

Aus der Klinik für Herzchirurgie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Die Rolle von endothelial-mesenchymaler Transition
bei Entstehung und Fortschreiten degenerativer
Veränderungen in Aortenklappen

Dissertation

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

vorgelegt von

Nadine Müller

2021

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Meinen Eltern gewidmet.

Zusammenfassung

Degenerative Aortenklappenerkrankungen stellen in der alternden Bevölkerung der Industrienationen ein zunehmendes medizinisches Problem dar. Aufgrund des begrenzten Verständnisses der Pathogenese valvulärer Degenerationsprozesse sind jedoch bislang keine pharmakologischen Behandlungsoptionen verfügbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung der endothelial-mesenchymalen Transition (EndoMT) im Rahmen der Pathogenese degenerativer Aortenklappenerkrankungen zu untersuchen. Dieser Begriff beschreibt das Phänomen der Umwandlung einer Zelle endothelialen Phänotyps in eine Zelle mesenchymalen Phänotyps. Stattgehabte Untersuchungen zeigen, dass jener Vorgang sowohl im Zusammenhang mit der Entwicklung verschiedener Organe und Gewebe, als auch im Rahmen diverser Krankheitsprozesse, wie Metastasierung und Fibrosierung, von Bedeutung ist.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden sowohl makroskopisch unveränderte als auch erkrankte humane Aortenklappen molekularbiologisch analysiert. Darüber hinaus wurde in Zellkultur-Versuchen der Einfluss verschiedener Substanzen auf den Ablauf von EndoMT untersucht. Um das unterschiedliche Verhalten entwicklungsbiologisch diverser Zelllinien zu eruieren, wurde unter Anwendung eines standardisierten Protokolls mit drei verschiedenen Zelltypen aus zwei verschiedenen Herkunftsorganismen (human und ovin) gearbeitet.

Im Rahmen der molekularbiologischen Analyse humaner Aortenklappen zeigten sich hinsichtlich der bezüglich EndoMT relevanten Gene signifikante Expressionsunterschiede zwischen den makroskopisch unveränderten und den erkrankten Aortenklappen. Die gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass EndoMT einen protektiven Effekt gegenüber degenerativen Prozessen im Bereich der Aortenklappe haben könnte.

Im Rahmen der Zellkultur-Versuche ließen sich beim Vergleich der verschiedenen Versuchsbedingungen Unterschiede im Wachstumsmuster und in der Genexpression erkennen. Diese erscheinen hinweisgebend auf eine EndoMT-induzierende Wirkung von TGF β 1 und Biglycan. Darüber hinaus legen die Ergebnisse einen unterschiedlichen Ablauf von EndoMT in Abhängigkeit vom Zelltyp nahe und stellen somit die Vergleichbarkeit von Versuchen zu EndoMT mit unterschiedlichen Zelltypen in Frage.

Mit den genannten Ergebnissen trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, die Pathogenese valvulärer Degenerationsprozesse besser zu verstehen und unterstützt somit das langfristige Ziel, Ansatzpunkte zur therapeutischen Intervention zu ermitteln.

Abstract

Degenerative diseases of the aortic valve represent an increasing cause of morbidity among the elderly population of industrial nations. However, due to limited understanding of the pathogenesis of valvular degeneration, there are no pharmacological treatment options available up until now.

Our research focuses on the question, to what extent endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) plays a role in the pathogenesis of degenerative aortic valve disease. This term defines a certain kind of transformation which endothelial cells can undergo to acquire a mesenchymal phenotype. Many studies did show that this process is of importance both during embryonic development and in context of pathological events, such as metastasis and fibrosis.

Our experiments included a molecular biologic analysis of unaltered and diseased human aortic valve leaflets. Furthermore, we investigated the influence of various substances on EndoMT by use of cell-culture. To elicit the properties of developmental diverse cell lineages we used a standardized protocol to work with three different cell types from two different species (human and ovine).

Our data show distinct varieties between unaltered and diseased aortic valve leaflets regarding the expression of EndoMT-relevant genes. The results suggest a protective effect of EndoMT against valvular degeneration.

In the course of our cell-culture-experiments, differences were perceptible between variant test conditions, concerning growth patterns and gene-expression. The results indicate an EndoMT-inducing effect of TGF β 1 and biglycan. Furthermore, they suggest that the process of EndoMT varies between different cell types. Consequential, this puts the comparability of experiments on EndoMT with different cell types into question.

With these results our research adds to a better understanding of valvular degeneration and contributes to the long-term aim of identifying starting points for therapeutic intervention.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Aortenklappe
AV	atrioventrikulär
β-GP	β-Glycerolphosphat
BGN	Biglycan
BMP	Bone Morphogenic Protein
DII	Delta-like (= Notch-Ligand-Kategorie)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EC	Endothelial Cells
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EndoMT	Endothelial-Mesenchymale Transition
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
HA	Hyaluronsäure
HCEC	Human Coronary Endothelial Cells
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HPVEC	Human Pulmonary Valve Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HVEC	Human Vein Endothelial Cells
KHK	Koronare Herzkrankheit
kDa	kiloDalton
MEndoT	Mesenchymal-Endotheliale Transition
MEpiT	Mesenchymal-Epitheliale Transition
min	Minute

MW	Mittelwert
OVEC	Ovine Valvular Endothelial Cells
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler
TGF β	Transforming Growth Factor- β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIC	Valvular Interstitial Cells
WB	Western Blot

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Epidemiologische Bedeutung von Erkrankungen der Aortenklappe.....	1
1.2	Ätiologie von Aortenklappenerkrankungen.....	1
1.3	Endothelial-mesenchymale und epithelial-mesenchymale Transition - Begriffserklärung	2
1.4	EndoMT und Herzklappenentwicklung.....	2
1.5	Pathologische Bedeutung von EMT und EndoMT.....	3
1.6	EMT/EndoMT-spezifische Signalwege.....	3
1.6.1	TGF β /BMP	3
1.6.2	Notch.....	4
1.6.3	ErbB	5
1.6.4	VEGF	5
1.7	Die Beteiligung von EndoMT an kardialer Fibrose	5
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Materialien	7
2.1.1	Chemikalien, Medien, Zusätze.....	7
2.1.2	Verbrauchsmaterialien, Instrumente und Gerätschaften	10
2.1.2.1	Verbrauchsmaterialien.....	10
2.1.2.2	Instrumente	11
2.1.2.3	Gerätschaften.....	11
2.1.3	Verwendete Lösungen, Puffer und Kulturmedien.....	13
2.1.3.1	Amphotericin B	13
2.1.3.2	Biglykan.....	13
2.1.3.3	Collagenase A	13
2.1.3.4	DMEM	13
2.1.3.5	Einfriermedium (10%ig) für lebende Zellen	14
2.1.3.6	EC-Medium	14
2.1.3.7	Gelatinelösung zum Beschichten der Zellkulturflaschen	14

2.1.3.8	Hyaluronsäure	14
2.1.3.9	Laemmli-Puffer	14
2.1.3.10	Primer.....	15
2.1.3.11	Renaturierungs-Puffer für Western Blot	15
2.1.3.12	RIPA-Puffer	15
2.1.3.13	Sammelgelpuffer	15
2.1.3.14	TBST	15
2.1.3.15	TGFβ1	15
2.1.3.16	Transfer-Puffer	16
2.1.3.17	Trenngelpuffer	16
2.1.3.18	VEGF	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Aortenklappen- und Gewebebank.....	17
2.2.1.1	Akquirierung von Patientendaten und Aortenklappen für die Daten- und Gewebebank.....	17
2.2.1.2	Klassifizierung der humanen Aortenklappen.....	18
2.2.1.3	Patientenkollektiv.....	19
2.2.2	Zellkultur.....	19
2.2.2.1	Verwendete Zellen.....	19
2.2.2.2	Isolation und Kultivierung von endothelialen Zellen aus ovinen Aortenklappen.....	19
2.2.2.2.1	Transportart.....	21
2.2.2.2.2	Verarbeitung der präparierten Klappensegel im Labor.....	21
2.2.2.2.3	Serumgehalt des EC-Mediums.....	21
2.2.2.3	Isolation und Kultivierung von endothelialen Zellen aus humanen Venen	21
2.2.2.4	Kultivierung von EC und VIC	22
2.2.2.5	Passagieren der Zellkultur	23
2.2.2.6	Mikroskopische Zellzahlbestimmung durch Lebendzellfärbung.....	23
2.2.2.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	24
2.2.2.8	Zur Stimulation der Zellkultur verwendete Substanzen	24
2.2.2.8.1	β-Glycerophosphat.....	24

2.2.2.8.2	Biglykan.....	24
2.2.2.8.3	Hyaluronsäure	25
2.2.2.9	Stimulation der Zellen	25
2.2.3	Untersuchung von RNA	27
2.2.3.1	Untersuchte Gene	27
2.2.3.2	RNA-Isolation aus Zellen	27
2.2.3.3	RNA-Isolation aus Gewebe.....	28
2.2.3.4	RNA-Messung	29
2.2.3.5	cDNA-Synthese	30
2.2.3.6	Primer-Design.....	30
	PCR.....	31
2.2.3.7	PCR-Auswertung.....	32
2.2.4	Untersuchung von Proteinen	32
2.2.4.1	Untersuchte Proteine	32
2.2.4.2	Protein-Isolation aus Zellen	33
2.2.4.3	Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels BCA-Assay	33
2.2.4.4	Western-Blot.....	33
2.2.4.4.1	Anfertigung der Gele	34
2.2.4.4.2	Vorbereitung der Proben	34
2.2.4.4.3	Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.2.4.4.4	Transfer.....	35
2.2.4.4.5	Waschschritte, Blockierung und Inkubation der Membran mit Antikörpern 36	
2.2.4.4.6	Detektion der Proteinbanden mittels Chemolumineszenz.....	38
2.2.4.4.7	Aufbewahrung der Membranen	38
2.2.4.4.8	Renaturierung der Membranen.....	38
2.2.4.5	Western-Blot Auswertung	38
2.2.5	Statistische Auswertung und bildliche Darstellung von Daten mittels GraphPad 38	
3	Ergebnisteil.....	40
3.1	Patientenkollektiv.....	40

3.2	Methodenetablierung – Isolation von EC aus ovinen Klappen	42
3.2.1	Transportarten	42
3.2.2	Verarbeitung der präparierten Klappensegel im Labor	42
3.2.3	Serumgehalt	43
3.3	Mikroskopisches Erscheinungsbild der EC nach Stimulation	43
3.3.1	OVEC	43
3.3.1.1	ECov3 Versuch2 (Schaf 1)	43
3.3.1.2	ECov5 Tier1 Versuch2 (Schaf 2)	45
3.3.1.3	ECov5 Tier3 Versuch3 (Schaf 3)	48
3.3.2	HVEC	50
3.3.2.1	EC8 Versuch2 (Patient 1)	50
3.3.2.2	EC10 Versuch1 (Patient 2)	52
3.3.2.3	EC14 Versuch2 (Patient 3)	54
3.3.3	HUVEC	56
3.4	PCR-Ergebnisse	59
3.4.1	Genexpression in humanen Aortenklappen	59
3.4.2	Ergebnisse der Stimulationsversuche, geordnet nach Genen	60
3.4.2.1	SNAI1	61
3.4.2.1.1	OVEC	61
3.4.2.1.2	HVEC	62
3.4.2.1.3	HUVEC	63
3.4.2.2	SNAI2	64
3.4.2.2.1	OVEC	64
3.4.2.2.2	HVEC	65
3.4.2.2.3	HUVEC	66
3.4.2.3	SMAD2	67
3.4.2.3.1	OVEC	67
3.4.2.3.2	HVEC	68
3.4.2.3.3	HUVEC	69
3.4.2.4	TWIST1	70

3.4.2.4.1	OVEC.....	70
3.4.2.4.2	HVEC.....	71
3.4.2.4.3	HUVEC.....	71
3.4.2.5	SPP1.....	71
3.4.2.5.1	OVEC.....	71
3.4.2.5.2	HVEC.....	73
3.4.2.5.3	HUVEC.....	73
3.4.2.6	BGLAP.....	74
3.4.2.6.1	OVEC.....	74
3.4.2.6.2	HVEC.....	74
3.4.2.6.3	HUVEC.....	76
3.5	Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse, geordnet nach Zelltyp.....	77
3.5.1	OVEC.....	77
3.5.1.1	α -SMA.....	77
3.5.1.2	CD31.....	78
3.5.2	HVEC.....	79
3.5.2.1	α -SMA.....	80
3.5.2.2	CD31.....	81
3.5.3	HUVEC.....	82
3.5.3.1	α -SMA.....	83
3.5.3.2	CD31.....	84
4	Diskussion.....	86
4.1	Diskussion der Methoden.....	86
4.1.1	Methodenetablierung: Isolation von EC aus ovinen Klappen.....	86
4.1.1.1	Transportart.....	86
4.1.1.2	Verarbeitung der präparierten Klappensegel im Labor.....	86
4.1.1.3	Serumgehalt des Mediums.....	86
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	87
4.2.1	Molekularbiologische Analyse von Patientenmaterial.....	87
4.2.2	Zellkultur-Stimulationsversuche.....	89

4.2.2.1	Morphologische Veränderungen	89
4.2.2.1.1	OVEC	89
4.2.2.1.2	HVEC	90
4.2.2.1.3	HUVEC.....	90
4.2.2.1.4	Vergleich der verschiedenen Zelltypen	90
4.2.2.2	Veränderungen auf RNA-Ebene	91
4.2.2.2.1	OVEC.....	91
4.2.2.2.2	HVEC	92
4.2.2.2.3	HUVEC.....	92
4.2.2.2.4	Vergleich der verschiedenen Zelltypen	93
4.2.2.3	Veränderungen der Kalzifizierungsmarker in den Stimulationsversuchen sowie in den erkrankten Aortenklappen.....	93
4.2.2.3.1	OPN	93
4.2.2.3.2	OCN	95
4.2.2.4	Veränderungen auf Protein-Ebene	96
4.2.2.4.1	Ovine Aortenklappen-EC.....	96
4.2.2.4.2	Humane Venen-EC	97
4.2.2.4.3	HUVEC.....	97
4.2.2.4.4	Ko-expression von CD31 und α -SMA.....	97
4.3	Schlussfolgerung.....	99
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	100

1 Einleitung

1.1 Die Epidemiologische Bedeutung von Erkrankungen der Aortenklappe

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen seit Mitte des 20. Jahrhunderts die Todesursachenstatistik in den Industrienationen an. Daneben gewinnen sie auch in den Entwicklungsländern zunehmend an Bedeutung [1]. In Deutschland wurden im Jahr 2018 36,2% aller Todesfälle von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursacht [2].

Unter den zehn häufigsten Todesursachen durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen finden sich auch die nicht-rheumatischen Aortenklappenkrankheiten wieder. Auf sie entfällt in dieser Kategorie im Jahr 2018 ein Anteil von 3,1 % [2], was ca. 1 % aller Todesfälle entspricht.

Epidemiologisch gesehen ist die Aortenklappenstenose die bedeutsamste Herzklappenerkrankung. Tatsächlich stellt sie in Europa und den USA die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung nach der arteriellen Hypertonie und der koronaren Herzkrankheit dar [3, 4]. Die Prävalenz der Aortenklappenstenose bei über 65-Jährigen beträgt 1,7-3 % [4-7], bei über 75-Jährigen sogar über 12 % [8]. Die Aortenklappensklerose, welche eine Vorstufe der kalzifizierenden Aortenklappenstenose darstellt, ist bei ca. 25 % der über 65-Jährigen und bei fast 50 % der über 85-Jährigen nachweisbar [4].

1.2 Ätiologie von Aortenklappenerkrankungen

Allgemein lassen sich Herzklappenerkrankungen in Klappenstenosen und Klappeninsuffizienzen einteilen, wobei diese auch in Kombination auftreten können. Unter einer Stenose versteht man eine Verengung im Klappenbereich, wodurch es zu einer herabgesetzten Schwingungsfähigkeit der Klappe mit konsekutiver Behinderung des Blutflusses kommt. Eine Klappeninsuffizienz stellt dagegen eine akute oder chronische Schlussunfähigkeit der Klappe dar, was einen retrograden Blutfluss zur Folge hat.

Bei Patienten über 65 Jahren liegen einer Aortenklappenstenose ätiologisch meist atherosklerotische Veränderungen zugrunde. Jüngere Patienten weisen dagegen häufig eine angeborene bikuspidale Aortenklappe auf. Bei dieser Anomalie sind Klappenöffnungsfläche und -schwingungsfähigkeit von vorneherein reduziert. Auch eine Endokarditis oder das hauptsächlich in Entwicklungsländern vorkommende rheumatische Fieber können ursächlich für die Entstehung einer Aortenklappenstenose sein [9].

Einer Aortenklappeninsuffizienz liegt zumeist eine Dilatation der Aortenwurzel bzw. der Aorta ascendens zugrunde. Hierzu kann es bedingt durch degenerative Prozesse, aber auch im Rahmen eines Marfan- oder Ehlers-Danlos-Syndroms sowie bei unbehandelter Lues kommen. Darüber hinaus kann auch die Aortenklappeninsuffizienz Folge einer Endokarditis oder des rheumatischen Fiebers sein [10].

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Entstehung von Aortenklappenerkrankungen durch Degeneration. Prozesse der endothelial-mesenchymalen Transition (EndoMT) und beteiligte Einflussfaktoren werden im Klappenendothel untersucht und mit denen in anderen Endothelien verglichen.

1.3 Endothelial-mesenchymale und epithelial-mesenchymale Transition - Begriffserklärung

Der Begriff endothelial-mesenchymale Transition (EndoMT) beschreibt das Phänomen der Umwandlung einer Zelle endothelialen Ursprungs in eine Zelle mesenchymalen Phänotyps. Korrespondierend hierzu wird die Umwandlung einer Zelle epithelialen Ursprungs in eine Zelle mesenchymalen Phänotyps als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Zwischen beiden Prozessen bestehen viele Gemeinsamkeiten, weswegen sich in der Literatur nicht selten eine begriffliche Durchmischung findet [11]. In der Chronologie der Entdeckung steht die EMT an erster Stelle, sie wurde 1968 erstmals von Elisabeth Hay beschrieben [12]. Die Erkenntnisse über die EMT bilden das Fundament der Forschung über die EndoMT.

