50 mm ²
ECM-Behandlung	Photodisruption (400-1000 mW)	Trypsin (10 µM, 30 min)	Trypsin (100 µM, 30 min)
Kultivierung	EECD	EECD	EECD (d1) + <i>transwell</i> (d2-7)

Tabelle 12: Manipulation der dECM-Oberfläche und Besiedlungskonditionen. Die dECM wurden vor der Besiedlung mit Femto second Laser (FSL) bestrahlt, wobei Laserleistungen zwischen 400 mW und 1000 mW eingesetzt wurden ($n = 7$). Alternativ wurden die dECM für 30 min mit Trypsin inkubiert. Im letzteren Falle wurde ein Standardmodell sowie ein modifiziertes Besiedlungsmodell angewandt, in dem die besiedelten dECM nach 24 Stunden vom *ECM evaluation culture device (EECD)* in ein *transwell* überführt wurden, eine höhere Zellzahl ausgesät und stärker konzentriertes Trypsin verwendet wurde (je $n = 5$).

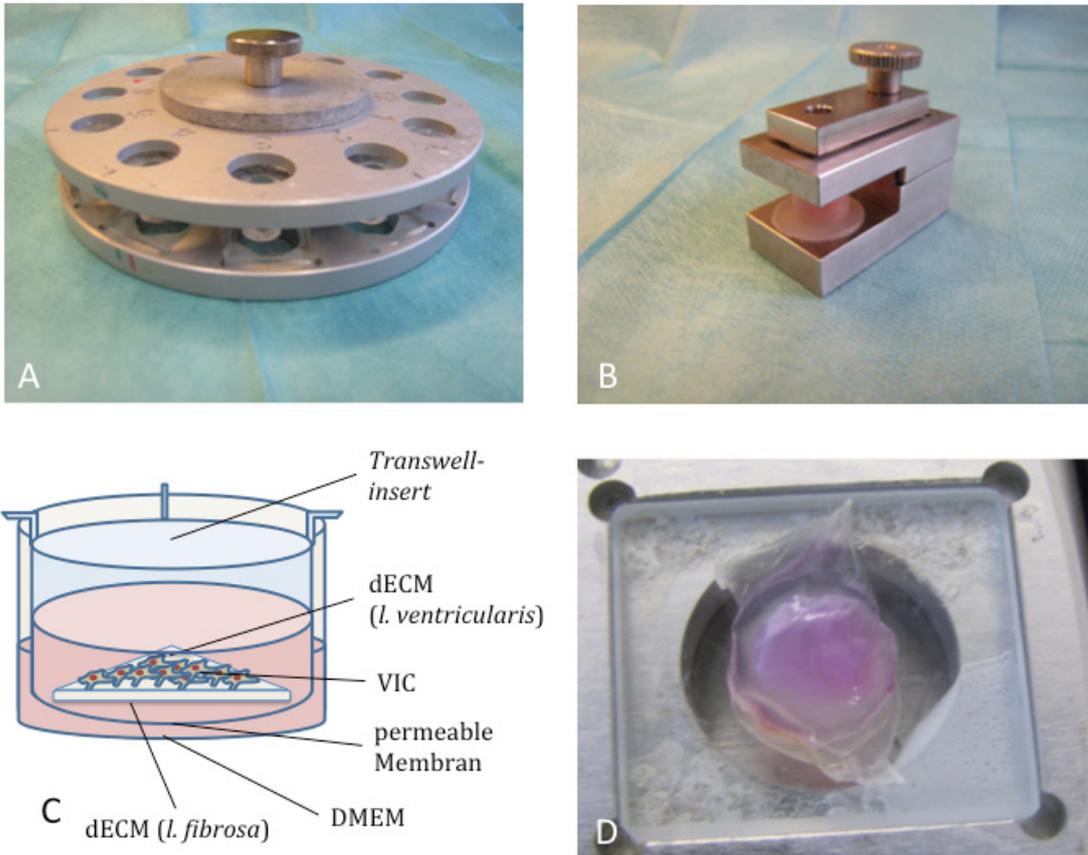


Abb. 7: Besiedlungssettings für dECM. A, B: EECD, Disc-System (A) und Blocksystem (B). Beide Besiedlungsvorrichtungen bestehen aus Bodenplatte, Zylinderaufsatz, dessen Volumen die Besiedlungskammer darstellt und dessen Grundfläche mit ca. 50 mm² die besiedelte Fläche der dECM definiert sowie einem Schraubverschluss. Die Besiedlungskammer ist von oben zum Mediumwechsel zugänglich. C: Schematische Darstellung einer rebesiedelten dECM, welche in ein *transwell*-System überführt wurde. Medium umgibt die Matrix von beiden Seiten. Die ventrikuläre Seite der dECM ist besiedelt. D: Rebesiedelte dECM auf der EECD-Bodenplatte nach 7-tägiger Kultivierung im EECD. Der Zylinderaufsatz wurde abgenommen. Areale der dECM, welche nicht vom Zylinder bedeckt waren sind eingetrocknet (adaptiert nach Hof et al., *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016 ⁷⁸).

4.2 Proteinanalyse mittels Westernblot

Zur Proteinanalyse mittels Westernblot wurden Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wie erstmals von Ulrich Lämmli beschrieben nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt, anschließend auf eine Membran übertragen und mittels Antikörperreaktion sichtbar gemacht ⁸¹.

4.2.1 Probenaufbereitung

Die mECM wurden mit PBS gewaschen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit 50 µl Phosphatase- und Protease-Inhibitoren-haltigem M-PER-Puffer versetzt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die mECM mittels Ultraschall zerkleinert, sodass Zellysate entstanden, in welchen die Proteine frei vorlagen. Von der so gewonnenen Lösung wurden 10 µl in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 5 µl 4x-Lämmli-Puffer versetzt. Zuvor wurde das Zellysate bei einer zu hohen photometrischen Dichte gegebenenfalls mit M-PER-Puffer verdünnt. Dann wurden die Proben für 5 min bei 90°C im Heizblock erhitzt, sodass die Proteine in ihrer Primärstruktur vorlagen und im Anschluss für 15 min bei 10.000 G zentrifugiert.

4.2.2 Gelherstellung

Zur Herstellung des Polyacrylamid-Gels wurde zunächst ein 10%-iges Trenngel vorgefertigt (Tabelle 13), mit welchem die Gelkassette zu $\frac{3}{4}$ befüllt wurde. Nachdem 1 ml Propanol auf das Trenngel in der Gelkassette gegeben wurde, um Blasenbildungen im Gel zu vermeiden, polymerisierte das Trenngel innerhalb von 30 min aus. Daraufhin wurde das überstehende Propanol abgeschüttet und die Gelkassette bis oben mit 5%-igem Sammelgel befüllt. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm für 10 bzw. 15 Geltaschen gesteckt. Nach weiteren 30 min war auch das Sammelgel auspolymerisiert und von fester Konsistenz. Nun konnte das Gel entweder sofort für die Gelelektrophorese verwendet oder in angefeuchteten Zellstoff gewickelt und bei 4°C für maximal 3 Tage gelagert werden.

	<i>Trenngel (10%)</i>	<i>Sammelgel (5%)</i>
<i>Bisacrylamide 40%</i>	2,5 ml	720 µl
<i>H₂O</i>	4,8 ml	3,5 ml
<i>Tris Base 1,5 M pH 8,8</i>	2,5 ml	650 µl
<i>20% SDS</i>	50 µl	25 µl
<i>10% Ammoniumperoxosulfat</i>	100 µl	50 µl
<i>TEMED</i>	5 µl	5 µl

Tabelle 13: Zusammensetzung von 10%-igem Trenn- und 5%-igem Sammelgel für die Gelelektrophorese.

4.2.3 Gelelektrophorese/SDS-PAGE

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE wurde die Gelkassette inklusive des Polyacrylamidgels in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Geltaschen wurden mit 15 µl der mit Lämmli-Puffer aufbereiteten Probe, einem Proteingrößenmarker sowie gegebenenfalls einer Positivkontrolle zur späteren Evaluierung des Bandensignals befüllt. Die Elektrophoresekammer wurde an den *BIO-RAD PowerPac 200* angeschlossen und so ein elektrisches Feld angelegt. Durch dieses elektrische Feld wurden die Proteine in der jeweiligen Probe entsprechend ihrer Ladung und Größe durch das Polyacrylamidgel bewegt, wobei sich die Proteine um so schneller durch das Gel bewegten, je kleiner und je stärker negativ sie geladen waren. Nach ca. 40 min hatten die Proteinbanden das Trenngel nahezu vollständig durchlaufen, sodass die Gelelektrophorese gestoppt wurde.

4.2.4 Western-Blotting und Antikörperbindung

Mithilfe der Westernblot-Methode wurden die durch die Gelelektrophorese entstandenen und nach Größe aufgetrennten Proteinbanden auf eine Membran transferiert, um ausgewählte Banden im Anschluss sichtbar machen zu können. Ein zurechtgeschnittenes Stück *Whatman-Paper* wurde in Anodenpuffer 1, ein weiteres in Anodenpuffer 2 (Tabelle 3) und zwei *Whatman-Paper* sowie das Polyacrylamidgel in Kathodenpuffer getaucht. Nacheinander wurden nun die *Whatman-Paper* aus Anodenpuffer 1 und 2, das Polyacrylamidgel, die *Amersham-* bzw. Nitrocellulosemembran und das *Whatman-Paper* aus dem Kathodenpuffer unter Vermeidung von Blasenbildung auf den *Semidry transfer cell* bzw. den *Electrophoresis Power Supply EPS 301* gelegt. Nun wurde für 90 min ein elektrisches Feld mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA pro Polyacrylamid-Gel angelegt, durch welches die Proteinbanden von dem Gel in Richtung Anode auf die darunterliegende *Amersham-* bzw. Nitrocellulose-Membran übertragen wurden. Im Anschluss an den Bandentransfer wurden die unspezifischen Epitope der Proteine 60 min lang abhängig vom Zielprotein mit 5% Magermilch bzw. 5% BSA auf TBST blockiert. Anschließend wurde die Blotmembran mit dem entsprechenden Erstantikörper über Nacht bei 4°C unter permanenter Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran auf einem Schüttler für 3x15 min bei Raumtemperatur (RT) in TBST gewaschen und für 90 min mit dem Zweitantikörper inkubiert, welcher an den F_c-Teil des Erstantikörpers bindet und somit indirekt den Nachweis der jeweiligen Proteinbande auf der Blotmembran ermöglicht. Abschließend wurde die Blotmembran erneut 3x15 min bei RT in TBST gewaschen und entwickelt.

4.2.5 Bandenvisualisierung und Auswertung

Zur Entwicklung des Blots wurden 500 µl *WesternBright* Chemilumineszenz Substrat Quantum auf die Membran pipettiert und diese dann in Folie eingeschweißt. Die Bandendetektion erfolgte mit Hilfe des *EpiChemie-II-Darkroom*. Bei schlechter Signalqualität wurde zur Signalverstärkung

250 µl *SuperSignal West Femto* auf die Membran gegeben. Nach Aufnahme wurden die Membranen in TBST gewaschen, in TBST-benetzte *Whatman-Paper* gelegt, eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt bzw. erneut für die Ladekontrolle verwendet. Als Ladekontrolle wurde in allen Fällen β -Aktin verwendet. Die Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper sowie die Entwicklung für die Ladekontrolle wurden entsprechend wiederholt, wobei zuvor die am Zielprotein gebundenen Erst- und Zweitantikörper mittels *stripping-buffer* entfernt wurden. Die Auswertung der Westernblots erfolgte durch die Bandenintensitätsmessung mittels *ImageJ*.

4.3 Histologie und Immunhistochemie

4.3.1 Kryoschnitte

Zur histologischen und immunhistologischen Darstellung der Präparate wurden mECM- bzw. dECM-Kulturen mittels *KP-CryoCompound* eingebettet, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die eingebetteten Proben wurden am Kryostat geschnitten, wobei die Schnittdicke der Präparate für alle histologischen und immunhistologischen Untersuchungen 10 µm, für den MMP-Aktivitätsnachweis mittels *in situ* Zymographie und die relativ Kollagenquantifizierung 15 µm betrug. Die geschnittenen Präparate wurden auf Objektträger aufgezogen und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

4.3.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Um einen orientierenden Eindruck der 3D-Kulturen zu erhalten, wurden sowohl von rebesiedelten dECM als auch von mECM Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbungen (H&E-Färbungen) angefertigt.

Nachdem die Kryoschnitte für 30 min bei RT aufgetaut wurden, wurden sie sukzessiv für jeweils 1 min in Hämatoxylin, frisches Aqua_{dest}, 5%-ige Essigsäure als Oxidanz für das Hämatoxylin und erneut in frisches Aqua_{dest} getaucht. Im Anschluss wurden die Präparate unter fließendes Leitungswasser gehalten, wodurch der pH-Wert angehoben und die basophilen Zellkomponenten „gebläut“ wurden. Die Kryoschnitte wurden daraufhin in 70%-iges Ethanol getaucht, für 15 min mit Eosin gegengefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol, Xylol) entwässert. Dann wurden die Schnitte getrocknet und mit *Roti HistoKit II* eingedeckt.

4.3.3 Von Kossa Färbung

Die Von Kossa Färbung dient dem histologischen Kalzifizierungsnachweis auf der Basis einer Präzipitationsreaktion von Silberionen mit Phosphat. Als Positivkontrolle dienten Präparate kalzifizierter Mäuseaorten (freundliche Gabe von Dr. J.-P. Minol). Die Kryoschnitte wurden aufgetaut und mit Aceton für 8 min bei -20°C fixiert. Anschließend wurden sie luftgetrocknet, kurz in Aqua_{dest} getaucht und dann 15 min lang in einer 5%-igen Silbernitratlösung inkubiert. Da

es sich hierbei um eine lichtabhängige Reaktion handelt, wurde dieser Schritt bei direkter Lichteinstrahlung unter einer Neonlichtröhre durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Präparate mit Aqua_{dest} gewaschen und mit Natriumkarbonat-Formaldehydlösung reduziert, wodurch ein schwarzer Niederschlag entstand. Die Präparate wurden mit fließendem Leitungswasser gewaschen, mit 5%-iger Natriumthiosulfatlösung inkubiert und dann erneut gewaschen. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Aluminiumsulfat-Kernechtrot. Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit *Roti HistoKit II* eingedeckt.

4.3.4 *Movat's Pentachrom Färbung*

Zur Evaluation der ECM wurden die einzelnen Bestandteile des extrazellulären Gewebes mittels Movat's Pentachrom-Färbung dargestellt. Hierzu wurden die Kryoschnitte über Nacht auf 37°C erwärmt und dann mit 4%-iger Formalinlösung fixiert. Nun wurden die Objektträger für 10 min in auf 50°C erhitzte Bouin'sche Lösung gestellt und anschließend für 10 min mit fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Schnitte wurden mit 5%-igem Natriumthiosulfat inkubiert und anschließend mit Aqua_{dest} gespült. Dann wurden die Präparate sukzessiv mit 1%-igem Alzianblau (20 min), erhitztem alkalischem Alkohol (30% Ammoniumhydroxid in 96% Ethanol 1:9; 10 min), *Weigert's working solution* (9 min, Tabelle 7) und *Brillant-Crocein-Säurefuchsin working solution* (1 min, Tabelle 8) inkubiert. Dazwischen wurden die Präparate jeweils mit Leitungswasser oder Aqua_{dest} gewaschen. Anschließend wurden die Färbungen mit 5%-iger Phosphorwolframsäure differenziert und dann in Essigsäure gespült. Die Präparate wurden zuletzt mit Alkohol entwässert (96% und 100% Ethanol), mit alkoholischem Safran gefärbt (6 g *Safran du Gatinais* in 100 ml Ethanol 100%), erneut entwässert (100% Ethanol, Xylol) und dann eingedeckt.

4.3.5 *Immunhistochemische Färbungen*

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung basiert auf dem spezifischen Nachweis von Antigenstrukturen im histologischen Präparat mit Hilfe von Antikörpern. Dabei wird das Präparat zunächst mit einem Antikörper, welcher gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist, inkubiert und schließlich ein Zweitantikörper hinzugegeben, dessen F_{ab}-Teil an den F_c-Teil des Erstantikörpers bindet. Im Anschluss kann der Zweitantikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

4.3.5.1 *Immunhistochemische Färbung mittels 3,3'-Diaminobenzidin*

Bei der 3,3'-Diaminobenzidin- (DAB-) Färbung gelingt der Nachweis des Zweitantikörpers über eine enzymatische Reaktion, bei der eine an den Zweitantikörper gekoppelte, aus Meerrettich gewonnene Peroxidase (*horseradish*-Peroxidase) H₂O₂ oxidiert. Hierbei werden Protonen frei, welche zum braunen Farbumschlag eines zuvor farblosen Chromogens führen (Abb. 8).

Die Schnitte wurden zunächst aufgetaut und bei -20°C in Aceton fixiert. Als Positivkontrolle wurde ovines Myokard verwendet, welches im Zuge der VIC-Isolierung aus den Schafsherzen gewonnen und wie oben beschrieben eingebettet und geschnitten wurde. Daraufhin wurden die Präparate in PBS gewaschen und für eine Stunde in Blockierlösung gegeben, welche unspezifische Antikörperbindungsstellen im Präparat blockiert, sodass der Erstantikörper möglichst spezifisch an das Antigen bindet. Nun wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer für 60 min mit dem Erstantikörper inkubiert. Die Präparate wurden erneut in PBS gewaschen und sodann zur Blockierung in der Probe vorhandener Hydroxid-Peroxidasen mit 3%-igem H_2O_2 inkubiert, sodass es nicht zu Interferenzen mit der Zweitantikörper-gekoppelten *horseradish*-Peroxidase kommen konnte. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper und weitere Waschschrift mit PBS. Zur Detektion des Zweitantikörpers wurden die Präparate für in Tris Base Puffer getaucht und für kurz Zeit mit dem Substrat-Chromogen-Gemisch (20:1) inkubiert. Zum Abstoppen der DAB-Reaktion wurden die Präparate erneut in Tris Base Puffer getaucht und anschließend in $\text{Aqua}_{\text{dest}}$ gewaschen. Schließlich folgte eine Kernfärbung mit Hämalaun mit anschließender Bläuung durch Leitungswasser.

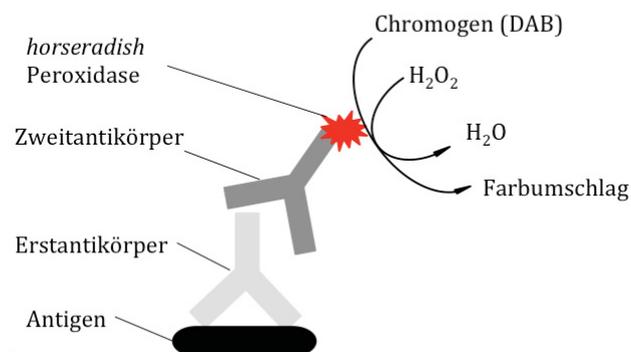


Abb. 8: Immunhistochemischer Antigennachweis mittels DAB. Der Erstantikörper bindet das spezifische Antigen. Der F_{ab} -Teil des sekundären Antikörpers richtet sich gegen den F_{c} -Teil des primären Antikörpers und ist an eine *horseradish*-Peroxidase gekoppelt, welche über eine Oxidation des DAB zum braunen Farbumschlag führt (adaptiert nach Kim et al, *J Pathol Transl Med.* 2016 ⁸²).

4.3.5.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Alternativ zur DAB-Färbemethode wurde auch der immunhistochemische Antigennachweis mittels fluoreszenzgekoppelten Antikörpern angewandt. Hier ist der Zweitantikörper statt an ein Enzym an ein fluoreszierendes Substrat gekoppelt, welches im Anschluss an die Färbung unter einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann.

Die Schnitte wurden aufgetaut, bei -20°C mit 99%-igem Ethanol fixiert und anschließend luftgetrocknet. Daraufhin wurden die Präparate 5 min mit 0,2%-igem Triton X in PBS behandelt. Triton X ist ein nichtionisches Detergenz, welches die Zellmembran permeabel für größere Proteine wie etwa Antikörper macht. Es folgte ein Waschschrift mit PBS, woraufhin die Präparate mit dem Erstantikörper in einer Feuchtkammer inkubiert und daraufhin erneut in PBS gewaschen wurden. Anschließend erfolgte die 45-minütige Inkubation mit einem fluorochrommarkierten Zweitantikörper. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Präparate kurz mit Aqua_{dest} gespült, in 99% Ethanol getaucht, luftgetrocknet und mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) – einem blau fluoreszierender Farbstoff, welcher sich im Zellkern an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) lagert und somit kernhaltige Zellen nachweist – eingedeckt.

4.4 *In situ* Zymographie

Mit Hilfe der *in situ* Zymographie erfolgt im Gegensatz zur Immunhistochemie, bei welcher Antigene detektiert werden, der Nachweis von enzymatischer Aktivität. Im konkreten Fall wurde die enzymatische Aktivität der MMP2 und MMP9 untersucht, welche auch als Gelatinasen bezeichnet werden.

Frisch hergestellte Kryoschnitte von 15 µm Dicke wurden mit 1%-iger, fluoreszenzmarkierter Gelatine in ISZ-Puffer (Tabelle 9) über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Lichtausschluss um die Fluoreszenz der Gelatine zu erhalten. Als Negativkontrolle wurden Proben sowohl mit reinem ISZ-Puffer als auch mit EDTA-haltiger Arbeitslösung, welche die Gelatinaseaktivität inhibiert eingesetzt. Am Folgetag wurden die Präparate mit PBS gewaschen, luftgetrocknet und anschließend mit DAPI eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

4.5 *Picro-Sirius Red*/ *Fast Green*-Färbung und relative Kollagenquantifizierung

Die *Picro-Sirius Red*/*Fast Green*-Färbung dient der Beurteilung von kollagenösen und nicht-kollagenösen Proteinanteilen des Gewebes. Dabei färbt *Picro-Sirius Red* Kollagenstrukturen und *Fast Green* nicht-kollagenöse Proteine an. Zum einen wurden histologische Färbungen an 10 µm dicken Kryoschnitten von dECM angefertigt. Diese wurden für eine Stunde mit 0,1% *Sirius Red* und 0,1% *Fast Green*-Lösung in Picrinsäure inkubiert. Daraufhin wurden die Präparate in 0,01 M HCl gewaschen, in 100% Ethanol entwässert und wieder in *Roti HistoClear* gewaschen, anschließend eingedeckt und mikroskopiert.

Für eine photokolorimetrische Quantifizierung in Anlehnung an die 1985 von López de León und Rojkind beschriebene Methode wurden 15 µm dicke Kryoschnitte verwendet⁸³. Sie wurden ebenfalls für eine Stunde in der zuvor beschriebenen *Picro-Sirius Red*/*Fast Green*-Picrinsäurelösung gefärbt und anschließend mit fließendem Aqua_{dest} gewaschen. Nun wurden die Präparate mit einer scharfen Klinge vom Objektträger gekratzt und in ein 2 ml Eppendorf-

Gefäß gegeben. Dieses wurde mit 1 ml 0,1 M Natronlauge und 1 ml Methanol befüllt und solange geschüttelt, bis die Farbstoffe vollständig in die Lösung übergegangen waren und die Präparate sich entfärbt hatten. Die Extinktion wurde für *Picro-Sirius* Red bei 540 nm und für *Fast Green* bei 605 nm gemessen. Der relative Kollagenanteil berechnet sich anhand der Formel:

$$\frac{(Ext_{540nm} - 0,291 \times Ext_{605nm}) \div 2,08}{((Ext_{540nm} - 0,291 \times Ext_{605nm}) \div 2,08) + (Ext_{605nm} \div 38,4)}$$

Dabei entspricht der Zähler dem korrigierten Kollagengehalt der Probe, welcher in Relation zum Gesamtproteingehalt im Nenner gesetzt wird. Dieser ergibt sich aus der Summe von korrigiertem Kollagengehalt und nicht-kollagenösen Proteinanteilen. Die Subtraktion des relativen Kollagengehalts von dem Wert 1 liefert den relativen Anteil an nicht-kollagenösen Proteinanteilen.

4.6 BCIP/NBT-Assay

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der TNAP wurde ein BCIP/NBT-Assay durchgeführt. Die Substanz 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat (BCIP) ist ein synthetisches Substrat der alkalischen Phosphatase. Diese hydrolysiert BCIP zu anorganischem Phosphat und 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl, welches anschließend mit Hilfe von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) oxidiert wird. Dabei entsteht der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor. Ein Tag vor dem Ernten der mECM-Kulturen wurde beim letzten Mediumwechsel BCIP/NBT-Substrat und Basalmedium im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die mECM ins *transwell-insert* sowie in das *well* gegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C und einem pCO₂ von 5% über Nacht inkubiert, am nächsten Tag zur histologischen Aufarbeitung eingebettet und bei -80°C weggefroren. Nach der Anfertigung von Kryoschnitten erfolgte eine Kernfärbung mit Aluminiumsulfat-Kernechtrot. Die Kryoschnitte wurden für 8 min bei -20°C in Aceton fixiert, anschließend luftgetrocknet und kurz in Aqua_{dest} gewaschen. Daraufhin erfolgte eine 15-minütige Inkubation der Schnitte in Aluminiumsulfat-Kernechtrot-Lösung, erneutes Waschen in Aqua_{dest} und schließlich die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Präparate wurden eingedeckt und konnten nun mikroskopisch ausgewertet werden.

4.7 *Quantitative Genanalyse*

Zur Analyse der Genexpression wurde das Verfahren der sog. quantitative reverse transcriptase (bzw. *real time*) polymerase chain reaction (qRT-PCR) angewandt, welches sich aus der 1986 erstmals beschriebenen Polymerasen-Kettenreaktion ableitet⁸⁴. Zunächst wurde aus den Zellen in der 3D-Matrix mRNA gewonnen, welche im Anschluss in cDNA umgeschrieben und der spezifischen Genanalyse mittels qRT-PCR zugeführt wurde.