Um sich den Begriffen EMT und EndoMT zu nähern, ist es zunächst notwendig, sich die Eigenschaften epithelialer, endothelialer sowie mesenchymaler Zellen vor Augen zu führen.

Epithelien und Endothelien erfüllen die Aufgabe, Gewebe gegenüber der Außenwelt oder körpereigenen Lumina abzugrenzen. Sie sind dazu in Form von Flächen organisiert. Diese besitzen darüber hinaus eine dreidimensionale Komponente, da die Zellen, aus welchen jene Flächen aufgebaut sind, senkrecht zu diesen eine apikal-basale Polarität aufweisen. Gürtelförmig angeordnete *tight* und *adherens junctions* verbinden die Zellen lückenlos miteinander, geben Stabilität und schaffen innerhalb des Epithels bzw. Endothels ein apikales und ein basales Kompartiment. Die Basalmembran bildet das Fundament des gesamten Epithels bzw. Endothels. Sie sorgt ebenfalls für Stabilität und grenzt das Epithel bzw. das Endothel von dem darunterliegenden Bindegewebe ab [11].

Mesenchymale Zellen hingegen sind nicht Teil einer solch strengen Architektur, da sie keine *tight junctions* ausbilden. Insbesondere die Gruppe der Myofibroblasten ist daher sowie dank ihrer amöboiden Morphologie dazu in der Lage, sich als individuelle Zellen durch die extrazelluläre Matrix (ECM) zu bewegen [11].

Durch die Umwandlung dieser sehr verschiedenen Zelltypen ineinander ermöglichen EMT, EndoMT sowie die gegenteiligen Prozesse, die mesenchymal-epitheliale bzw. mesenchymal-endotheliale Transition (MET bzw. MEndoT), dem Körper eine hohe Flexibilität bezüglich der Bildung verschiedener Gewebe. Dies ist insbesondere in der Embryologie von Bedeutung. So basiert die Entwicklung der meisten Gewebe und Organe auf Serien von EMT/EndoMT und MET/MEndoT. Das Herz stellt diesbezüglich keine Ausnahme dar. Alle Zellen, aus welchen es besteht, entstammen dem Wechselspiel der genannten Prozesse [11, 13].

1.4 EndoMT und Herzklappenentwicklung

Im Folgenden soll gesondert auf die Rolle eingegangen werden, welche EndoMT in Zusammenhang mit der Entwicklung der Herzklappen spielt.

In der Frühphase seiner Entwicklung besteht das Herz aus einem Schlauch, dessen Wand aus zwei Schichten aufgebaut ist: Einer inneren endokardialen und einer äußeren myokardialen Schicht. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich die extrazelluläre Matrix (ECM), welche auch als *cardiac jelly* bezeichnet wird [11]. Im Bereich von

Ausflusstrakt und atrioventrikulärem (AV) Kanal bilden sich beim Menschen zwischen dem 31. und 35. Entwicklungstag Vorwölbungen durch lokale Expansion der ECM, die sogenannten *endocardial cushions* [14]. In der Folge durchläuft ein Teil der endokardialen Zellen, welche diese Endokardkissen bedecken, EndoMT, um deren Inneres mit mesenchymalen Zellen zu besiedeln. Zur Besiedlung der Endokardkissen im Bereich des Ausflusstraktes tragen zusätzlich pharyngeale mesodermale Zellen sowie Zellen aus der Neuralleiste bei, die Endokardkissen im Bereich des AV-Kanals erhalten überdies via EMT mesenchymale Zellen aus dem Epikardium [13].

Die eingewanderten Zellen stellen Vorläufer der zukünftigen valvulären Interstitialzellen (VIC) dar. Im weiteren Verlauf der Klappenentwicklung expandiert das so entstandene Mesenchym in den Endokardkissen. Diese werden in der Folge zu hauchdünnen, beweglichen Klappensegeln mit charakteristischer trilaminärer Struktur umgebaut [11]. Während sich die Endokardkissen im Ausflusstrakt zu den Taschenklappen entwickeln, entsteht aus den Vorwölbungen im AV-Kanal neben den Segelklappen auch das AV-Septum sowie der membranöse Teil des Ventrikelseptums [13].

1.5 Pathologische Bedeutung von EMT und EndoMT

So unabdingbar EMT und EndoMT in der Embryonalentwicklung sind, so fatal können die Auswirkungen einer unkontrollierten Reaktivierung dieser Prozesse im adulten Organismus sein. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Ermöglichung von invasivem Wachstum und Metastasierung maligner Tumoren durch EMT [15]. Darüber hinaus sind EMT und EndoMT im Rahmen fibrotischer Erkrankungen, beispielsweise der Lunge, des Herzens oder der Niere, von Bedeutung. Hierbei kommt es zu einer übermäßigen Ansammlung von Myofibroblasten in dem betroffenen Gewebe. Drei Mechanismen sind dafür im Wesentlichen verantwortlich: Zum ersten die Proliferation und Aktivierung örtlicher Gewebefibroblasten oder Fibroblasten aus der Adventitia von Blutgefäßen. Dies stellt eine Reaktion auf die Infiltration inflammatorischer Zellen dar, welche profibrotische Signale aussenden. Zum zweiten die Rekrutierung von Fibroblasten-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark infolge lokaler Chemokin-Ausschüttung. Und zum dritten die Transformation epithelialer oder endothelialer Zellen in Myofibroblasten, *ergo* EMT bzw. EndoMT [16].

1.6 EMT/EndoMT-spezifische Signalwege

Es wurden verschiedene Signalwege im Zusammenhang mit EMT und EndoMT untersucht und beschrieben. Im Folgenden werden hiervon einige zum besseren Verständnis einzeln dargestellt.

1.6.1 TGF β /BMP

Von allen Faktoren, welche EMT und EndoMT beeinflussen, kommt der *transforming growth factor β* (TGF β) - Superfamilie eine Schlüsselrolle zu [13]. Zwei ihrer Unterfamilien, die TGF β - und die *bone morphogenetic protein* (BMP) - Familie, sind dabei von besonderer Bedeutung [11]. Erstere umfasst die drei Isoformen von TGF β , TGF β 1-3. Die Faktoren binden an einen Rezeptorkomplex aus Typ1- und Typ2-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren,

wodurch es zur Aktivierung des *Smad*-Signalweges kommt. Nach Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten *Smads* (*R-Smads*) *Smad2* und *Smad3* bilden diese einen Komplex mit *Smad4* (*co-Smad*). Dieser Komplex wandert zum Zellkern, wo er mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert und so die Transkription bestimmter Target-Gene reguliert [17, 18]. Unter anderem kommt es hierdurch zur Induktion des sogenannten *high mobility group factor* (HMGA2), welcher wiederum einige für den Ablauf von EMT/EndoMT wichtige Transkriptionsfaktoren induziert: *Snai1* (= *Snail*), *Snai2* (= *Slug*) und *Twist* [13, 19]. *Snai1* ist für den Ablauf von EMT/EndoMT von zentraler Bedeutung, da es die Expression von E-Cadherin sowie von Claudin und Occludin, zwei wichtigen Bestandteilen der *tight junctions*, herunter reguliert [20-22]. Hierdurch wird die Herauslösung der betroffenen Zellen aus dem Epithel- bzw. Endothelzellverband ermöglicht. *Snai1*-Knockout-Tiere sterben bei der Gastrulation, da ihren Zellen die Fähigkeit zum Durchlaufen dieses primären EMT-Ereignisses fehlt [23]. *Twist* trägt ebenfalls durch Herunter-Regulierung von E-Cadherin, Claudin und Occludin zur Auflösung der Zell-Zell-Kontakte bei. Darüber hinaus erhöht es die Expression von N-Cadherin, welches die Migrationsfähigkeit der Zellen steigert, und von Vimentin, einem mesenchymalen Marker [24, 25]. *Snai2* führt zur Repression von VE-Cadherin und zur Dissoziation von Desmosomen, was die Motilität der betroffenen Zellen ebenfalls steigert [26, 27]. Dabei ist *Snai2* in den Notch-Signalweg eingebunden, welcher den klassischen EMT/EndoMT-Signalweg über die TGF β -Superfamilie moduliert [26].

Die genannten Transkriptionsfaktoren werden außer durch TGF β 1-3 auch durch Vertreter der BMP-Familie reguliert [11]. Die BMPs binden dabei wie TGF β an einen Rezeptorkomplex aus Typ1- und Typ2-Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Dies zieht ebenfalls die Aktivierung des *Smad*-Signalweges nach sich, allerdings handelt es sich bei den Rezeptor-assoziierten *Smads* (*R-Smads*) in diesem Fall um *Smad1*, *Smad5* und *Smad8*. Nach ihrer Phosphorylierung assoziieren sie analog zum TGF β -Signalweg mit *Smad4* (*co-Smad*) und der Rezeptorkomplex wandert zum Zellkern, um dort die Genexpression zu beeinflussen [17, 18]. BMP2 und BMP4 wirken auf diese Weise EMT/EndoMT-induzierend, während BMP7 den Prozess interessanterweise hemmt [11, 28-31].

Sowohl der TGF β - als auch der BMP-Signalweg wird über eine negative Feedbackschleife reguliert. Hauptakteure dieses Mechanismus sind *Smad6* und *Smad7*, die sogenannten *Inhibitory Smads* (*I-Smads*). Sie hemmen die Signaltransduktion auf mehrfache Weise, u.a. indem sie mit den *R-Smads* interagieren. Während *Smad7* sowohl in den TGF β - als auch in den BMP-Signalweg eingebunden ist und diesen antagonisiert, ist *Smad6* spezifisch für BMP [32, 33].

Neben ihrer Bedeutung für die Induktion von EndoMT wird insbesondere BMP2 und TGF β 1 eine Rolle bei Kalzifizierungsprozessen zugeschrieben. Beide Faktoren wirken osteogen [34].

1.6.2 Notch

Der Notch-Signalweg ist ein evolutionär stark konservierter Signaltransduktionsweg, welcher in die Regulation vielfältiger zellulärer Prozesse eingebunden ist [35]. Er vermittelt über laterale Inhibition die Zell-Zell-Kommunikation und ist so für die Gewebeformation von großer Bedeutung [36]. So ist es nicht verwunderlich, dass Notch auch im Zusammenhang mit

EMT/EndoMT eine Rolle spielt und somit Defekte dieses Signalweges unter anderem zur Ausbildung von Herzklappenanomalien führen [37-40].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass über den Notch-Signalweg *Smad3* hochreguliert wird und Notch somit synergistisch mit dem TGF β -Signalweg, nicht aber mit dem BMP-Signalweg zusammenwirkt [26, 41]. In einer Studie von Niessen et al. exprimierten Endothelzellen (EC) bei simultaner Stimulation mit TGF β 2 und dem Notch Liganden Dll4 verstärkt und verlängert *Snai1* im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit TGF β 2. Während TGF β 2 jedoch auch alleine zu erhöhten Levels von *Snai1* führte, zeigte sich bei alleiniger Anwendung von Dll4 gar kein Effekt. Dagegen führte die alleinige Stimulation mit Dll4 zu einer verstärkten Expression von *Snai2*, während die alleinige Stimulation mit TGF β 2 auf *Snai2* nur minimale Wirkung hatte. Ko-Stimulation mit TGF β 2 und Dll4 erhöhte das Level von *Snai2* im Vergleich zu dem nach alleiniger Stimulation mit Dll4 nicht. Ähnliche Effekte zeigten sich bei Stimulation mit TGF β 1 anstelle von TGF β 2.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Verzahnung der TGF β - und Notch-Signalwege und zeigen, dass *Snai2* ein spezifisches Target von Notch ist [26].

1.6.3 ErbB

Die Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase ermöglicht die Interaktion von Zellen mit ihrer extrazellulären Umgebung. Sie sind essentiell für die Entwicklung des Herzens im Allgemeinen sowie im Speziellen für die Klappenentwicklung, wobei ein Zusammenhang mit EMT/EndoMT besteht [42, 43]. Im adulten Organismus wirken ErbB2 und ErbB4 kardioprotektiv. Während es Hinweise darauf gibt, dass ErbB1 und ErbB4 eher EMT/EndoMT-inhibierend wirken, haben Signale über ErbB2 und ErbB3 offensichtlich die gegenteilige Wirkung [11, 42-44].

Der ErbB-Signalweg ist mit einer Vielzahl anderer Signalwege verschaltet, unter anderem sowohl mit dem TGF β als auch mit dem Notch-Signalweg. So kann TGF β Signalwege aktivieren, welche den ErbB-Rezeptoren nachgeschaltet sind. Eine verstärkte Aktivierung von Notch geht mit einer Überexpression von ErbB2 und ErbB3 einher [45, 46].

1.6.4 VEGF

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein wichtiges Signalmolekül, welches die Vaskulogenese sowie die Angiogenese steuert und zudem für die vaskuläre Homöostase von Bedeutung ist [47]. Darüber hinaus ist VEGF in die Regulation von EMT/EndoMT eingebunden. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl stark erhöhte (z.B. bei Hypoxie) als auch stark erniedrigte (z.B. bei Hyperglykämie) VEGF-Level einen hemmenden Einfluss auf EMT/EndoMT haben [43, 48-50].

1.7 Die Beteiligung von EndoMT an kardialer Fibrose

In einer wegweisenden Studie demonstrierten Zeisberg et al. 2007 eine wesentliche Beteiligung von EndoMT in der Entwicklung von experimentell induzierter myokardialer Fibrose [51]. Bislang ist offen, inwieweit sich die Erkenntnisse speziell auf Erkrankungen der Aortenklappe übertragen lassen. Jedoch zeigten Paranya et al. bereits 2001, dass eine

Stimulation oviner und humaner Pulmonal- sowie Aortenklappen-EC mit TGF β 1 zur Auslösung von EndoMT führt. Die Autoren stellten zudem fest, dass bei analoger Stimulation mikrovaskulärer sowie venöser EC diese Transdifferenzierung ausblieb [52]. Dieselbe Abhängigkeit vom Zelltyp zeigte sich 2006 auch in einer Studie von Parachuri et al.: Es wurden humane Pulmonalklappen-EC (HPVEC) u.a. mit TGF β 1,2,3 oder VEGF sowie simultan mit TGF β 2 und VEGF behandelt. Dabei zeigte sich bei Stimulation mit TGF β 2, nicht jedoch bei Stimulation mit TGF β 1 oder 3, eine verstärkte Expression mesenchymaler Marker. Die Stimulation mit VEGF bewirkte mit einer verstärkten Expression endothelialer Marker den gegenteiligen Effekt und war in der Lage, die durch TGF β 2 induzierte Transformation zu hemmen. Bei Stimulation humaner dermaler mikrovaskulärer EC (HDMEC) mit TGF β 2 waren dagegen keine Effekte zu beobachten [53]. Dies widerspricht einer Studie von Medici et al., in welcher sowohl HDMECs als auch humane Nabelschnur-EC (HUVECs) nach Stimulation mit TGF β 2 bzw. BMP4 EndoMT-spezifische Veränderungen aufwiesen [54]. Weitere Studien berichten ebenfalls über die Auslösung von EndoMT bei Stimulation nonvalvulärer EC bovinen und murinen Ursprungs mit TGF β [55-57]. Die bei diesen Versuchen verwendete Isoform war TGF β 1, welches hier anders als bei Paruchuri et al. EndoMT auszulösen vermochte. Auch in den Versuchen von Wylie-Sears et al. war EndoMT durch Stimulation mit TGF β 1 in Kulturen oviner Mitralklappen- und Aortenklappen-EC auslösbar [58, 59].

Die unterschiedlichen Ergebnisse der genannten Studien verdeutlichen, dass weitere Forschung zur Auslösung von EndoMT in Zellkulturen benötigt wird. In Frage zu stellen ist, inwiefern die verschiedenen Ergebnisse aus den genannten Experimenten miteinander vergleichbar sind. Schließlich wurde mit sehr unterschiedlichen Zelltypen aus verschiedenen Herkunftsorganismen gearbeitet und die angewandten Versuchsprotokolle waren nicht immer vergleichbar. Dabei existieren auch abseits der Forschung zu EMT/EndoMT Hinweise darauf, dass z.B. selbst die sehr eng benachbarten EC-Populationen der Aortenklappe und der Aorta mitunter ganz unterschiedliche Eigenschaften aufweisen [60].

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Ablauf sowie die Bedeutung von EndoMT im Rahmen der Pathogenese von degenerativen Aortenklappenerkrankungen zu untersuchen. Aufbauend auf den in Abschnitt 1.7 zusammengefassten Studien fokussiert die vorliegende Arbeit dabei auf die durch TGF β und VEGF induzierten Signalwege.

Es wurden sowohl makroskopisch unveränderte als auch degenerierte humane Aortenklappen molekularbiologisch analysiert. Darüber hinaus wurde in Zellkultur-Versuchen mit EC unterschiedlicher Herkunft der Einfluss verschiedener Substanzen sowie Substanzkombinationen auf den Ablauf von EndoMT untersucht. Hierfür wurde geprüft, ob es durch entsprechende Stimulation zu Änderungen der Gen- oder Proteinexpression kommt. Um das unterschiedliche Verhalten entwicklungsbiologisch diverser Zelllinien zu eruieren, wurde unter Anwendung eines standardisierten Protokolls mit drei verschiedenen Zelltypen aus zwei verschiedenen Herkunftsorganismen (human und ovin) gearbeitet.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Medien, Zusätze

Substanz	Hersteller	Cat.Nr.
10 x SDS-Laufpuffer	Thermo Scientific	28362
Alpha-SMA-AK (Source: Mouse)	Sigma-Aldrich	A 5228
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma Aldrich	A3678-25G
Amphotericin B (Handelsname: Fungizone)	Bristol-Myers Squibb	PZN 05104 483
Anti-mouse-Sekundärantikörper (Source: Goat)	Jackson Immuno Research	115-035- 044
Anti-rabbit-Sekundärantikörper (Source: Goat)	Dianova	111-035- 003
Bicinchoninic Acid Solution (für BCA Assay)	Sigma Aldrich	B9643
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	B0126-25G
CD31-AK (Source: Rabbit)	Abcam	Ab32457
Collagenase A	Roche Diagnostics GmbH	10 103 578 001
Copper(II) Sulfate Solution (für BCA-Assay)	Sigma Aldrich	C2284
Deoxycholic Acid sodium salt (für RIPA-Puffer)	Amresco	0613
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich	43819-25G
DMEM	gibco by life technologies	21885-025
DPBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco by life technologies	14190-094
Endothelial Cell Growth Medium	Promo Cell	C-22010

Endothelial Cell Growth Medium – SupplementMix	Promo Cell	C-39215
Ethanol 99,5%	VWR Chemicals	85033.360
Fetal bovine serum	Sigma-Aldrich	F7572
Gelatine	Sigma-Aldrich	69391
Glycerin	Roth	3783.2
Glycine	Serva	23390.04
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega	A6001
Healon5 (= Hyaluronsäure)	Abbott Medical Optics	10-2000-15
Hydrochlorid Acid (HCl)	VWR Chemicals	20255.290
IGEPAL® CA-630	Sigma Aldrich	I8896
Isopropanol (2-Propanol)	Merck	1.09634.25 11
Jonosteril-Infusionslösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	1340224
Kaliumchlorid 3 mol/l - Elektrolytlösung	Mettler-Toledo	51350072
L-Glutamin (200 mM)	gibco by life technologies	25030-024
Medium 199	gibco by life technologies	31150-022
Methanol	VWR Chemicals	20847.320
Natriumchlorid	Merck	1.06404.10 00
Non-essential amino acids	Sigma-Aldrich	M7145
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa)	Thermo Scientific	26616
PenStrep = Penicillin Streptomycin	gibco by life technologies	15140-122
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	32209

QIA Shredder™	QIAGEN GmbH	79656
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH	205313
RDD-Puffer	Qiagen	1010397
Recombinant human TGFβ ₁	RD System	240-B-0027CF
Recombinant human VEGF	RD System	293-VE
rh-Biglycan	R&D-Systems	2667-CM
RNase-Free DNase set	QIAGEN GmbH	79254
RNeasy® MiniKit	QIAGEN GmbH	74106
Rotiphorese Gel (40% Acrylamid+Bisacrylamid 29:1)	Roth	A515.1
SDS-Pellets	Roth	CN30.4
β-Actin-AK (Source: Rabbit)	Cell Signaling	4967
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich	50020
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M7154
Super Signal Molecular Weight Protein Ladder	Thermo Scientific	84785
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad	161-0801
TRIZMA® base	Sigma-Aldrich	T1503
Trypanblau 0,4%	VWR Chemicals	K940
Trypsin-EDTA 0,25%	gibco by life technologies	25200-056
TWEEN 20 Detergent	CALBIOCHEM	655205
WesternBright™ Quantum	Biozym	541015

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Instrumente und Gerätschaften

2.1.2.1 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller	Cat.Nr.
6-Well-Platte	Greiner bio-one GmbH	657160
Cell Scraper 16 cm	Sarstedt	83.1832
Cellstar cell culture flasks T25	Greiner bio-one GmbH	690175
Cellstar cell culture flasks T75	Greiner bio-one GmbH	658175
Cellstar Falcons 15mL	Greiner bio-one GmbH	188271
Cellstar Falcons 50mL	Greiner bio-one GmbH	227261
Combs (für SDS-Gele) 1,0mm 12-Well	Novex by life technologies	NC3012
Combs (für SDS-Gele) 1,0mm 15-Well	Novex by life technologies	NC3015
Combs (für SDS-Gele) 1,5mm 10-Well	Novex by life technologies	NC3510
Cryo Tube	Clear Line	390708
Einwegskalpelle	Feather	02.001.30.01 0
Entsorgungsbeutel 200x300mm	Roth	E706.1
Gelkassetten	Thermo Fisher Scientific	NC2015
Handschuhe Latex	Semper Care	
Handschuhe Nitril	Ansell	
Nitrocellulose-Membran (0,2µm Porengröße)	Biometra	090-005
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GMBH	747720 747715
Pipettenspitzen	StarLab Eppendorf Corning Incorporated	

Präzisionswischtücher KIMTECH Science	Kimberly-Clark	7552
Raucodrape (sterile Tücher)	Lohmann&Rauscher	33010
Reaktionsgefäß	Eppendorf	
Rotilabo®Blottingpapiere	Roth	
Single use syringe filter (0,2µm)	Sartorius AG	17597
Stericup® 500mL Millipore Express® PLUS 0,22µm PES	Millipore Corporation	SCGPU05R E
UV-Küvetten mikro	BRAND GMBH	7592 10
Zellsieb: 100µm Cell Strainer	Biologix Research Company	15-1100

2.1.2.2 Instrumente

Instrumente	Hersteller	Cat.Nr.
Bulldog-Klemmen (Dieffenbach Serrefines 3,5cm straight)	Schreiber Instrumente	15-1030
Nadelhalter		
Pinzetten (Anatomisch und chirurgisch)		
Pipetten	Eppendorf	

2.1.2.3 Gerätschaften

Geräte und Software	Genauere Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	VX-95	Systemec
Bildanalyse-Software (für WB-Auswertung)	ImageQuant TL	GE Healthcare Life Science
Chemolumineszenz- Scanner	Amersham Imager 600	GE Healthcare Bio-Sciences
CO ₂ -Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Scientific
Digitalkamera	PowerShot SX 20 IS	Canon

Durchlichtmikroskop	LEICA DMIL LED	Leica
Laminarflow-Werkbank	HERAsafe KS	Thermo Scientific
Mikroskop-Software	Leica Application Suite	Leica
Netzgerät für die Elektrophorese	Electrophoresis power supply EPS301	Amersham pharmacia biotech
PCR-Gerät	StepOne Plus Real time PCR-System	Applied Biosystems
pH-Meter		inoLab
Photometer	BioPhotometer plus ND-1000 Spectrophotometer	Eppendorf Nanodrop technologies
Pipetten	Eppendorf reference Eppendorf research	Eppendorf
Pipettierhelfer	Accu-jet pro	BRAND GMBH
Präzisionswaage	BP110S	Sartorius
Statistik-Software	GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Tank-Blot-Kammer	Mini-Protean® 3cell	BIO-RAD
Taumelnder Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments
Taumelrollenmischer	RS-TR05	PHOENIX Instrument
Thermocycler	Thermocycler T3000	Biometra
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge	Model: Sprout	Biozym
Ultraschall-Homogenisator	Braun-Sonic 125 Homogenisator	Quigley Rochester
Vortex Mixer	REAX 2000 Vibrofix VF1 MS1 Minishaker	Heidolph Janke&Kunkel labortechnik IKA

Wasserbad	Typ 1092	Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL)
WesternBlot Gel-Laufkammer	XCell SureLock™ Mini-Cell System	Invitrogen
Zählkammer für Zellen	0,1 mm Tiefe; 0,0025 mm ³	Neubauer
Zentrifugen	Centrifuge 5804R Universal 16 Heraeus Labofuge 300 Megafuge 1.0	Eppendorf Hettich Zentrifugen Thermo Scientific Heraeus Sepatech

2.1.3 Verwendete Lösungen, Puffer und Kulturmedien

2.1.3.1 Amphotericin B

Amphotericin B wurde als Zusatz für das Zellkulturnährmedium verwendet, um ein mögliches Wachstum von Pilzen darin zu unterbinden.

Es erfolgte die Herstellung einer Stocklösung von 500 µg/mL. Hierzu wurden 50 mg lyophilisiertes Amphotericin B in 100 mL 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst. Anschließend wurde die fertige Stocklösung mithilfe eines Spritzenfilters mit 0,2µm Filter-Membran steril filtriert und aliquotiert bei -20°C weggefroren.

2.1.3.2 Biglykan

Rekombinantes humanes Biglykan (BGN) wurde dem EC-Medium im Rahmen der Stimulationsversuche zugesetzt.

Die Herstellung der Stocklösung mit einer Konzentration von 100 µg/mL erfolgte durch Zugabe von 500 µL sterilem PBS zu 50 µg lyophilisiertem BGN. Sie wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.1.3.3 Collagenase A

Zum Ablösen der EC im Rahmen der EC-Isolation diente eine 0,2%ige Collagenase A – Lösung. Diese wurde im Vorfeld wie folgt hergestellt:

Zunächst wurde eine 1%ige Stocklösung aus lyophilisierter Collagenase A und sterilem PBS angesetzt und mithilfe eines Spritzenfilters mit 0,2µm Filter-Membran steril-filtriert. Die Aufbewahrung bis zur Verwendung erfolgte aliquotiert bei -20°C. Vor Gebrauch wurde die Stocklösung 1:5 mit 37°C-warmem Medium 199 verdünnt und so die gewünschte Konzentration von 0,2 % erreicht.

2.1.3.4 DMEM

DMEM diente als Zellkulturmedium für ovine valvuläre Interstitialzellen (VIC). Zu 500 mL DMEM wurden 5 mL Pen/Strep, 5 mL L-Glutamin, 5 mL non-essential amino acids (jeweils in

handelsüblicher Konzentration) und 50 mL FCS gegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

2.1.3.5 Einfriermedium (10%ig) für lebende Zellen

Das verwendete 10%ige Einfriermedium für die Zellkultur entspricht einer Lösung aus 10 % Dimethyl-Sulfoxid und 90 % FCS. Diese wurde nach Herstellung aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.1.3.6 EC-Medium

Zu 500 mL EC-Medium wurden zunächst der zugehörige Supplement Mix, 5mL AmphotericinB (500 µg/mL) und 5mL Pen/Strep (handelsübliche Konzentration) gegeben. Darüber hinaus erwies sich das Aufstocken des Serumgehaltes von 2% auf 10% mittels 40mL FCS als zuträglich für das Wachstum der isolierten EC. Das fertige Medium wurde steril-filtriert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.1.3.7 Gelatinelösung zum Beschichten der Zellkulturflaschen

Alle verwendeten Zellkulturflaschen wurden im Vorfeld mit einer 1%igen Gelatinelösung beschichtet, um eine bessere Anhaftung der Zellen zu ermöglichen.

Zur Herstellung dieser Lösung wurden zunächst in einer Schottflasche 5g Gelatine in 500mL PBS gelöst. Da sich die Gelatine erst durch Erhitzen vollständig löst, wurde die Mischung autoklaviert und anschließend steril-filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.1.3.8 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) wurde dem EC-Medium im Rahmen der Stimulationsversuche zugesetzt.

Die Herstellung der Stocklösung mit einer Konzentration von 2,5 µg/µL erfolgte durch Zugabe von 4980 µL sterilem PBS zu 600 µL handelsüblicher HA-Lösung mit einer Konzentration von 23 mg/mL. Sie wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.1.3.9 Laemmli-Puffer

Zur Herstellung von 10 mL Laemmli-Puffer wurden folgende Zutaten zueinander gegeben:

- 3,75 mL 1M Tris/HCl pH 6,8 (Die Herstellung hiervon erfolgte analog zu der vom Sammel- und Trenngelpuffer)
- 6 mL Glycerin (≅ 60 %)
- 1,26 g SDS-Pellets (≅ 12,6%)
- ca. 0,9258 g DTT (≅ 600 mM)
- ca. 0,009 g Bromphenolblau (≅ 0,09%)

Anschließend wurde die Lösung mit Aqua bidest. auf 10 mL aufgefüllt und aliquotiert bei -20°C weggefroren.

2.1.3.10 Primer

Zunächst wurde entsprechend der Herstellerangaben eine Primer-Stocklösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μL angesetzt. Anschließend wurde diese 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, um eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/μL zu erhalten. Die Primersequenzen können Tabelle 3 und Tabelle 4 auf S. 31 entnommen werden.

2.1.3.11 Renaturierungs-Puffer für Western Blot

Zur Herstellung von 1 L Renaturierungs-Puffer wurden folgende Zutaten zueinander gegeben:

- 15 g Glycin
- 100 mL 10%ige SDS-Lösung (\cong 10 g SDS-Pellets in 100 mL Aqua bidest.)
- 1 mL Tween 20

Anschließend wurde die Lösung mit 37% HCl auf pH = 2,3 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 1 L aufgefüllt.

2.1.3.12 RIPA-Puffer

Zur Herstellung von 50 mL RIPA-Puffer wurden folgende Zutaten zueinander gegeben:

- 0,44g NaCl (\cong 150 mM)
- 0,3 g Tris (\cong 50 mM)
- 0,5 mL Igepal CA 630 (\cong 1%)
- 0,25 g Natriumdeoxycholat (\cong 0,5%)
- 0,05 g SDS-Pellets (\cong 0,1%)

Anschließend wurde die Lösung mit 1 M HCl auf pH = 8 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 50 mL aufgefüllt.

2.1.3.13 Sammelgelpuffer

Für die Herstellung der für die Gelelektrophorese benötigten SDS-Gele wurde 0,5 M Tris/HCl-Puffer benötigt. Hierfür wurden zunächst ca. 9,0855 g TrizmaBase in ca. 100 mL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 37 % HCl auf pH = 6,8 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 150 mL aufgefüllt. Gelagert wurde der Puffer bei 4°C.

2.1.3.14 TBST

Zunächst wurde 1L des Puffers in 10facher Konzentration angesetzt. Dazu wurden ca. 24,228 g Tris Base (\cong 200 mM), ca. 87,66 g NaCl (\cong 1,5 M) und 10 mL Tween-20 (\cong 1%) in Aqua bidest. gelöst. Der pH wurde mit 37 % HCl auf 7,6 eingestellt. Vor Verwendung wurden 100 mL des 10 x Puffers mit 900 mL Aqua bidest. verdünnt.

2.1.3.15 TGFβ1

Rekombinantes humanes TGFβ1 wurde dem EC-Medium im Rahmen der Stimulationsversuche zugesetzt.

Die Herstellung der Stocklösung mit einer Konzentration von 10 µg/mL erfolgte durch Zugabe von 200 µL steril filtrierter 4mM HCl mit einem FCS-Gehalt von 0,1 % zu 2 µg lyophilisiertem TGFβ1. Sie wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.1.3.16 Transfer-Puffer

Zunächst wurde 1L des Puffers in 10facher Konzentration angesetzt. Dazu wurden ca. 30,285g Tris Base (\pm 250 mM) und ca. 142,633g Glycin (\pm 1,9 M) in Aqua bidest. gelöst. Vor Verwendung wurden 100 mL des 10 x Puffers mit 700 mL Aqua bidest. und 200 mL Methanol verdünnt und der pH mit 37 % HCl auf 8,3 eingestellt.

2.1.3.17 Trenngelpuffer

Für die Herstellung der für die Gelelektrophorese benötigten SDS-Gele wurde 1,5 M Tris/HCl-Puffer benötigt. Hierfür wurden zunächst ca. 45,4275 g TrizmaBase in ca. 200 mL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 37% HCl auf pH= 8,8 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 250 mL aufgefüllt. Gelagert wurde der Puffer bei 4°C.

2.1.3.18 VEGF

Rekombinantes humanes VEGF wurde dem EC-Medium im Rahmen der Stimulationsversuche zugesetzt.

Die Herstellung der Stocklösung mit einer Konzentration von 5 µg/mL erfolgte durch Zugabe von 2 mL PBS und 2 µL FCS zu 10 µg lyophilisiertem VEGF. Sie wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Aortenklappendaten- und Gewebebank

2.2.1.1 Akquirierung von Patientendaten und Aortenklappen für die Daten- und Gewebebank

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine bereits seit dem Jahr 2010 vorbestehende Daten- und Gewebebank mit Daten und Gewebe von Patienten, welche sich einem Aortenklappenersatz bzw. einer Herztransplantation unterziehen mussten, gepflegt. Diese Tätigkeit umfasste sowohl die Aufklärung von Patienten als auch die Abholung entfernter Aortenklappen aus dem OP. Insgesamt wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten 153 Patienten aufgeklärt und die entsprechend verfügbaren Aortenklappen akquiriert. Das Projekt wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität genehmigt (Studennummern der Ethikvoten: 3428, 4412R, 3508 und 4567). Für jeden in der Daten- und Gewebebank erfassten Patienten liegt eine unterschriebene Aufklärung vor, in welcher er sich zur Bereitstellung seiner Daten, zu einer zusätzlichen präoperativen Blutentnahme mit Bestimmung der in Tabelle 1 aufgeführten Laborwerte sowie zur Spende seiner Aortenklappe für Forschungszwecke bereiterklärt. Die in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführten Parameter wurden bei jedem teilnehmenden Patienten in anonymisierter Form erhoben und in numerischen Werten bzw. mit Ziffern kodiert in einer Datenbank erfasst.

Tabelle 1: Parameter Patientendatenbank: Laborwerte, Vorerkrankungen

Laborwerte	Vorhandensein spezieller Vorerkrankungen
Kreatinin	Diabetes mellitus Typ1/2
Thrombozytenzahl	Niereninsuffizienz
Leukozytenzahl	Arterielle Hypertonie
CRP	KHK
HbA1c	cAVK
Gesamtcholesterin	pAVK
HDL	Inflammatorische Erkrankung
LDL	Dyslipoproteinämie
Triglyceride	

CRP: C-reaktives Protein, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, KHK: Koronare Herzkrankheit, cAVK: Cerebrale arterielle Verschlusskrankheit, pAVK: Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Tabelle 2: Parameter Patientendatenbank: Untersuchungsergebnisse, Sonstiges

Untersuchungsergebnisse	Sonstiges
Ejektionsfraktion	Gewicht
Vmax über der Aortenklappe	Größe
dpmax über der Aortenklappe	Raucherstatus
LVEDD	Ethnische Gruppe
KÖF der Aortenklappe	Marcumareinnahme
	Anzahl der Klappensegel (bicuspid/trikuspid)

Vmax: Maximale Flussgeschwindigkeit, dpmax: Maximaler Druckgradient, LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, KÖF: Klappenöffnungsfläche

Zusätzlich wurden, wenn vorhanden, weitere Vorerkrankungen der Patienten sowie deren aktuelle Medikation notiert und im Freitext in der Datenbank vermerkt. Die Untersuchungsergebnisse wurden der Patientenakte entnommen. Waren sie unvollständig, wurde zur Ergänzung kurz vor der Operation ein Schluckecho durchgeführt. Auch der Großteil der Laborwerte ließ sich der Akte entnehmen. Lediglich das Gesamtcholesterin, HDL, LDL sowie die Triglyzeride wurden aus einer gesonderten Blutprobe, welche kurz vor der OP entnommen wurde, bestimmt. Ausschlusskriterien zur Aufnahme eines Patienten in die Klappendatenbank waren Infektionen mit HIV, Hepatitis B oder C, sowie eine Endokarditis.