4.7.1 *RNA-Isolation*

Die RNA-Isolation erfolgte unter Anwendung des *Qiagen RNeasy Mini Kits* und die Verarbeitung der Proben wurde im Allgemeinen entsprechend der Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Die mECM-Kulturen wurden nach dem Ernten in 1 ml Trizol, ein aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat zusammengesetztes Reagenz zur RNA-Extraktion aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben entweder bei -80°C weggefroren oder zur RNA-Extraktion aufgetaut, mittels *Vortex-Mixers* durchmischt und homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte durch mehrmalige Aspiration durch eine Kanüle mit 0,9 mm Durchmesser sowie zusätzlich durch Qiagen-Shreddersäulen. Es wurden 200 µl Chloroform pro ml zur Trizollösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 6°C und 15.000 rcf zentrifugiert und der wässrige, die RNA enthaltende Überstand von der Trizolphase abpipettiert, in welcher sich im Wesentlichen Proteine anreicherten.

Zum wässrigen Anteil wurden 500 µl Isopropanol gegeben, was nach einer 10-minütigen Inkubation und anschließenden Zentrifugation bei 6°C und 15.000 rcf über 10 min zur RNA-Präzipitation und Pelletierung führt. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 1 ml 75% Ethanol vorsichtig gewaschen. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt über 5 min bei 6°C. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 100 µl RNase-freiem H₂O gelöst. Anschließend wurden 350 µl β-Mercaptoethanol-Lösung (1:100 in RLT-Puffer) hinzugegeben. Die Proben wurden mittels Vortex-Mixer durchmischt, mit 250 µl 100% Ethanol versetzt und in die Zentrifugationssäulen überführt.

Weiterhin wurde nach Herstellerprotokoll verfahren, bis die RNA-Probe zuletzt in 25 µl RNase-freies H₂O aufgenommen werden konnte und anschließend sofort auf Eis gestellt oder bei -80°C weggefroren wurde.

4.7.2 *Photometrische Konzentrationsbestimmung*

Die RNA-Konzentration in den Proben wurde mittels Spektrophotometrie bestimmt. Hierbei wurde der *NanoDrop1000* verwendet. Die RNA-Konzentration in ng/µl wurde anhand der Absorption bei 260 nm Wellenlänge ermittelt. Die Probenqualität wurde mit Hilfe des 260/280- und 260/230-Quotienten beurteilt.

4.7.3 Reverse Transkription

Für die qRT-PCR sind DNA-Sequenzen notwendig, weshalb die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden musste. Umgeschrieben wurden 100 ng RNA in einem Endvolumen von 20 µl. Dazu wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* verwendet, und die Verarbeitung der Proben im Allgemeinen entsprechend der Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Während der Probenvorbereitung wurden die Proben auf Eis gelagert. Es wurden 100 ng der in RNase-freiem H₂O gelösten RNA mit 2 µl *gDNA wipeout buffer* versetzt und auf ein Volumen von 14 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation im *Thermocycler* bei 42°C für 2 min. Den Proben wurden sukzessiv 4 µl *RT buffer*, 1 µl *RT primer* und 1 µl reverse Transkriptase hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation im *Thermocycler* über 30 min bei 42°C zum *Primer-Annealing*, woraufhin die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt und schließlich wieder abgekühlt wurden. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.7.4 Quantitative reverse transcriptase PCR

Die qRT-PCR amplifiziert die vorhandene cDNA in mehreren Reaktionszyklen und weist durch fluoreszenzbasierte Verfahren den DNA-Gehalt in einer Probe nach. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der fluoreszierende Cyanin-Farbstoff *BRYT Green™* benutzt. Dieser interkaliert an doppelsträngige DNA und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 530 nm. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge vorhandener Amplifikationsprodukte und kann so als Maß für die Expression des untersuchten Genabschnittes dienen. Primer, cDNA und Fluoreszenzfarbstoff wurden in folgendem Verhältnis mit RNase-freiem Wasser vermischt (Tabelle 14):

<i>BRYT Green™</i>	10 µl
<i>RNase-freies H₂O</i>	7,4 µl
<i>cDNA</i>	2 µl ± 10 ng
<i>Forward primer</i>	0,3 µl
<i>Reverse primer</i>	0,3 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.

Es wurde das *StepOnePlus™ real time PCR System* von *Applied Biosystems* als *Thermocycler* sowie der *GoTaq® qPCR Master Mix* zur Amplifikation und Signaldetektion verwendet. Ein Amplifikationszyklus besteht aus drei Phasen (Abb. 9). Zunächst wird der cDNA-Doppelstrang durch Erhitzen denaturiert, sodass DNA-Einzelstränge vorliegen. Es folgt das *Primer-Annealing* – die *Primer* lagern sich hierbei ihrer Leserichtung entsprechend an einen der beiden DNA-Einzelstränge an, und zwar dort, wo ihre Basensequenz komplementär zu der der DNA ist. Anschließend läuft die Polymerase Kettenreaktion ab, durch welche ausgehend vom *Primer* der

komplementäre DNA-Strang synthetisiert wird. Dieser Schritt wird auch als *Elongation* bezeichnet. So verdoppelt sich die Menge der DNA nach jedem Amplifikationszyklus. Es wurden insgesamt 40 Amplifikationszyklen pro PCR durchlaufen. Vorher und hinterher erfolgten Schritte zur Aktivierung bzw. endgültigen Terminierung der PCR-Reaktion. Die Konditionen während eines Amplifikationszyklus sind Tabelle 15 zu entnehmen. Die Auswertung erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ⁸⁵.

	Temperatur	Zeit
Hot-Start Aktivierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	15 sec
Annealing und Elongation	60°C	60 sec
Dissoziation	95°C – 60°C – 95°C	15 sec – 60 sec – 15 sec

Tabelle 15: Ablaufkonditionen der qRT-PCR-Reaktion.

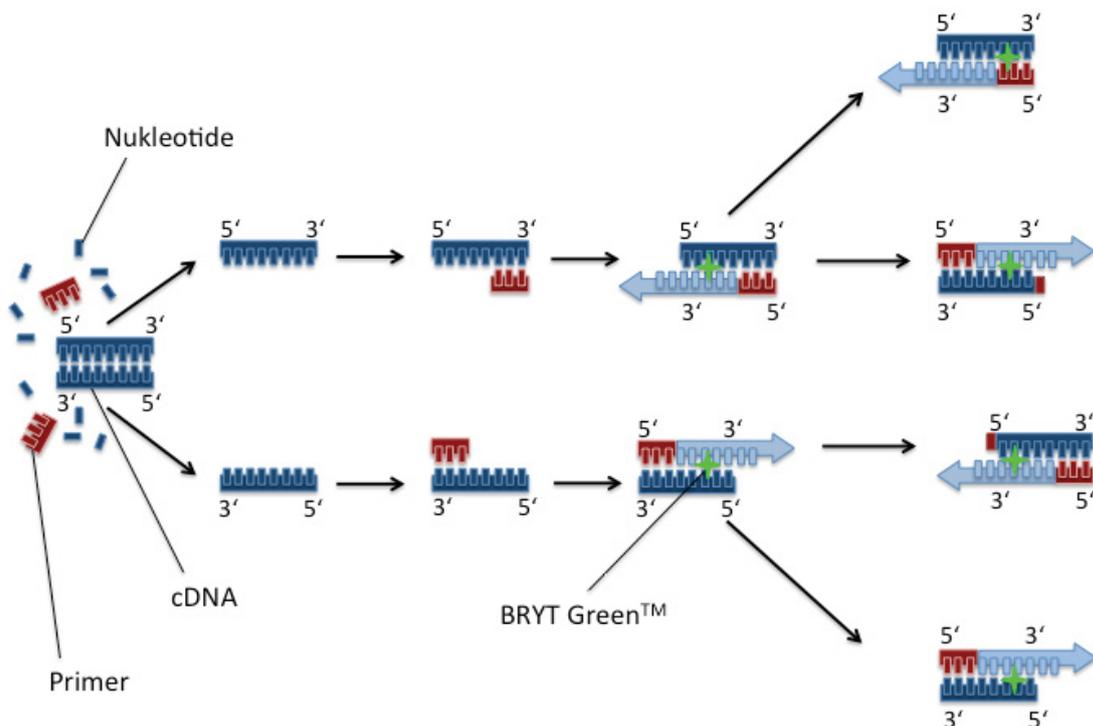


Abb. 9: Ablauf eines Amplifikationszyklus im Rahmen der qRT-PCR. In einem ersten Schritt wird der cDNA-Doppelstrang durch Denaturierung in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Es folgt die Hybridisierung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Anschließend synthetisiert eine Polymerase vom Primer ausgehend den komplementären Strang, sodass am Ende eines jeden Amplifikationszyklus die doppelte Menge DNA vorliegt. Der Cyanin-Farbstoff *BRYT-Green™* bindet an doppelsträngige DNA und lässt somit auf das Vorhandensein des primer-spezifischen Gens rückschließen (adaptiert nach *Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 2011* ⁸⁶)

4.8 Kalzium-Assay

Der Gesamt-Kalziumgehalt der mECM wurde mit Hilfe des *Cayman Kalzium-Assays* ermittelt. Dieser Assay macht sich zunutze, dass Kalzium in alkalischer Umgebung mit *o-Cresolphthalein-Complexone* reagiert. Als Reaktionsprodukt entsteht ein Komplex, welcher Licht zwischen 570 nm und 590 nm Wellenlänge absorbiert. Diese Absorption kann mit Hilfe eines *Microplate-Readers* detektiert und quantifiziert werden. Somit kann der Kalziumgehalt der einzelnen Proben bestimmt werden.

Die mECM-Kulturen wurden mit PBS gewaschen, gewogen und in 5 ml Tris-HCl-Puffer pro 1 g mECM aufgenommen. Daraufhin wurden sie mittels Ultraschall zerkleinert, durchmischt und für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben 15 min lang bei 4°C und 15.000 rcf zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 10 µl jeder Probe sowie einer Standard-Konzentrationsreihe in eine *96-well-Platte* pipettiert. Unter Lichtexklusion wurde das *Working Detector Reagent* nach Herstellerangaben vorbereitet und 100 µl des Reagenz zu jeder Probe gegeben. Die Platte wurde 20-30 sec lang gleichmäßig geschwenkt, 5 min bei RT inkubiert und schließlich wurde die Absorption bei 580 nm im *Microplate-Reader* gemessen. Von dieser ließ sich auf den Kalziumgehalt in der Probe schließen.

4.9 Live/Dead Assay

Mit Hilfe des Live/Dead-Assays können lebende von toten Zellen innerhalb einer dreidimensionalen Matrix unterschieden werden. Er basiert auf den Farbstoffen Calcein und Ethidiumhomodimer (EthD). Calcein-Acetoxyethyl (Calcein AM) kann frei durch die Zellmembran diffundieren. Im Zellinneren wird der Acetoxyethylrest unspezifisch durch Esterasen, welche ubiquitär in lebenden Zellen vorkommen, abgespalten, wodurch das grün fluoreszierende, membranimpermeable Calcein entsteht. EthD hingegen kann nur über Defekte in der Zellmembran, wie sie bei apoptotischen oder nekrotischen Zellen vorkommen, in die Zelle sowie in den Kern gelangen, wo eine Anlagerung an die DNA erfolgt. Hier wird die Emission von rotem Licht durch Bindung an Nukleinsäuren angeregt und so die Fluoreszenz des EthD um den Faktor 100 gesteigert. Calcein AM wurde 1:9, EthD 1:4 in PBS verdünnt. Die Arbeitslösungen wurden anschließend im Verhältnis 1:250 in Basalmedium gegeben. Die mECM-Kulturen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei 37°C und einem pCO₂ von 5% mit dem Chromogen-enthaltenden Basalmedium inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte anschließend am Laserrastermikroskop (engl.: *laser scanning microscope*, LSM) mithilfe der ZEN-Software. Mittels *Z-stacking* konnten Schichtaufnahmen einer 3D mECM-Probe angefertigt und beurteilt werden.

4.10 Software und statistische Auswertung

Photointensitätsmessungen zur Westernblot-Signalauswertung sowie geometrische Messungen im Rahmen der Kulturgrößenbestimmung wurden unter Zuhilfenahme von *ImageJ 1.48v software* durchgeführt. Aufnahmen von Gewebeschnitten im Rahmen der Histologie und Immunhistochemie wurden mit Hilfe des *Leica DM2000* und der *Leica Application Software LAS v3.1* angefertigt. Für LSM-Aufnahmen im Life/Dead-Assay wurde die *ZEN imaging software* von CARL ZEISS benutzt. Statistische Analysen wurden mit *GraphPad Prism Version 6* unternommen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt, wobei eine Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde. Unterschiede wurden ab einem p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant erachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur VIC-Kultivierung in mECM

5.1.1 Morphologische Charakterisierung der besiedelten mECM

5.1.1.1 Kulturgrößenbestimmung

Um sich der morphologischen Charakterisierung des dreidimensionalen Kultivierungsmodells anzunähern, wurden zunächst makroskopische Veränderungen von besiedelten mECM über den gesamten Kultivierungszeitraum dokumentiert. Die Auswertung erfolgte wie unter 4.1.5.1 beschrieben mithilfe von *ImageJ*.

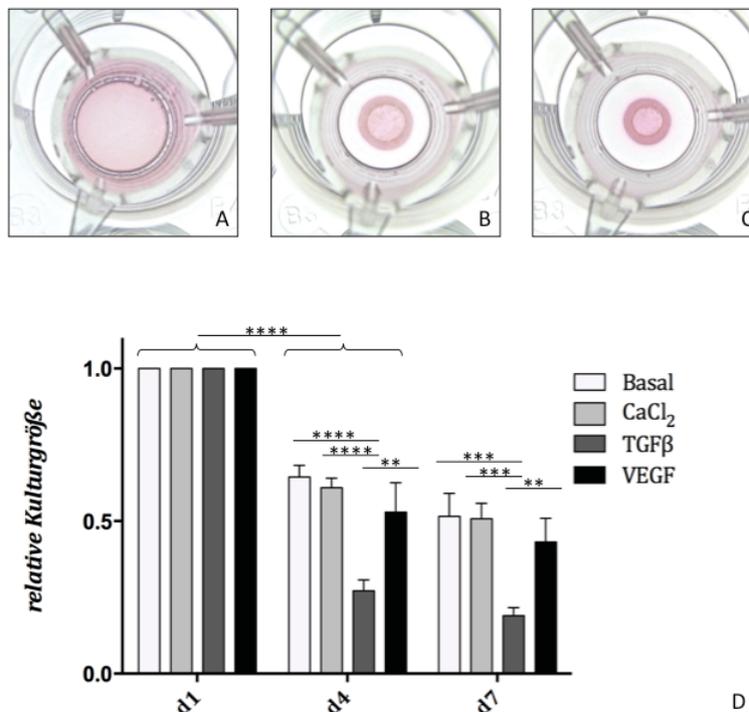


Abb. 10: Makroskopische Charakterisierung der mECM-Kulturen über den zeitlichen Verlauf. A-C: Fotodokumentation von mithilfe eines *lightpads* durchleuchteten mECM-Kulturen. Dargestellt sind repräsentative Bilder von TGFβ-stimulierten mECM an Tag 1 (A), Tag 4 (B) und Tag 7 (C) der Kultivierung mit initialem Volumen von 300 µl. Makroskopisch lässt sich eine Kulturgrößenreduktion über den zeitlichen Verlauf erkennen. D: Relative Kulturgrößenquantifizierung. Approximativ wurde der Kulturumfang als Surrogat für die Kulturgröße mittels *ImageJ* definiert und dieser zu den Zeitpunkten d1, d4 und d7 ins Verhältnis zur initialen Kulturgröße (d0) gesetzt. Nach Stimulation mit den unterschiedlichen Nährmedien zeigte sich für alle Konditionen eine hoch signifikante Abnahme der Kulturgröße zwischen d1 auf d4. Am stärksten war dieser Effekt mit 72,8% Größenreduktion unter Stimulation mit TGFβ zu sehen, am geringsten unter Konditionierung mit Basalmedium (35,6%). Nach Tag 4 schrumpften die mECM-Kulturen nur noch langsam um weitere 8,2 - 12,9%, mit einer maximalen Gesamtgrößenreduktion von 81,8% der Ausgangsgröße (TGFβ). Im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander besteht an Tag 1 makroskopisch kein Unterschied, wohingegen sowohl nach vier als auch nach sieben Tagen die Kulturgröße von mit TGFβ stimulierten mECM gegenüber den übrigen Konditionen signifikant reduziert ist. Diese weisen untereinander keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Größenentwicklung auf. $n = 5$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

Zu Beginn der Kultivierungsperiode füllten mECM mit einem Volumen von 300 µl die gesamte Grundfläche des *transwell-inserts* aus (Abb. 10A). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine zunehmende Größenreduktion der Kulturen, welche sich in einer Abnahme des Kulturumfangs niederschlug (Abb. 10B und C). Dabei nahmen die mECM im dreidimensionalen Raum meist eine kegelstumpfförmige Konfiguration an. Während insbesondere zu Anfang der Kultivierung eine schnelle Abnahme der Kulturgröße um 35,6% (Basal) bis 72,8% (TGFβ) beobachtet werden konnte, kam es zwischen dem vierten und siebten Tag der Kultivierung nur noch zu einer schwach ausgeprägten Größenabnahme um maximal 12,9% (Basal). In jeder Gruppe war die Reduktion der Kulturgröße von Tag 1 auf Tag 4, nicht jedoch von Tag 4 auf Tag 7 der Kultivierungszeit hoch signifikant. Die stärkste Größenabnahme zeigte sich mit einer finalen Kulturgröße von 19% der initialen Ausdehnung in mit TGFβ stimulierten mECM-Kulturen. Die geringste Schrumpfungstendenz wurde bei mECM-Kulturen beobachtet, welche mit Basalmedium kultiviert wurden. Hier betrug die Größenreduktion über den gesamten Kultivierungszeitraum bis zum 7. Tag 49,4% der Initialgröße, die Schrumpfung war also um etwa 30% geringer als unter Stimulation mit TGFβ. Während an Tag 1 der Kultivierung makroskopisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationskonditionen festzustellen waren, zeigte sich beim Vergleich der Gruppen untereinander sowohl an Tag 4 als auch an Tag 7 eine deutlich verringerte Kulturgröße unter Stimulation mit TGFβ gegenüber allen anderen Konditionen. Basal-, CaCl₂- und VEGF-stimulierte mECM-Kulturen unterschieden sich jedoch untereinander nicht signifikant zu den verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 10D).

5.1.2 *Histologische Charakterisierung*

Um einen histologischen Eindruck der besiedelten mECM zu erhalten, wurden H&E-Färbungen angefertigt. Morphologisch stellten sich die mECM in der Histologie als kompakte, wenn auch nicht absolut kreisrunde Strukturen dar (Abb. 11A, D, G und J). Die Matrix der Kulturen war im Vergleich zum natürlichen Aortenklappengewebe lockerer gepackt. Es fielen jedoch stellenweise Areale auf, in welchen die mECM-Matrix stark verdichtet und mit der nativer Aortenklappen vergleichbar war. Die gesamte Matrix der mECM war am Ende der insgesamt 9-tägigen Kultivierungszeit durch VIC besiedelt. Dabei war auffällig, dass die Peripherie der mECM tendenziell stärker und unregelmäßiger besiedelt war als zentrale Anteile. Zum Teil stellte sich an der Kulturoberfläche ein regelrechter, konfluierender Randsaum durch epithelhaft angeordnete VIC dar (Abb. 11E und H). Fokal bildeten sich dabei Zellaggregationen mit stark erhöhter Zelldichte in Relation zu umliegenden Arealen. In zentralen Bereichen wiederum verteilten sich die Zellen mehr oder weniger gleichmäßig mit einer ähnlichen Zelldichte unter allen Stimulationsbedingungen (Abb. 11C, F, I und L). So ergab sich ein insgesamt inhomogenes Verteilungsmuster bezüglich der Matrixbesiedlung. Histologisch zeigten mit TGFβ stimulierte

Kulturen insgesamt eine größere Zelldichte gegenüber den restlichen Konditionen (Abb. 11G, H und I). Weiterhin waren jedoch keine essentiellen Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsbedingungen auszumachen.

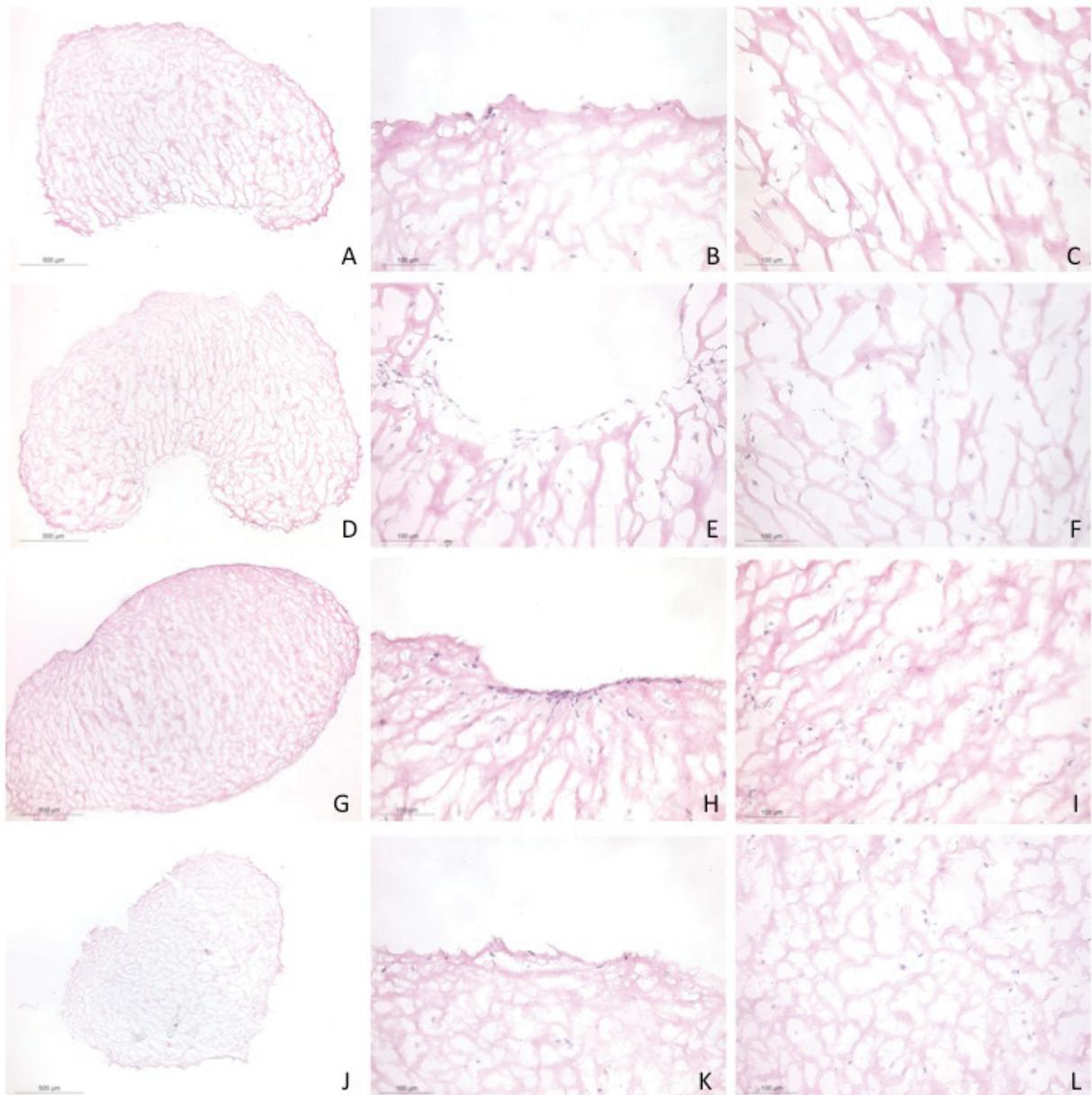


Abb. 11: Darstellung von mECM-Kulturen mit 150 μ l Initialvolumen in der H&E-Färbung. Basal- (A, B, C), CaCl_2 - (D, E, F), $\text{TGF}\beta$ - (G, H, I) und VEGF-Stimulation (J, K, L). A, D, G, J: Übersichtsaufnahme der mECM-Kultur nach insgesamt 9 Tagen Kultivierung bzw. 8 Tagen Stimulation mit unterschiedlichen Medien. B, E, H, K: vergrößerte Darstellung peripherer Kulturareale. Z.T. bilden sich epitheloide Zellschichten und Zellaggregationen am Kulturrand. C, F, I, L: Ansicht zentraler Bereiche der mECM-Kulturen. Hier stellen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturbedingungen dar. Maßstäbe = 500 μ m (A, D, G, J) bzw. 100 μ m (B, C, E, F, H, I, K, L). Rosa = Kollagen, blau = Zellkerne.

5.2 Viabilität und Apoptose der VIC in mECM

5.2.1 Life/Dead Assay

Der Life/Dead Assay bot die Möglichkeit, die Zellviabilität in den besiedelten mECM zu analysieren und weiterhin unter Zuhilfenahme des LSM einen Einblick in die dreidimensionale Struktur der Kultur zu erlangen. Die überwiegende Anzahl der VIC innerhalb der mECM-Kulturen stellten sich als vitale Zellen mit den für sie charakteristischen dendritischen Zellausläufern dar (Abb. 12). Es zeigte sich, dass die VIC mit ihren Zellausläufern im dreidimensionalen Raum ein sehr engmaschiges Zellgeflecht ausbildeten und hierüber miteinander in einer engen räumlichen Beziehung zueinander stehen. Dieser Eindruck wurde durch die H&E-Färbung nicht suggeriert, da hier lediglich die Zellkerne - und diese nur in einer Ebene - abgebildet werden konnten. Übereinstimmend mit den histologischen Färbungen konnten auch im Life/Dead Assay je nach Areal unterschiedliche Zelldichten nachgewiesen werden. Zu den Unterschieden in den einzelnen Kultivierungsbedingungen ließ sich diesbezüglich keine Aussage treffen. Auffällig war eine relativ hohe Anzahl an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen in den mit TGF β stimulierten Kulturen (Abb. 12C). Darüber hinaus glichen sich die mECM-Kulturen unterschiedlicher Behandlungsgruppen weitestgehend.

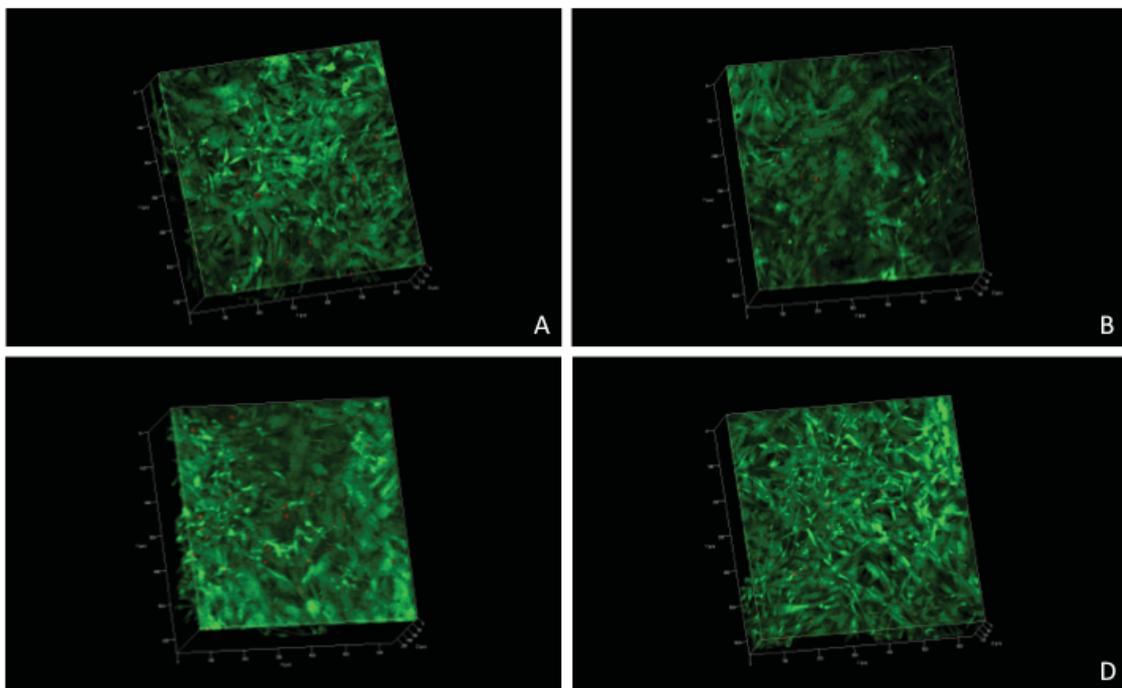


Abb. 12: Darstellung von mECM-Kulturen im LSM nach Inkubation mit Calcein-Acetoxyethyl und Ethidiumhomodimer im Life/Dead-Assay. A: Basalkondition. B: CaCl₂-Kondition. C: TGF β -Kondition. D: VEGF-Kondition. In allen Konditionen stellt sich der überwiegende Anteil der VIC als lebende Zellen dar, welche in enger topographischer Beziehung zueinander stehen. Vereinzelt treten – insbesondere unter TGF β -Stimulation – tote Zellen auf. Grün = vitale Zellen, rot = tote Zellen; Skalierung = 100 μ m auf der X- bzw. Y-Achse; 60 μ m (A, B), 50 μ m (C), 40 μ m (D) auf der Z-Achse.

5.2.2 Quantitative Analyse der Apoptoserate

Um die Apoptoserate unter den einzelnen Stimulationsbedingungen zu quantifizieren, wurde auf Proteinebene der Gehalt des Apoptosemarkers *cleaved Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)* analysiert. Hierbei handelt es sich um ein nukleäres Enzym, welches bei starker Schädigung der DNA, wie etwa beim Zellertrag durch Caspasen gespalten und inaktiviert wird. Das Vorhandensein der gespaltenen Form von *PARP* (sog. *cleaved PARP*) korreliert mit dem Ausmaß des Zellertrags innerhalb der jeweiligen Kultur.

Die Stimulation mit reinem CaCl_2 -Medium zeigte verglichen mit der Basalbedingung keinen Effekt auf die Apoptoserate in den mECM-Kulturen. Auch in der VEGF-Behandlungsgruppe entsprach die Apoptoserate in etwa jener der Kontrollgruppe und unterschied sich nicht wesentlich von mECM-Kulturen, die mit CaCl_2 -Medium stimuliert wurden. Unter Stimulation mit $\text{TGF}\beta$ hingegen zeigte sich ein deutlicher Anstieg von *cleaved PARP* in den mECM-Kulturen auf das etwa 2,3-fache der Basalbedingung, wobei die Apoptose signifikant gegenüber der VEGF-Kondition und der CaCl_2 -Kondition erhöht war. Somit zeigte sich ein klarer, proapoptotischer Effekt von $\text{TGF}\beta$ auf die mECM-Kulturen (Abb. 13).

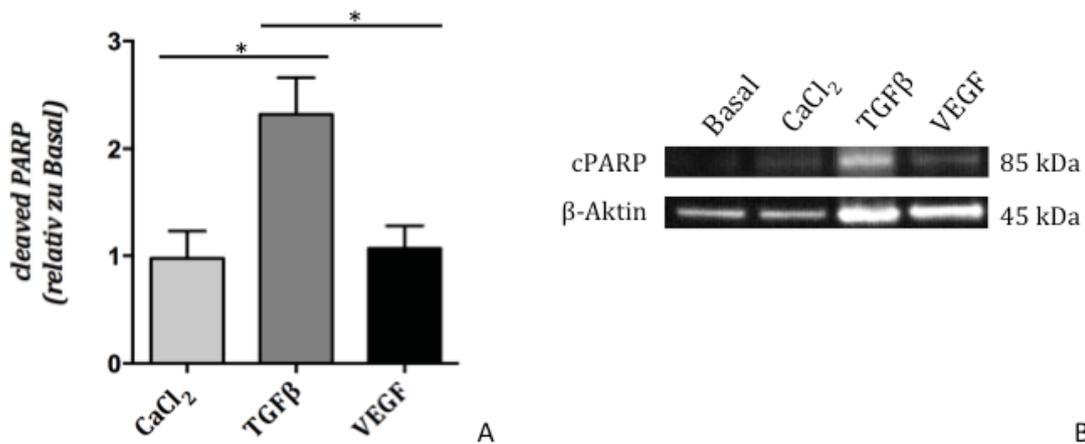


Abb. 13: Quantitative Analyse der Apoptoserate mittels *cleaved PARP* Westernblot. A: Statistische Auswertung der Bandenintensitätsbestimmung. Es zeigt sich ein klarer Effekt von $\text{TGF}\beta$ auf den Gehalt an *cleaved PARP* und somit auf die Apoptoserate, welcher sich in einer Erhöhung des *cleaved PARP*-Gehalts um das 2,3-fache gegenüber der Basalbedingung manifestiert und sich signifikant von der CaCl_2 - bzw. VEGF-Behandlungsgruppe unterscheidet. Die Apoptoserate unter der Behandlung mit CaCl_2 -Medium (0,97-fache der Basalkondition) bzw. mit VEGF-haltigem Medium (1,02-fache der Basalkondition) entsprechen der Apoptoserate unter Basalbedingung und unterscheiden sich somit weder von dieser noch untereinander. $n = 5$; * $p \leq 0,05$; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Die Resultate der Behandlungsgruppen wurden auf die Kontrollgruppe (Basalkondition) bezogen. B: Repräsentatives Bandenmuster eines *cleaved PARP* Westernblots und der internen Ladekontrolle durch β -Aktin.

5.3 Matrixkalzifizierung

5.3.1 Von Kossa Färbung

Mit Hilfe der Von Kossa Färbung wurden phosphatbasierte Mineralisationsprozesse in der mECM nachgewiesen. Die Matrix wies eine ungleichmäßig starke beige-bräunliche Färbung unter allen Kultivierungsbedingungen auf. Stellenweise konnten Mikrokalzifizierungsprozesse mit lokal begrenztem, braun-schwarzen Farbumschlag gezeigt werden (Abb. 14).

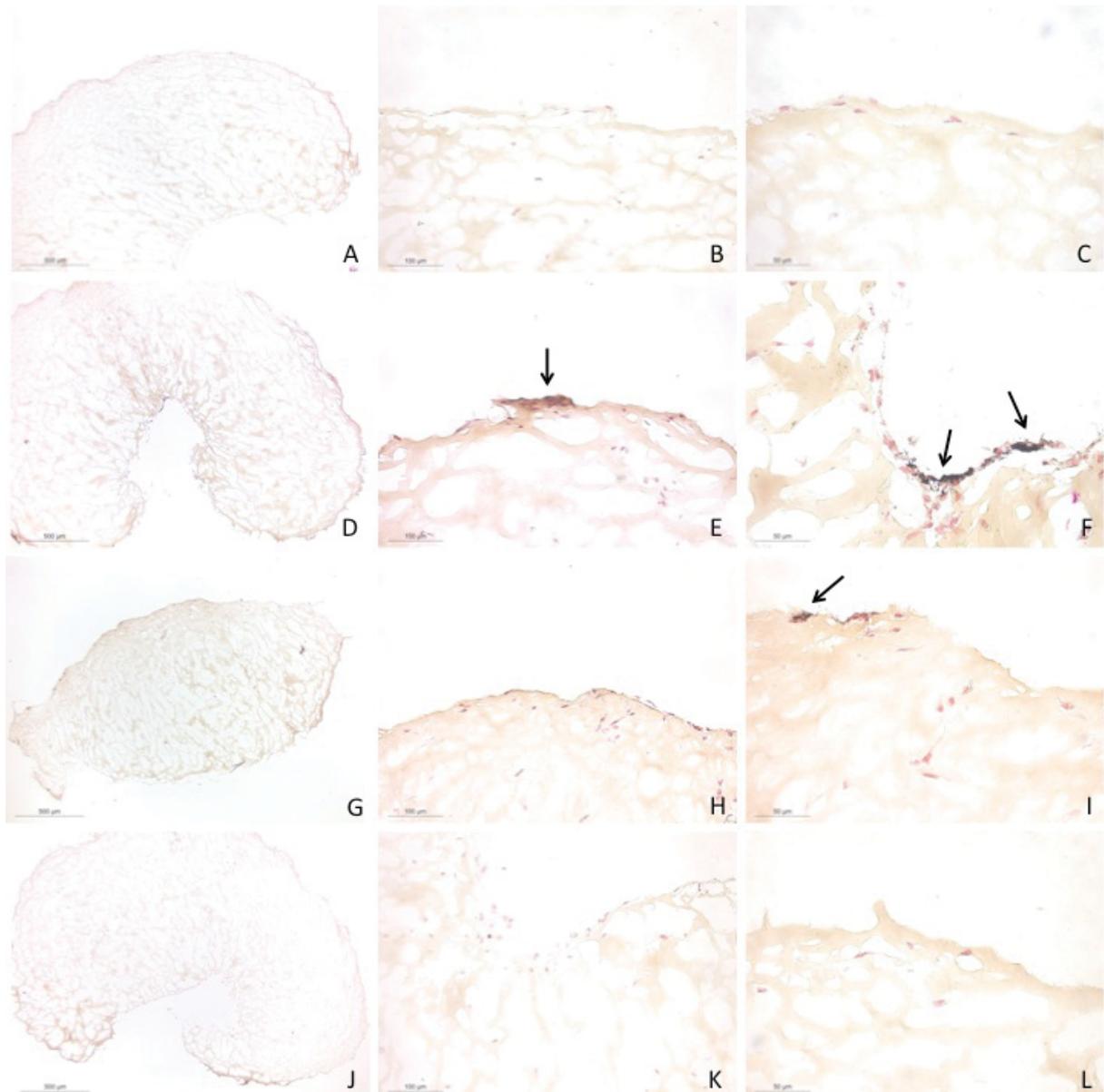


Abb. 14: Von Kossa Färbung der mECM-Kulturen nach einwöchiger Kultivierung. A, B, C: Basalkondition; D, E, F: CaCl_2 -Kondition; G, H, I: TGF β -Kondition; J, K, L: VEGF-Kondition. Die Matrix der mECM zeigt unter allen Bedingungen eine bläss-bräunliche Farbanreicherung. Z.T sind in den peripheren Kulturarealen beginnende Kalzifizierungsprozesse zu erkennen (Pfeile). Beige-braun = Phosphatanreicherung, schwarz = Kalzifizierungsherde, rot = Zellkerne; Maßstäbe = 500 μm (A, D, G, J), 100 μm (B, E, H, K) und 50 μm (C, F, I, L).

Eine starke flächige Schwarzfärbung im Sinne einer essentiellen Kalzifizierung der ECM wurde allerdings in keiner der Kulturen beobachtet.

Zwischen den einzelnen Kulturbedingungen ergaben sich histologisch keine markanten Unterschiede. Beginnende Kalzifizierungsprozesse waren vornehmlich in randständigen Kulturbereichen zu beobachten, allerdings waren diese Befunde sowohl zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen als auch innerhalb dieser nicht konstant zu beobachten.

5.3.2 Kalzium-Assay

Der Kalziumgehalt innerhalb der mECM-Kulturen wurde als Indikator für Mineralisierungsvorgänge mittels Kalzium-Assay gemessen. Zunächst ließ sich unter allen Behandlungsgruppen der Trend einer erhöhten Kalziumkonzentration gegenüber der mit Basalmedium kultivierten Kontrollgruppe feststellen. Dieser Effekt war signifikant für mECM-Kulturen, welche CaCl_2 -Medium oder VEGF-Medium stimuliert worden waren. Hier zeigte sich eine Erhöhung der Kalziumkonzentration um das 2- bis 3-fache verglichen mit der Basalbedingung. Dabei war der Kalziumgehalt mit einer mittleren Kalziumkonzentration von etwa 3,4 mg/dl unter VEGF-Behandlung der mECM-Kulturen am höchsten.

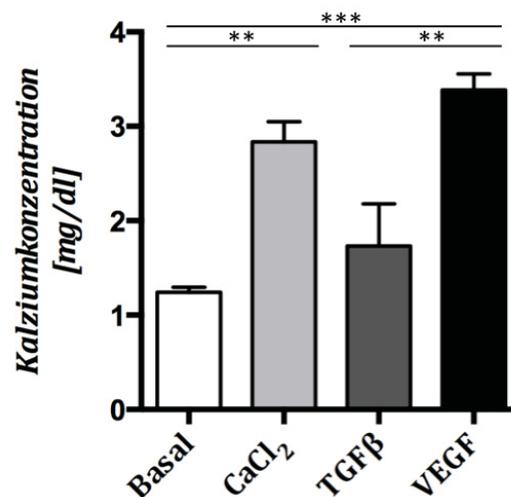


Abb. 15: Bestimmung des Kalziumgehalts in mECM-Kulturen mit einem Ausgangsvolumen von 300 μl mittels Kalzium-Assay. Die Kalziumkonzentration ist in allen Konditionen gegenüber der Basalkondition ($1,2 \pm 0,05$ mg/ dl) erhöht. Signifikant ist dieser Anstieg für CaCl_2 - ($2,8 \pm 0,21$ mg/ dl) und VEGF-behandelte mECM-Kulturen ($3,4 \pm 0,17$ mg/ dl), wobei der mittlere Kalziumgehalt in der VEGF-Behandlungsgruppe am größten ist und sich auch gegenüber der TGF β -Behandlungsgruppe ($1,7 \pm 0,45$ mg/ dl) signifikant unterscheidet. $n = 5$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

5.4 Myofibroblastische Transdifferenzierung

5.4.1 Immunhistologischer Nachweis von α -SMA

Zur Beurteilung des Vorkommens sowie der Verteilung von α -SMA innerhalb der Kultur wurden immunhistochemische Färbungen gegen α -SMA angefertigt. Dabei handelt es sich um einen charakteristischen Marker für myofibroblastische Transdifferenzierung, welchen VIC insbesondere im aktivierten Zustand (aVIC) aufweisen (Abb. 16).

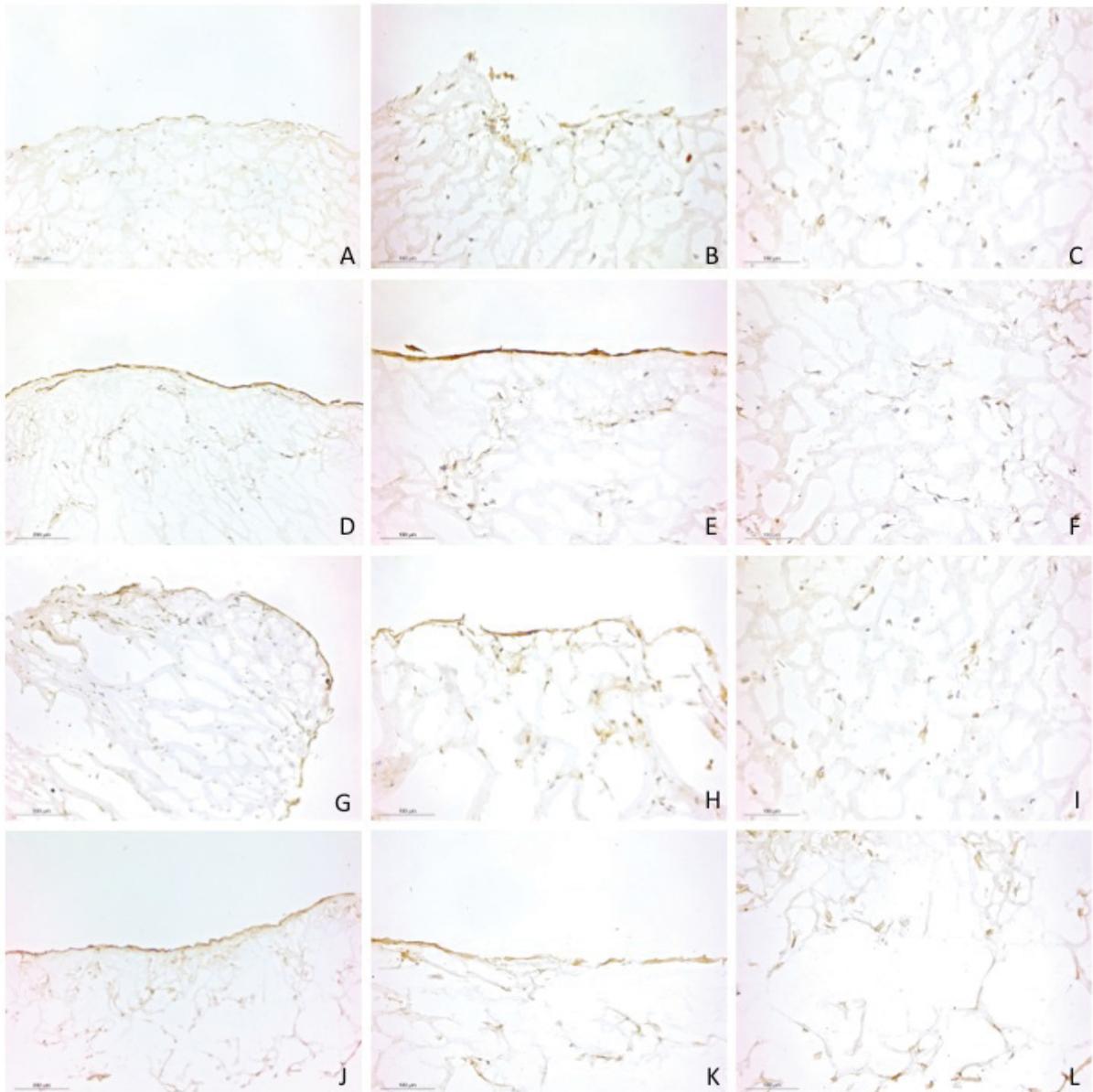


Abb. 16: Immunhistologische α -SMA-Färbung der besiedelten mECM-Kulturen. A, B, C: Basalbedingung; D, E, F: CaCl₂-Bedingung; G, H, I: TGFβ-Stimulation; J, K, L: VEGF-Stimulation. Dargestellt sind jeweils Übersichtsaufnahmen (A, D, G, J), periphere (B, E, H, K) und zentrale Bereiche der mECM-Kultur. Unter allen Bedingungen zeigen die peripheren Kulturareale ein stark positives α -SMA-Signal. Auch zentral finden sich α -SMA-positive Zellen, jedoch in geringerem Maße als peripher. 10-fache Vergrößerung. Braun = α -SMA, blau = Zellkerne; Maßstab = 200 μ m (A, D, G, J) bzw. 100 μ m (B, C, E, F, H, I, K, L).

In allen Kulturen und unter allen Stimulationsbedingungen konnte das Signal für α -SMA in den VIC detektiert werden. Hierbei fiel auf, dass besonders an der Kulturoberfläche ein kräftiges α -SMA-Signal auszumachen war. Dabei präsentierte sich an mehreren Stellen ein langstreckiger Signalverlauf welcher eine ausgeprägte myofibroblastische Transdifferenzierung der äußersten VIC-Schicht in den mECM-Kulturen suggeriert (Abb. 16B, E, H und K). Zentral gelegene VIC exprimierten α -SMA in wesentlich geringerem Maße. Nichtsdestotrotz fanden sich auch hier α -SMA-positive Zellen (Abb. 16C, F, I und L).

5.4.2 Quantitative Analyse von α -SMA auf Protein- und Genexpressionsebene

Mittels Westernblot wurde der α -SMA-Gehalt der Zellen unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen semi-quantitativ bestimmt. Hierbei zeigte sich eine leichte Erhöhung des Markers in mit CaCl_2 -Medium und TGF β stimulierten mECM gegenüber der Basalkondition. Die Stimulation mit VEGF hingegen führte zu einer signifikanten Senkung des α -SMA-Gehalts um knapp die Hälfte in Relation zur Basalkondition und auf etwa ein Drittel des α -SMA-Gehalts in mit CaCl_2 - oder TGF β -Medium stimulierten mECM-Kulturen (Abb. 17A und B). Auf Genexpressionsebene hingegen konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen festgestellt werden (Abb. 17C). Die Menge der α -SMA-Amplifikationsprodukte in der PCR entsprach jeweils – unter Berücksichtigung physiologischer Schwankungen – der Kontrollgruppe (Abb. 17C).

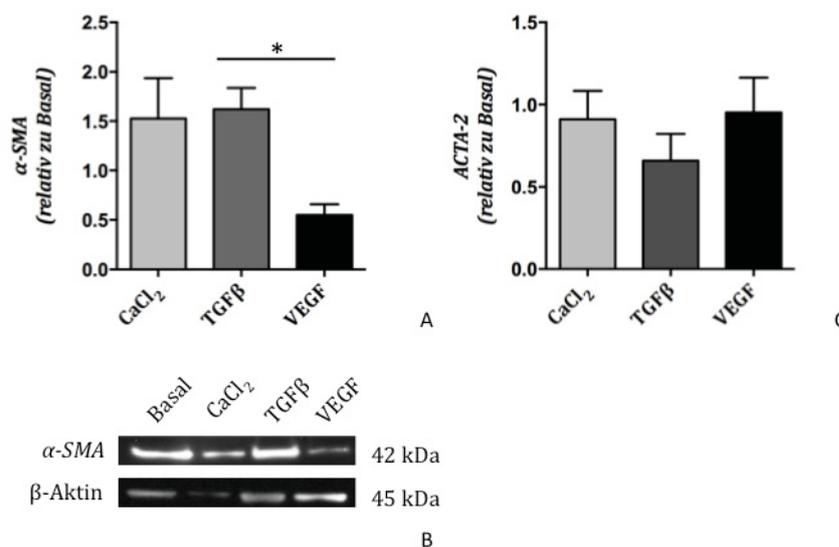


Abb. 17: Quantifizierung des α -SMA-Gehalts der mECM-Kulturen auf Protein- und Genexpressionsebene. A: Statistische Auswertung der Bandenmuster in der Westernblot-Analyse für α -SMA. Während die α -SMA-Expression unter Stimulation mit CaCl_2 -Medium ($1,53 \pm 0,41$) und TGF β ($1,61 \pm 0,21$) auf etwa das 1,5-fache der Genexpression in der Kontrollgruppe erhöht ist, reduziert sie sich unter VEGF-Behandlung auf etwa die Hälfte der Basalbedingung ($0,55 \pm 0,11$). $n = 5$; * $p \leq 0,05$. B: Repräsentatives Bandenmuster für α -SMA-Westernblot und Ladekontrolle mit β -Aktin. C: Graphische Darstellung der α -SMA-Genamplifikation in der PCR-Analyse. Die Werte der einzelnen Behandlungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. $n = 6$; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

5.5 Expression und Aktivität von MMP2 und MMP9

5.5.1 *In situ* Zymographie

Mittels *in situ* Zymographie konnte die enzymatische Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9 innerhalb des Präparates lokalisiert werden. Das Verteilungsmuster ließ auf den ersten Blick erkennen, dass enzymatische Aktivität vornehmlich in der unmittelbaren Umgebung von Zellen vorhanden war. Dort, wo keine Zellen lagen, konnte auch kein Aktivitätssignal nachgewiesen werden. Allerdings war im Umkehrschluss nicht um alle Zellen ein perizelluläres MMP-Signal auszumachen. So wiesen einige VIC in ihrer Umgebung – insbesondere wenn sie vereinzelt vorlagen – keinerlei enzymatische Aktivität auf. Demgegenüber präsentierte sich im Bereich von Zellen, welche im Verbund arrangiert waren oder Zellagglomerate bildeten eine übermäßig starke MMP-Aktivität. Diese Aktivitätsfoci um Zellagglomerate konnten insbesondere bei mit TGF β stimulierten Kulturen dargestellt werden. Weiterhin stellte sich das Aktivitätssignal entsprechend der oben beschriebenen Zellverteilung innerhalb der Matrix in peripheren Arealen stärker als in zentralen Kulturbereichen dar (Abb. 18).