Sobald in einer OP die Aortenklappe eines Patienten entfernt wurde, erfolgte die Benachrichtigung des Labors. Bis zur Abholung verblieb die Aortenklappe in Ringer-Lösung. Zunächst wurde die Aortenklappe klassifiziert (siehe Kapitel 2.2.1.2). Anschließend wurden die Segel fotografiert, einzeln in Kryoröhrchen überführt und vor Ort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die dauerhafte Aufbewahrung im Labor erfolgte bei -80°C.

2.2.1.2 Klassifizierung der humanen Aortenklappen

Die Klassifizierung der in der Gewebebank asservierten Aortenklappen erfolgte anhand makroskopischer Gesichtspunkte. Dabei orientierten sich die Einteilungskriterien am Vorgehen von Barth et al. [61]. Unterschieden wurden makroskopisch unveränderte, fibrotische und kalzifizierte Aortenklappen. Die makroskopisch unveränderten Aortenklappen stammten von Patienten, welche sich einer Herztransplantation unterziehen mussten. Solchermaßen klassifiziert wurden Klappensegel, welche in physiologischer Weise eine zarte, durchscheinende Struktur aufwiesen. Aortenklappen, welche infolge degenerativer Prozesse eine Verdickung ihres Gewebes zeigten, wurden in der Gruppe der fibrotischen Klappen zusammengefasst. Wiesen die Präparate Kalzifizierungen auf, wurden sie entsprechend in die kalzifizierte Gruppe eingeteilt (Siehe Abb. 1).

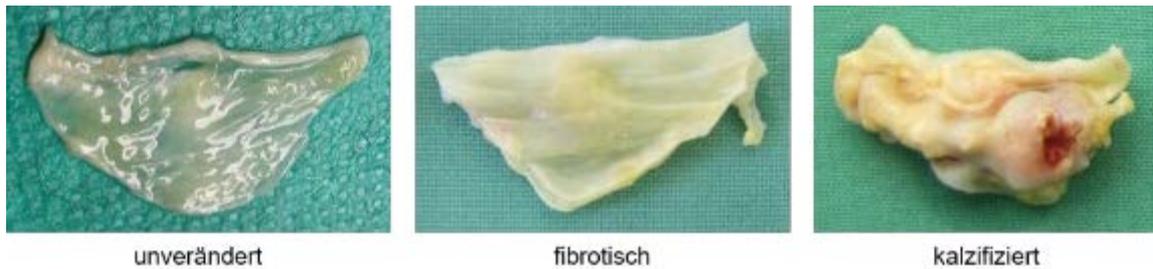


Abb. 1: Klassifizierung von humanen Aortenklappen nach makroskopischen Gesichtspunkten [62]

2.2.1.3 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 30 Aortenklappen aus der Gewebebank molekularbiologisch analysiert. Hierfür wurden jeweils 10 makroskopisch unveränderte, fibrotische und kalzifizierte Aortenklappen ausgewählt. Ausschlusskriterium war das Vorhandensein einer bikuspiden Klappe.

Das Patientenkollektiv, dessen Aortenklappen molekularbiologisch analysiert wurden, weist die in Tabelle 7 zusammengefassten Eigenschaften auf (siehe S. 40). Zur deskriptiven statistischen Analyse wurden nicht alle der in Tabelle 1 und Tabelle 2 genannten Parameter herangezogen, da sie zum Teil nicht für jeden Patienten vollständig erhoben werden konnten. Jene Daten, die vollständig und damit korrekt auswertbar waren, finden sich in Tabelle 7.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Verwendete Zellen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden sowohl humane und ovine EC als auch humane und ovine VIC kultiviert. Erstere wurden für die Versuche verwendet, letztere wurden vereinzelt als Positiv-Kontrolle im Rahmen von Messungen benötigt. Neben selbst isolierten EC aus ovinen Aortenklappen (OVEC) und humanen Venen (HVEC) fanden auch humane Nabelschnur-EC (HUVEC), welche aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) Düsseldorf (AG Prof. Dr. Kögler) bezogen wurden, Verwendung. Die genutzten VIC stammen aus der eigenen Arbeitsgruppe.

2.2.2.2 Isolation und Kultivierung von endothelialen Zellen aus ovinen Aortenklappen

Die Schafsherzen, aus welchen die Isolation der OVEC erfolgte, wurden frisch von dem am nächsten gelegenen Schlachthof bezogen (Schlachthof Laame in Wuppertal).

Im Zuge der Etablierung dieses Protokolls wurden verschiedene Möglichkeiten des Transportes und der Verarbeitung des Materials erprobt. Es wird zunächst jene Methode dargestellt, welche von allen die besten Ergebnisse brachte. Eine Darstellung der darüber hinaus erprobten Varianten des Prozedere schließt sich am Ende dieses Abschnitts an.

Vorbereitend wurde pro Herz eine T25er-Flasche mit 3 mL 1%iger Gelatine beschichtet, um später ein gutes Anhaften der Zellen zu ermöglichen. Kurz vor der Abfahrt zum Schlachthof

wurden die benötigten Zellkulturmedien im Wasserbad (37°C) warm gestellt und pro Herz 0,5 mL der tiefgefrorenen Collagenase-Stocklösung in den 4°C-Kühlschrank verbracht, um sie dort auftauen zu lassen.

Die Aortenklappen wurden beim Schlachthof vor Ort steril aus den Herzen herausgeschnitten. Zur Orientierung wurde zunächst die gesamte Herzspitze mit einem Skalpell entfernt. Aus dem muskelstärkeren linken Ventrikel wurde dann mithilfe einer Pinzette der Weg Richtung Klappenebene verfolgt, um die Aortenklappe darzustellen. Anschließend wurde die Aorta gekürzt und längs im Bereich einer der Kommissuren aufgeschnitten, sodass das Gefäß aufgeklappt werden konnte und die Aortenklappe frei lag. Daraufhin konnten die einzelnen Klappensegel mit einer anatomischen Pinzette leicht gespannt und mit einer Schere an der Gefäßwand herausgeschnitten werden. Es wurde dabei darauf geachtet, die Kontaktfläche der Pinzette mit der Klappe gering zu halten, um das Endothel möglichst wenig zu schädigen. Anschließend wurden die herausgeschnittenen Klappensegel sofort in ein Falcon mit gekühltem EC-Medium überführt, welches während des gesamten Transports zum Labor auf Eis stand. Der Transport dauerte je nach Verkehrsaufkommen ca. 1-1,5 h.

Im Labor fanden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank statt.

Alle Segel einer Klappe wurden mit steriler Pinzette aus dem Falcon mit EC-Medium in ein Falcon mit 2,5 mL Collagenase A (0,2 % in Medium 199) überführt. Hierin erfolgte eine 5-minütige Inkubation im Wasserbad schüttelnd bei 37°C. Anschließend wurde die Collagenase-Aktivität mittels 3,5 mL Medium 199 mit 10 % FCS-Gehalt abgestoppt. Die gesamte Zellsuspension wurde mithilfe einer Pipette durch ein Zellsieb in ein weiteres Falcon überführt. Zudem wurden die einzelnen Klappensegel auf dem Zellsieb platziert und mehrfach mit Medium 199 mit 10 % FCS-Gehalt abgespült. Es folgte die Zentrifugation der gewonnenen Zellsuspension über 5 min mit 1500 rpm bei RT. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 mL Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert und in eine mit Gelatine beschichtete T25-Zellkulturflasche ausgesät.

Daraufhin wurde diese sofort in den Brutschrank (37°C; 5% CO₂) gestellt und nach Möglichkeit 48h lang nicht bewegt. Erst nach dieser Zeit erfolgte die mikroskopische Beurteilung. Lag Wachstum vor, wurde das Medium bei Verfärbung sofort, andernfalls am darauffolgenden Tag gewechselt. Es erwies sich als vorteilhaft, die Zellen in den ersten Tagen nach der Isolation nicht mit PBS zu waschen, um sie nicht zusätzlich zu stressen. Die Zelldichte wurde täglich kontrolliert. Im Verlauf erfolgte der Mediumwechsel alle 2-3 Tage, bei sehr raschem Wachstum und Verfärbung des Mediums ggf. auch täglich.

Kam es initial zum Wachstum der OVEC in Kultur, konfluieren die anfangs vorliegenden EC-Nester zumeist innerhalb weniger Tage zu einem einheitlichen Monolayer.

Wie bereits eingangs erwähnt, wurden im Zuge der Methodenetablierung verschiedene Möglichkeiten hinsichtlich Transportart vom Schlachthof ins Labor, Materialverarbeitung und Serumgehalt des Nährmediums erprobt.

Im Folgenden sollen die verschiedenen Vorgehensweisen dargestellt werden.

2.2.2.2.1 Transportart

Neben der beschriebenen Methode, die Klappen beim Schlachthof vor Ort herauszuschneiden und in eisgekühltem EC-Medium zu transportieren, wurden zwei weitere Transportarten erprobt. Bei beiden wurden die Herzen in Gänze ins Labor gebracht und erst dort präpariert. Eine Variante bestand darin, die Herzen zum Transport lediglich in eine Kühltasche zu packen. Die andere Variante bestand darin, die Herzen in einem großen, mit Jonosteril-Infusionslösung gefüllten Glasgefäß auf Eis zu transportieren.

2.2.2.2.2 Verarbeitung der präparierten Klappensegel im Labor

Weiter oben ist die letztlich gewählte Methode dargestellt, die Klappensegel in Gänze in Collagenase A zu inkubieren. Eine weitere getestete Variante bestand in Anlehnung an das Vorgehen von Paranya et al. darin, die Klappensegel vor der Inkubation in Collagenase A zu zerschneiden [52]. Danach wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb gefiltert und wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Bei der dritten getesteten Variante wurden die Klappensegel zerschnitten und die Stücke direkt mit EC-Medium in eine Zellkulturflasche hineingegeben. Anschließend wurde diese im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Es fand bei dieser Methode also keine Behandlung der Klappensegel mit Collagenase A statt.

2.2.2.2.3 Serumgehalt des EC-Mediums

Auch mit dem Serumgehalt des verwendeten EC-Mediums wurde experimentiert. Dafür erfolgte in zwei Versuchsansätzen die Kultivierung von EC mit unverändertem, handelsüblichem EC-Medium mit einem FCS-Gehalt von 2 % sowie in Anlehnung an das Vorgehen von Paranya et al. mit EC-Medium mit einem aufgestockten FCS-Gehalt von 10 % [52].

2.2.2.3 Isolation und Kultivierung von endothelialen Zellen aus humanen Venen

Bei den verwendeten Venen handelte es sich um überschüssiges Bypass-Material, welches direkt aus dem OP bezogen wurde. Die Patienten wurden über die Weiterverwendung der Venen sowie ihrer Daten zu experimentellen Zwecken aufgeklärt. Das Projekt ist durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität genehmigt (StUDIENnummern der Ethikvoten: 3428, 4412R, 3508 und 4567). Die Aufbewahrung der Venen bis zum Eintreffen im Labor erfolgte in Ringer-Lösung. Es erwies sich als essenziell, die dortige Weiterverarbeitung möglichst schnell erfolgen zu lassen.

Im Labor fanden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank statt. Sofort nach Eintreffen einer Vene im Labor wurde diese mithilfe einer 1000µL-Pipette zweimal mit 1mL warmem EC-Medium durchspült, um Erythrozytenrückstände zu entfernen (Im Verlauf der Etablierung erwies sich dieses Vorgehen als vorteilhafter gegenüber dem Durchspülen mit PBS, die Isolationsversuche waren häufiger erfolgreich.). Hierbei wurde zudem kontrolliert, ob Leckagestellen vorhanden waren, durch welche später Isolationslösung austreten könnte – dies war jedoch im Rahmen der EC-Isolationen für diese Doktorarbeit nie der Fall.

Zum Ablösen der HVEC diente wie bei der Isolation der OVEC eine 0,2%ige Collagenase A – Lösung. Nach Verschluss des einen Gefäßendes mittels einer Bulldog-Klemme wurde die Vene mit dieser 0,2%igen Collagenase A – Lösung befüllt. Die notwendige Menge hiervon belief sich dabei meist auf etwa 1mL. Anschließend wurde auch das andere Ende der Vene mit einer Bulldog-Klemme verschlossen und das Gefäß in eine sterile Petrischale gelegt. Nach erneuter Kontrolle auf Dichtigkeit wurde die Vene in der Petrischale mit 37°C-warmem Medium 199 übergossen bis sie vollständig bedeckt war und anschließend für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert (siehe Abb. 2). Es wurde darauf geachtet, diese Zeit nicht zu überschreiten, um zu verhindern, dass außer den HVEC auch die darunterliegenden Fibroblasten abgelöst werden.

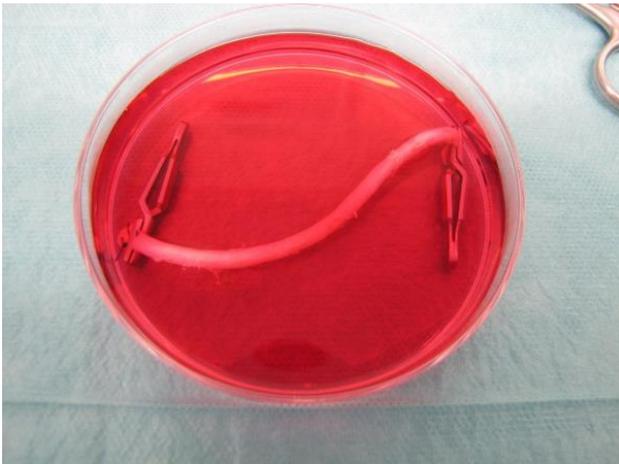


Abb. 2: Isolation von EC aus humanen Venen

Anschließend wurde die Collagenase-Suspension in einer frischen Petrischale aufgefangen und das Gefäß mehrfach mit Medium199 mit 10 % FCS-Gehalt durchspült, um das Enzym abzustoppen. Im weiteren Verlauf folgte zunächst die Zentrifugation der gewonnenen Zellsuspension über 5 min mit 1500 rpm bei RT. Im Anschluss hieran wurde dann der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 mL Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert und in eine mit Gelatine beschichtete T25-Zellkulturflasche ausgesät.

Das weitere Vorgehen erfolgte analog zur Kultivierung endothelialer Zellen aus ovinen Aortenklappen (siehe Abschnitt 2.2.2.2).

Es erfolgten elf Isolationsversuche. Von den betreffenden Patienten beträgt der Altersmittelwert 75,18 Jahre, der Altersmedian 76 Jahre. Es handelte sich um fünf weibliche und sechs männliche Patienten. Drei der Isolationsversuche waren erfolgreich. Von den hier zugehörigen Patienten beträgt der Altersmittelwert 80 Jahre, der Altersmedian 79 Jahre. Es handelte sich um zwei weibliche und einen männlichen Patienten.

2.2.2.4 Kultivierung von EC und VIC

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank statt. Alle Medien und Zusätze wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Um das Risiko für Kontaminationen des Mediums zu minimieren und häufiges Erwärmen und Abkühlen zu vermeiden, wurde es aliquotiert und jeweils nur die benötigte Menge erwärmt.

Zur Unterstützung der Adhärenz der Zellen in den Kulturflaschen wurden diese vor Verwendung mit Gelatine beschichtet. Hierzu wurde dort so viel 37°C warme 1%ige Gelatinelösung hineingegeben, dass der gesamte Boden bedeckt war. Danach wurden die Kulturflaschen für mindestens 5 min bei 37°C inkubiert. Kurz vor der Besiedlung mit Zellen wurde die überschüssige Gelatinelösung abgesaugt.

Außerhalb der Stimulationsversuche wurden die Kulturflaschen nicht mit einer festgelegten Zahl von Zellen besiedelt. Stattdessen wurden die Zellen beim Passagieren in einer 1:3 bis 1:5 Verdünnung in die neuen Flaschen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Es wurden pro cm² Kulturflasche ca. 160 µL Zellkulturmedium eingesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

2.2.2.5 Passagieren der Zellkultur

Die EC wurden passagiert, sobald sie ca. 80 % Konfluenz erreicht und ihre typische Kopfsteinpflaster-Morphologie ausgebildet hatten. Hierzu wurde die Kultur nach Absaugen der Nährlösung zunächst 2 x mit PBS gewaschen, um Zelltrümmer und Medienrückstände wie FCS zu entfernen. FCS hemmt das Enzym Trypsin, welches für die Ablösung der Zellen verwendet wird. Pro cm² Kulturflasche wurden 40µL Trypsin / EDTA (einfach konzentriert) auf die Zellkultur pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 4 min bei 37°C im Brutschrank. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und – wenn nötig - mechanisch unterstützt. Durch Zugabe von ca. 100 µL Medium199 mit 10 % FCS-Gehalt pro cm² Kulturflasche wurde die Trypsinwirkung abgestoppt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15 mL Falcon überführt und für 5 min mit 1500 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific Inc.). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 3-5 mL EC-Medium resuspendiert. Zur Vermehrung wurden die EC meist in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:5 in neue Kulturflaschen ausgesät. In den Stimulationsversuchen wurde dagegen darauf geachtet, genau die vorher festgelegte Zellzahl auszusäen. Hierzu mussten die Zellen zunächst gezählt werden.

Das Passagieren der VIC erfolgte analog zu dem geschilderten Vorgehen ebenfalls bei 80 % Konfluenz.

2.2.2.6 Mikroskopische Zellzahlbestimmung durch Lebendzellfärbung

Die Bestimmung der Konzentration einer Zellsuspension erfolgte durch Lebendzellfärbung mit Trypanblau. Diese diente gleichzeitig dem Vitalitätsnachweis, da Trypanblau durch die Zellmembran abgestorbener oder geschädigter Zellen eindringen kann und somit Zellkern und Zytoplasma blau anfärbt, während die intakte Zellmembran lebender Zellen den Farbstoff am Eindringen hindert und diese somit im mikroskopischen Bild weiß erscheinen.

Im Vorfeld der Zellzählung wurde zunächst die Neubauer-Zählkammer zusammengesetzt. Dazu wurden die Zählkammer und das zugehörige Deckgläschen angehaucht und so aneinandergespreßt, dass Newton'sche Ringe sichtbar wurden.

Für die Zellzählung wurden jeweils 50 µL Zellsuspension und 50 µL Trypanblau miteinander vermischt und von der Seite unter das Deckgläschen pipettiert. Anschließend wurden die

lebenden Zellen in allen 8 Großquadraten ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte mittels folgender Formel: Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat x 10.000 (Kammerfaktor) x 2 (Verdünnungsfaktor) = Zellzahl/mL.