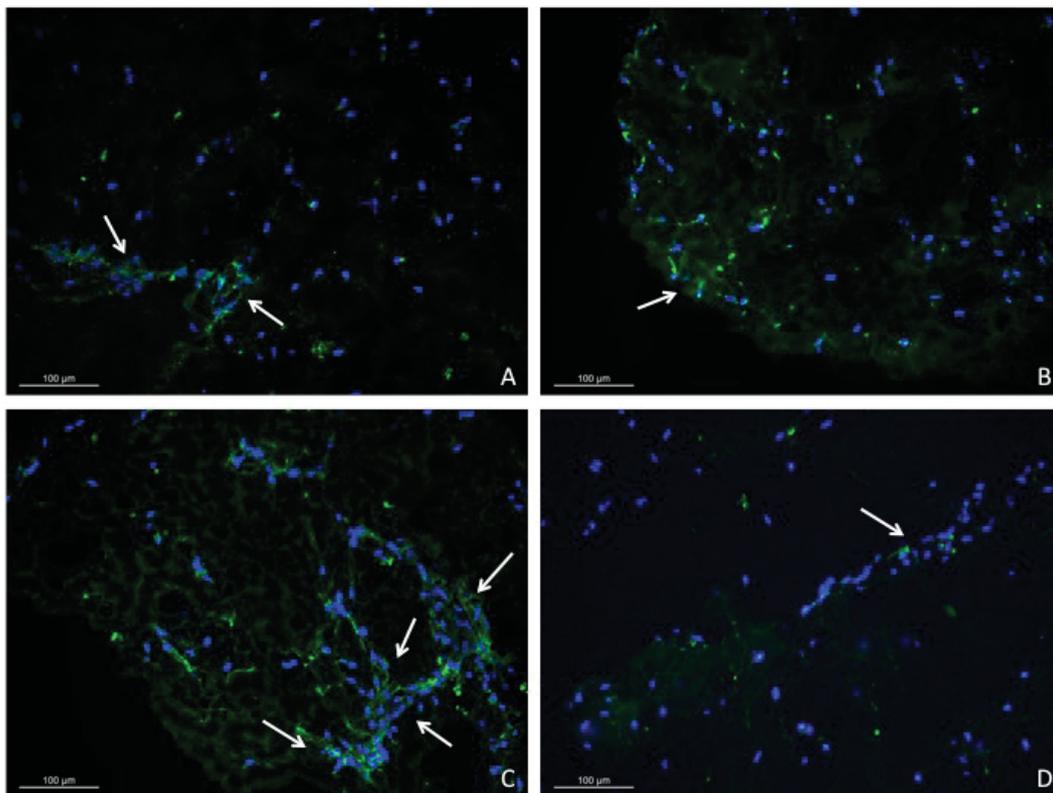


Abb. 18: *In situ* Zymographie von mECM-Kulturen nach Stimulation mit Basal- (A), CaCl₂- (B), TGF β - (C) und VEGF-Medium (D). Die *in situ* Zymographie zeigt keine konstant beobachtbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bezüglich der Gesamt-MMP-Aktivität. Es lässt sich jedoch feststellen, dass hohe Enzymaktivität mit einer hohen Zelldichte assoziiert ist. Pfeile deuten auf ein perizellulär erhöhtes MMP-Signal in der Umgebung solcher Zellagglomerationen. Grün = enzymatische Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9, blau = Zellkerne (DAPI); Maßstäbe = 100 μ m.

5.5.2 *In situ* Zymographie mit immunhistologischer Vimentin-Gegenfärbung

Zur näheren Betrachtung und Validierung der topographischen Beziehung zwischen VIC und MMP-Signal wurde eine fluoreszenzbasierte, immunhistologische Vimentin-Gegenfärbung im Anschluss an die *in situ* Zymographie vorgenommen (Abb. 19). Dabei handelt es sich um einen fibroblastentypischen Marker, welcher Zytoplasmaanteile der VIC kennzeichnet. Wie erwartet konnte gezeigt werden, dass sich um die DAPI-gefärbten Zellkerne ein Vimentinsignal präsentierte. Topographisch bestand eine enge Beziehung zwischen dem Vimentinsignal und der MMP-Aktivität, wobei auch eine extrazelluläre Komponente des MMP-Signals auszumachen war.

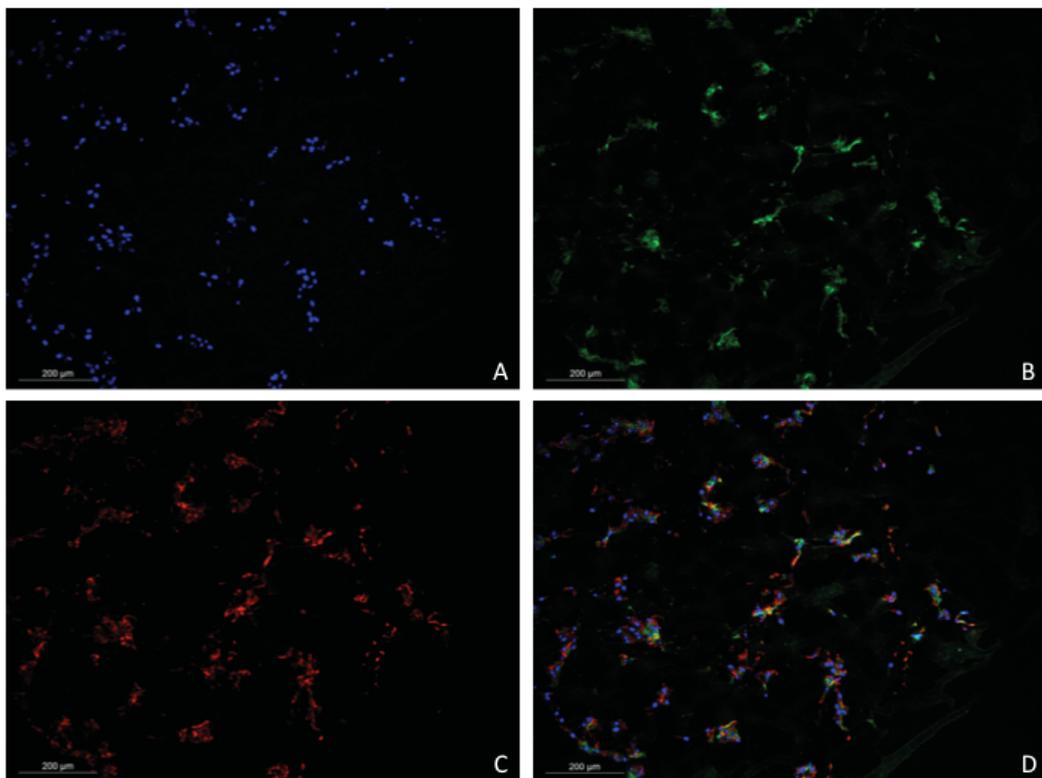


Abb. 19: Vimentin-Gegenfärbung nach *in situ* Zymographie. Dargestellt ist das Präparat einer TGF β -behandelten mECM-Kultur. A: Zellkerne (DAPI, blau), B: Vimentin (rot), C: enzymatische Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9 (grün), D: Overlay. Es präsentiert sich eine enge topographische Assoziation von Zellkernen, Vimentinverteilung und enzymatischer MMP-Aktivität. Maßstab = 200 μ m.

5.5.3 Quantitative Analyse von MMP2 auf Protein- und Genexpressionsebene

Zur Quantifizierung der MMP2-Expression innerhalb der dreidimensionalen mECM-Kulturen wurden sowohl Westernblot- als auch PCR-Analysen durchgeführt. Der absolute Protein- bzw. RNA-Gehalt in den Behandlungsgruppen wurde in Relation zur jeweiligen Kontrollgruppe gesetzt. Dabei unterschieden sich weder die Proteinmenge noch die Genamplifikate signifikant voneinander und schwankten bei einer relativ breiten Streuung der Werte um den MMP2 Gehalt in Basalkulturen.

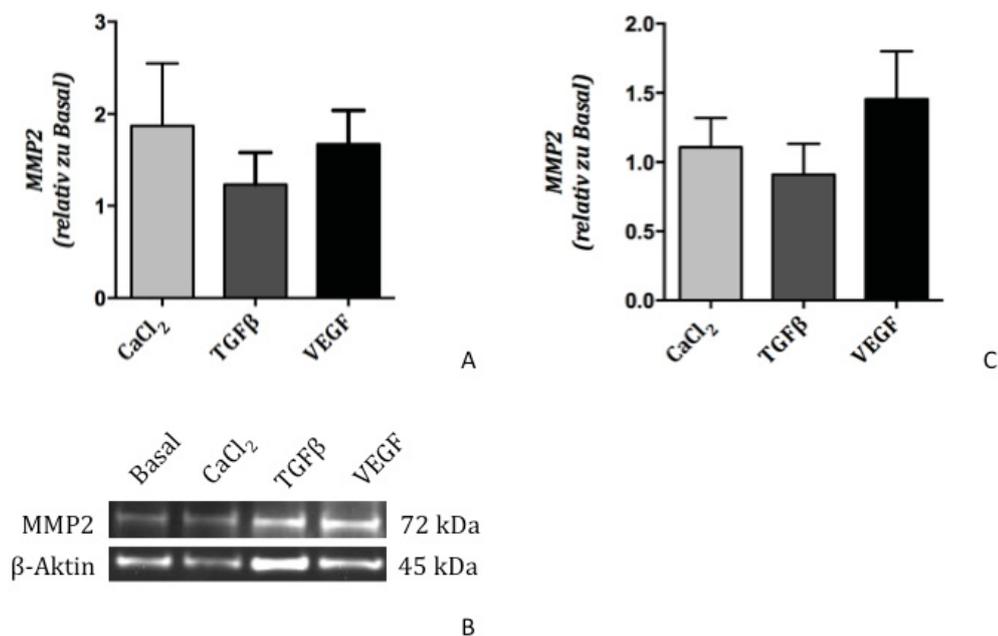


Abb. 20: Quantifizierung des MMP2-Gehalts der mECM-Kulturen auf Protein- und Genexpressionsebene. A: Statistische Auswertung der Westernblot-Analyse. Ergebnisse sind auf die Basalbedingung normiert. Unter den Behandlungsgruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des MMP2-Proteingehalts. Bei einer relativ weiten Streuung der Ergebnisse liegen die Werte zwischen dem 1,23-fachen ($\pm 0,35$, TGFβ) und dem 1,87-fachen ($\pm 0,68$, CaCl₂) der Kontrollgruppe. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 6$. B: Abbildung eines repräsentativen Westernblot-Bandenmusters für MMP2. C: Quantifizierung der Genamplifikation nach $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Die Ergebnisse decken sich mit der Westernblot-Analyse und weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen auf. Im Verhältnis zur Kontrollgruppe zeigen sich ebenfalls keine Effekte, die Mittelwerte (CaCl₂ = 1,11 \pm 0,56; TGFβ = 0,91 \pm 0,22; VEGF = 1,45 \pm 0,35) entsprechen in etwa der Kontrolle. $n = 6$; dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

5.6 Expression von OPN und CD73

5.6.1 Quantitative Analyse der OPN-Expression auf Proteinebene

Mittels Westernblot und PCR-Methode wurde der Einfluss der unterschiedlichen Stimulationsbedingungen auf die OPN-Expression in den mECM untersucht (Abb. 21). Im Westernblot zeigten sich dabei zwei dominante Banden je bei 44 kDa und bei 60 kDa. Dabei repräsentiert die 44 kDa-Banden unphosphoryliertes, die Bande bei 60 kDa phosphoryliertes OPN. Weder durch die Kultivierung mit CaCl₂-Medium noch durch die Zugabe der Zytokine TGFβ oder VEGF ließ sich ein signifikanter Effekt auf die OPN-Expression nachweisen. Diese Beobachtung konnte sowohl für phosphoryliertes als auch für unphosphoryliertes OPN machen. Während dabei der Gehalt an phosphoryliertem OPN in allen Behandlungsgruppen der Basalkontrolle entsprach, wurde in TGFβ-stimulierten mECM-Kulturen – bei einer großen Streubreite – ein nahezu doppelt so hoher Gehalt an unphosphoryliertem OPN wie in der Basalkondition beobachtet (Abb. 21C; $1,98 \pm 0,50$). Die Mittelwerte der mit CaCl₂- oder VEGF-Medium stimulierten mECM-Kulturen unterschieden sich nur unwesentlich von der Kontrollgruppe (CaCl₂-Medium: $1,28 \pm 0,33$; VEGF: $1,05 \pm 0,26$).

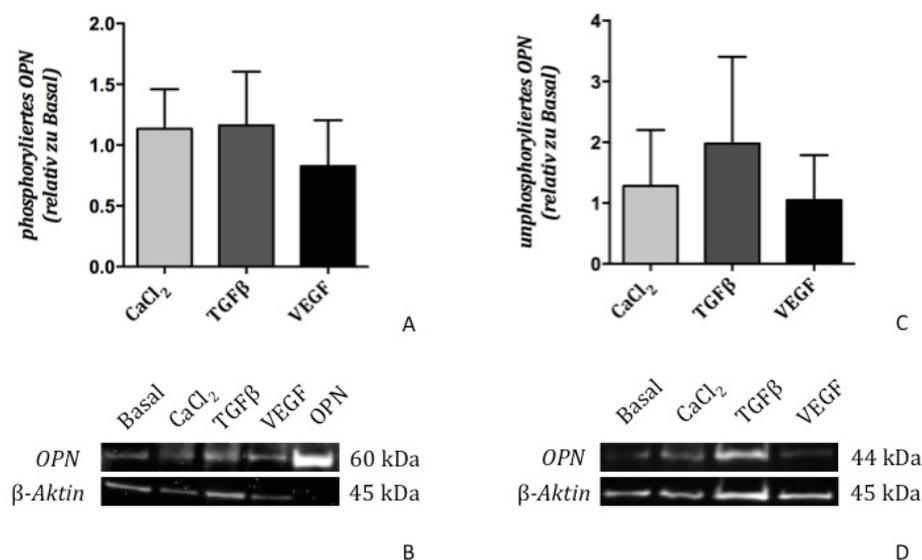


Abb. 21: Quantifizierung von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem OPN mittels Westernblot-Analyse. A: Graphische Darstellung des Gehalts an phosphoryliertem OPN (60 kDa). Der Gehalt unterscheidet sich nicht wesentlich innerhalb der Gruppen und entspricht in etwa dem Gehalt der Basalkondition (CaCl₂-Medium: $1,13 \pm 0,33$; TGFβ: $1,16 \pm 0,44$; VEGF: $0,83 \pm 0,38$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 5$. B: Abbildung eines repräsentativen Bandenmusters für phosphoryliertes OPN bei 60 kDa, sowie für β-Aktin als Ladekontrolle (45 kDa). Industriell hergestelltes, bovines phosphoryliertes OPN dient als Kontrollbande. C: Graphische Darstellung des Gehalts an unphosphoryliertem OPN in den einzelnen Kultivierungsbedingungen. Auch auf die Expression des unphosphorylierten OPN haben die unterschiedlichen Stimulationen keinen signifikanten Effekt. Bei einer großen Streuung kann unter Stimulation mit TGFβ ein fast doppelt so hoher Gehalt an unphosphoryliertem OPN ($1,98 \pm 0,50$) wie in der Kontrollgruppe sowie den übrigen Behandlungsgruppen beobachtet werden. $n = 8$. D: Repräsentatives Bandenmuster für unphosphoryliertes OPN bei 44 kDa sowie β-Aktin als Ladekontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

5.6.2 PCR-Analyse der OPN- und CD73-Expression

PCR-Analysen zur Quantifizierung der OPN- und CD73-Expression wurden sowohl nach der Standard-Kultivierungszeit von 9 Tagen (davon 8 Tage Kultivierung unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen) als auch im zeitlichen Verlauf an d2, d4 und d6 der Kultivierung durchgeführt (Zeitreihe; Abb. 22). Hierdurch sollte evaluiert werden, ob eine vorzeitige und kurzfristige Hoch- oder Herunterregulation von OPN bzw. CD73 stattfindet, welche am Ende der Kultivierung nichtmehr detektiert werden kann. Weder für OPN noch für CD73 zeigte sich nach 8 Tagen ein signifikanter Effekt in den Behandlungsgruppen. Bei einer großen Streubreite zeichnete sich eine leichte Tendenz zur erhöhten Expression beider Marker unter VEGF-Stimulation ab, welche aber weder signifikant noch von hoher Effektstärke war (Abb. 22A und C). Auch im zeitlichen Verlauf waren durch die unterschiedlichen Behandlungen keine deutlichen Effekte auf die OPN- oder CD73-Genexpression zu sehen (Abb. 22B und D).

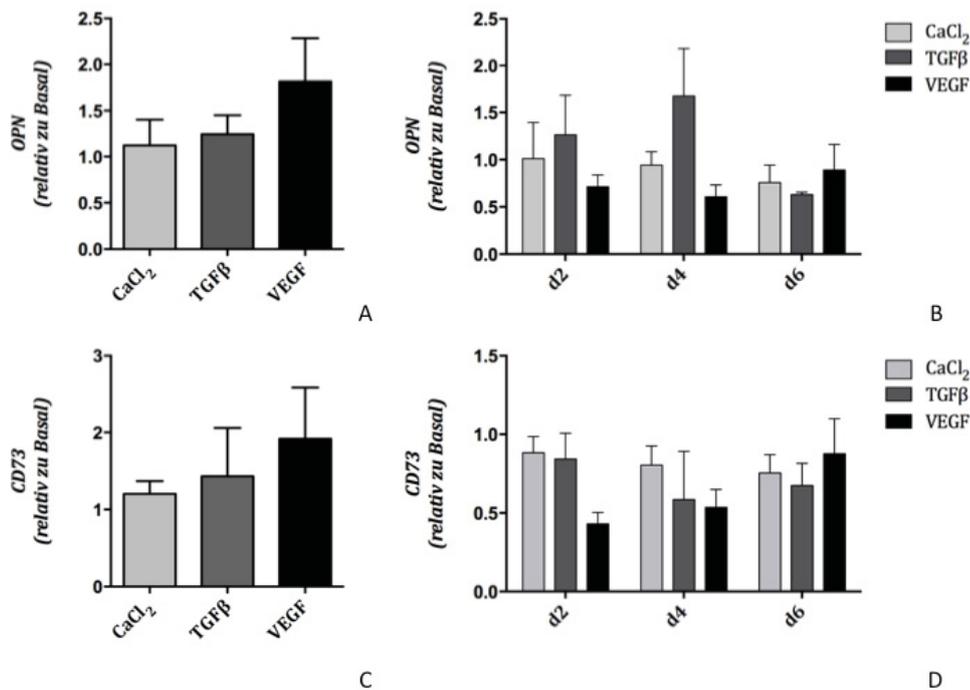


Abb. 22: PCR-Analyse der Genexpression von OPN und CD73. A: OPN-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kultivierungsbedingungen. $n = 6$. B: Genexpression von OPN über den zeitlichen Verlauf an Tag 2, 4 und 6 der Kultivierung. $n = 2-3$. C: OPN-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Es zeichnet sich eine Tendenz zur erhöhten CD73-Expression unter VEGF-Stimulation ab, welche angesichts der großen Streuung jedoch nicht eindeutig interpretierbar ist. $n = 6$. D: CD73-Genamplifikate zu den verschiedenen Zeitpunkten d2, d4 und d6; $n = 2-3$; dargestellt sind die Mittelwert mit Standardfehler. B, D: Aufgrund kleiner Gruppengrößen wurde nicht auf statistische Signifikanz getestet.

5.7 BCIP/NBT-Assay

Zum Nachweis der TNAP-Aktivität in den mECM-Kulturen wurde ein BCIP/NBT-Assay durchgeführt. Während unter basalen Konditionen vor allem randständige Zellen eine mäßige Aktivität der TNAP aufwiesen, fiel besonders in mit TGF β stimulierten mECM-Kulturen ein starkes TNAP-Aktivitätssignal auf. Dabei konnte sowohl peripher als auch zentral eine hohe Enzymaktivität beobachtet werden. Mit CaCl₂-Medium inkubierte mECM-Kulturen wiesen eine mäßige TNAP-Aktivität auf, das Aktivitätssignal war allerdings eindeutig geringer als in TGF β -stimulierten mECM. Unter Stimulation mit VEGF zeigte sich bezogen auf die gesamte Kultur kaum Enzymaktivität, sodass insbesondere zwischen den zytokinbehandelten Gruppen ein klarer Unterschied auszumachen war.

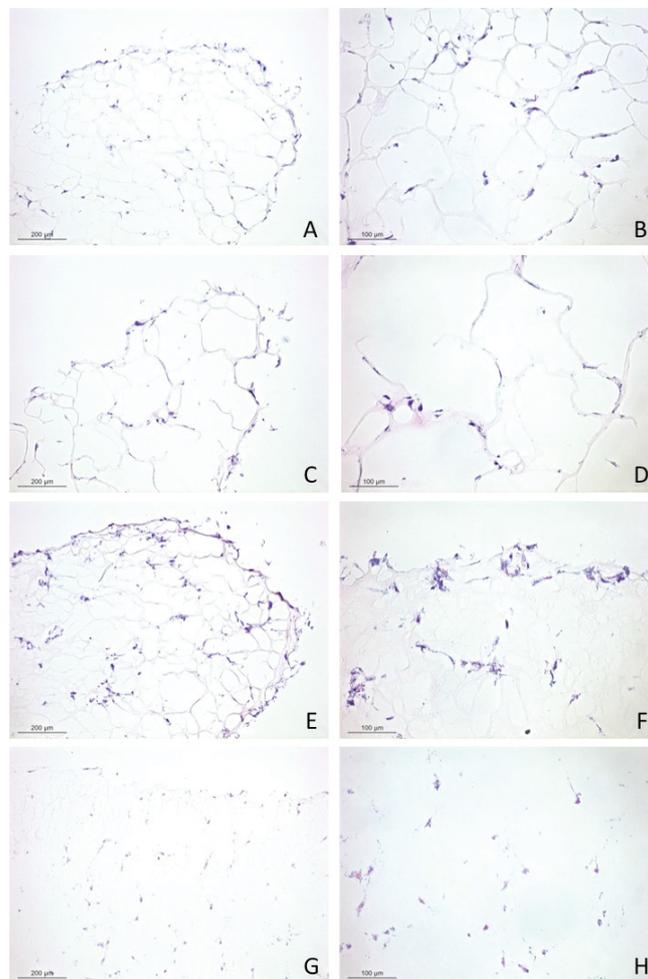


Abb. 23: Histologischer Nachweis der TNAP-Aktivität im BCIP/NBT-Assay. A, B: Basalbedingung; C, D: Stimulation mit CaCl₂-Medium; E, F: TGF β -Behandlung; G, H: VEGF-Behandlung. Während mit Basal- und CaCl₂-Medium stimulierte mECM-Kulturen eine eher mäßige TNAP-Aktivität, vermehrt in peripheren Arealen der Kultur zeigen, besteht ein klarer Unterschied zwischen der Zytokinbehandlung mit TGF β und VEGF. Dabei ist die höchste Enzymaktivität unter allen Behandlungsgruppen nach Stimulation mit TGF β vorzufinden. In dieser Behandlungsgruppe verteilen sich die Enzym-Aktivitätsfoci zudem auf die gesamte Matrix. Demgegenüber kann in VEGF-behandelten mECM-Kulturen so gut wie keine TNAP-Aktivität gezeigt werden. Blau = TNAP-Aktivität, rot = Zellkerne (Kernechtrot); Maßstab = 200 μ m (A, C, E, G) bzw. 50 μ m (B, D, F, H).

5.8 Matrixcharakterisierung der dECM

5.8.1 Gegenüberstellung verschiedener Dezellularisierungsverfahren

Durch den detergenzienbasierten Dezellularisierungsprozess ließ sich eine vollständig dezellularisierte Aortenklappenmatrix erstellen, welche den charakteristischen trilamellären Aufbau der nativen Aortenklappe beibehalten hatte. Somit stellte die dECM ein optimales Kultivierungsgerüst für 3D *in vitro* Versuche dar, da sie zum einen in ihrer Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit der physiologischen Klappenmatrix aufwies, zum anderen jedoch keinen wesentlichen Strukturverlust durch das Dezellularisierungsprotokoll erlitten hatte. Im Gegensatz dazu zeigte sich aus Vorversuchen mit einer rein enzymatischen Dezellularisierung der Aortenklappe durch Trypsinbehandlung über 48 h ein substanzieller Strukturverlust. Der Versuch, diesen durch eine Reduktion der Trypsinexpositionsdauer auf 24 h zu minimieren führte zu einer unzureichenden Dezellularisierung der Aortenklappe. Damit wurde das detergenzienbasierte („Hannoveraner“) Dezellularisierungsprotokoll als Grundlage zur Herstellung von dECM für weitere Experimente gewählt.