2.2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Im Rahmen der Zellkulturarbeiten wurden die kultivierten Zellen in einer niedrigen Passage eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt wieder zu verwenden.

Hierzu wurde zunächst das Einfrieremedium bei 4°C aufgetaut, da es in kaltem Zustand weniger toxisch für die Zellen ist. Die Ablösung der einzufrierenden Zellen erfolgte wie weiter oben in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben. Sollten bestimmte Zellzahlen eingefroren werden, wurde nach der Zentrifugation das Zellpellet zunächst in mehreren mL EC-Medium resuspendiert um - wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben - die Zellkonzentration und Gesamtzellzahl zu ermitteln. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut 5 min mit 1500 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit der Gesamtzellzahl konnte dann errechnet werden in wie vielen mL Einfrieremedium das Zellpellet aufgenommen werden musste, um die gewünschte Zellkonzentration zu erreichen. Oft wurden die Zellen aus einer Kulturflaschen aber auch nur in 3-4 Portionen aufgeteilt und eingefroren, wodurch in diesem Fall der Zwischenschritt mit dem Zählen entfiel. Die Zellportionen wurden jeweils in einem Volumen von 1 mL Einfrieremedium resuspendiert und zügig bei -80°C eingefroren. Nach zwei Tagen erfolgte die Umlagerung in flüssigen Stickstoff, zur dauerhaften Aufbewahrung.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellportionen mit 5 mL 37°C - warmem Medium199 versetzt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde 5 min mit 1500 rpm bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 3-5 mL EC-Medium bzw. DMEM resuspendiert und anschließend in eine mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.2.8 Zur Stimulation der Zellkultur verwendete Substanzen

Von den zur Stimulation eingesetzten Substanzen wurde auf TGFβ1 und VEGF bereits im Rahmen der Einleitung eingegangen. Die darüber hinaus verwendeten Substanzen sollen in der Folge kurz vorgestellt werden.

2.2.2.8.1 β-Glycerophosphat

Bekanntermaßen fördert Hyperphosphatämie vaskuläre Kalzifikation und kardiale Fibrose [63, 64]. Unklar ist, ob auch EndoMT durch erhöhte Level von Phosphat beeinflusst wird.

Der Zusatz von β-Glycerophosphat (β-GP) zu Zellkulturmedien stellt eine erprobte Möglichkeit dar, *in vitro* Hyperphosphatämie zu simulieren und Kalzifikationen auszulösen [65]. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um zu testen, welche Auswirkungen kalzifizierend wirkende Umgebungsbedingungen auf den Ablauf von EndoMT haben.

2.2.2.8.2 Biglykan

Biglykan (BGN) ist ein Proteoglykan und als solches Bestandteil der ECM, wo es hauptsächlich in ungelöster Form vorliegt. Gelöstes BGN wird u.a. von aktivierten

Makrophagen ausgeschüttet und neigt dazu, sich in verletztem Gewebe anzusammeln [34, 66]. Dies wiederum fördert die Akkumulation von Lipoproteinen, welche von BGN gebunden werden, und damit die Bildung atherosklerotischer Plaques [67]. So zeigen fibrosierte und kalzifizierte Aortenklappen in unmittelbarer Nähe kalzifizierender Knötchen Ansammlungen von BGN sowie eine erhöhte BGN-Genexpression im Klappengewebe [61, 68, 69]. Zudem induziert BGN über die Aktivierung von *Toll-like-2*- und *-4*-Rezeptoren BMP2 und TGF β 1 und moduliert deren pro-osteogene Aktivität [34]. Es steht zu vermuten, dass BGN über Beeinflussung dieser Faktoren auch Auswirkungen auf den Ablauf von EMT/EndoMT haben könnte. Entsprechend konnte eine 2017 veröffentlichte Studie zeigen, dass Chondroitinsulfat und Dermatansulfat – beides Bestandteile von BGN – eine EndoMT-induzierende Wirkung besitzen [68].

2.2.2.8.3 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein Glykosaminoglykan (GAG) und wie BGN Bestandteil der ECM. Schon lange ist bekannt, dass eine HA-reiche Umgebung die Zellmigration fördert und damit charakteristisch ist für Gewebe, welches Reparaturmechanismen oder Umbauvorgänge durchläuft [70]. So ist beispielsweise das Stroma maligner Tumoren oft reich an HA [71]. Daneben spielt die migrationsfördernde Wirkung von HA naturgemäß auch in der Entwicklungsbiologie eine wichtige Rolle. Unter anderem wurde gezeigt, dass HA die migratorische Kapazität von EC im Rahmen der Herzklappenentwicklung fördert. Speziell wurde in verschiedenen Versuchen eine EndoMT-fördernde Wirkung von HA demonstriert [68, 72]. Ferner ist bekannt, dass es im Rahmen der Klappensklerose zu Ansammlungen von HA in der Nähe kalzifizierender Knötchen kommt [69, 73]. Inwieweit dieser Umstand und die Fähigkeit von HA zur EndoMT-Induktion zusammenhängen bzw. pathophysiologische Bedeutung haben, ist derzeit nicht geklärt.

2.2.2.9 Stimulation der Zellen

Im Rahmen der Stimulationsversuche wurden EC verschiedenen Ursprungs mit den in Abschnitt 2.2.2.8 genannten Substanzen bzw. Substanzkonzentrationen behandelt. Ziel hiervon war, deren EndoMT-auslösendes Potential zu beurteilen. Ein Versuch umfasste die Aussaat einer Zelllinie auf zwei 6-Well-Platten, wobei in jedem Well andere Bedingungen herrschten.

Es wurden mit drei verschiedenen Zelltypen Stimulationsversuche durchgeführt: HUVEC, HVEC und OVEC. Zu Beginn wurde mit Verdünnungsreihen die zur Aussaat optimale Zellkonzentration für jede Zelllinie ermittelt, um am Ende des Protokolls eine weder zu dichte, noch zu geringe Besiedlung vorzufinden. Hierzu wurden die Zellen in unterschiedlicher Anzahl auf einer 6-Well-Platte ausgesät und analog zum geplanten Versuchssetting über 8 Tage in 1 mL EC-Medium kultiviert. Das Medium wurde am 2. und am 5. Tag nach der Aussaat gewechselt. Am 8. Tag wurde die Zelldichte evaluiert und die für die Aussaat der Versuchsreihen geeignete Zellkonzentration bestimmt.

An Tag 0 der Versuche wurden dann die verschiedenen Zelltypen in entsprechender Anzahl auf jeweils zwei 6-Well-Platten ausgesät und zunächst in 1 mL EC-Medium kultiviert. Am 2. und am 5. Tag wurde das Medium gewechselt und dabei die stimulierenden Substanzen

zugemischt. Dabei erfolgte regelmäßig eine mikroskopische Beurteilung von Zellwachstum und Zellmorphologie.

Die Stimulation erstreckte sich somit insgesamt über eine Zeitdauer von 6 Tagen (Siehe Abb. 3). In jedem der 12 besiedelten Wells herrschten dabei eigene Versuchsbedingungen. Stimuliert wurde mit VEGF, TGF β 1, β -GP, BGN und HA einzeln sowie in Kombination von VEGF bzw. TGF β 1 mit β -GP, BGN oder HA. Ein Well diente als Kontrolle, darin fand keine Stimulation statt (siehe Abb. 4).

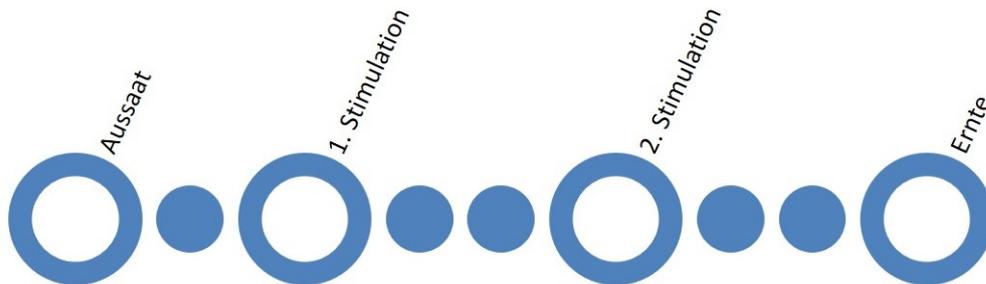


Abb. 3: Zeitlicher Ablauf der Stimulation (jeder Kreis symbolisiert 1 Tag)

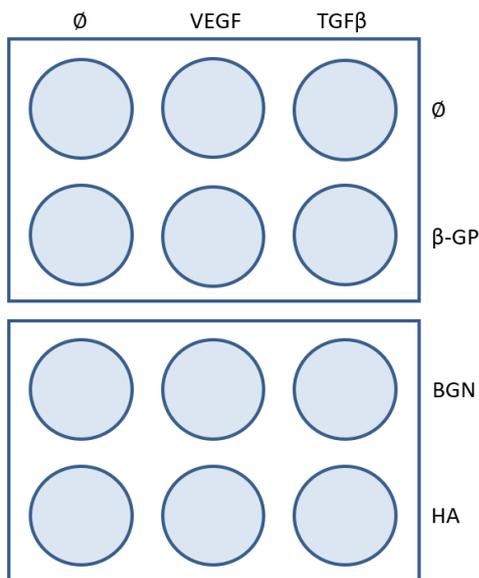


Abb. 4: Stimulationsbedingungen

Die verwendeten Konzentrationen der zugesetzten Substanzen orientierten sich an der Literatur. So wurde TGF β 1 in Anlehnung an die Versuche von Gwanmesia et al. zur Degeneration valvulärer Interstitialzellen in einer Konzentration von 5 ng/mL eingesetzt [74]. Dies liegt außerdem im Rahmen der von Paranya et al. ausgetesteten TGF β 1-Konzentrationen zur Auslösung von EndoMT [52]. Der Einsatz von VEGF in einer Konzentration von 10 ng/mL orientierte sich an den Versuchen von Paruchuri et al. [53]. β -GP wurde - wiederum in Anlehnung an Gwanmesia et al. - in einer Konzentration von 10

mMol/L verwendet [74]. Die eingesetzten Mengen von BGN (1 µg/mL) und HA (100 µg/mL) entsprechen Erfahrungswerten aus laufenden internen Experimenten.

Insgesamt fanden 2 x 21 Versuchsdurchläufe statt. Jeweils die Hälfte der doppelt durchgeführten Versuche diente zur Gewinnung von RNA und von Protein. Es wurden jeweils 3 Versuche mit HUVEC, HVEC aus den Venen dreier verschiedener Patienten und OVEC von drei verschiedenen Schafen durchgeführt (siehe Abb. 5).

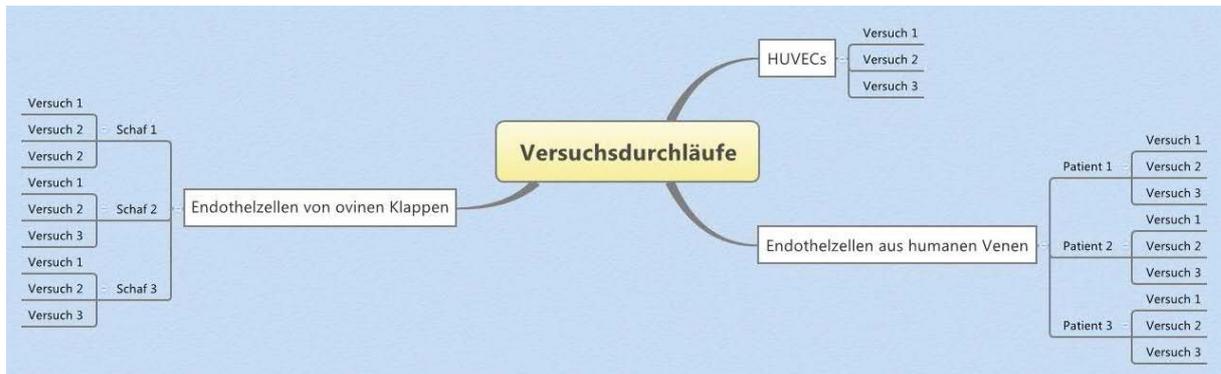


Abb. 5: Versuchsdurchläufe

Da angenommen wurde, dass sich die selbst isolierten Zellen aufgrund der Variabilität der Herkunftsorganismen variabler verhalten als die sozusagen standardisierten HUVEC, sollte die Schwankungsbreite innerhalb jedes biologischen Replikates bei diesen Zellen durch die Versuchswiederholungen verringert werden, um die Repräsentativität des Vergleichs zwischen den biologischen Replikaten zu erhöhen.

Am letzten Tag der Stimulationsversuche wurden die Zellen fotografiert und anschließend geerntet.

2.2.3 Untersuchung von RNA

2.2.3.1 Untersuchte Gene

Im Rahmen der molekularbiologischen Analyse von Gewebe und Zellen erfolgte die Expressionsbestimmung mehrerer EndoMT-spezifischer Gene (*Snai1*, *Snai2*, *Smad2* und *Twist1*). Darüber hinaus wurde die Genexpression zweier chondro-osteogener Marker bestimmt: Osteopontin (OPN, Genname (speziesabhängig): *OPN* bzw. *SPP1*) und Osteocalcin (OCN, Genname: *BGLAP*). Ihre Expression korreliert bei vorliegender Kalzifizierung bzw. Kalziumablagerung mit deren Ausmaß [75].

2.2.3.2 RNA-Isolation aus Zellen

Am Ende der Zellkultur-Stimulationsversuche wurde aus einem der beiden 6-Well-Pärchen RNA isoliert. Alle hierzu verwendeten Gebrauchsmaterialien waren RNase-frei und die getragenen Handschuhe wurden mit RNase-Away benetzt. Die in diesem sowie im folgenden Kapitel aufgeführten Reagenzien und Gebrauchsmaterialien sind, sofern nicht anderswo aufgeführt, Bestandteil des hierfür verwendeten *Rneasy Mini Kit* (Qiagen).

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und 2 x mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well 350 µL mit 1 % β-Mercaptoethanol versetzter RLT-Puffer hinein pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Wells gelöst und die Suspension jeweils auf einen *Qia-Shredder* gegeben. Anschließend wurden diese 1 min lang mit 10621 g bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 350 µL 70%igem Ethanol versetzt, wobei die Suspension so lange auf- und abpipettiert wurde, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Anschließend wurde sie auf die RNA-Isolations-Säulen gegeben. Diese wurden nun ebenfalls 1 min lang mit 10621 g bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µL RW1-Puffer auf jede Säule gegeben. Danach wurden die Säulen erneut wie gehabt zentrifugiert. Es folgte der DNase-Verdau. Hierzu wurden zunächst pro Säule 70 µL RDD-Puffer und 10 µL DNase-Lösung miteinander vermischt. Von dieser Mischung wurden dann 75 µL direkt auf die Membran jeder Säule pipettiert und diese damit 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Säulen erneut mit 350 µL RW1-Puffer befüllt und so wie bisher üblich zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µL RPE-Puffer auf die Säulen gegeben. Nach erneuter Zentrifugation unter den bekannten Bedingungen, wurden wieder 350 µL RPE-Puffer auf die Säulen gegeben und diese im Anschluss 2 min lang mit 10621 g bei RT zentrifugiert. Danach wurden die Einsätze der Säulen in frische 1,5mL-Reaktionsgefäße überführt und 30 µL RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Die Reaktionsgefäße mit den Säulen wurden daraufhin wieder 1 min lang mit 10621 g bei RT zentrifugiert. Hiermit war die Isolation beendet, der Durchfluss wurde bei -80°C eingefroren und verwahrt.

2.2.3.3 RNA-Isolation aus Gewebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde RNA humaner Aortenklappen aus der Gewebekbank (siehe Kapitel 2.2.1) molekularbiologisch analysiert, welche zuvor von Frau Dr. med. Svenja Klose im Rahmen ihrer medizinischen Doktorarbeit aufgereinigt und nicht vollständig verbraucht worden war. Ihr Vorgehen zur RNA-Isolation ist nachfolgend geschildert.

Vorbereitend wurden ein Metall-Mörser, eine Pinzette und ein Spatel zur gründlichen Reinigung für 15 min in 1M NaOH gestellt und die Gewebeproben aus der Kühlung bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt. Das Messer des Homogenisators wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 1 min in RNase-Away gelagert und anschließend zweimal mit autoklaviertem Aqua bidest. abgespült. Der Mörser, die Pinzette und der Spatel wurden ebenfalls mit autoklaviertem Aqua bidest. abgespült, getrocknet und in flüssigen Stickstoff gehalten, bis keine Luftblasen mehr aufstiegen. Anschließend wurde mit der Pinzette eine Gewebeprobe in den Mörser überführt, dieser einmal mit einem Hammer beklopft und das zermörserte Gewebe mit dem Spatel in ein Falcon mit 1-1,5 mL RT-warmem TRIzol überführt. Nun wurde das Gewebe im TRIzol mit dem Homogenisator zerkleinert, bis keine Stückchen mehr zu erkennen waren, und das Falcon für mindestens 5 min bei RT stehen gelassen. Der Homogenisator wurde gesäubert und wie oben beschrieben gewaschen. Mörser, Pinzette und Spatel wurden erneut mit autoklaviertem Aqua bidest. abgespült und in flüssigen Stickstoff gehalten. Die Behandlung weiterer Gewebeproben erfolgte entsprechend der beschriebenen Schritte. Die gewonnenen Suspensionen wurden in frische Reaktionsgefäße

überführt und 0,2 mL Chloroform pro mL TRIzol hinzu pipettiert. Sie wurden geschüttelt, bis keine Phase mehr erkennbar war und anschließend 15 min bei 4°C mit 12851 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL 75% Ethanol pro mL eingesetztem TRIzol gespült. Darauf folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C mit 7855 g. Der Überstand wurde verworfen. Die Lagerung der Proben erfolgte fortan auf Eis. Die Pellets wurden 2-3 min trocknen gelassen und anschließend in 100 µL RNase-freiem Wasser resuspendiert. Den Proben wurden jeweils 350 µL mit 1 % β-Mercaptoethanol versetzter RLT-Puffer zugesetzt. Zur gründlichen Durchmischung wurden sie gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 250 µL 100%igem Ethanol. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Suspension auf die RNA-Isolations-Säulen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 22°C und 15.000 g. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µL RW1-Puffer auf jede Säule gegeben. Danach wurden die Säulen wieder für 15 Sekunden bei 22°C und 15.000 g zentrifugiert. Nun fand der DNase-Verdau statt. Hierzu wurden zunächst pro Säule 70 µL RDD-Puffer und 10 µL DNase-Lösung miteinander vermischt. Die Mischung wurde direkt auf die Membran jeder Säule pipettiert und diese damit 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Säulen erneut mit 350 µL RW1-Puffer befüllt und wie gehabt zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µL RPE-Puffer auf die Säulen gegeben. Nach erneuter Zentrifugation unter den bekannten Bedingungen, wurden wieder 500 µL RPE-Puffer auf die Säulen gegeben und diese im Anschluss 2 min lang bei 22°C und 15000 g zentrifugiert. Danach wurden die Einsätze der Säulen in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und 1 min lang bei 22°C und 15000 g zentrifugiert, um eventuell in den Säulen verbliebenes Ethanol zuverlässig zu entfernen. Nach nochmaliger Überführung der Einsätze in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße wurden 50 µL RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Die Reaktionsgefäße mit den Säulen wurden daraufhin erneut 1 min lang bei 22°C und 15000 g zentrifugiert. Hiermit war die Isolation beendet, der Durchfluss wurde bei -80°C eingefroren und verwahrt.

2.2.3.4 RNA-Messung

Die Messung der isolierten RNA-Menge erfolgte mit dem ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies) und der zugehörigen Software.

Zunächst erfolgte die Kalibrierung des Gerätes mit 1,5 µL RNase-freiem Wasser. Dann wurde ebenfalls mit 1,5 µL RNase-freiem Wasser der Leerwert bestimmt. Die Proben wurden während des Zeitraums der Messung auf Eis verwahrt. Kurz vor dem Messvorgang wurden sie aufgetaut und 1-2 Sekunden gevortext. Von jeder Probe wurden 2 µL auf die Messstelle pipettiert. Neben den Ergebnissen für die RNA-Konzentration wurden auch die 260/280 - und die 260/230 – Ratios, welche Aufschluss über die Reinheit der Proben geben, notiert. Diese sollten beide bei etwa 2.0 – 2.2 liegen. Die 260/280 – Ratio lag bis auf wenige Ausnahmen in diesem Bereich, die 260/230 – Ratio meist darunter. Es wurde darauf verzichtet, die aus dem Rahmen fallenden Proben weiter zu behandeln bzw. die entsprechenden Experimente zu wiederholen, da leichte Messungenauigkeiten bei der Bestimmung der RNA-Konzentration bei den sich anschließenden PCRs durch die Normierung auf ein Housekeeping-Gen ausgeglichen wurden. Zudem erfolgte im Rahmen der PCR-Befundung eine Beurteilung hinsichtlich des Auftretens von Nebenprodukten.

2.2.3.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *QuantiTect®Reverse Transcription Kit* (Qiagen).

Für die PCRs wurde cDNA in einer Konzentration von 5 ng/μL benötigt. Hierzu musste zunächst RNA entsprechend umgeschrieben werden. Sollten 20 μL cDNA gewonnen werden, benötigte man also 100 ng RNA. Es wurde zunächst berechnet, wie viel μL der umzuschreibenden Proben 100 ng RNA enthielten und wie viele μL RNase-freies Wasser zusätzlich benötigt wurden, um insgesamt ein Volumen von 12 μL zu erhalten. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte auf Eis. Nach Vortexen der Proben wurden die erforderlichen Mengen von RNA und Wasser miteinander vermischt. Alle Proben wurden mit 2 μL gDNA-Wipeout-Buffer versetzt und für 2 min im Thermocycler auf 42°C erhitzt. Danach wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und jeweils 4 μL RT-Puffer, 1 μL RT-Primer und 1 μL Reverse Transkriptase hinzu pipettiert. Daran anschließend folgte eine weitere Hitzebehandlung im Thermocycler für 30 min bei 42°C, für 3 min bei 95°C und das Abkühlen auf 4°C. Die cDNA wurde bei – 20°C verwahrt.

2.2.3.6 Primer-Design

Das Design der für die PCR benötigten Primer erfolgte auf Basis der Gen-Datenbanken des NCBI. Nach Auswahl von gesuchtem Gen und Spezies wurden bei Vorhandensein mehrerer Transkriptionsvarianten die Exons verglichen, um geeignete Regionen für Exon-umspannende Primer zu finden. Anschließend wurde die mRNA-Sequenz in das Programm Primer3Plus übertragen, mithilfe dessen das eigentliche Primerdesign erfolgte. In diesem Programm konnten nun die gewünschten Eigenschaften von Primer und Amplifikat festgelegt werden: Die Größe des Amplifikats sollte 70 – 150 bp betragen, die Schmelztemperatur der Primer sollte bei 60°C (Toleranzbereich: 59 – 61°C) und der GC-Gehalt der Primer bei 55 % (Toleranzbereich: 20 – 80 %) liegen. Weiterhin wurde festgelegt, dass die Primer die Exons umspannen sollten, um eine unspezifische Replikation evtl. vorhandener genomischer DNA zu verhindern. Nachdem das Programm die infrage kommenden Primervarianten herausgesucht hatte, wurden diese hinsichtlich ihrer Produktspezifität beurteilt. Neben Parametern aus dem Programm Primer3Plus, welche z.B. anzeigten, ob die Primer mit sich selbst reagieren könnten, wurde hierzu auch das Programm Primer-BLAST des NCBI herangezogen. Mithilfe dessen konnte überprüft werden, ob in der Gesamt-mRNA der untersuchten Spezies Sequenzen vorhanden waren, welche möglicherweise unspezifisch mit den Primern reagieren würden. War dies der Fall, wurden die entsprechenden Nebenprodukte hinsichtlich ihrer Größe beurteilt. Nebenprodukte ab einer Größe von 600 bp wurden als vernachlässigbar eingestuft, da die Polymerase über solche Entfernungen kein Produkt amplifizieren sollte.

Im Zuge der Primeretablierung wurden pro zu untersuchendem Gen mehrere Primervarianten getestet. Als Test-Proben wurde cDNA aus humanen bzw. ovinen VICs verwendet. Anhand der Schmelzkurven der Produkte wurde beurteilt, wie spezifisch die Replikation war. Unterschiede in den C_t-Werten ließen erkennen, wie gut verschiedene Primer das gewünschte Produkt amplifizieren konnten. Alle Primer wurden auch mit Leerproben, also Nuklease-freiem Wasser, getestet, um zu überprüfen, ob dabei Primer-

Dimere auftreten würden. War dies nicht der Fall, wurde bei weiteren PCRs darauf verzichtet, Leerproben mitlaufen zu lassen.

Von allen entworfenen Primern wurden letztlich die in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführten verwendet.

Tabelle 3: Humane Primer

Gen	Forward-Primer (5' - 3')	Reverse-Primer (5' - 3')
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
SNAI1	CACTATGCCGCGCTCTTT	TAGGGCTGCTGGAAGGTAAA
SNAI2	GCCAAACTACAGCGAACTGG	CACAGTGATGGGGCTGTATG
SMAD2	ATGGAGAAACAAGTGACCAACA	CACCAAATGCAGGTTCTGA
TWIST1	GGCTCAGCTACGCCTTCTC	TCCTTCTCTGGAAACAATGACA
SPP1	TTGCAGTGATTTGCTTTTGC	GCCACAGCATCTGGGTATTT
BGLAP	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	CTCCCAGCCATTGATACAGG

Tabelle 4: Ovine Primer

Gen	Forward-Primer (5' - 3')	Reverse-Primer (5' - 3')
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
SNAI1	CCTGCACGACTCTTCTCCA	AGATGAGTGTCGGCAAGGAG
SNAI2	ATTTCAACGCCTCCAAGAAG	TCGTAGAGACACGGGGAGAT
SMAD2	TTTTTGCCGAGTGCCCTAAGT	AGCAGCAAATTCCTGGTTGT
TWIST1	GGCTCAGCTACGCCTTCTC	TCCTTCTCTGGAAACAATGACA
OPN	GATGGCCGAGGTGATAGTGT	TCGTCTTCTTAGGTGCGTCA
BGLAP	GAAGAGACTCAGGCGCTACC	GCTCATCACAGTCAGGGTTG

PCR

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) stellt ein Verfahren zur Messung der Genexpression (mRNA-Expression) dar. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Proben aus den Stimulationsversuchen sowie Proben aus 30 menschlichen Aortenklappen hinsichtlich der Expression der in Abschnitt 2.2.3.1 genannten Gene untersucht. Als Referenzgen diente 18S.

Zu Beginn wurden pro Well 2 μL cDNA mit 10 μL *GoTaq® qPCR Master Mix*, sowie 7,4 μL Nuklease-freies Wasser zueinander pipettiert, gevortext und wie vorher festgelegt in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurden die F- und R-Primer gründlich in einem Verhältnis von 1:1 miteinander vermischt und jeweils 0,6 μL der Lösung in die entsprechenden Wells gegeben. Dabei lagen alle Proben auf der Platte als Dubletten vor. Waren alle Wells wie geplant befüllt, wurden sie mit Klebefolie verschlossen. Bei Vorhandensein von Luftblasen in den Vertiefungen erfolgte eine Zentrifugation der Platte für 1 min. mit 1100 g bei RT. Anschließend konnte die PCR gestartet werden. Die Proben wurden zunächst für 2 min auf 95°C erhitzt. Nach weiteren 15 s bei 95°C erfolgte eine Abkühlung auf 60°C für 1 min. Die letzten beiden Schritte wurden insgesamt 41x wiederholt. Nach erneuter Erhitzung auf 95°C für 15 s war die PCR beendet.

2.2.3.7 PCR-Auswertung

Nach Abschluss der PCR wurde zunächst überprüft, ob alle Werte in die Analyse übernommen werden konnten. Eine irreguläre Schmelzkurvenform sowie eine Abweichung der C_t -Werte innerhalb der Dubletten > 1 stellten Ausschlusskriterien dar.

Analysiert wurden die Werte nach der Delta-Delta- C_t -Methode [76]. Hierbei wird die Expression des untersuchten Zielgens auf die Expression eines konstant exprimierten Referenzgens (hier 18S) bezogen. Nach Ermittlung der Delta- C_t -Werte beider Gruppen werden diese auf die Kontrolle bezogen, womit man den jeweiligen Delta-Delta- C_t -Wert erhält. Anschließend wird dieser in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt, um den Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu bestimmen.

2.2.4 Untersuchung von Proteinen

2.2.4.1 Untersuchte Proteine

Die Proteinproben aus den Stimulationsversuchen wurden hinsichtlich ihres Gehaltes an CD31 und *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) analysiert.

CD31 ist auch bekannt unter dem Namen *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1). Es wird in besonderem Maße von EC sowie von Leukozyten und Thrombozyten exprimiert. Auf EC ist CD31 vor allem im Bereich der Zell-Zell-Kontakte lokalisiert und reguliert die Barrierefunktion des Endothels. Darüber hinaus ist es in vielfältige Signaltransduktionswege eingebunden [77, 78]. Aufgrund der genannten Eigenschaften ist CD31 ein häufig genutzter EC-Marker. Es kann angenommen werden, dass Veränderungen seiner Expression repräsentativ sind für Veränderungen hin zu bzw. weg von einem endothelialen Phänotyp der betreffenden Zelle [79].

α -SMA wird demgegenüber von EC typischerweise nicht exprimiert. Es ist ein Marker myofibroblastoider Zellen, welchen es die sie charakterisierenden kontraktile Eigenschaften verleiht [80]. Die Induktion von α -SMA in einer EC-Kultur stellt eine erprobte Methode zum Nachweis von EndoMT dar [52].

2.2.4.2 Protein-Isolation aus Zellen

Am Ende der Stimulationsversuche wurde aus einem der beiden 6-Well-Pärchen Protein isoliert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und 2 x mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well 100 μ L RIPA-Puffer hinein pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die Suspension wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und schnellstmöglich bei -80°C eingefroren.

2.2.4.3 Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels BCA-Assay

Bei dem verwendeten BCA-Assay handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay. Durch Absorptionmessung kann damit auf die Proteinkonzentration geschlossen werden.

Im Vorfeld der Messung wurden die Proben zum Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall homogenisiert, indem sie für 10 Sekunden einer Frequenz von 40 kHz ausgesetzt wurden. Anschließend wurden sie 5 min bei 15000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Die Aufbewahrung zwischen den einzelnen Schritten erfolgte auf Eis. Nun wurde eine Protein-Standardreihe hergestellt, um später die Messung der Proben hierauf beziehen zu können. Hierzu wurde BSA in verschiedenen Konzentrationen von 0,05 mg/mL bis 2 mg/mL in RIPA-Puffer gelöst. Diese Standardreihe wurde nicht bei jeder Messung neu angesetzt sondern zwischendurch bei -80°C eingefroren und wiederverwendet. Die nachfolgende Behandlung erfolgte jedoch stets zusammen mit den zu messenden Proben. Sie wurde damit begonnen, zunächst die zwei Komponenten des Assays, CopperII Sulfate Solution und Bicinchoninic Acid Solution miteinander zu vermischen, wobei pro mL Bicinchoninic Acid Solution 20 μ L CopperII Sulfate Solution eingesetzt wurden. Pro zu messender Probe wurden 800 μ L des Ansatzes in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 10 μ L Probe nach Vortexen hinzu pipettiert. Die Standardreihe wurde ebenso behandelt. Zur Herstellung der Leerprobe wurden 10 μ L RIPA-Puffer zu dem Ansatz pipettiert. Es folgte eine Hitzebehandlung aller Proben bei 65°C für 15 min unter Agitation. Anschließend wurden alle Proben gevortext und in UV-Küvetten überführt. Nun konnte nach Kalibrierung auf die Leerprobe die Absorption der Proben bei 550 nm am Spektrometer gemessen werden. Proben, welche eine Absorption > 1 aufwiesen, mussten den Assay in 10facher Verdünnung mit RIPA-Puffer erneut durchlaufen, da die Messung in diesem Bereich unzuverlässig wird.

Es wurde dann mittels Excel eine Eichgerade aus der BSA-Standardreihe erstellt. Anschließend konnte die Proteinkonzentration der Proben in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ errechnet werden, indem die jeweilige Absorption durch die Steigung der Eichgerade dividiert wurde.

2.2.4.4 Western-Blot

Durch die Proteinanalyse mittels Western Blot lassen sich spezifisch einzelne Proteine nachweisen. Darüber hinaus können durch Densitometrie und Normierung auf ein konstant exprimiertes Referenzprotein die Mengen des zu untersuchenden Proteins in verschiedenen Proben zueinander in Relation gesetzt werden. Auf diese Weise erfolgte die Analyse der Proteinproben aus den Stimulationsversuchen hinsichtlich ihres Gehaltes an CD31 und α -SMA. Als Referenzprotein diente β -Aktin.

2.2.4.4.1 Anfertigung der Gele

Zunächst mussten die für die Gelelektrophorese (SDS-PAGE) benötigten Gele hergestellt werden.

Zur Herstellung des Trenngels wurden folgende Zutaten zueinander gegeben:

- 4,85 mL Aqua bidest
- 2,5 mL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
- 2,5 mL Trenngelpuffer 1,5 M Tris pH 8,8
- 100 µL SDS 10% in Aqua bidest.
- 5 µL TEMED
- 50 µL APS 10% in Aqua bidest.

Das Sammelgel wurde aus folgenden Zutaten hergestellt:

- 3,18 mL Aqua bidest
- 0,5 mL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
- 1,26 mL Sammelgelpuffer 0,5 M Tris pH 6,8
- 50 µL SDS 10% in Aqua bidest.
- 5 µL TEMED
- 25 µL APS 10% in Aqua bidest.

Die Gele wurden in vorgefertigte Gelkassetten mit einer Dicke von 1,5 mm gegossen. Nach Gießen des Trenngels wurde dessen Oberfläche mit Isopropanol geglättet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol verworfen und die Oberfläche 2-3mal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde das Sammelgel darauf gegossen und der Kamm eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, keine Luftblasen mit einzuschließen. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde die Kassette in feuchte Tücher verpackt, eingeschweißt und zur späteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zum Zeitpunkt der Elektrophorese waren die verwendeten Gele maximal eine Woche alt.

2.2.4.4.2 Vorbereitung der Proben

Pro Geltasche sollten 20 µg Protein eingesetzt werden. Das dafür benötigte Probenvolumen ließ sich aus der zuvor mittels BCA-Assay ermittelten Proteinkonzentration errechnen. Es wurden zur Sicherheit stets 10 % mehr angesetzt.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel mussten diese mit LaemmLi-Puffer versetzt und durch Hitzebehandlung denaturiert werden. Es wurde 6 x LaemmLi verwendet. Die benötigte Menge an LaemmLi-Puffer pro Probe entsprach damit einem Fünftel des jeweiligen Probenvolumens. Nachdem alle Proben mit LaemmLi Puffer versetzt waren, wurden sie gevortext und für 5 min bei 95°C unter Agitation denaturiert. Danach wurden sie für 1 min bei 10.000 g und RT abzentrifugiert. Nun waren die Proben bereit zur Befüllung der Gele.

2.2.4.4.3 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese dient dem Auftrennen der in einer Probe enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Es wurde mit dem *XCell SureLock™ Mini-Cell System* (Invitrogen) gearbeitet. Alle Komponenten wurden nach Herstellerangaben zusammengebaut. Der Raum zwischen den Gelkassetten wurde mit gekühltem 1 x Laufpuffer aufgefüllt und überlaufen gelassen bis die Elektroden in der äußeren Pufferkammer mit Flüssigkeit bedeckt waren. Anschließend wurden vorsichtig die Kämmen aus den Gelen entfernt. Nun konnten die Proben und der farbige Proteinstandard aufgetragen werden. Es wurden 7 µL Proteinstandard eingesetzt. Außerdem wurde stets eine Positivkontrolle für α -SMA aufgetragen. Hierfür wurden Proteinlysate von humanen bzw. ovinen VICs verwendet. Von letzteren wurden wie für die Proben 20 µg eingesetzt, von ersteren 10 µg. Es wurden stets alle 12 Proben eines Versuchsdurchlaufs auf ein Gel aufgetragen. Waren Probenvolumina zu groß für die Taschen, wurde bis zu zweimal nachgeladen. Hierzu wurde zunächst so viel Probe aufgetragen wie möglich, diese mit 70 V und 400 mAmpere einlaufen gelassen und gewartet, bis die Proben fast aus den Taschen verschwunden waren. Dann wurde wieder Probe nachgeladen. Das Sammelgel durchliefen die Proteine mit 70 V und 400 mAmpere, das Trenngel mit 200 V und 400 mAmpere. Während der gesamten Elektrophorese stand die Kammer auf Eis. Erreichte der Farbstoff die Unterkante des Gels, wurde die Elektrophorese gestoppt. Der Laufpuffer wurde nicht wiederverwendet.