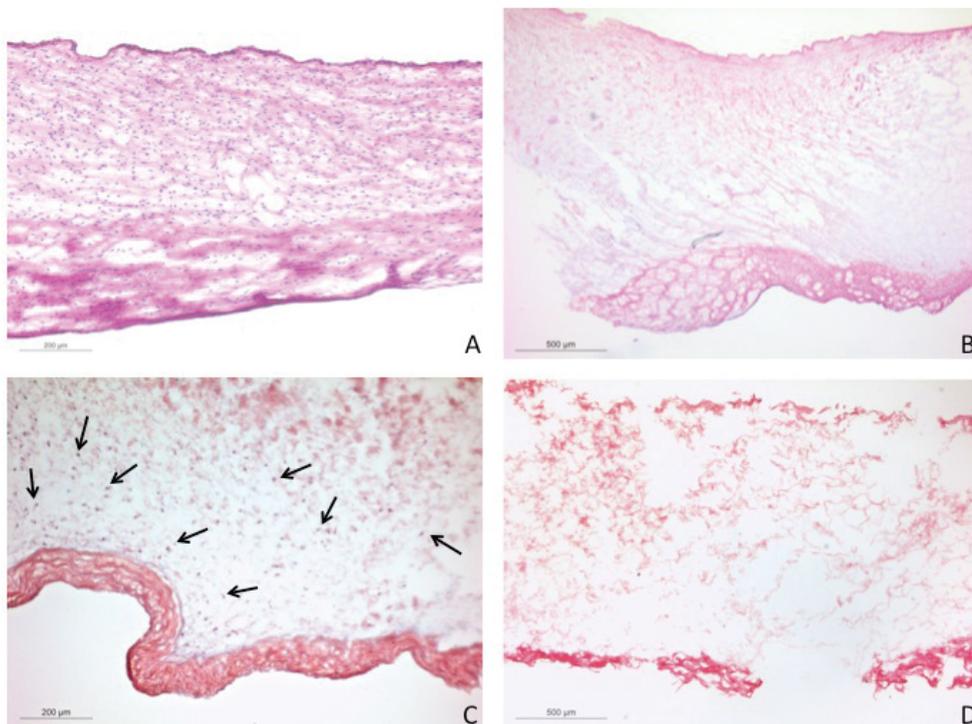


Abb. 24: Dezellularisierungskonzepte. Dargestellt sind H&E-Färbungen von Aortenklappensegeln vor und nach unterschiedlichen Dezellularisierungsverfahren. A: Natives ovines Aortenklappensegel nach Explantation. Die valvuläre Matrix ist flächendeckend und homogen von VIC besiedelt. Diese weisen eine hohe Zelldichte auf. B: Aortenklappensegel nach detergenzienbasierter Dezellularisierung (dECM). Durch dieses Verfahren ist eine weitestgehende Zellfreiheit der Matrix bei gutem Erhalt der charakteristischen, trilamellären Struktur des Segels möglich. C: Eine enzymatische Dezellularisierung durch 24-stündige Inkubation mit Trypsin führt zur unzureichenden Entfernung von Zellkernen und Zelldebris aus der Matrix (Pfeile). D: Diese wird bei längerer Inkubationsdauer (hier 48 h) durch einen massiven Strukturverlust erkaufte. Rot = Kollagen, blau = Zellkerne; Maßstab = 200 µm (A, C) bzw. 500 µm (B, D).

5.8.2 Trypsinbehandlung der dECM

Um den Effekt einer kurzzeitigen Trypsininkubation der dECM auf die einzelnen ECM-Bestandteile zu evaluieren, wurden *Picro-Sirius Red* und Movat's Pentachrom-Färbungen durchgeführt. Sowohl nach 30-minütiger Inkubation mit konzentriertem (100 μM , Abb. 25B) als auch mit verdünntem (10 μM , Abb. 25C) Trypsin konnte der Erhalt der charakteristischen, trilamellären Matrixstruktur mit dichter gepackten Kollagenfasern in den *laminae ventricularis et fibrosa* sowie lockerer gepackten Kollagenanteilen in der *lamina spongiosa* dazwischen beobachtet werden (Tabelle 12). Dieses Verteilungsmuster entspricht der dECM-Struktur ohne Trypsininkubation (Abb. 25A) und im Wesentlichen auch der physiologischen valvulären Matrix. Auch in der Movat's Pentachrom-Färbung stellten sich keine erheblichen Unterschiede bezüglich der Klappentextur dar (Abb. 25D-F). Die Verteilung der Matrixkomponenten entsprach sowohl nach der detergentenbasierten Dezellularisierung (Abb. 25D) als auch nach zusätzlicher Inkubation mit verdünntem (Abb. 25E) und konzentriertem Trypsin (Abb. 25F) über 30 min der physiologischen Situation mit einem hohen Anteil an Glykosaminoglykanen in der *lamina spongiosa* (blau-türkis) sowie prädominanten Kollagenanteilen in der *lamina ventricularis* und *fibrosa* (grün).

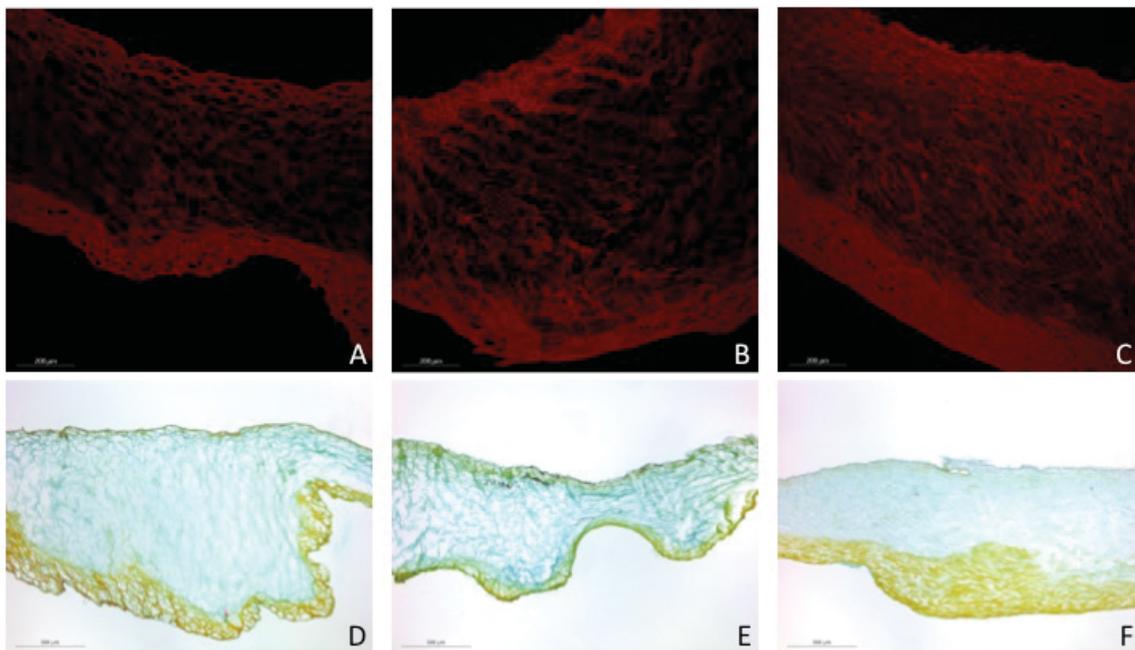


Abb. 25: Strukturert der dECM nach kurzzeitiger Trypsininkubation. A, D: dECM ohne Trypsinbehandlung; B, E: 30 min Inkubation mit verdünntem Trypsin (10 μM); C, F: 30 min Inkubation mit konzentriertem Trypsin (100 μM). In der *Picro-Sirius Red* Färbung (A-C, rot = Kollagenfasern) zeigt sich der charakteristische, trilamelläre Aufbau der valvulären Matrix unter allen Konditionen erhalten, mit locker gepackten Kollagenanteilen in der *lamina spongiosa* und dicht gepackten Kollagenfasern in den *laminae fibrosa et ventricularis*. Auch die Movat's Pentachrom-Färbung zeigt den Erhalt des physiologischen Klappenaufbaus nach detergentenbasierter Dezellularisierung (D) und additiver Trypsinbehandlung (E, F) mit hohem Glykosaminoglykangehalt der lamina spongiosa (blau-türkis) und kollagengeprägter ECM in der *lamina fibrosa* und *ventricularis* (grün); Maßstab = 200 μm (A-C) bzw. 500 μm (D-E) (Hof et al., *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016 ⁷⁸).

Für eine tiefere Untersuchung des Einflusses von Trypsin auf die einzelnen Matrixkomponenten wurde mithilfe der *Picro-Sirius Red/Fast Green-Färbung* sowie einer anschließenden kolorimetrischen Auswertung die topographische Verteilung und das Verhältnis von nicht-kollagenen Proteinen und Kollagen innerhalb der dECM analysiert. Während nach der detergentenbasierten Dezellularisierung noch ein relativ hoher Gehalt an nicht-kollagenen Proteinen in der Matrix vorhanden war (Abb. 26A), führte eine zusätzliche Inkubation insbesondere mit konzentriertem Trypsin zu einer signifikanten Reduktion der nicht kollagenen Proteine (Abb. 26B, C und F). Dabei konnte in unbehandelten dECM insbesondere in der *lamina fibrosa* ein hoher nicht-kollagener Anteil der Matrixkomponenten beobachtet werden (Abb. 26A). Auffällig ist hier ebenfalls die Darstellung eines oberflächlichen, grünlich kolorierten Saumes im Sinne nicht-kollagener Basalmembran-Anteile (Laminin, Proteoglykane), welcher nach Trypsinbehandlung nicht mehr erkennbar ist.

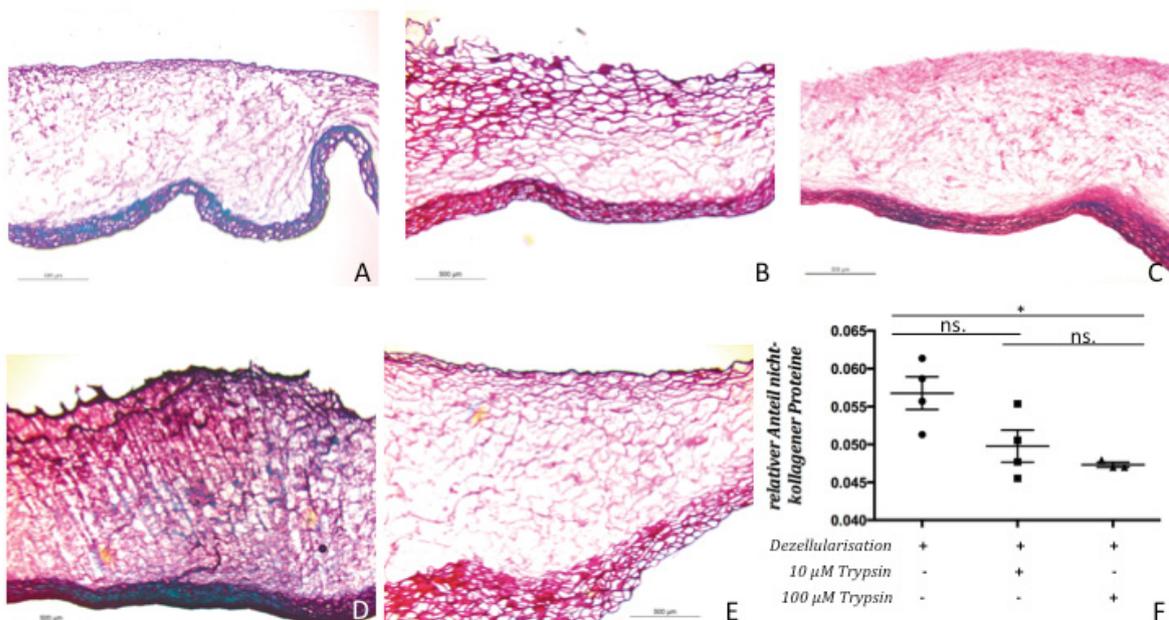


Abb. 26: Der Effekt von Trypsin auf den Gehalt unterschiedlicher Proteingruppen in der dECM. A-E: *Picro-Sirius Red/Fast Green-Färbung* (rot = Kollagen, grün = nicht-kollagene Proteine). F: Relative kolorimetrische Quantifizierung der einzelnen Proteingruppen. Dargestellt ist der Anteil nicht-kollagener Proteine am Gesamtproteingehalt (nicht-kollagene Proteine + Kollagen). Durch eine zusätzliche Trypsinbehandlung mit verdünntem (10 μM, B) und insbesondere konzentriertem Trypsin (100 μM, C) kann der relative Gehalt von nicht-kollagenen Proteinen im Vergleich zu unbehandelten dECM (A) signifikant reduziert werden (F). Während eine 24-stündige Trypsininkubation nativer Aortenklappensegel hohe nicht-kollagene Proteinrückstände zur Folge hat (D), kann durch 48 h Trypsininkubation der nicht-kollagen-Anteil ebenfalls deutlich reduziert werden (E). Maßstäbe = 500 μm, n = 3-4; * p ≤ 0,05; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (Hof et al., *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016 ⁷⁸).

Auch die *lamina fibroreticularis* enthält zahlreiche nicht kollagene Proteine und Proteoglykane wie das Versican. Beschränkt man den Dezellularisierungsprozess auf rein enzymatische Verfahren, so ist nach 24 h Trypsininkubation noch ein relativ hoher Gehalt nicht-kollagener Proteine in der Matrix zu erkennen (Abb. 26D), welcher am ehesten auf eine insuffiziente Dezellularisierung mit massiven Zellresten in der Matrix zurückzuführen ist (Vgl. Abb. 24C). Demgegenüber ist durch eine 48-stündige Dezellularisierung mit Trypsin eine ähnlich gute Reduktion nicht-kollagener Anteile wie durch Detergenzienbehandlung mit additiver Trypsininkubation zu erzielen, jedoch auf Kosten des Strukturverlustes (vgl. Abb. 24D).

5.8.3 Perforation mittels Photodisruption

Ein weiterer Ansatz, dECM einer interstitiellen Besiedlung über die Segeloberfläche zugänglich zu machen, stellt die Photodisruption der Oberfläche mithilfe des FsL dar (Tabelle 12). Der Erfolg dieser neuartigen Strategie wurde mittels verschiedener Techniken validiert (Abb. 27). Lichtmikroskopisch konnte in allen Fällen das laserexponierte Feld mit den separaten Manipulationsstellen identifiziert werden (Abb. 27A und B). Auch im Multiphotonen-Mikroskop präsentierten sich die Auftreffstellen des Lasers in der apikalen Ansicht als nahezu runde, homogene Spots von 100 µm Durchmesser in einem Abstand von 1 mm (Abb. 27C und D).

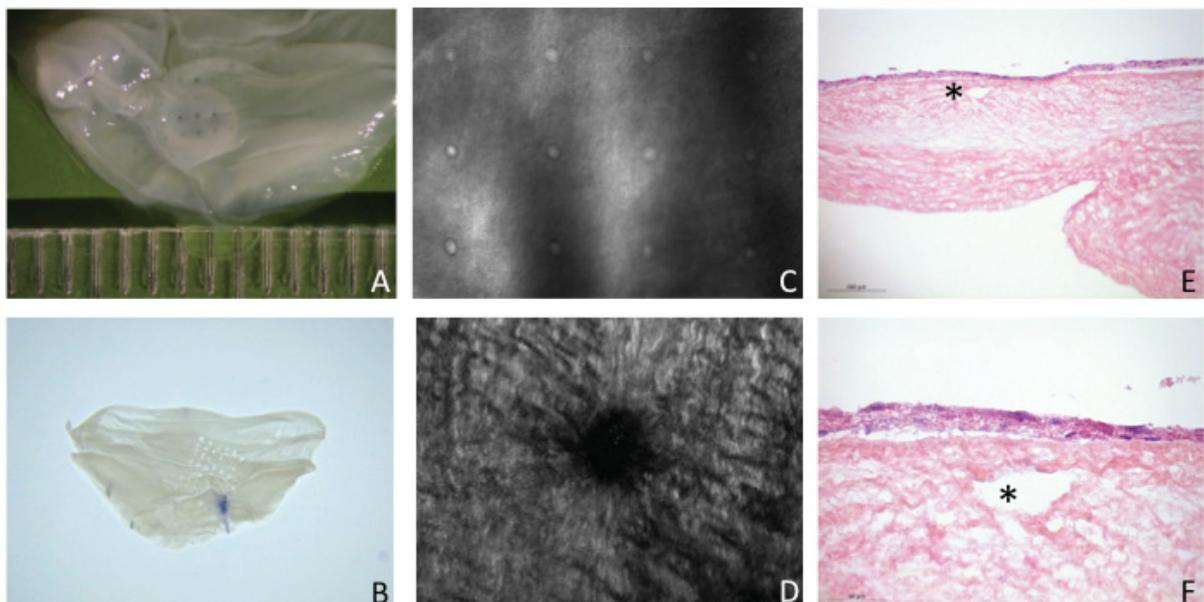


Abb. 27: Erfolg der Membranperforation durch Femto second Laser (FsL) vermittelte Photodisruption. A, B: Lichtmikroskopische Aufnahme photoperforierter dECM (800 mW) mit Millimetermaß (A) bzw. Durchleuchtung mittels *lightpad* (B). C, D: Darstellung der perforierten Areale im Multiphotonen-Mikroskop in niedriger (C) und hoher Vergrößerung (D). E, F: Histologische Darstellung einer photoperforierten dECM in H&E-Färbung in 10- (E) und 40-facher Vergrößerung (F). Asteriske kennzeichnen potentiell manipulierte Areale (Hof et al., *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016 ⁷⁸).

Histologisch ließ sich kein Anhalt für einen Strukturverlust bei sehr gut erhaltener valvulärer Matrix finden. Allerdings konnte die histologische Darstellung photoperforierter Stellen nur inkonstant reproduziert werden. So war in einigen Fällen aufgrund der Dreidimensionalität des Modells keine klare Abgrenzung zu Artefakten oder anderen Oberflächenalterationen möglich (Abb. 27E und F). In anderen photoperforierten Segeln wiederum konnten trotz systematischer histologischer Durchmusterung keine Oberflächendisruptionen auf histologischer Ebene wiedergefunden werden.

5.9 Evaluierung der interstitiellen dECM-Rebesiedlung

5.9.1 Qualitative Analyse der dECM-Rebesiedlung

Zur qualitativen Analyse der interstitiellen Matrixbesiedlung wurden H&E-Färbungen der rebesiedelten dECM angefertigt, welche Aufschluss über topografische Verteilung und Besiedlungsstärke lieferten (Abb. 28). Hier zeigten sich essentielle Unterschiede im Erfolg der Wiederbesiedlung, abhängig von der Art der Matrixvorbehandlungen. In dECM, welche nach der detergentenbasierten Dezellularisierung ohne weitere Prozessierung mit VIC besiedelt wurden, konnte keine interstitielle Neubesiedlung erreicht werden. Nach der Aussaat von VIC zeigte sich zwar ein mehrreihiger Zellschicht auf der dECM-Oberfläche (*I. ventricularis*) nach 7 Tagen Kultivierungszeit, ein Eindringen in das valvuläre Interstitium war den VIC jedoch nicht möglich. Die Ergebnisse der Rebesiedlung von dECM nach Photodisruption präsentierten sich als inhomogen in ihrer Qualität. Die eindeutige histologische Identifizierung der laserbehandelten Areale gestaltete sich schwierig. In mehreren Versuchen konnten Disruptionsstellen entweder nicht klar von anderen Oberflächenalterationen bzw. Einbettungsartefakten unterschieden werden, oder es wurde trotz systematischer Durchmusterung kein histologischer Anhalt für eine technische Oberflächenmanipulation gefunden. Darüberhinaus konnte auch bei klarer Identifizierung lasermanipulierter Bereiche keine konstante Matrixbesiedlung beobachtet werden. In anderen dECM dieser Gruppe wiederum zeigte sich eine fokale Matrixbesiedlung durch VIC, welche sich allerdings auf die unmittelbare Umgebung der Perforationsstelle beschränkte (Abb. 28C und D).

Durch eine additive Trypsininkubation der dECM über 30 min wurde es den VIC möglich, in das Interstitium der dECM einzudringen. Zum ersten Mal zeigte sich so die Möglichkeit, in konstanter Weise eine Wiederbesiedlung von dECM zu erreichen. Allerdings beschränkte sich diese lediglich auf oberflächlich gelegene Anteile des dezellularisierten Klappensegels (Abb. 28E und F). Da eine möglichst flächendeckende interstitielle Wiederbesiedlung der Segel angestrebt wurde, wurden sowohl an den Besiedlungsmodalitäten als auch an der Vorbehandlung der dECM Modifikationen vorgenommen um diese Restriktion zu überwinden. So wurden die dECM mit höher konzentriertem Trypsin (100 µM) inkubiert und die ausgesäte Zellzahl pro dECM auf

2×10^6 VIC erhöht. Zudem wurden die wiederbesiedelten dECM nach 24-stündiger Zellanhaftung aus den EECD herausgenommen und im weiteren Verlauf in einem *transwell*-System kultiviert, um das Angebot an Medium und Nährstoffen für die VIC innerhalb der valvulären Matrix zu verbessern.

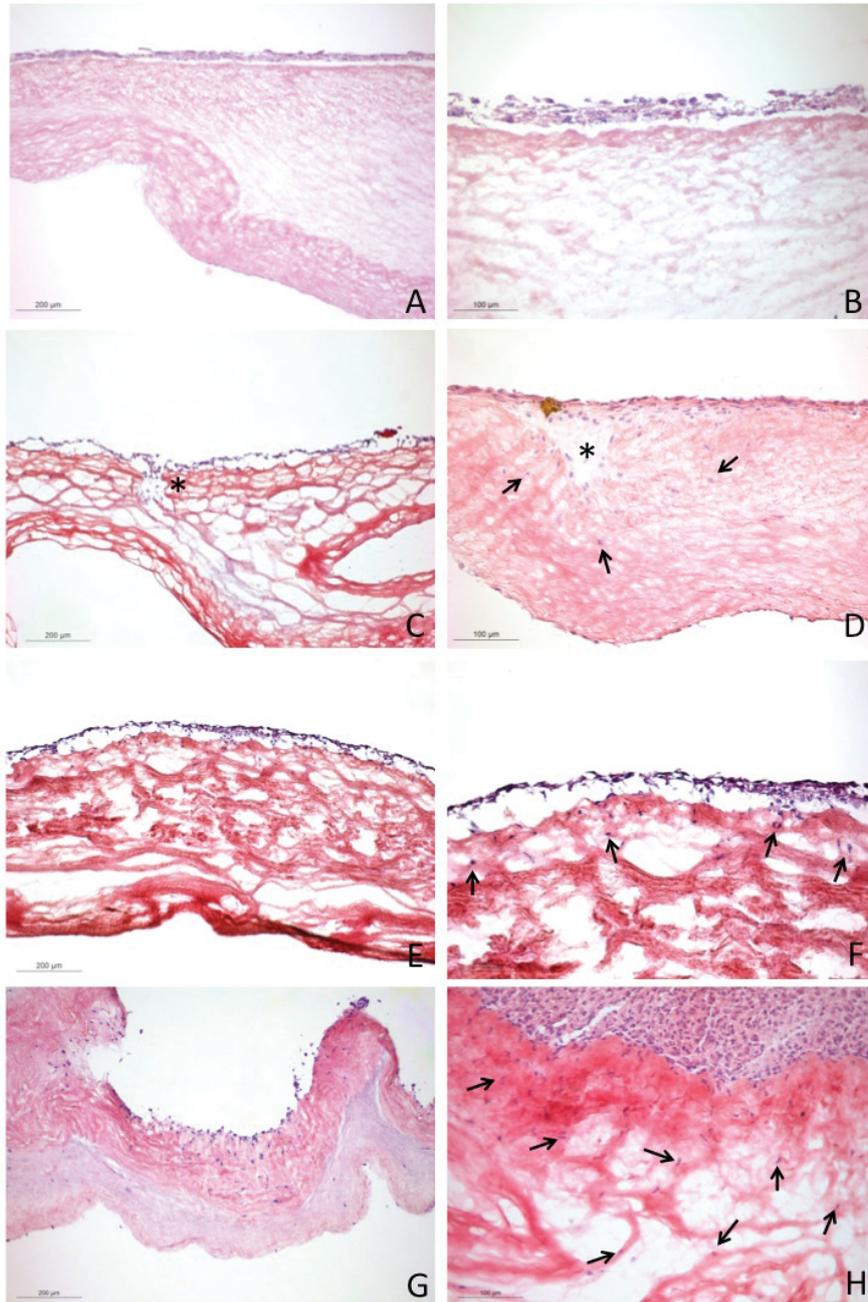


Abb. 28: Qualitative Evaluierung der dECM-Rebesiedlung. A-H: H&E-Färbung von mit VIC wiederbesiedelten dECM. A, B: In dECM ohne weitere Prozessierung zeigt sich 7 Tage nach Zellaussaat keine Matrixbesiedlung durch VIC. C, D: In photoperforierten dECM zeigen sich um die Disruptionstellen z.T. perifokale Besiedlungserfolge. Die Ergebnisse präsentieren sich allerdings inkonstant. E, F: Durch eine zusätzliche Inkubation mit Trypsin lässt sich eine oberflächliche Rebesiedlung der dECM erreichen. G, H: Durch Erhöhung von Trypsinkonzentration und Zellzahl sowie der Kultivierung in einem *transwell* nach 24 h initialer Zelladhäsion im EECD lassen sich Qualität der Besiedlung und besiedelte Fläche steigern. Maßstäbe = 200 μm (A, C, E, G) bzw. 100 μm (B, D, F, H). Pfeile deuten auf interstitiell lokalisierte Zellkerne (bläulich), Asteriske kennzeichnen identifizierte, photoperforierte Areale (Hof et al., Eur J Cardiothorac Surg. 2016 78).

Hierdurch konnte eine tiefere interstitielle Rebesiedlung der dECM erreicht werden, welche sich in der histologischen Darstellung stellenweise über den gesamten Durchmesser der dECM erstreckte (Abb. 28G und H). In allen Konditionen bildeten die VIC – wie auch bei den unbehandelten dECM – einen Polyzelllayer auf der Oberfläche, welcher allerdings in seltenen Fällen während der methodischen Prozessierung der Präparate nicht erhalten werden konnte.

5.9.2 Quantifizierung der interstitiellen Rebesiedlung von dECM

Zwei Parameter wurden zur Objektivierung der Matrixbesiedlung herangezogen; die Gesamtzahl aller VIC, die das Interstitium in einem definiertem Bereich besiedeln (Abb. 29A) und die mittlere Migrationstiefe der VIC in eben diesem Bereich, wobei auch hier lediglich die sich in der Matrix befindlichen Zellen berücksichtigt wurden (Abb. 29B). Wurden die dECM nach der alleinigen Detergenzienbehandlung mit VIC besiedelt, kam es zu keiner VIC-Migration in das Interstitium. Durch eine zusätzliche, kurze Trypsininkubation konnte die absolute Zellzahl innerhalb der dECM signifikant erhöht werden ($28,6 \pm 4,1$ Zellen).