2.2.4.4.4 Transfer

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert, welche den späteren Bildträger darstellte. Hierzu wurde die Kammer aus dem *Mini-PROTEAN® 3 Cell-System* in Kombination mit Komponenten des *Mini Trans-Blot® Cell-System* (Bio-Rad) verwendet.

Zunächst mussten die Gelkassetten mit einem Spatel aufgebrochen werden. Die Gele wurden in 4°C kalten Transfer-Puffer überführt und darin für 10 min equilibriert. Dies sollte ein Schrumpfen des Gels während des Transfers und eine damit einhergehende Bandenverzerrung verhindern. Pro Gel wurde ein 6,5 x 8,5 cm großes Stück Nitrocellulosemembran zurechtgeschnitten und 30 s lang in Aqua bidest. hydriert. Anschließend wurden die Membranstücke zusammen mit den zum *Mini Trans-Blot® Cell-System* gehörigen fiber pads und zwei 7,5 x 10 cm großen Filterpapierstücken pro Gel mit Transfer-Puffer angefeuchtet. Anschließend wurden fiber pads, Filterpapier, Gel und Membran in den Gelkassetten wie in Abb. 6 dargestellt aufeinandergeschichtet.

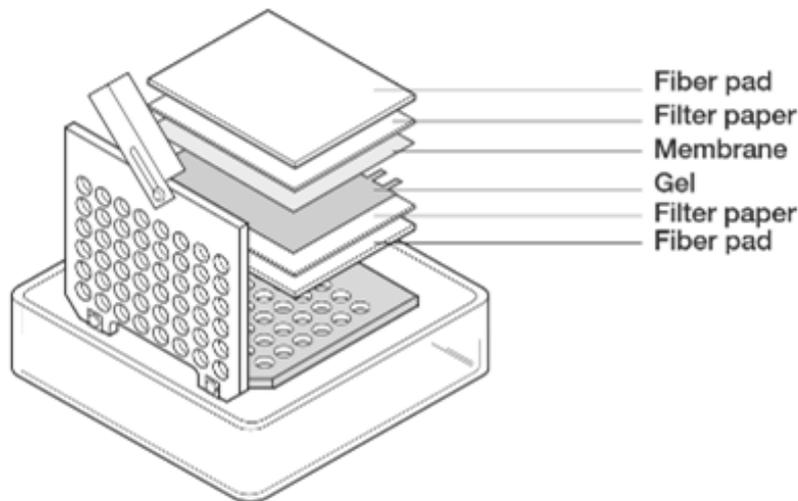


Abb. 6: Aufbau Gelkassette für Proteintransfer [81]

Dabei wurde jede Lage mit einer Walze glatt gerollt, um eventuell vorhandene Luftblaseneinschlüsse zu entfernen. Die Kassette wurde fest verschlossen, wobei darauf geachtet wurde, den Inhalt möglichst nicht zu bewegen. Die Kassette wurde so in der Halterung mit den Elektroden platziert, dass dessen Unterseite und damit das Gel in Richtung der Anschlüsse orientiert war und die Membran davon weg. Alle Komponenten wurden zusammen mit einem Rührfisch in der Kammer platziert. Der Rührfisch diente dazu, während des Transfers eine gleichmäßige Temperatur und Ionenkonzentration im Puffer aufrechtzuerhalten. In dem freien Raum neben der Halterung mit den Elektroden wurden mehrere eisgefüllte Falcons platziert, welche als Kühl-Akkus fungierten. Nach Auffüllen der Kammer mit Transfer-Puffer wurde der Transfer gestartet. Er lief über eine Dauer von 1,5 h mit 100 V und 400 mA. Nach Ablauf dieser Zeit wurde anhand des farbigen Proteinstandards verifiziert, dass der Transfer erfolgreich war. Der Transfer-Puffer wurde maximal einmal wiederverwendet.

2.2.4.4.5 Waschschritte, Blockierung und Inkubation der Membran mit Antikörpern

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zunächst mit TBST abgespült, um Reste des Transfer-Puffers zu entfernen. Anschließend wurde sie für 1 h bei RT auf dem Rollschüttler blockiert. Als Blockierungs-Puffer sowie als Puffer zur Verdünnung der Antikörper diente eine Lösung von 5 % BSA in TBST. Diese wurde vor Verwendung mithilfe eines Spritzenfilters mit einer Porengröße von 0,45 μm filtriert, um Sprengel auf der Membran zu vermeiden. Der Blockierungs-Puffer wurde bis zu 3x verwendet und zwischendurch eingefroren. Auf die Blockierung folgte die Inkubation der Membran mit den Erstantikörpern. Hierzu wurde sie zunächst bei etwa 70 kDa durchgeschnitten, wobei der farbige Proteinstandard zur Orientierung diente. Auf dem Stück mit den Proteinen, welche schwerer als 70 kDa waren, wurde CD31 detektiert, welches etwa 130 kDa wiegt. Auf dem Stück mit den leichteren Proteinen wurde sowohl α -SMA als auch β -Aktin detektiert. Ersteres hat ein Molekulargewicht von 42 kDa, letzteres von 45 kDa. Da sie so eng benachbart sind, war es notwendig, die Membran vor der Detektion des zweiten Proteins zu renaturieren.

(siehe unten). Zuerst wurde α -SMA detektiert, da dessen Menge deutlich unter der von β -Aktin lag und bei der Renaturierung immer die Gefahr besteht, neben gebundenen Antikörpern auch Proteine mit abzulösen. Die Erstantikörper wurden in den in Tabelle 5 angegebenen Konzentrationen verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Erstantikörper

Spezies der Proben:	human	ovin
CD31	Polyklonaler Kaninchen-AK, abcam; 1:1000	Polyklonaler Kaninchen-AK, Abbiotec; 1:1000
α -SMA	Monoklonaler Maus-AK, Sigma Aldrich; 1:1000	
β -Aktin	Polyklonaler Kaninchen-AK, Cell Signaling; 1:1000 – 1:2500	

Sie wurden vor dem Blotten der Proben aus den Versuchsdurchläufen mit jeweils geeigneten Positivkontrollen (humane und ovine VICs für α -SMA, humane und ovine EC für CD31, beide Zellarten für β -Aktin) getestet.

Die Inkubation der Membran mit den Erstantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Rollschüttler. Die Lösung mit den Erstantikörpern wurde hierfür bis zu 3x verwendet und in der dazwischen liegenden Zeit bei -20°C verwahrt.

Anschließend wurden die Membranstücke zunächst 3 x 5 min in TBST gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit den Zweitantikörpern über 1,5 h. Nach Gebrauch wurde die Lösung verworfen. Die Zweitantikörper wurden in den in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen verwendet:

Tabelle 6: Verwendete Zweitantikörper

CD31	Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO, Jackson ImmunoResearch; 1:10000
α -SMA	Ziege IgG anti-Maus IgG+IgM (H+L)-HRPO, Jackson ImmunoResearch; 1:10000 – 1:20000
β -Aktin	Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO, Jackson ImmunoResearch; 1:20000

Anschließend wurden die Membranstücke erneut 3 x 5 min in TBST gewaschen. Nun konnten die gesuchten Proteine mittels Chemolumineszenz detektiert werden.

2.2.4.4.6 Detektion der Proteinbanden mittels Chemolumineszenz

Nach Trockenschütteln der Membran wurde so viel Chemolumineszenz-Lösung darauf pipettiert, dass sie vollständig bedeckt war. Zur Sichtbarmachung von CD31 und β -Aktin wurde ECL verwendet, zur Detektion von α -SMA dagegen Western Bright Pico, welches sensitiver ist. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte mithilfe des Amersham Imager 600.

2.2.4.4.7 Aufbewahrung der Membranen

Nach der Chemolumineszenzmessung wurden die Membranen 3 x 5 min in TBST gewaschen, um das Substrat vollständig zu entfernen. Anschließend wurden sie zwischen zwei angefeuchteten Filterpapier-Stücken in einer Plastiktüte eingeschweißt und bei 4° C verwahrt.

2.2.4.4.8 Renaturierung der Membranen

Da α -SMA und β -Aktin wegen ihrer ähnlichen Größe eng benachbart liegen, war es notwendig, die Membran vor der Detektion des zweiten Proteins zu renaturieren. Hierzu wurde sie nach der Chemolumineszenzmessung 3 x 5 min in TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran in ein Falcon mit Renaturierungs-Puffer überführt und darin für 30 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Es folgten 4 weitere 5-minütige Waschschrte. Danach wurde erneut Chemolumineszenz-Substrat auf die Membran gegeben und mit dem Imager verifiziert, dass kein Signal mehr vorhanden war. Nach 3 weiteren 5-minütigen Waschschrten konnte die Membran erneut blockiert und im weiteren Fortgang mit frischen Antikörpern inkubiert werden.

2.2.4.5 Western-Blot Auswertung

Ausgewertet wurden die Western Blots mithilfe der Software Image Quant TL und Excel. Nach Kennzeichnung der gesuchten Banden und manuellem Setzen einer Baseline zur Backgroundsubtraktion wurde die Pixelintensität der Banden miteinander verglichen. Hierzu wurde zunächst der Quotient aus der Pixelintensität (V) einer Test-Protein-Bande (α -SMA bzw. CD31) und der Pixelintensität der zugehörigen Referenzprotein-Bande (β -Aktin) gebildet. Anschließend wurden die verschiedenen Versuchsbedingungen in gleicher Art auf die Kontrolle normiert. Die weitere Analyse und bildliche Darstellung der erhaltenen Werte erfolgte mittels GraphPad.

2.2.5 Statistische Auswertung und bildliche Darstellung von Daten mittels GraphPad

Die Analyse und bildliche Darstellung der Patientendaten sowie der aus den verschiedenen Versuchen gewonnenen Daten erfolgte mittels GraphPad.

Die Daten des Patientenkollektivs, dessen Aortenklappen molekularbiologisch analysiert wurden, wurden bei drei miteinander zu vergleichenden Gruppen einer nichtparametrischen Varianzanalyse unterworfen. Hierzu wurde bei kontinuierlichen Daten der Kruskal-Wallis-Test und bei kategorischen Daten der Chi-Quadrat Test angewendet. Bei zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen erfolgte ein direkter Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney

Test bei kontinuierlichen Daten und Fisher's exact Test bei kategorischen Daten. Im Anschluss an die nichtparametrische Varianzanalyse wurde bei den kontinuierlichen Daten mit dem Dunn's post-hoc Test und bei den kategorischen Daten mit dem Fisher's exact Test getestet, ob signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Gruppe der unveränderten Aortenklappen vorliegen.

Bei den Ergebnissen der molekularbiologischen Analyse humaner Aortenklappen sowie den Ergebnissen der Zellkulturversuche (Genexpression und Proteinexpression nach Stimulation) erfolgte die Durchführung einer nichtparametrischen Varianzanalyse in Form des Kruskal-Wallis-Tests. Als Post-hoc-Test diente der Dunn's-Test auf welchen sich in diesem Fall alle Angaben von Signifikanzen - sofern nicht weiter spezifiziert - beziehen. Gelegentlich wurde der Mann-Whitney-Test zur gesonderten Beurteilung des Verhältnisses zweier Ergebnisgruppen verwendet. Sollte das Ergebnis einer bestimmten Stimulationsbehandlung isoliert mit der Kontrolle verglichen werden, kam der Wilcoxon-Signed-Rank-Test zur Anwendung. Ist von Konfidenzintervallen die Rede, ist stets das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwerts gemeint.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse humaner Aortenklappen sowie die Ergebnisse der Zellkulturversuche wurden bildlich als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Zusätzlich wurden die einzelnen Messwerte als Punkte eingefügt. Bei Auswertung der Stimulationsversuche wurden verschiedene biologische Replikate durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet, Versuchswiederholungen innerhalb eines biologischen Replikats durch ein gleichbleibendes Symbol. Unterschieden sich Ergebnisgruppen signifikant, wurden die entsprechenden Daten ebenfalls als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) im Fließtext angegeben.

3 Ergebnisteil

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv, dessen Aortenklappen molekularbiologisch analysiert wurden, weist die in Tabelle 7 zusammengefassten Eigenschaften auf. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse finden sich in Kapitel 3.4.1.

Tabelle 7: Patientendaten (prä-operativ), aufgeteilt nach Grad der Degeneration der Aortenklappe

	Alle (n=30)	Unverändert(n=10)	Fibrotisch (n=10)	Kalzifiziert (n=10)	p-Wert
Geschlecht (männlich), n (%)	18 (60)	8 (80)	7 (70)	3 (30)	0,0541
Alter, Jahre	68±13	56±13	72±9*	76±6**	0,0021
Body Mass Index (kg/m ²)	26±5	23±4	27±6	28±5	0,1215
Primäre Indikation, n (%)					
Aortenklappenstenose	18 (60)	0 (0)	8 (80)***	10 (100)****	<0,0001
Aortenklappeninsuffizienz	1 (3)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0,3554
Herztransplantation	11 (37)	10 (100)	1 (10)***	0 (0)****	<0,0001
ICM	6 (20)	5 (50)	1 (10)	0 (0)*	0,0126
DCM	4 (13)	4 (40)	0 (0)	0 (0)	0,0099
RCM	1 (3)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0,3554
Lipide (mg/dL)					
Gesamtcholesterin	156±48	-†	140±44	172±49	0,1903
HDL	47±15	-†	43±12	52±17	0,3072
LDL	96±41	-†	86±38	105±43	0,3865
Triglyzeride	150±52	-†	149±57	150±50	0,9815
Kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)					
Raucher	12 (40)	3 (30)	4 (40)	5 (50)	0,6592
Bluthochdruck	24 (80)	4 (40)	10 (100)*	10 (100)*	0,0006
T2DM	9 (30)	3 (30)	4 (40)	6 (60)	0,3867
davon IDDM	4 (13)	0 (0)	2 (20)	2 (20)	0,1644
Dyslipoproteinämie	21 (70)	3 (30)	10 (100)**	8 (80)	0,0020
KHK	23 (77)	6 (60)	8 (80)	9 (90)	0,2713
Niereninsuffizienz	7 (23)	4 (40)	3 (30)	0 (0)	0,0887
Extrakardiale vaskuläre Erkrankungen, n (%)	8 (27)	2 (20)	4 (40)	2 (20)	0,5057
Medikation					
Antikoagulantien, n (%)	10 (33)	7 (70)	3 (30)	0 (0)**	0,0039

Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Anzahl der Messwerte (in Prozent auf die Gesamtstichprobe innerhalb der Gruppe bezogen), ICM: Ischämische Kardiomyopathie, DCM: Dilatative Kardiomyopathie, RCM: Restriktive Kardiomyopathie, HDL: High density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, T2DM: Diabetes mellitus Typ 2, IDDM: Insulinabhängiger T2DM, KHK: Koronare Herzkrankheit, †: keine Blutabnahme nüchtern prä-OP erfolgt zur Bestimmung der Fettwerte, Die p-Werte entsprechen bei kontinuierlichen Daten dem Kruskal-Wallis Test bzw. dem Mann-Whitney Test bei drei bzw. zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen. Bei kategorischen Daten entsprechen die p-Werte dem Chi-Quadrat Test bei drei und dem Fisher's Exact Test bei zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen, *: Signifikanz im Vergleich zur Gruppe der unveränderten Aortenklappen nach Dunn's post-hoc Test bei kontinuierlichen Daten und Fisher's exact Test bei kategorischen Daten

Die Geschlechterverteilung schwankt laut Chi-Quadrat Test annähernd signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen des Patientenkollektivs ($p = 0,0541$). Der Fisher's exact Test ergab keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der Gruppe der fibrotischen Klappen bzw. der Gruppe der kalzifizierten Klappen mit der Gruppe der unveränderten Klappen.

Bezüglich des Alters bestehen laut Kruskal-Wallis Test signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen ($p = 0,0021$). Der Dunn's post-hoc Test ergab, dass sowohl die Patienten mit den fibrotischen Klappen ($p = 0,0381$) als auch die Patienten mit den

kalzifizierten Klappen ($p = 0,0022$) ein signifikant höheres Alter aufwiesen als die Patienten mit den unveränderten Klappen.

Bezüglich des Body Mass Index (BMI) bestehen laut Kruskal-Wallis Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Bezüglich des Vorhandenseins einer Aortenklappenstenose bestehen laut Chi-Quadrat Test signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen ($p < 0,0001$). Der Fisher's exact Test ergab, dass sowohl die Patienten mit den fibrotischen Klappen ($p = 0,0007$) als auch die Patienten mit den kalzifizierten Klappen ($p < 0,0001$) signifikant häufiger eine Aortenklappenstenose aufwiesen als die Patienten mit den unveränderten Klappen. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass schließlich das Vorhandensein einer Stenose die Hauptindikation für einen operativen Klappenersatz darstellt, wodurch sehr viele aufgrund dessen entfernte Aortenklappen in der Gewebekbank enthalten sind.

Bezüglich des Vorhandenseins einer Aortenklappeninsuffizienz bestehen laut Chi-Quadrat Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Bezüglich der Indikation zur Herztransplantation bestehen laut Chi-Quadrat Test signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen ($p < 0,0001$). Eine solche lag präoperativ sowohl in der Gruppe der fibrotischen Klappen ($p = 0,0001$) als auch in der Gruppe der kalzifizierten Klappen ($p < 0,0001$) laut Fisher's exact Test signifikant seltener vor als in der Gruppe der unveränderten Klappen. Dies ist dadurch begründet, dass die Akquirierung unveränderter Klappen ausschließlich im Rahmen von Herztransplantationen erfolgte, während die fibrotischen und kalzifizierten Klappen den Patienten meist im Rahmen von Klappenersatz-OPs entnommen wurden.

Ähnlich ist das Vorhandensein einer Kardiomyopathie zu bewerten, welche bei starker Ausprägung einen klassischen Grund für die Notwendigkeit einer Herztransplantation darstellt. Passend dazu zeigt der Chi-Quadrat-Test signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen bezüglich des Vorhandenseins einer ischämischen Kardiomyopathie (ICM) ($p = 0,0126$) sowie einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) ($p = 0,0099$). Der Fisher's exact Test zeigt, dass in der Gruppe der kalzifizierten Klappen signifikant weniger häufig eine ICM vorliegt als in der Gruppe der unveränderten Aortenklappen ($p = 0,0325$).