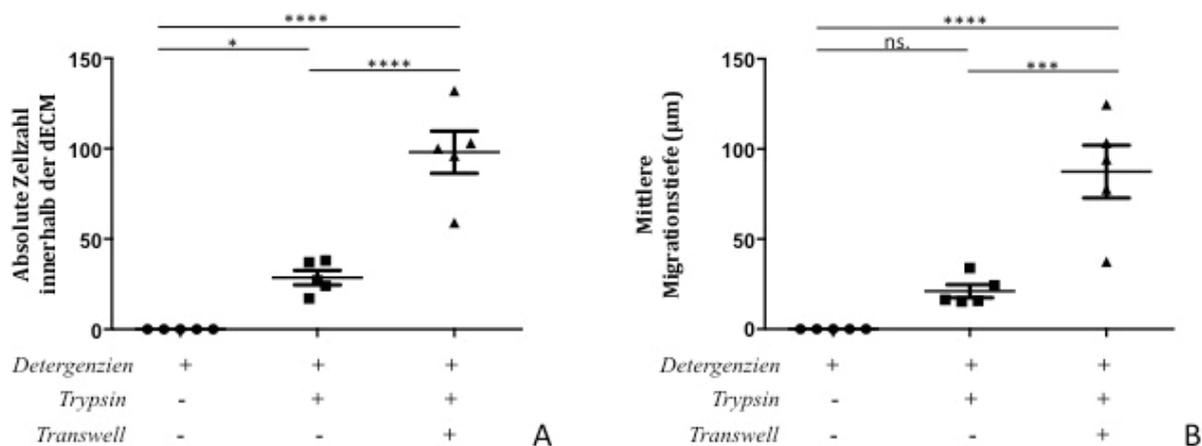


Abb. 29: Quantitative Analyse der Rebesiedlung verschiedener dECM-Modelle. A: Bestimmung der absoluten Zellzahl innerhalb der dECM über einen definierten Bereich anhand von fünf repräsentativen H&E-Bildern. Nach reiner detergenzienbasierter Dezellularisierung befinden sich keine VIC im Interstitium des Segels. Durch eine 30-minütige Trypsininkubation der dECM wird eine interstitielle Rebesiedlung ermöglicht. Es findet sich ein signifikanter Anstieg der die Matrix besiedelnden Zellen mit durchschnittlich $28,6 \pm 4,1$ Zellen pro beobachtetem Areal. Durch Erhöhung von Trypsinkonzentration, ausgesäter Zellzahl und Kultivierung der rebesiedelten dECM in einem *transwell*-System nach 24-stündiger Zelladhäsion im EECd wird eine signifikante Steigerung auf die höchste Besiedlungsdichte der dECM erreicht ($98 \pm 11,6$ Zellen pro beobachtetem Besiedlungsareal). B: Analyse der Migrationstiefe aller unter A beobachteten Zellen innerhalb der dECM. Während VIC nicht fähig sind, in das Interstitium unbehandelter dECM zu migrieren, führt eine additive Trypsinbehandlung zu einer Besiedlung oberflächlicher dECM-Areal mit einer geringen Migrationstiefe von $21 \pm 3,6$ µm. Durch weitere Modifikationen der dECM-Vorbehandlung und des Besiedlungsprotokolls lässt sich eine signifikant erhöhte Einwanderungsdistanz von durchschnittlich $87,4 \pm 14,7$ µm erreichen. $n = 5$; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (Hof et al., Eur J Cardiothorac Surg. 2016 ⁷⁸).

Durch Erhöhung von Trypsinkonzentration und ausgesäter Zellzahl sowie additiver Kultivierung in einem *transwell* konnte wiederum eine hoch signifikante Steigerung sowohl der absoluten Zellzahl innerhalb der Matrix als auch der mittleren Einwanderungstiefe der VIC gegenüber beiden zuvor genannten Konditionen erreicht werden. Diese Gruppe zeigte somit das beste Rebesiedlungsergebnis dezellularisierter Aortenklappensegel mit einer durchschnittlichen absoluten Zellzahl von $98 \pm 11,6$ Zellen pro beobachtetem Besiedlungsareal und einer mittleren Migrationstiefe von $87,4 \pm 14,7 \mu\text{m}$.

5.9.3 Untersuchung der Zellaktivität innerhalb der dECM

Als immunhistologischer Aktivitätsmarker wurde α -SMA verwendet, ein charakteristischer Marker für VIC im myofibroblastisch aktivierten Zustand. Auffälligerweise zeigte der VIC-Polylayer auf der dECM-Oberfläche in allen Konditionen ein insgesamt starkes α -SMA-Signal. Demgegenüber wiesen VIC, welche die Matrix besiedelten (Abb. 30C-H) unter allen Bedingungen ein wesentlich geringeres Aktivierungssignal auf. Nichtsdestotrotz färbten sich vereinzelte Zellen auch interstitiell positiv für α -SMA.

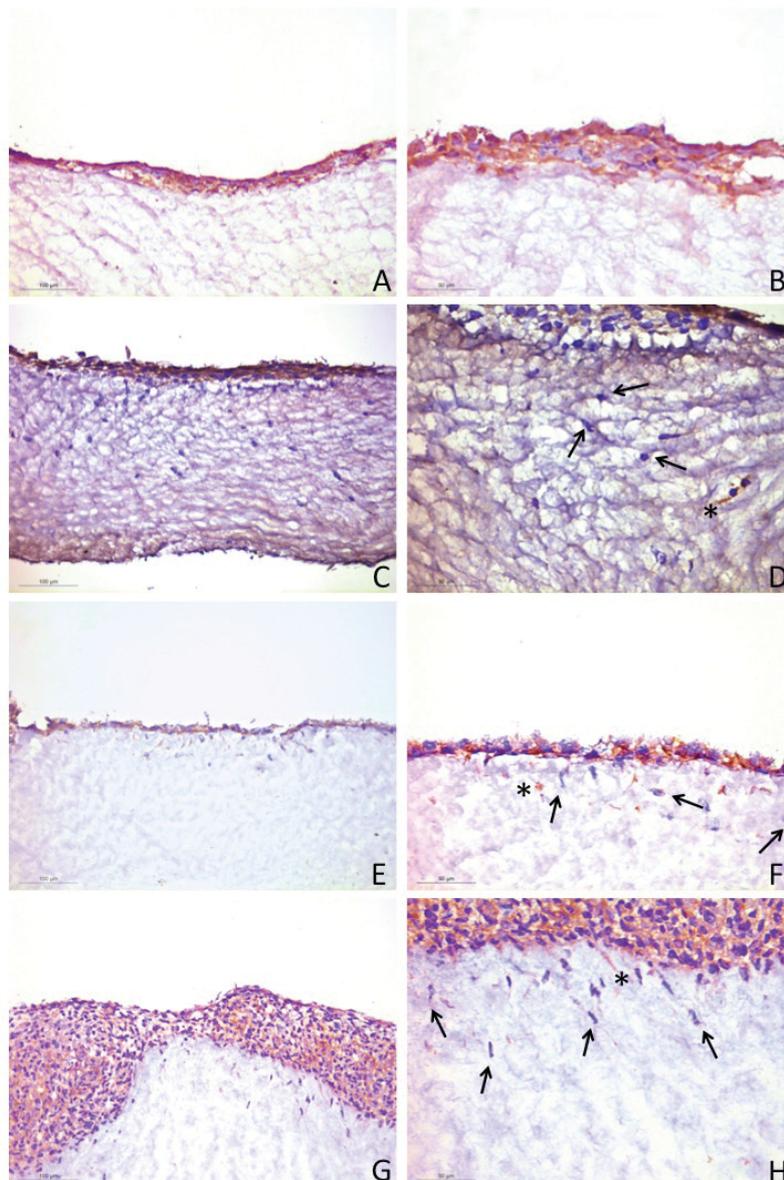


Abb. 30: Immunhistologische α -SMA-Färbung als Zellaktivitätsindikator. A, B: dECM ohne weitere Vorbehandlung. C, D: dECM mit Photoperforation. E, F: dECM mit Trypsinbehandlung. G, H: dECM mit Trypsinbehandlung und zusätzlicher Kultivierung in einem *transwell*. Während der Zelllayer auf der dECM-Oberfläche ein intensives α -SMA-Signal aufweist, zeigen interstitiell lokalisierte VIC eine geringe Signalantwort (Asteriske). Pfeile deuten auf interstitielle Zellen nach erfolgreicher Matrixbesiedlung. Maßstäbe = 100 μ m (A, C, E, G) bzw. 50 μ m (B, D, F, H). Braun = α -SMA-Signal, blau = Zellkerne (Hof et al., Eur J Cardiothorac Surg. 2016 ⁷⁸).

5.9.4 Die Aktivität der Matrix-Metalloproteasen MMP2 und MMP9

Mittels *in situ* Zymographie wurde die Enzymaktivität der MMP2 und MMP9 untersucht. Auch die MMP-Aktivität präsentierte sich deutlich gesteigert im oberflächlichen Zelllayer auf der dECM. Innerhalb der dECM konnte vereinzelt perizellulär lokalisierte MMP-Aktivität gezeigt werden, insgesamt allerdings war interstitiell nur ein sehr geringes MMP-Signal unter allen Bedingungen, die eine interstitielle Besiedlung überhaupt ermöglichten, nachweisbar.

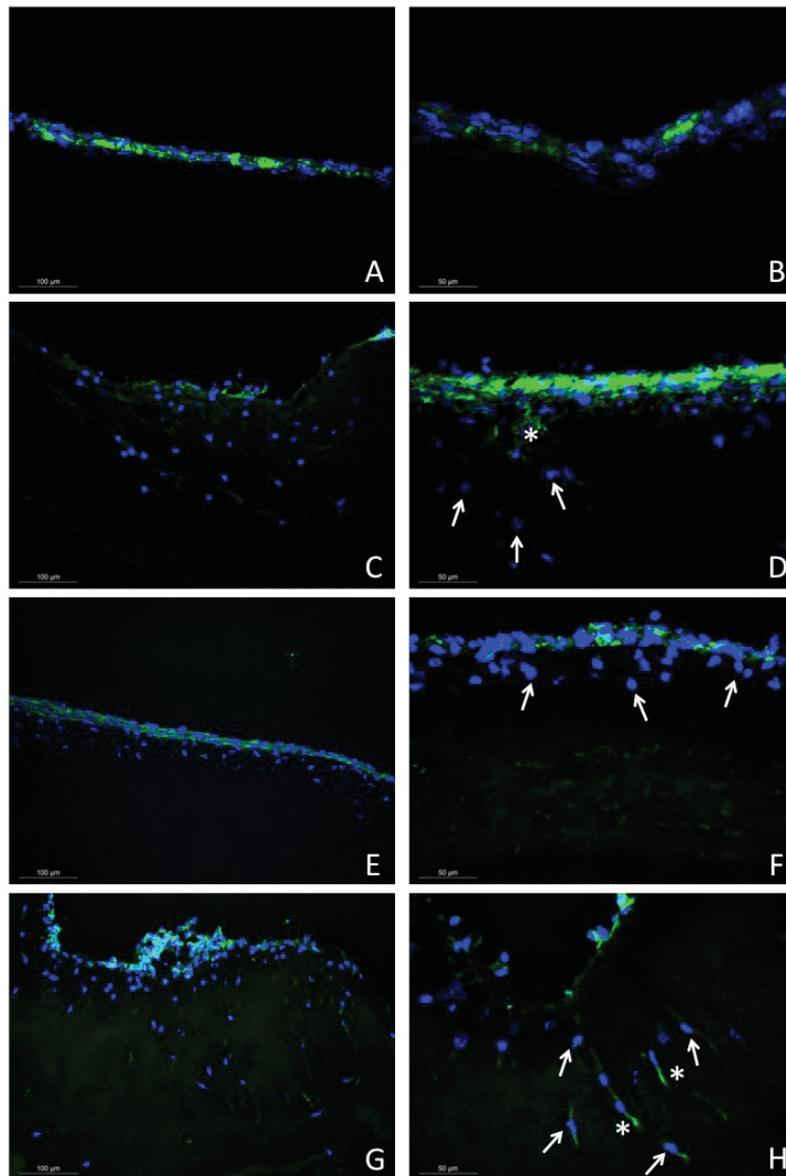


Abb. 31: *In situ* Zymographie zur Aktivitätsbestimmung der MMP2 und MMP9. A, B: dECM ohne weitere Vorbehandlung. C, D: dECM mit Photoperforation. E, F: dECM mit Trypsinbehandlung. G, H: dECM mit Trypsinbehandlung und zusätzlicher Kultivierung in einem *transwell*. Unter den Bedingungen, welche eine interstitielle dECM-Besiedlung zulassen ist ein MMP-Signal innerhalb der Matrix allenfalls schwach ausgeprägt. Teils weisen die VIC perizelluläre MMP-Aktivität auf, wie durch die Asteriske gekennzeichnet. Der Zelllayer auf der dECM-Oberfläche zeigt unter allen Bedingungen ein starkes MMP-Signal. Pfeile deuten auf interstitielle Zellen nach erfolgreicher Matrixbesiedlung. Maßstäbe = 100 µm (A, C, E, G) bzw. 50 µm (B, D, F, H). Blau = DAPI-Zellkernfärbung, grün = Enzymaktivität (Hof et al., *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016 ⁷⁸).

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung der mECM-Kulturen und Zellverhalten im dreidimensionalen Kultivierungsmodell unter Zytokineinfluss

6.1.1 Kulturmorphologie und Zellviabilität

Die Entstehung der nicht-rheumatischen Aortenklappendegeneration wird mehr und mehr als ein Prozess verstanden, welcher durch die Interaktion zellulärer und extrazellulärer Bestandteile der Herzklappe beeinflusst wird. Um eine bessere Vergleichbarkeit von *in vitro* Experimenten mit dem *in vivo* Verhalten von VIC herzustellen und physiologische Bedingungen möglichst getreu der realen Situation abbilden zu können, war die Etablierung von dreidimensionalen Zellkulturmodellen für VIC ein maßgeblicher Aspekt dieser Studie. Vergleichende Untersuchungen haben deutlich gezeigt, dass allein die VIC-Kultivierung in einem 2D-Modell bereits phänotypische Veränderungen der Zellen im Sinne einer unphysiologischen Reizantwort hervorrufen kann ⁸⁷. Daraus folgt der Schluss, dass 2D-Experimente auf zellbiologischer Ebene nicht die natürlichen Verhältnisse widerspiegeln können, was die Einführung von 3D-Modellen für ein tiefergreifendes Verständnis der Aortenklappendegeneration unerlässlich macht. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen die Machbarkeit der 3D-Zellkultivierung in der verwendeten ECM aus Kollagen I und Matrigel. Dabei überlebten VIC die insgesamt 9-tägige Kultivierungszeit innerhalb der Matrix und wiesen eine hohe Viabilitätsrate auf. Ferner zeigte die Stimulation mit TGF β einen proapoptotischen Effekt auf die mECM-Kulturen. *Clark-Greuel et al.* beschreiben bereits einen Apoptose-induzierenden Effekt von TGF β in 2D-Kultur und sehen diesen in Zusammenhang mit der Bildung kalzifizierender Zellaggregate. Auch *in vivo* konnte eine Korrelation zwischen der TGF β -Konzentration sowie der Apoptoserate von VIC gezeigt werden ^{30,40}. Unter der Annahme, dass ein solcher verstärkter Zelluntergang als Teil des Pathomechanismus bzw. als Konsequenz einer Aortenklappendegeneration zu verstehen ist, kann von einem wesentlichen Einfluss von TGF β auf diesen Prozess ausgegangen werden. Weiterhin kann die verstärkte Apoptose auch in Zusammenhang mit einem insgesamt erhöhten, TGF β -induzierten Zell-*turnover* gesehen werden, wie er bereits von *Liu et al.* beschrieben wurde ³⁶. Hierfür spricht auch die in den histologischen Untersuchungen beobachtete erhöhte Zelldichte in mit TGF β stimulierten mECM-Kulturen.

Auffällig gestaltete sich das Distributionsmuster der VIC innerhalb der mECM. Obwohl die VIC in der Matrix suspendiert wurden, und somit eine homogene Zellverteilung in der Kultur zu erwarten wäre, zeigte sich nach 9 Tagen der Kultivierung eine unregelmäßige Matrixbesiedlung. Dabei präsentierte sich eine peripher erhöhte Zelldichte gegenüber zentralen Matrixanteilen.

Häufig bildete sich auf der Kulturoberfläche ein ein- bis mehrschichtiger Zellsaum von dicht aneinander gereihten VIC. Eine mögliche Erklärung für diese Zellanordnung könnten zum Zentrum der mECM-Kulturen hin abfallende Nähr- und Sauerstoffgradienten liefern. Diese würden zum Absterben oder zumindest zu einer verminderten Proliferation zentral gelegener VIC führen, wohingegen oberflächliche VIC aufgrund des ausreichenden Nährstoffangebotes ein günstigeres Verhältnis von Apoptose zu Proliferation aufweisen. Hinweise auf solche Mechanismen in dreidimensionalen Zellkultivierungsmodellen liefern Untersuchungen aus der Tumorforschung. So wurde ein verminderter Sauerstoffgehalt und eine stark erhöhte Apoptoserate im Zentrum von 3D-Tumormodellen nachgewiesen ⁸⁸. *Schilling et al.* beschreiben dieses Problem ebenfalls auf dem Gebiet des myokardialen *tissue engineerings* und definieren eine kritische Diffusionsstrecke von 100-200 μm ⁸⁹.

Makroskopisch zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine Matrixkompaktierung der mECM-Kulturen. Dieses Schrumpfungsverhalten konnten auch *Butcher et al.* für dreidimensionale VIC-Kulturen in kollagenbasierten Hydrogelen beobachten ^{90,91}. Auch in diesen Studien wurde eine starke Größenreduktion – vornehmlich in der ersten Hälfte des Kultivierungszeitraums – gezeigt. Dabei ähnelte das Ausmaß der Matrixschrumpfung mit 60 – 80% der Initialgröße dem in der vorliegenden Studie beobachteten Effekt. *Butcher et al.* betrachteten ebenfalls die Auswirkung von TGF β auf VIC, welche jedoch aus caninen Mitralklappen gewonnenen wurden. Im Einklang mit den hier präsentierten makroskopischen Befunden konnte seine Arbeitsgruppe eine signifikant stärkere Größenreduktion der Hydrogele durch die Zugabe von exogenem TGF β sowohl für aVIC als auch für embryonale, valvuläre Progenitorzellen feststellen ^{92,93}.

6.1.2 *Myofibroblastische Transdifferenzierung der VIC und Matrix-remodeling in mECM-Kulturen*

In Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren und Wachstumsstimuli können VIC verschiedene phänotypische Ausprägungen aufweisen. So können sie durch eine myofibroblastische Transdifferenzierung in den aktivierten Zustand übergehen. Aktivierte VIC (aVIC) sind in Reparationsprozesse der pathologisch veränderten Herzklappe eingebunden, können bei übermäßiger Aktivierung jedoch auch zu einer massiv gesteigerten Apoptoserate führen und somit selbst zur Klappenfibrosierung beitragen ^{39,40}. Dabei spielt das Gleichgewicht zwischen MMP-vermittelter Matrixdegradation und Matrixerneuerung ebenfalls eine entscheidende Rolle ¹⁵. Das Zytoskelett der aVIC zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an kontraktilen Filamenten, insbesondere α -SMA aus. Durch die Behandlung mit unterschiedlichen Zytokinen konnte die α -SMA-Expression in den mECM-Kulturen beeinflusst werden. Unter Stimulation mit TGF β zeigte sich ein tendenziell erhöhter Gehalt an α -SMA gegenüber der Basalbedingung ohne zusätzliche Zytokingabe. VEGF hingegen hatte einen gegenteiligen Effekt zur Folge und führte zu einer

signifikanten Reduktion der α -SMA-Expression verglichen mit TGF β -behandelten Kulturen. In der Literatur wird TGF β als potenter Aktivator für VIC beschrieben, welcher die myofibroblastische Transdifferenzierung von ruhenden qVIC stimuliert. Berücksichtigt man auch die immunhistologischen Ergebnisse sowie die PCR-Analysen, so konnte dieser Effekt für die mECM-Kulturen nicht klar gezeigt werden. Dies macht die Bedeutung von dreidimensionalen Zellkulturmodellen für die zuverlässige Interpretation von *in vitro* Daten besonders deutlich. Während für 2D-Kulturmodelle verschiedene Studien eine klare VIC-Aktivierung durch bloße Zugabe von exogenem TGF β beobachten konnten, geben Untersuchungen am 3D-Kulturmodell Hinweise auf ein weitaus komplexeres Zusammenspiel mehrerer Faktoren, die maßgeblich in die myofibroblastische Transdifferenzierung von VIC und darüber in den Pathomechanismus der Aortenklappenstenose involviert sind ³⁶⁻³⁸. Eine herausragende Rolle spielen dabei mechanische Einflussgrößen, welche über die ECM auf die Zellen wirken. *Merryman et al.* untersuchten die α -SMA-Expression unter dem Aspekt der synergistischen Wirkung von TGF β mit der mechanischen Spannung in 3D-Kulturen. Dabei wurden porcine Aortenklappen zyklischer Spannung ausgesetzt und mit oder ohne TGF β über 14 Tage kultiviert. Weder durch die alleinige Applikation von zyklischer Spannung noch durch Stimulation mit TGF β konnte die myofibroblastische Transdifferenzierung angeregt werden. Erst durch die Kombination beider Faktoren zeigte sich ein signifikanter Anstieg des α -SMA-Gehalts. Interessanterweise konnte auf diese Weise auch ein starker Anstieg des biologisch aktiven TGF β beobachtet werden ⁹⁴.

In dem Kulturmodell der vorliegenden Studie befindet sich die mECM-Kultur ohne Fixierung frei beweglich in den *transwells*. Dies führt dazu, dass keine exogen induzierte Spannung in der Kultur aufgebaut werden kann, und somit keine synergistische Wirkung von Spannung und TGF β entsteht. Dadurch bleibt ein signifikanter Effekt von TGF β auf die α -SMA-Expression aus. Auch muss die Beschaffenheit der Matrix berücksichtigt werden. Es wird angenommen, dass erstens die VIC-Aktivierung durch TGF β u.a. über Matrixkomponenten vermittelt wird, und dass zweitens das Ausmaß dieser matrixvermittelten Zellaktivierung abhängig von den Matrixbestandteilen ist. So präsentiert sich eine deutlich geringere VIC-Aktivierung in Kollagen I-beschichteten Kulturen verglichen mit Fibronektin- oder Heparin-beschichteten Kulturen ³⁸. Zudem gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die Matrixsteifigkeit verschiedener ECM-Modelle ebenfalls den Aktivierungsstatus der VIC sowie die Effektivität einer Zytokinstimulation durch TGF β beeinflussen kann ^{95,96}. *Kloxin et al.* haben in kollagenhaltigen Hydrogelkulturen gezeigt, dass eine erhöhte Steifigkeit der Matrix in dosisabhängiger Weise zu einem Anstieg der α -SMA-Expression führt ⁹⁷. Während TGF β alleine nur einen geringen Effekt auf die Kontraktilität der einzelnen VIC in einer Matrix mit hoher Compliance hat, steigt die Kontraktilität einzelner Zellen bei einer erhöhten Matrixsteifigkeit stark an ⁹⁸. Vor diesem Hintergrund sind die dargestellten Ergebnisse zu reevaluieren, sodass die insgesamt niedrige

myofibroblastische Transdifferenzierung durch TGF β im angewandten Kulturmodell plausibel erscheint. Dass mechanische Beanspruchung und Spannung an der mECM-Kulturoberfläche am größten sind, könnte dabei das peripher gesteigerte α -SMA-Signal in immunhistologischen Analysen erklären. *Ex vivo* Beobachtungen an Aortenklappen in Bioreaktor-Systemen, in welchen eine VIC-Aktivierung durch eine stärkere hämodynamische Belastung nachgewiesen wurde, unterstützen diese Hypothese^{99,100}. Dass TGF β in 2D-Kulturen eine starke myofibroblastische Transdifferenzierung induziert, könnte wiederum darauf zurückzuführen sein, dass die bloße Anzucht der VIC in 2D-Kulturen bereits zu einer Kontraktilitätserhöhung der VIC im Sinne einer pathologischen Zellaktivierung führt und damit einem mechanischen Reiz gleich kommt⁸⁷.

Der Einfluss von VEGF auf die Aktivierung von VIC hingegen ist bis heute weniger untersucht. Es konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass VEGF die α -SMA-Expression gegenüber TGF β -behandelten mECM-Kulturen reduziert. Diese Beobachtung steht in Analogie zu Untersuchungen von *Gwamnesia et al.*, welche einen insgesamt protektiven Effekt von VEGF auf VIC belegen. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass der protektive Einfluss von VEGF im Bezug auf die Bildung kalzifizierender Noduli nachgewiesen wurde und eine VIC-Aktivierung nicht unmittelbar mit Kalzifizierungsprozessen korrelieren muss⁵⁷.

Mit der VIC-Aktivierung einher geht die gesteigerte Expression und Aktivität von MMPs. Beide Prozesse sind im Sinne einer Reaktion auf pathologische Reize zu bewerten. Histologisch konnten Kulturareale beobachtet werden, in denen sich sowohl eine erhöhte Zelldichte als auch eine gesteigerte Aktivität von MMP2 und MMP9 zeigte. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen konnten allerdings weder histologisch noch quantitativ mittels PCR- oder Westernblot-Analyse klare Alterationen der MMP-Aktivität bzw. -Expression festgestellt werden. Aktivierte VIC exprimieren und sezernieren vermehrt MMPs, um so Matrixumbauprozesse im Rahmen pathologischer Geschehen an der Herzklappe zu induzieren^{15,35,101}. Speziell für eine Stimulation mit TGF β konnten *Clark-Greuel et al.* in 2D-Kultur eine signifikante Erhöhung der pro-MMP9-Expression – nicht jedoch der MMP-Aktivität – aufzeigen³⁰. Da im mECM-Kulturmodell im Vergleich zu konventionellen 2D-Zellkulturmodellen nur eine limitierte Stimulation der myofibroblastischen Transdifferenzierung zu aVIC stattgefunden hat, ist es nicht verwunderlich, dass sich der MMP-Gehalt in den verschiedenen Behandlungskonditionen nur geringfügig voneinander unterscheidet. Unabhängig von der Kulturbedingung könnte die Bildung von Zellaggregaten auf eine erhöhte Proliferationsrate im Sinne einer VIC-Aktivierung in den entsprechenden mECM-Arealen deuten und somit gleichzeitig die dort verstärkte MMP-Aktivität erklären.

6.1.3 Osteoblastische Transdifferenzierung und Matrixkalzifizierung

Ruhende VIC (qVIC) können weiterhin einen osteoblastischen Phänotypen annehmen (obVIC), welcher im fortgeschrittenen Stadium einer Aortenklappenerkrankung Kalzifizierungsprozesse der valvulären Matrix induziert und unterhält. Die an der Degeneration der Aortenklappe entscheidend beteiligten obVIC zeichnen sich durch eine Hochregulierung der TNAP, die Formierung kalzifizierender Zellnoduli und die Einlagerung von Kalziumapatitkristallen in der ECM aus ³³. Zudem konnte in kalzifizierten Herzklappen ein erhöhter Gehalt an osteogenese-typischen Proteinen wie OPN nachgewiesen werden ^{19,41}. Bekannte Induktoren der osteoblastischen Differenzierung sind u.a. TGF β und organische Phosphate. CD73 ist als membranständige Phosphatase genau wie TNAP in den ATP-Katabolismus eingebunden und könnte somit ebenfalls für die osteogene Transdifferenzierung eine Rolle spielen ^{23,52}.

Sowohl *Clark-Greuel et al.* als auch *Gwamnesia et al.* konnten beobachten, dass VIC in der Monolayer-Kultur zur Bildung von charakteristischen, kalzifizierenden Noduli neigen, sobald sie mit TGF β stimuliert wurden. Dabei benutzten sie TGF β -Konzentrationen zwischen 5 und 10 ng/ml ^{30,57}. *Fisher et al.* hingegen konnten bei alleiniger TGF β -Applikation keine Nodus-Bildung beobachten. Ähnlich wie bei der myofibroblastischen Transdifferenzierung konnte erst durch die Kombination von TGF β -Behandlung der mECM-Kulturen mit der Applikation von zyklischer Spannung die Formation kalzifizierender Zellaggregate im Sinne eines osteoblastischen Zellphänotyps gezeigt werden. Dabei beschreibt diese Arbeitsgruppe sowohl in Bezug auf die Spannung als auch auf die TGF β -Konzentration eine dosisabhängige Entwicklung der Nodusformierung ⁸. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte hingegen eine ähnliche Bildung kalzifizierender Zellnoduli im mECM-Kulturmodell nicht vorgefunden werden. Zwar wurden fokale Zellverdichtungen festgestellt, in der Von Kossa Färbung zeigte sich allerdings keine einschlägige Matrixkalzifizierung unter den angewandten Behandlungsbedingungen. Vielmehr wurden randständige Mikrokalzifizierungen beobachtet, welche jedoch nicht regelmäßig mit einer bestimmten Kondition assoziiert waren. Zwar zeigte der Kalzium-Assay eine erhöhte Kalziumkonzentration in den Behandlungsgruppen gegenüber der Basalkultur, jedoch bleibt zu diskutieren, ob es sich hierbei wirklich um obVIC-vermittelte Kalziumanreicherungen handelt. Der gezeigte Effekt könnte ebenso auf einer Sequestration von Kalziumkomponenten aus dem Kulturmedium innerhalb der mECM beruhen. Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass der Kalziumgehalt in allen Gruppen gegenüber der Basalkondition erhöht ist. Auch der Umstand, dass der Kalziumgehalt in TGF β -stimulierten Kulturen am geringsten unter den Behandlungsgruppen ist, läuft konträr zu den vielfach beobachteten, prokalzifizierenden Effekten von TGF β und lässt einen zellvermittelten Kalzifizierungsmechanismus im vorliegenden 3D-Modell als Auslöser fraglich erscheinen ⁴⁰. Ob die zusätzliche Applikation von Spannung oder eine Erhöhung der Matrixsteifigkeit einen

prokalzifizierenden Effekt in mit TGF β stimulierten mECM-Kulturen hat bleibt durch weitere Studien zu überprüfen. Auch der zeitliche Faktor könnte eine Rolle spielen. So postulieren *Hjortnaes et al.*, dass VIC unter Kultivierung mit prokalzifizierendem Medium in den ersten 7 Tagen zunächst einen myofibroblastischen Phänotypen aufweisen, und erst nach 2 – 3 Wochen eine osteoblastische Transdifferenzierung durchlaufen¹⁰². Demnach könnte das Ausbleiben einer starken Matrixkalzifizierung und Nodus-Bildung auf eine zu kurze Kultivierungszeit zurückzuführen sein.

Die TNAP ist über den ATP-Katabolismus und die Dephosphorylierung von OPN maßgeblich in valvuläre Kalzifizierungsprozesse eingebunden²³. Histologisch zeigte sich im BCIP/NBT-Assay durch die Behandlung mit TGF β eine erhöhte Enzymaktivität in den mECM-Kulturen. Diese Beobachtung deckt sich mit einer erhöhten ALP-Aktivität in 2D-Kulturen, welche in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte^{30,103}. Interessanterweise zeigte sich auch ein antagonistischer Effekt auf die TNAP-Aktivität durch die Behandlung mit VEGF. *Gwamnesia et al.* entdeckten, dass VEGF Kalzifizierungsprozessen entgegenwirken kann⁵⁷. In Kombination dieser beider Beobachtungen könnte also eine durch VEGF verursachte TNAP-Inhibition der protektiven Wirkung zugrunde liegen. Allerdings konnte weder am Ende der Kultivierungszeit noch im Verlauf eine Hochregulierung der TNAP-Genexpression beobachtet werden.

Während bis vor einiger Zeit die Bedeutung von OPN für die ektope Kalzifizierung nicht gut untersucht war, zeigen neuere Analysen, dass OPN in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsstatus auf die valvuläre Matrixkalzifizierung Einfluss nehmen kann. *Sainger et al.* konnten erstens nachweisen, dass Patienten mit pathologisch veränderten Aortenklappen einen erhöhten Serum-OPN-Spiegel aufweisen, und zeigten zweitens einen gesteigerten Anteil an dephosphoryliertem OPN im Serum dieser Patienten¹⁰⁴. Nach aktueller Kenntnislage ist OPN wiederum hauptsächlich im phosphorylierten Zustand dazu in der Lage, z.B. über die Komplexierung von Hydroxyapatitkristallen einer ektope Kalzifizierung entgegenzuwirken. Dephosphoryliertes OPN hingegen verliert diese Eigenschaft größtenteils und unterstützt somit eine ektope Biomineralisation^{22,45}. *Narisawa et al.* berichten, dass die Hochregulierung der TNAP zu einer Dephosphorylierung des OPN führt und hierüber eine Matrixkalzifizierung vorantreibt²³. Während in der vorliegenden Studie die Proteinanalyse zeigte, dass das phosphorylierte OPN durch die unterschiedlichen Behandlungen unverändert gegenüber der Kontrollgruppe blieb, ließ sich unter TGF β -Stimulation ein tendenzieller Anstieg des dephosphorylierten OPN nachweisen. Dieser – wenn auch nicht signifikante – Effekt könnte wie bereits dargelegt auf die gesteigerte Aktivität der TNAP zurückzuführen sein. Allerdings konnte diese Beobachtung weder nach 8 Tagen noch im Verlauf der Kultivierung durch eine Analyse der Genexpression bestätigt werden. Dabei ist zu bedenken, dass ein veränderter Phosphorylierungsstatus nicht im Zusammenhang mit einer veränderten Genexpressionsrate stehen muss. Weitere Untersuchungen, die fokussiert auf die Analyse der Phosphorylierung von

OPN sowie deren Regulation abzielen, werden nähere Einsicht in diese Zusammenhänge bringen.

Zusammenfassend konnte in keiner Behandlungsgruppe eine relevante Mineralisierung der Matrix beobachtet werden. Indikatoren, die auf eine beginnende osteoblastische Transdifferenzierung der VIC hinweisen, konnten dennoch identifiziert werden. Dabei waren in der Literatur beschriebene Effekte von TGF β und VEGF nachweisbar, jedoch in der hier erstmals eingesetzten 3D-Versuchsordnung gegenüber früheren Beobachtungen in 2D-Untersuchungen abgeschwächt. Als Ursache hierfür kommen in Analogie zur myofibroblastischen Transdifferenzierung fehlende mechanische Aspekte im mECM-Modell in Frage. Mehrere Studien konnten zeigen, dass VIC-vermittelte Kalzifizierungsprozesse von der Steifigkeit der Matrix abhängig sind. Das Ausmaß der Matrixsteifigkeit scheint zu beeinflussen, ob qVIC sich zu aVIC oder obVIC differenzieren, wobei ein mittlerer elastischer Modulus (ca. 25-50 kPa) einen osteogenen Phänotypen, höhere elastische Moduli einen myofibroblastischen Phänotypen der VIC begünstigen ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. *Balachandran et al.* haben zudem in *ex vivo* Untersuchungen nachgewiesen, dass die Applikation von TGF β in Kombination mit mechanischer Spannung zu einer erhöhten Kalzifizierung explantierter Schweineherzklappen führt – ein weiterer Faktor, der berücksichtigt werden muss. Dabei konnten mit zunehmender Matrixdehnung zum einen deutlich erhöhte Osteocalcin- und Kalziumkonzentrationen und zum anderen eine vermehrte ALP-Aktivität beobachtet werden ¹⁰⁸. Resümiert man die Beobachtungen der vorliegenden Studie vor diesem Hintergrund, so lässt sich daraus ableiten, dass in 3D-Kulturen TGF β alleine nur schwach auf die Transdifferenzierung der VIC Einfluss nehmen kann. Vielmehr scheint die Kombination von Zytokinstimulation und mechanischen, matrixvermittelten Einflüssen für die Aktivierungs- und Kalzifizierungsprozesse der valvulären Zellen essentiell zu sein. Neben dem Fehlen mechanischer Faktoren wird das verwendete Modell durch die Tatsache limitiert, dass Matrigel bereits zahlreiche Wachstumsfaktoren enthält – darunter auch TGF β . Dass die VIC in ihrem Zellverhalten und Expressionsmuster durch diese beeinflusst werden, kann nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin spielen auch entzündliche Prozesse im Rahmen der Aortenklappendegeneration eine wichtige Rolle. So sind neben VIC, ECM-Molekülen und Wachstumsfaktoren auch Makrophagen und andere Zellen des Immunsystems an der Entstehung der ektopen Kalzifizierung beteiligt ¹⁷. Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht weiter berücksichtigt.

6.2 Die interstitielle Rebesiedlung von dECM

Die heutzutage zur Verfügung stehenden Herzklappenprothesen weisen bereits deutlich verbesserte Eigenschaften gegenüber den Prothesen aus den Anfängen des Herzklappenersatzes auf. Dennoch sind alle existierenden Optionen noch weit von einer optimalen Herzklappenprothese entfernt. Ein großes Defizit ist dabei die fehlende Regenerationsfähigkeit künstlicher Herzklappen, wodurch degenerative Veränderungen der Klappenprothesen nicht intrinsisch antagonisiert werden können. Des Weiteren macht die Wachstumsunfähigkeit des Implantats bei jungen Patienten Re-Operationen notwendig. Diese Nachteile werden generiert durch die Tatsache, dass sowohl mechanische als auch glutaraldehydfixierte, biologische Herzklappenprothesen keine lebenden Zellen enthalten. Vitale Zellen wiederum sind die Grundlage für valvuläre Reparationsmechanismen und biologisches Klappenwachstum. Die Möglichkeit der Herzklappenzellularisierung stellt die Grundlage für die Entwicklung alternativer Klappenprothesen in Aussicht ^{71,109,110}.

Als zweites Modell der dreidimensionalen Kultivierung valvulärer Zellen wurde in dieser Studie die Möglichkeit der *in vitro* Repopulation einer dezellularisierten Aortenklappenmatrix eruiert. Hierzu wurden verschiedene Ansätze der Herzklappenzellularisierung und Rebesiedlung implementiert und verglichen. Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung eines *in vitro* Rebesiedlungsmodells dezellularisierter Herzklappen mit VIC zur Untersuchung zugrundeliegender Zellmigrationsmechanismen, welches als Ausgangspunkt für weiterführende Experimente zur Entwicklung optimierter Herzklappenprothesen dienen kann.

Um ein geeignetes Verfahren zur Dezellularisierung der Aortenklappen auszuwählen, wurde die Qualität unterschiedlicher Dezellularisierungsverfahren im Vorfeld evaluiert. Unter Verwendung eines trypsinbasierten Protokolls über 48 h wie 2002 von *Cebotari et al.* beschrieben zeigte sich ein starker Strukturverlust der Klappenmatrix ¹¹¹. Unter einer kürzeren, 24-stündigen Trypsininkubation hingegen präsentierte sich eine insuffiziente Entfernung von Zellmaterial aus der valvulären Matrix. Trypsin wurde in den Anfängen des kardiovaskulären *tissue engineering* vermehrt zur enzymatischen Dezellularisierung verwendet. Allerdings hat man dieses Verfahren mit der Zeit größtenteils verlassen, da Trypsin auch Proteine der ECM unspezifisch aufspaltet und somit die valvuläre Architektur zerstört. Sowohl *Grauss et al.* als auch *Liao et al.* berichten über einen Verlust der Kollagenstruktur valvulärer Klappenmatrices nach Behandlung mit Trypsin. Demgegenüber konnte eine klare Überlegenheit von SDS gezeigt werden. Zudem konnte *Grauss et al.* – übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit – keine vollständige Dezellularisierung der Klappenmatrix durch Trypsin-basierte Verfahren mit einer Inkubationsdauer von bis zu 17 Stunden erreichen. *Tudorache et al.* demonstrierte darüberhinaus, dass durch eine SDS-basierte Dezellularisierung sogar die Basalmembran erhalten werden kann, wohingegen Trypsin zur Zerstörung selbiger führt ¹¹²⁻¹¹⁴.

Vor diesem Hintergrund wurde für die hier beschriebenen Untersuchungen eine detergenzienbasierte Dezellularisierung nach *Akhyari et al.* gewählt ⁷⁹. Der bedeutende Vorteil dieses Verfahrens liegt in einer matrixschonenden und gleichzeitig suffizienten Herzklappendezellularisierung, wobei die Basalmembran weitestgehend erhalten bleibt. Eine erhaltene Basalmembran wiederum ist essentiell für die Endotheladhäsion im Rahmen einer Re-endothelialisierung dezellularisierter Herzklappen und gewährleistet somit wichtige physiologische Funktionen. So nimmt ein konfluenter Endothellayer Einfluss auf die Signalweiterleitung an interstitielle Zellen und ist darüberhinaus essentiell für eine adäquate Inhibierung der Thrombozytenadhäsion und Gerinnungsaktivierung ¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Lichtenberg et al. konnten für auf diese Weise dezellularisierte Herzklappen eine flächendeckende *in vitro* Re-endothelialisierung mittels Bioreaktor-System erreichen, welche darüberhinaus eine gute *in vivo* Funktionalität ohne verstärkte Inflammation, Kalzifizierung oder Thrombenbildung nach einem und drei Monaten aufwies ^{73,119}. Demgegenüber zeigten dezellularisierte Herzklappen ohne Re-endothelialisierung eine wesentlich höhere Thrombogenität nach orthotoper Implantation *in vivo* ¹²⁰.

Bei der interstitiellen Rebesiedlung einer dezellularisierten Herzklappe muss nun zwischen der Besiedlung *in vivo* einerseits, auch als *guided tissue engineering* bezeichnet, und einer *in vitro*-Besiedlung andererseits unterschieden werden. Während sich die *in vivo* Rebesiedlung zwar als potentiell möglich erwies, lieferte trotz zahlreicher verschiedener Ansätze keine Methode eine interstitiell vollständig besiedelte Herzklappenprothese, welche vergleichbar mit einer nativen Klappe wäre. So zeigten *in vivo* Versuche nach 3, 5 und sogar 9 Monaten nur eine unvollständige interstitielle Neubesiedlung basisnaher Klappenanteile von dezellularisierten, re-endothelialisierten und orthotop reimplantierten Herzklappen. Die statischen Zellkulturexperimente der vorliegenden Studie zeigten zunächst, dass unter Anwendung des beschriebenen Dezellularisierungsprotokolls keine interstitielle Matrixbesiedlung durch eine VIC-Aussaat auf der dECM-Oberfläche zu erreichen war. Dieses Resultat ist nicht verwunderlich, berücksichtigt man, dass auch in Langzeitstudien nach Reimplantation dieser dezellularisierten Herzklappen *in vivo* keine Zellmigration über die Basalmembran erfolgte ^{73,79,121}. Die Beobachtung des *guided tissue engineering* in dezellularisierten Klappenimplantaten ebenso wie *in vitro* Studien mit enzymatisch dezellularisierten Herzklappen sind gleichsam beweisend für die Fähigkeit von VIC, innerhalb der Matrix zu migrieren. Dies wiederum wirft die Frage auf, was im vorliegenden Modell die VIC an der Migration in die Klappenmatrix hindert. In Betracht kommt dabei zum einen die Basalmembran als Migrationsbarriere, zum anderen mechanische und nutritive Faktoren bedingt durch das verwendete Modell. Die Basalmembran, bestehend aus Basallamina und *lamina fibroreticularis* enthält im Vergleich zur interstitiellen Matrix einen erhöhten Anteil an Proteoglykanen wie Ankerproteinen oder Vesikan und weist zusätzlich eine andere Kollagenstruktur und -zusammensetzung auf.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals für das Feld der kardiovaskulären Regenerationsforschung die generelle Durchführbarkeit einer kontrollierten, fokalen Oberflächenmanipulation der valvulären Matrix gezeigt werden, welche licht- und multiphotonenmikroskopisch dargestellt werden konnte. Dabei wurde ein Femto second laser (FsL) eingesetzt, welcher in translationalen Wissenschaften schon mehrfach und in vielfältiger Funktion verwendet und detailliert beschrieben wurde ^{122,123}. So stellt die laservermittelte Photomanipulation von Matrixoberflächen einen vielversprechenden methodischen Ansatz in der Entwicklung artifizierlicher Organe dar. Trotz des technischen Erfolgs konnte der histologische Nachweis der laserperforierten Felder nicht immer gelingen, und auch der Erfolg der Matrixbesiedlung gestaltete sich uneinheitlich. Es konnte in keiner der rebesiedelten dECM eine flächendeckende interstitielle Besiedlung erreicht werden. Vielmehr wurde lediglich in wenigen Fällen eine perifokale Matrixbesiedlung in unmittelbarer Nähe der perforierten Areale beobachtet, sodass weitere Untersuchungen zur Verfahrensoptimierung notwendig erscheinen. Der hier angewandte Ansatz muss somit zumindest auf dem heutigen technologischen Stand zwar als innovativ, jedoch in der Auswirkung nicht ausreichend angesehen werden. Eine Weiterentwicklung dieser Methodik, etwa durch eine stärkere Kontrolle über die biologische Wertigkeit der durch FsL erwirkten Manipulation, könnte jedoch in der Zukunft ihre Bedeutung für die translationale Wissenschaft steigern.

Als weiterer Ansatz zur verbesserten Zellpermeabilität der Basalmembran wurde eine kurze Trypsinbehandlung im Anschluss an die Dezellularisierung abgewendet. Trypsin ist – wie bereits ausgeführt – bekannt dafür, an der Basalmembran proteolytisch zu agieren. Ferner belegen Daten aus der Tumorforschung eine strukturelle Alteration der Basalmembran durch Trypsinbehandlung sowie die dosisabhängige Abnahme der Tumorprogressivität durch Inkubation mit Trypsininhibitoren ^{124,125}. Histologische Untersuchungen zeigen in der vorliegenden Studie, dass eine kurze Trypsininkubation für 30 min keine groben Veränderungen der Matrixstruktur hervorruft. Quantitativ zeigten sich geringe Unterschiede in der Matrixzusammensetzung nach Trypsinbehandlung dahingehend, dass der relative Anteil nicht-kollagener Proteine durch eine Trypsininkubation abnimmt. Durch diese kurze Inkubation mit Trypsin wurde schließlich eine interstitielle Klappenbesiedlung *in vitro* realisierbar, ohne dabei den Kompromiss eines massiven Strukturverlusts eingehen zu müssen. Eine partielle Desintegration der Basalmembran könnte dieser Beobachtung zugrunde liegen. Anzumerken ist, dass die interstitielle Besiedlung bei 8-tägiger Kultivierung in EECD auf sehr oberflächennahe Bereiche der dECM limitiert ist. Um eine tiefere Besiedlung der Matrix zu erzielen, wurde daher eine größere Zellzahl ausgesät und eine höhere Trypsinkonzentration gewählt, wobei der strukturelle Erhalt dieser dECM mit dem einer mit niedrigkonzentriertem Trypsin behandelten dECM vergleichbar war. Zusätzlich kommen – ähnlich wie bei den mECM-Kulturen – nutritive Aspekte als migrationslimitierende Faktoren in Betracht. So ist es naheliegend, dass VIC sich bei

einem geringen Angebot an Nährstoffen in der Matrix dem Konzentrationsgradienten entsprechend möglichst nah an der Oberfläche der dECM ansiedeln, um ihr Überleben zu sichern. Da die Rebesiedlung von dECM in EECd zwar eine kontrollierte Matrixbesiedlung erlaubt, jedoch konzeptionell die Entstehung eines solchen Konzentrationsgradienten provoziert, wurden besiedelte dECM nach 24 Stunden initialer Zellanhaftung in ein *transwell* transferiert. Insgesamt wurde durch diese Modifikationen eine tiefergehende Matrixbesiedlung erreicht. Dabei konnte mittels immunhistochemischer Färbung gezeigt werden, dass die in die Matrix migrierten VIC zu einem großen Teil kein α -SMA exprimieren, somit also überwiegend als qVIC vorliegen und nur wenige VIC eine myofibroblastische Transdifferenzierung durchlaufen. Weiterhin zeigte sich in der *in situ* Zymographie eine perizellulär erhöhte MMP-Aktivität um einige der in die dECM migrierten VIC, welche Rückschlüsse auf eine Einflussnahme durch VIC auf die ECM zulässt. Dass der mehrschichtige Zelloberlayer auf der Oberfläche rebesiedelter dECM sowohl starke MMP-Aktivität als auch ein erhöhtes α -SMA-Signal aufweist, könnte – analog zum 2D-Kultivierungsmodell – in der unphysiologischen Zellanordnung der VIC begründet liegen.

Das dECM-Modell wird allerdings durch zwei Aspekte limitiert; zum einen wird zu Gunsten der Matrixbesiedlung eine Zerstörung der Basalmembran in Kauf genommen. Zwar ist durch die detergentenbasierte Dezellularisierung ein zufriedenstellender Strukturverlust der Matrix gewährleistet, dennoch ist der Verlust einer intakten Basalmembran anzunehmen. Ohne Erhalt der Basalmembran würde sich eine anschließende Re-endothelialisierung der dECM wie bereits ausgeführt schwierig gestalten. Zum anderen sind zwar grundlegende Mechanismen identifiziert worden, die zu einer verbesserten interstitiellen Repopularisierung führen. Dennoch ist es nicht gelungen, eine physiologische Zellverteilung innerhalb der Klappenmatrix zu erreichen. Hierzu sind weitere Experimente erforderlich; so wäre die Verlängerung der Kulturdauer eine denkbar relevante Einflussgröße, welche es zu untersuchen gilt. Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang vergleichbare *in vitro* Studien zur interstitiellen Besiedlung dezellularisierter Herzklappen. So konnten *Schenke-Layland et al.* bei einer Gesamt-Kultivierungsdauer von 20 Tagen sehr gute Repopulationsergebnisse erzielen. Im Unterschied zur vorliegenden Studie wurde hier jedoch kein rein statisches Modell verwendet, sondern nach zwei Tagen initialer Zellanhaftung ein Bioreaktorsystem eingesetzt. Das Besiedlungsprotokoll unterschied sich bezüglich der ausgesäten Zellzahl, außerdem wurden die Zellen repetitiv und von beiden Seiten der Klappe ausgehend ausgesät. Verwendet wurde ein trypsinbasiertes Protokoll sowie vaskuläre statt valvulärer Myofibroblasten¹¹⁰. Auch *Leyh et al.* verwendeten ein trypsinbasiertes Dezellularisierungsprotokoll, repetitive Aussähschritte und ein dynamisches Kultivierungsmodell¹²⁶. Aus diesen Studien lässt sich eine positive Auswirkung sowohl von einer dynamischen Matrixbesiedlung als auch von repetitiven Besiedlungsschritten auf die Qualität der valvulären Matrixbesiedlung ableiten. *Steinhoff et al.* besiedelten mit Trypsin

dezellularisierte Herzklappen zwar in statischer Kultur, woraufhin sie jedoch – vergleichbar mit den hier vorliegenden Ergebnissen – nur eine sehr schwache, fokale interstitielle Matrixbesiedlung beobachteten. Erst nach orthotoper Reimplantation dieser *in vitro* rebesiedelten Klappen konnte eine adäquate Zelldichte – sei es durch Einwachsen empfängereigener Zellen oder die zusätzliche mechanische Komponente analog zu dynamischen *in vitro*-Modellen – erreicht werden ¹²⁷. Zwei besonders interessante Studien im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse sind die Untersuchungen von *Bertipaglia et al.* sowie *Cushing et al.* zur Rebesiedlung dezellularisierter Herzklappen, da in beiden Fällen statische VIC-Kulturmodelle verwendet wurden. Beide Gruppen konnten eine erfolgreiche Matrixbesiedlung nach Triton X-basierter Dezellularisierung erreichen, wobei die erzielten Resultate erst nach zwei- bzw. vierwöchiger Besiedlungsdauer gezeigt werden konnten. Weiterhin wiesen *Cushing et al.* nach, dass eine intermittierende Serumdeprivation der rebesiedelten dECM-Kulturen einen positiven Einfluss auf den Erfolg der interstitiellen Klappenrepopulation hat. Diese Beobachtung ergänzt sich mit der vorliegenden Studie, da sie dem nutritiven Angebot in der Umgebung der 3D-Matrix eine entscheidende Rolle für die interstitielle Repopulation und Zellproliferation zuspricht ^{128,129}.

In der Zusammenschau bereits veröffentlichter Studien sowie der vorliegenden Ergebnisse wurde eine interstitielle Matrixbesiedlung in der Regel unter Verwendung trypsinvermittelter Verfahren bzw. durch eine Zerstörung der Basalmembran erreicht. Die Anwendung dynamischer Kulturmodelle sowie eine Verlängerung der Kultivierungszeit sind mögliche Faktoren zur Optimierung der interstitiellen Besiedlungsqualität, welche es in weiteren Untersuchungen zu evaluieren gilt.

7 *Schlussfolgerungen*

Zusammenfassend konnte die vorliegende Studie die Realisierbarkeit und gleichzeitig die Herausforderungen der VIC-Kultivierung in einer 3D-Matrix herausstellen.

Im Falle des mECM-Modells konnte die Mehrdimensionalität und Komplexität kalzifizierender und pathologischer Differenzierungsprozesse aufgezeigt werden. Es wurde demonstriert, dass TGF β eine starke Kompaktion der mECM-Kulturen bewirkt und in Einklang mit anderen Studien auch im vorliegenden 3D-Modell apoptoseinduzierend wirkt – Beobachtungen, die Teilaspekte einer myofibroblastischen Transdifferenzierung repräsentieren. Als Ausdruck einer solchen wurde allerdings keine statistisch eindeutige Erhöhung des myofibroblastentypischen Markers α SMA vorgefunden. VEGF wiederum führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression von α SMA im Vergleich zu TGF β -exponierten Kulturen und könnte somit als Inhibitor der myofibroblastischen Transdifferenzierung verstanden werden. Insgesamt präsentieren sich Zytokineffekte im 3D-Versuch allerdings wesentlich abgeschwächer als in 2D-Experimenten, was ihre Bedeutung für die *in vivo* Situation neu zu bewerten veranlasst. So konnte keine deutliche Kalzifizierung der Matrix und auch keine osteoblastische Transdifferenzierung der VIC gezeigt werden. Die einzelnen Konditionen unterschieden sich nicht bezüglich der Expression anderer Marker wie OPN, CD73 oder MMPs, die im Prozess der Aortenklappendegeneration eine potentielle Rolle einnehmen. Es ist naheliegend, dass weitere Faktoren wie die Beschaffenheit der verwendeten Matrix, mechanische Stimuli und die Kultivierungsdauer zusätzlich zu den hier untersuchten Zytokineffekten berücksichtigt werden müssen, um ein Verständnis für die Entwicklung phänotypischer Veränderungen von VIC und die daraus resultierenden Konsequenzen für die Aortenklappendegeneration in ihrer Gesamtheit zu entwickeln.

Weiterhin ist es gelungen, ein Modell zur Besiedlung von dezellularisierten, valvulären Matrices zu etablieren. Hierbei zeigte sich ein positiver Einfluss auf den Erfolg der interstitiellen Matrixbesiedlung insbesondere durch eine enzymatische Behandlung der dECM mit Trypsin, eine Erhöhung der ausgesäten Zellzahl und ein verbessertes Nährstoffangebot innerhalb der Matrix. Die Photomanipulation der dECM-Oberfläche erbrachte nur inkonstante Besiedlungserfolge, welche sich auf oberflächliche und perifokale Areale beschränkten und erfordert darüberhinaus einen hohen technischen Aufwand. Die interstitielle Besiedlung über die dECM-Oberfläche scheint in der gewählten Versuchsanordnung nur auf Kosten einer Zerstörung der Basalmembran möglich zu sein. Ausgehend von dem hier etablierten Modell kann jedoch eine Optimierung der interstitiellen Matrixbesiedlung durch weiterführende Studien zur Komplettierung einer homogenen dECM-Besiedlung erfolgen.

8 Literaturverzeichnis

1. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005 Jun 21;111(24):3316–26.
2. Goldberg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Sep 25;50(13):1205–13.
3. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific Aortic Valve Stenosis: Methods, Models, and Mechanisms. *Circ Res*. 2011 May 27;108(11):1392–412.
4. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015 Jan 27;131(4):e29-322.
5. Rajamannan NM. Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 2010 Jan;298(1):H5–15.
6. Ben-Dor I, Pichard AD, Gonzalez MA, Weissman G, Li Y, Goldstein SA, et al. Correlates and causes of death in patients with severe symptomatic aortic stenosis who are not eligible to participate in a clinical trial of transcatheter aortic valve implantation. *Circulation*. 2010 Sep 14;122(11 Suppl):S37-42.
7. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med*. 1999 Jul 15;341(3):142–7.
8. Fisher CI, Chen J, Merryman WD. Calcific nodule morphogenesis by heart valve interstitial cells is strain dependent. *Biomech Model Mechanobiol*. 2013 Jan;12(1):5–17.
9. Mohler ER, Sheridan MJ, Nichols R, Harvey WP, Waller BF. Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors--a causal relationship? A clinical morphologic study. *Clin Cardiol*. 1991 Dec;14(12):995–9.
10. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study*. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Mar 1;29(3):630–4.
11. Aronow WS, Schwartz KS, Koenigsberg M. Correlation of serum lipids, calcium and phosphorus, diabetes mellitus, aortic valve stenosis and history of systemic hypertension with presence or absence of mitral anular calcium in persons older than 62 years in a long-term health care facility. *Am J Cardiol*. 1987 Feb 1;59(4):381–2.
12. Rosenhek R, Baumgartner H. Aortic sclerosis, aortic stenosis and lipid-lowering therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008 Mar;6(3):385–90.
13. Yetkin E, Waltenberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 2009 Jun 12;135(1):4–13.
14. Schoen FJ, Levy RJ. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current

- challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res*. 1999 Dec 15;47(4):439–65.
15. Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2000 Oct;9(5):281–6.
 16. Chen J-H, Simmons CA. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ Res*. 2011 Jun 10;108(12):1510–24.
 17. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin Inhibits Mineral Deposition and Promotes Regression of Ectopic Calcification. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):2035–46.
 18. Pohjolainen V, Taskinen P, Soini Y, Rysä J, Ilves M, Juvonen T, et al. Noncollagenous bone matrix proteins as a part of calcific aortic valve disease regulation. *Hum Pathol*. 2008 Nov 1;39(11):1695–701.
 19. Mohler ER, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Mar;17(3):547–52.
 20. Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KUE, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Mar;8(3):212–26.
 21. Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD. MEPE-ASARM Peptides Control Extracellular Matrix Mineralization by Binding to Hydroxyapatite: An Inhibition Regulated by PHEX Cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res*. 2008 Oct 1;23(10):1638–49.
 22. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J*. 1994 Jun 15;300(Pt 3):723–8.
 23. Narisawa S, Yadav MC, Millán JL. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2013 Jul;28(7):1587–98.
 24. Butler WT. Structural and functional domains of osteopontin. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Apr 21;760:6–11.
 25. Chen Y-J, Wei Y-Y, Chen H-T, Fong Y-C, Hsu C-J, Tsai C-H, et al. Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *J Cell Physiol*. 2009 Oct;221(1):98–108.
 26. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Oct;19(5–6):333–45.
 27. Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Ueda M, Nagata M, Guo J, et al. Osteopontin-integrin $\alpha(v)\beta(3)$ axis is crucial for 5-fluorouracil resistance in oral squamous cell carcinoma. *FEBS Lett*. 2015 Jan 16;589(2):231–9.
 28. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol*. 1998 May 18;141(4):1083–93.

29. Poggio P, Branchetti E, Grau JB, Lai EK, Gorman RC, Gorman JH, et al. Osteopontin-CD44v6 Interaction Mediates Calcium Deposition via Phospho-Akt in Valve Interstitial Cells From Patients With Noncalcified Aortic Valve Sclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Sep 1;34(9):2086-94.
30. Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, Narula NR, Rapoport HS, Mohler ER, et al. Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. *Ann Thorac Surg.* 2007 Mar;83(3):946-53.
31. Durbin AD, Gotlieb AI. Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovasc Pathol.* 2002 Mar;11(2):69-77.
32. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res.* 2004 Sep 3;95(5):459-70.
33. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007 Nov;171(5):1407-18.
34. Latif N, Sarathchandra P, Taylor PM, Antoniw J, Brand N, Yacoub MH. Characterization of molecules mediating cell-cell communication in human cardiac valve interstitial cells. *Cell Biochem Biophys.* 2006;45(3):255-64.
35. Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated Interstitial Myofibroblasts Express Catabolic Enzymes and Mediate Matrix Remodeling in Myxomatous Heart Valves. *Circulation.* 2001 Nov 20;104(21):2525-32.
36. Liu AC, Gotlieb AI. Transforming growth factor-beta regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells. *Am J Pathol.* 2008 Nov;173(5):1275-85.
37. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular Myofibroblast Activation by Transforming Growth Factor- β Implications for Pathological Extracellular Matrix Remodeling in Heart Valve Disease. *Circ Res.* 2004 Aug 6;95(3):253-60.
38. Cushing MC, Liao J-T, Anseth KS. Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor- β 1 interactions with matrix molecules. *Matrix Biol.* 2005 Sep;24(6):428-37.
39. Desmoulière A, Badid C, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jan;29(1):19-30.
40. Jian B, Narula N, Li Q, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 2003 Feb;75(2):457-465-466.
41. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, et al. Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation.* 2003 May 6;107(17):2181-4.
42. Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis.* 1999 May;8(3):254-60.
43. Osman L, Chester AH, Amrani M, Yacoub MH, Smolenski RT. A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification: a potential target for atorvastatin. *Circulation.* 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I566-572.

44. Rathan S, Yoganathan AP, O'Neill CW. The role of inorganic pyrophosphate in aortic valve calcification. *J Heart Valve Dis.* 2014 Jul;23(4):387–94.
45. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2010 Apr;25(4):695–705.
46. Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *J Biol Chem.* 2007 May 25;282(21):15872–83.
47. Ciancaglini P, Yadav MC, Simão AMS, Narisawa S, Pizauro JM, Farquharson C, et al. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. *J Bone Miner Res.* 2010 Apr 1;25(4):716–23.
48. Boskey AL, Christensen B, Taleb H, Sørensen ES. Post-translational modification of osteopontin: effects on in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Mar 9;419(2):333–8.
49. Poggio P, Sainger R, Branchetti E, Grau JB, Lai EK, Gorman RC, et al. Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Res.* 2013 Jun 1;98(3):402–10.
50. Mathieu P, Voisine P, Pépin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis.* 2005 May;14(3):353–7.
51. Mahmut A, Boulanger M-C, Bouchareb R, Hadji F, Mathieu P. Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. *Cardiovasc Res.* 2015 Apr 1;106(1):109–20.
52. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2006 Jun;2(2):351–60.
53. Akat K, Borggreffe M, Kaden JJ. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart Br Card Soc.* 2009 Apr;95(8):616–23.
54. Herpin A, Lelong C, Favrel P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol.* 2004 May 3;28(5):461–85.
55. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Fukuda K. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease. *J Mol Med Berl Ger.* 2009 Jan;87(1):17–24.
56. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(1):103–11.
57. Gwanmesia P, Ziegler H, Eurich R, Barth M, Kamiya H, Karck M, et al. Opposite effects of transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor on the degeneration of aortic valvular interstitial cell are modified by the extracellular matrix protein fibronectin: implications for heart valve engineering. *Tissue Eng Part A.* 2010 Dec;16(12):3737–46.

58. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Mar 13;49(10):1015–26.
59. Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol.* 2002 Apr;160(4):1393–403.
60. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation.* 1998 Jan 6;97(1):99–107.
61. Li X-D, Chen J, Ruan C-C, Zhu D-L, Gao P-J. Vascular Endothelial Growth Factor–Induced Osteopontin Expression Mediates Vascular Inflammation and Neointima Formation via Flt-1 in Adventitial Fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Sep 1;32(9):2250–8.
62. Mitchell JR, Wang J-J. Expanding application of the Wiggers diagram to teach cardiovascular physiology. *Adv Physiol Educ.* 2014 Jun 1;38(2):170–5.
63. Emonard H, Grimaud JA, Nusgens B, Lapière CM, Foidart JM. Reconstituted basement-membrane matrix modulates fibroblast activities in vitro. *J Cell Physiol.* 1987 Oct;133(1):95–102.
64. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS.* 2010 May 1;10(9):1886–90.
65. Rajamannan NM. Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2010 Jan 1;298(1):H5–15.
66. Harken DE, Soroff HS, Taylor WJ, Lefemine AA, Gupta SK, Lunzer S. Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1960 Dec;40:744–62.
67. Chikwe J, Filsoufi F, Carpentier AF. Prosthetic valve selection for middle-aged patients with aortic stenosis. *Nat Rev Cardiol.* 2010 Dec;7(12):711–9.
68. Vesely I. Heart Valve Tissue Engineering. *Circ Res.* 2005 Oct 14;97(8):743–55.
69. Khan SS, Trento A, DeRobertis M, Kass RM, Sandhu M, Czer LS, et al. Twenty-year comparison of tissue and mechanical valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Aug;122(2):257–69.
70. Dahm M, Husmann M, Eckhard-Mayer null, Prüfer D, Groh E, Oelert H. Relevance of immunologic reactions for tissue failure of bioprosthetic heart valves. *Ann Thorac Surg.* 1995 Aug;60(2 Suppl):S348-352.
71. Akhyari P, Minol P, Assmann A, Barth M, Kamiya H, Lichtenberg A. Tissue Engineering von Herzklappen. *Chir.* 2011 Mar 20;82(4):311.
72. Brody S, Pandit A. Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Oct;83(1):16–43.
73. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, et al. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation.* 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I559-565.

74. Cebotari S, Walles T, Sorrentino S, Haverich A, Mertsching H. Guided tissue regeneration of vascular grafts in the peritoneal cavity. *Circ Res.* 2002 May 3;90(8):e71.
75. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation.* 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I132-137.
76. Akhyari P, Ziegler H, Gwanmesia P, Barth M, Schilp S, Huelsmann J, et al. A novel culture device for the evaluation of three-dimensional extracellular matrix materials. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012 Jul 3;
77. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, et al. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1997 Jul;11(8):683-94.
78. Hof A, Raschke S, Baier K, Nehrenheim L, Selig JI, Schomaker M, et al. Challenges in developing a reseeded, tissue-engineered aortic valve prosthesis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2016 Sep 1;50(3):446-55.
79. Akhyari P, Kamiya H, Gwanmesia P, Aubin H, Tschierschke R, Hoffmann S, et al. In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Nov 1;38(5):539-46.
80. Trapp S, Ashcroft FM. Direct interaction of Na-azide with the KATP channel. *Br J Pharmacol.* 2000 Nov;131(6):1105-12.
81. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
82. Kim S-W, Roh J, Park C-S. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips, Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med J Pathol Transl Med.* 2016 Oct 13;50(6):411-8.
83. López-De León A, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 1985 Aug;33(8):737-43.
84. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001 Dec;25(4):402-8.
86. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. Garland Science; 2002.
87. Wyss K, Yip CYY, Mirzaei Z, Jin X, Chen J-H, Simmons CA. The elastic properties of valve interstitial cells undergoing pathological differentiation. *J Biomech.* 2012 Mar 15;45(5):882-7.
88. Szot CS, Buchanan CF, Freeman JW, Rylander MN. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials.* 2011 Nov;32(31):7905-12.

89. Schilling T, Cebotari S, Tudorache I, Haverich A. [Tissue engineering of vascularized myocardial prosthetic tissue. Biological and solid matrices]. *Chir Z Alle Geb Oper Medizen*. 2011 Apr;82(4):319–24.
90. Butcher JT, Nerem RM. Porcine aortic valve interstitial cells in three-dimensional culture: comparison of phenotype with aortic smooth muscle cells. *J Heart Valve Dis*. 2004 May;13(3):478-485-486.
91. Butcher JT, Barrett BC, Nerem RM. Equibiaxial strain stimulates fibroblastic phenotype shift in smooth muscle cells in an engineered tissue model of the aortic wall. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(30):5252–8.
92. Waxman AS, Kornreich BG, Gould RA, Moise NS, Butcher JT. Interactions between TGF β 1 and cyclic strain in modulation of myofibroblastic differentiation of canine mitral valve interstitial cells in 3D culture. *J Vet Cardiol Off J Eur Soc Vet Cardiol*. 2012 Mar;14(1):211–21.
93. Chiu Y-N, Norris RA, Mahler G, Recknagel A, Butcher JT. Transforming growth factor β , bone morphogenetic protein, and vascular endothelial growth factor mediate phenotype maturation and tissue remodeling by embryonic valve progenitor cells: relevance for heart valve tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010 Nov;16(11):3375–83.
94. Merryman WD, Lukoff HD, Long RA, Engelmayr GC, Hopkins RA, Sacks MS. synergistic effects of cyclic tension and transforming growth factor- β 1 on the aortic valve myofibroblast. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2007;16(5):268–76.
95. Hjortnaes J, Camci-Unal G, Hutcheson JD, Jung SM, Schoen FJ, Kluin J, et al. Directing valvular interstitial cell myofibroblast-like differentiation in a hybrid hydrogel platform. *Adv Healthc Mater*. 2015 Jan 7;4(1):121–30.
96. Duan B, Hockaday LA, Kapetanovic E, Kang KH, Butcher JT. Stiffness and adhesivity control aortic valve interstitial cell behavior within hyaluronic acid based hydrogels. *Acta Biomater*. 2013 Aug;9(8):7640–50.
97. Kloxin AM, Benton JA, Anseth KS. In situ elasticity modulation with dynamic substrates to direct cell phenotype. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(1):1–8.
98. Kural MH, Billiar KL. Mechanoregulation of valvular interstitial cell phenotype in the third dimension. *Biomaterials*. 2014 Jan;35(4):1128–37.
99. Weston MW, Yoganathan AP. Biosynthetic activity in heart valve leaflets in response to in vitro flow environments. *Ann Biomed Eng*. 2001 Sep;29(9):752–63.
100. Balachandran K, Konduri S, Sucusky P, Jo H, Yoganathan AP. An ex vivo study of the biological properties of porcine aortic valves in response to circumferential cyclic stretch. *Ann Biomed Eng*. 2006 Nov;34(11):1655–65.
101. Soini Y, Satta J, Määttä M, Autio-Harminen H. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol*. 2001 Jun;194(2):225–31.
102. Hjortnaes J, Goettsch C, Hutcheson JD, Camci-Unal G, Lax L, Scherer K, et al. Simulation of early calcific aortic valve disease in a 3D platform: A role for myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 May;94:13–20.

103. Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I547-552.
104. Sainger R, Grau JB, Branchetti E, Poggio P, Lai E, Koka E, et al. Comparison of transesophageal echocardiographic analysis and circulating biomarker expression profile in calcific aortic valve disease. *J Heart Valve Dis*. 2013 Mar;22(2):156–65.
105. Benton JA, Kern HB, Anseth KS. Substrate properties influence calcification in valvular interstitial cell culture. *J Heart Valve Dis*. 2008 Nov;17(6):689–99.
106. Yip CYY, Chen J-H, Zhao R, Simmons CA. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jun;29(6):936–42.
107. Duan B, Yin Z, Hockaday LA, Magin RL, Butcher JT. Active Tissue Stiffness Modulation Controls Valve Interstitial Cell Phenotype and Osteogenic Potential in 3D Culture. *Acta Biomater*. 2016 May;36:42–54.
108. Balachandran K, Sucusky P, Jo H, Yoganathan AP. Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenetic protein-dependent manner. *Am J Pathol*. 2010 Jul;177(1):49–57.
109. Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, Döring C, Halbhuber KJ, Schirmermeister F, et al. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study. *Cardiovasc Res*. 2003 Dec 1;60(3):497–509.
110. Schenke-Layland K, Riemann I, Opitz F, König K, Halbhuber KJ, Stock UA. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol*. 2004 May;23(2):113–25.
111. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I63–8.
112. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2005 Apr;27(4):566–71.
113. Liao J, Joyce EM, Sacks MS. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(8):1065–74.
114. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis*. 2007 Sep;16(5):567–573; discussion 574.
115. Bloch O, Erdbrügger W, Völker W, Schenk A, Posner S, Konertz W, et al. Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2012 Dec 4;18(12):BR487-BR492.
116. Pompilio G, Rossoni G, Sala A, Polvani GL, Berti F, Dainese L, et al. Endothelial-dependent dynamic and antithrombotic properties of porcine aortic and pulmonary valves. *Ann Thorac Surg*. 1998 Apr;65(4):986–92.

117. Butcher JT, Penrod AM, García AJ, Nerem RM. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Aug;24(8):1429–34.
118. Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, et al. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:527–49.
119. Lichtenberg A, Cebotari S, Tudorache I, Sturz G, Winterhalter M, Hilfiker A, et al. Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2006 Mar;15(2):287-293-294.
120. Kasimir M-T, Weigel G, Sharma J, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, et al. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost.* 2005 Sep;94(3):562–7.
121. Baraki H, Tudorache I, Braun M, Höffler K, Görler A, Lichtenberg A, et al. Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(31):6240–6.
122. Ma X, Lynch HE, Scully PC, Hutson MS. Probing embryonic tissue mechanics with laser hole drilling. *Phys Biol.* 2009;6(3):36004.
123. Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl Phys B.* 2005 Nov 15;81(8):1015–47.
124. Zimmermann B, Merker HJ, Barrach HJ. Basement membrane alterations after treatment with trypsin, hyaluronidase or collagenase. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1982;40(1):9–15.
125. Kobayashi H, Fujie M, Shinohara H, Ohi H, Sugimura M, Terao T. Effects of urinary trypsin inhibitor on the invasion of reconstituted basement membranes by ovarian cancer cells. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1994 May 1;57(3):378–84.
126. Leyh RG, Wilhelmi M, Walles T, Kallenbach K, Rebe P, Oberbeck A, et al. Acellularized porcine heart valve scaffolds for heart valve tissue engineering and the risk of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Oct;126(4):1000–4.
127. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, et al. Tissue Engineering of Pulmonary Heart Valves on Allogenic Acellular Matrix Conduits In Vivo Restoration of Valve Tissue. *Circulation.* 2000 Nov 7;102(suppl 3):Iii-50-Iii-55.
128. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, et al. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO Project (Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur). *Ann Thorac Surg.* 2003 Apr;75(4):1274–82.
129. Cushing MC, Jaeggli MP, Masters KS, Leinwand LA, Anseth KS. Serum deprivation improves seeding and repopulation of acellular matrices with valvular interstitial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Oct 1;75A(1):232–41.

Danksagungen

Zu aller erst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Arthur Lichtenberg für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, für einen äußerst wertschätzenden Umgang und auch für sehr hilfreiche Ratschläge, die die Promotion Dank seines weitreichenden Erfahrungsschatzes auf dem Gebiet des *tissue engineering* vorangebracht haben.

Zu tiefer Dankbarkeit fühle ich mich gegenüber Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari verpflichtet, dem ich viel mehr als nur eine herausragende Betreuung meiner Doktorarbeit verdanke. Durch seine charismatische Art und wissenschaftliche Präzision war er stets Quell der Inspiration und Motivation für mich, ein Lehrer, Mentor und Vorbild der mich während der Promotion und auf meinem gesamten Weg durch das Studium stark geprägt hat und dem ich in freundschaftlichem Verhältnis verbunden bleibe.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Frau Dr. Mareike Barth bedanken. Von ihr konnte ich von der Methodik bis hin zu denkstrukturellen Aspekten viel über das wissenschaftliche Arbeiten lernen. Darüber hinaus hatte sie stets ein offenes Ohr für alle Mitarbeiter des Instituts und hat das Laborleben durch ihre sympathische Art beseelt und geprägt. Bedanken möchte ich mich auch für ihren großartigen Einsatz und ihre Hilfe bei der Formatierung der Abbildungen im Rahmen der Datenveröffentlichung.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Dr. Andreas Weber, Herrn Dr. Antonio Pinto, Frau Dr. Silja Raschke und Herrn Dipl.-Ing. Jörn Hülsmann für eine gute Zusammenarbeit, für konstruktive Kritik und für ihre Hilfe bei methodischen oder theoretischen Fragestellungen. Insbesondere möchte ich mich zudem bei den ärztlichen Postdocs Herrn PD Dr. Assmann, Herrn Dr. Hug Aubin und Herrn Dr. Jan-Philipp Minol bedanken, für die uneingeschränkt Gleiches gilt und die mich durch ihren Ehrgeiz und ihren bedingungslosen Anspruch, klinisch wie auch gleichermaßen wissenschaftlich große Leistungen zu erbringen begeistert und motiviert haben. Ich bedanke mich bei unserer MTA, Frau Gisela Müller, die essentiell für den reibungslosen Ablauf des Tagesbetriebes im Labor ist, für ihre Gewissenhaftigkeit und freundliche Art.

Zudem möchte ich mich bei allen anderen Doktoranden des Institutes bedanken für eine schöne gemeinsame Zeit sowohl während des Laboralltags als auch auf diversen Kongressen sowie für die gegenseitige Unterstützung.

Großer Dank gilt auch Herrn Dipl.-Ing. Heiko Meyer und Herrn Dr. Ing. Markus Schomaker vom Laserzentrum Hannover für die gute und erfolgreiche Kooperation.

Ich bedanke mich bei Frau Eva Salveridou für ihre wissenschaftlichen Ratschläge, für das akribische Korrekturlesen und für ihre wertvolle Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Sehr großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Martina Deckert, welche bereits früh meine Begeisterung für die Wissenschaft geweckt hat, die mir jederzeit beratend zur Seite stand und vor der ich meine ausgesprochene Hochachtung zum Ausdruck bringen möchte.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Theodoros Moysidis für die Möglichkeit, schon früh Einblicke in die kardiovaskuläre Medizin zu erhalten, für beratende Gespräche und ein freundschaftliches Verhältnis.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir den Weg bis hierher geebnet und meine Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben sowie meinem Bruder Stefan. Ich danke euch für eure bedingungslose Unterstützung und den starken Rückhalt, dessen ich mir stets bewusst bin und der mir die Kraft gibt, meine Ziele zu erreichen.