Bezüglich der Serumspiegel von Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyzeriden bestehen laut Mann-Whitney Test keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der fibrotischen und der Gruppe der kalzifizierten Klappen.

Bezüglich des generellen Vorhandenseins einer Dyslipoproteinämie, welche im Gegensatz zu den Serumspiegeln der genannten Blutwerte auch für die Gruppe der unveränderten Aortenklappen erfasst wurde, bestehen dagegen laut Chi-Quadrat Test signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen ($p = 0,0020$). So wiesen die Patienten aus der Gruppe der fibrotischen Klappen laut Fisher's exact Test signifikant häufiger eine Dyslipoproteinämie auf als die Patienten aus der Gruppe der unveränderten Klappen ($p = 0,0031$).

Bezüglich des Raucherstatus bestehen laut Chi-Quadrat Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Dagegen zeigte der Chi-Quadrat Test, dass sich die Patientengruppen bezüglich des Vorhandenseins von Bluthochdruck signifikant unterscheiden ($p = 0,0006$). Der Fisher's exact Test ergab, dass sowohl die Patienten mit den fibrotischen Klappen ($p = 0,0108$) als auch die Patienten mit den kalzifizierten Klappen ($p = 0,0108$) signifikant häufiger unter Bluthochdruck litten als die Patienten mit den unveränderten Klappen.

Bezüglich des Vorhandenseins eines Diabetes mellitus, einer KHK, einer Niereninsuffizienz oder einer extrakardialen vaskulären Erkrankung bestehen laut Chi-Quadrat Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen besteht laut Chi-Quadrat Test in der Anzahl der antikoagulierten Patienten ($p = 0,0039$). Der Fisher's exact Test ergab, dass in der Gruppe der kalzifizierten Klappen signifikant weniger Patienten Antikoagulantien einnahmen als in der Gruppe der unveränderten Klappen ($p = 0,0031$).

Bezüglich sämtlicher aufgeführter Parameter bestehen zwischen der Gruppe der fibrotischen Klappen und der Gruppe der kalzifizierten Klappen keine signifikanten Unterschiede.

3.2 Methodenetablierung – Isolation von EC aus ovinen Klappen

Zu Beginn der Zellkulturversuche stand die Etablierung einer Methode, EC aus ovinen Klappen zu isolieren. Hierfür lagen bis dahin laborintern keine Erfahrungen vor. Durch die Austestung verschiedener Vorgehensweisen konnte eine funktionierende Methode entwickelt und im Verlauf optimiert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der getesteten Varianten dargestellt.

3.2.1 Transportarten

Wie im Methodenteil beschrieben, bestand eine der getesteten Transportarten darin, die Herzen zum Transport lediglich in eine Kühltasche zu packen. Bei diesem Vorgehen zeigte sich kein Isolationserfolg, es wurde daher verworfen. Die weitere Variante bestand darin, die Herzen in einem großen, mit Jonosteril-Infusionslösung gefüllten Glasgefäß auf Eis zu transportieren. Durch diese Methode gelang die Isolation von EC. Es fanden sich hierbei jedoch in den ersten Tagen der Kultivierung mehr tote Zellen als bei Transport der vor Ort herausgeschnittenen Klappen in eisgekühltem EC-Medium. Letztere Methode wurde daher zum Standardvorgehen gewählt.

3.2.2 Verarbeitung der präparierten Klappensegel im Labor

Sowohl bei der Variante, die Klappensegel vor der Inkubation in Kollagenase A zu zerschneiden, als auch bei der Variante, die Klappensegel ohne Behandlung mit Kollagenase auszusäen, traten Verunreinigungen mit Fibroblasten auf. Da dieses Problem ausblieb, wenn die Klappensegel in Gänze in Collagenase A inkubiert wurden, erfolgte die Wahl jener Methode zum Standardvorgehen.

3.2.3 Serumgehalt

Es zeigte sich, dass ein aufgestockter FCS-Gehalt von 10 % dem Wachstum der EC deutlich zuträglich war, weswegen es für alle Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurde.

3.3 Mikroskopisches Erscheinungsbild der EC nach Stimulation

Das Mikroskopische Erscheinungsbild, welches die EC am Ende der Stimulationsversuche boten, unterschied sich je nach Zellart. Von jeder verwendeten Zelllinie werden im Folgenden Bilder nach Abschluss der Stimulation gezeigt.

3.3.1 OVEC

Die OVEC zeigten in Reaktion auf die Stimulation von allen drei Zellarten die stärksten morphologischen Veränderungen. Nachfolgend werden die Bilder von jeweils einem der drei Versuche, welche pro Schaf durchgeführt wurden, gezeigt.

3.3.1.1 ECov3 Versuch2 (Schaf 1)

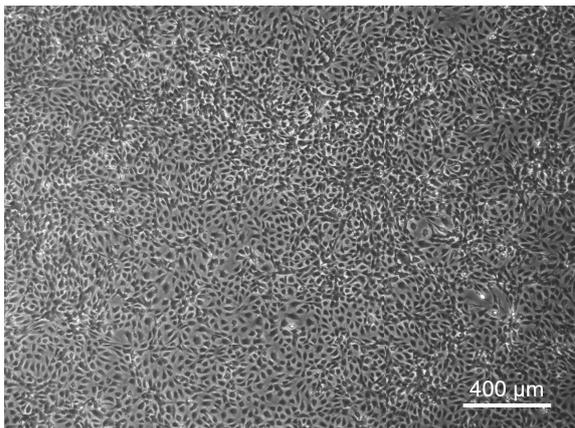


Abb. 7: ECov3 Versuch2 Kontrolle

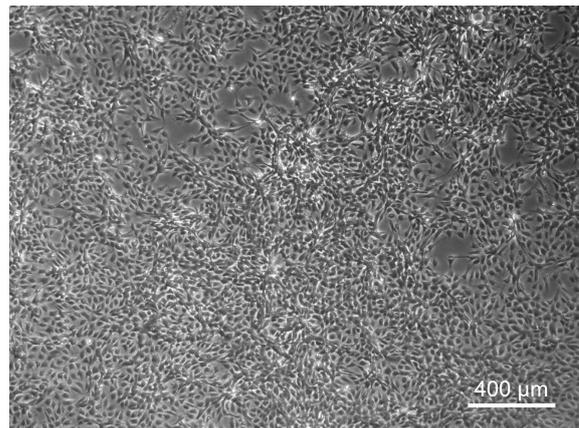


Abb. 8: ECov3 Versuch2 β-GP

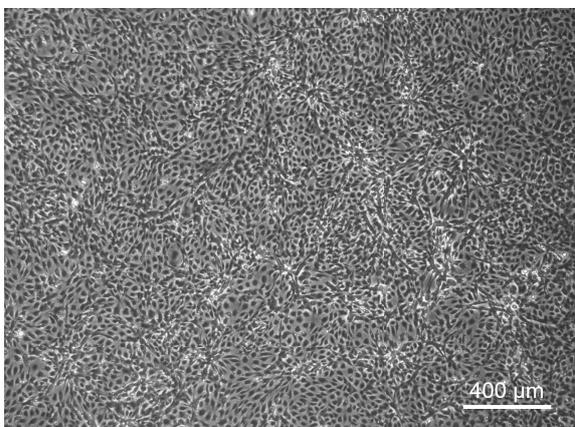


Abb. 9: ECov3 Versuch2 VEGF

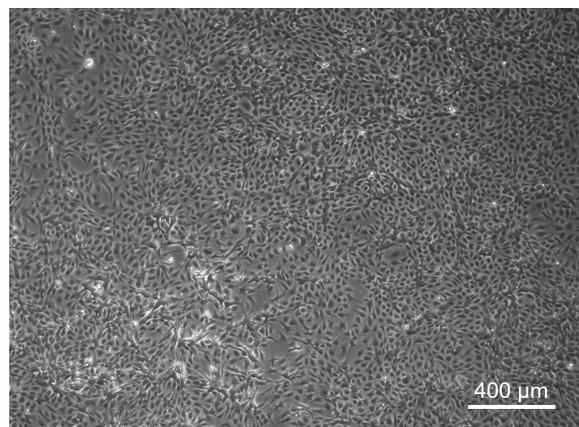


Abb. 10: ECov3 Versuch2 VEGF+β-GP

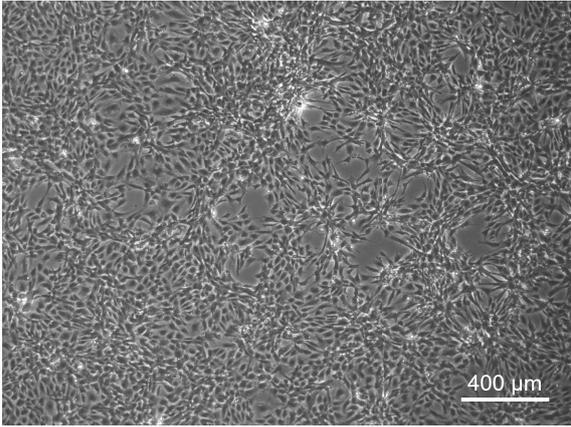


Abb. 11: ECov3 Versuch2 TGFβ₁

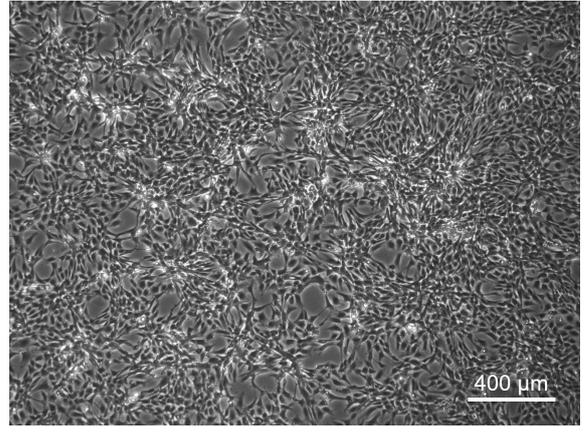


Abb. 12: ECov3 Versuch2 TGFβ₁+β-GP

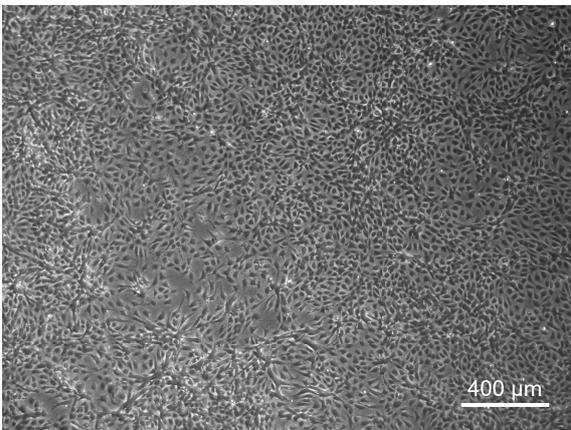


Abb. 13: ECov3 Versuch2 BGN

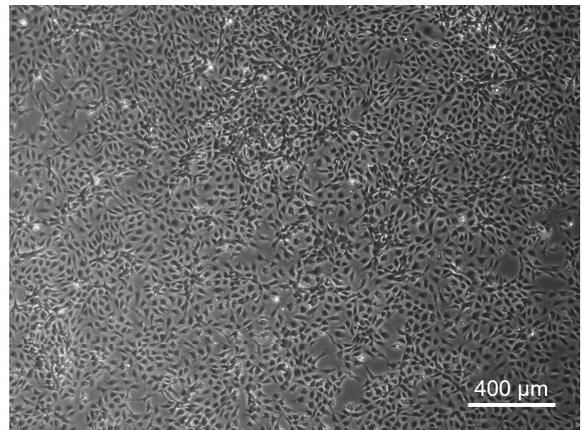


Abb. 14: ECov3 Versuch2 HA

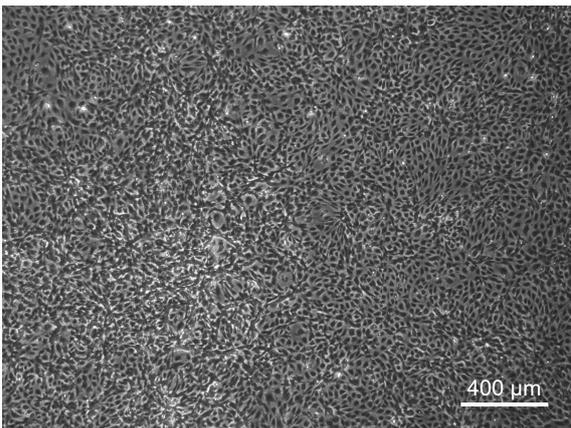


Abb. 15: ECov3 Versuch2 VEGF+BGN

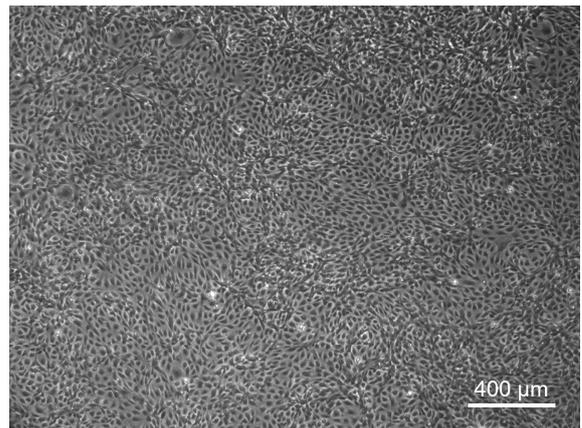


Abb. 16: ECov3 Versuch2 VEGF+HA

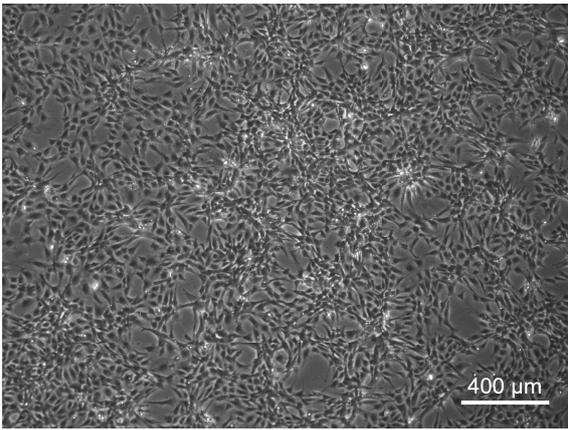


Abb. 17: ECov3 Versuch2 TGFβ₁+BGN

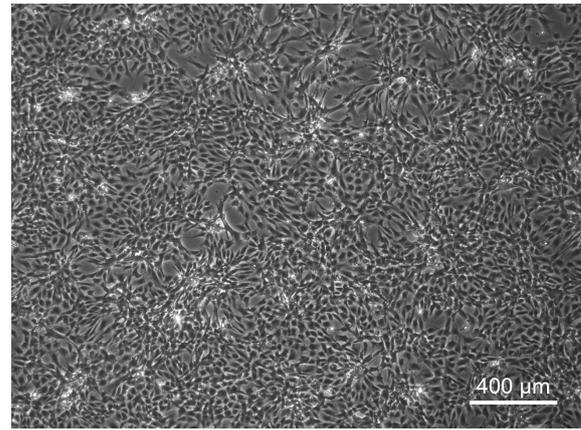


Abb. 18: ECov3 Versuch2 TGFβ₁+HA

Bei Kultivierung unter Kontrollbedingungen zeigen die EC von Schaf 1 zum Großteil das für diese Zellart typische Kopfsteinpflaster-Wachstumsmuster. Aufgrund sehr starken Wachstums erscheint dieses hier jedoch stellenweise sehr verdichtet. Auffällig ist, dass bei Stimulation mit TGFβ₁ die Zellen ein sternförmiges, knotenartiges Wachstumsmuster und z.T. lange Zellausläufer ausbilden. Dieses Phänomen lässt sich in etwas abgeschwächter Form auch bei alleiniger Stimulation mit β-GP beobachten. Bei Stimulation mit TGFβ₁ und β-GP in Kombination ist es stärker ausgeprägt als bei Stimulation mit TGFβ₁ alleine. HA und BGN scheinen die Knotenbildung nicht wesentlich zu beeinflussen. Die Stimulation mit VEGF resultiert in einer erhöhten Zelldichte und z.T. leichter Knotenbildung.

3.3.1.2 ECov5 Tier1 Versuch2 (Schaf 2)

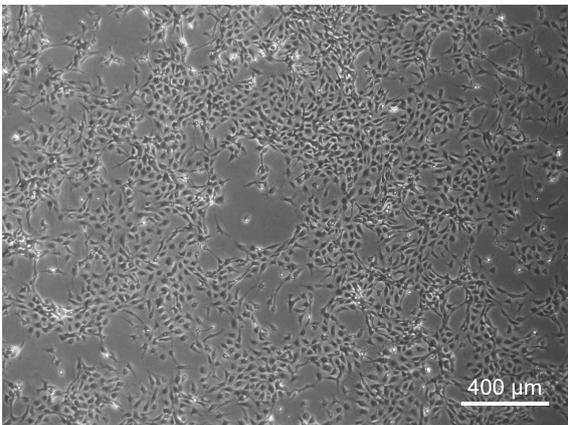


Abb. 19: ECov5 Tier1 Versuch2 Kontrolle

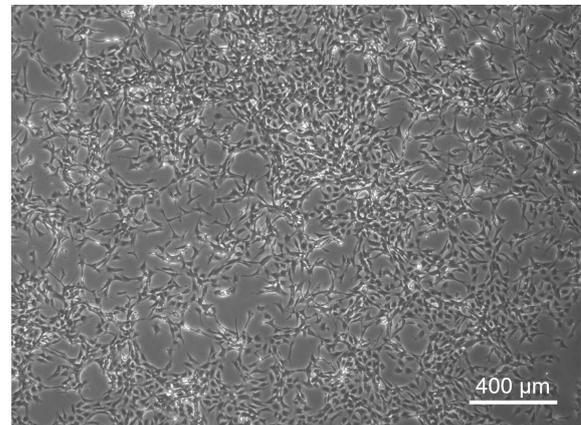


Abb. 20: ECov5 Tier1 Versuch2 β-GP

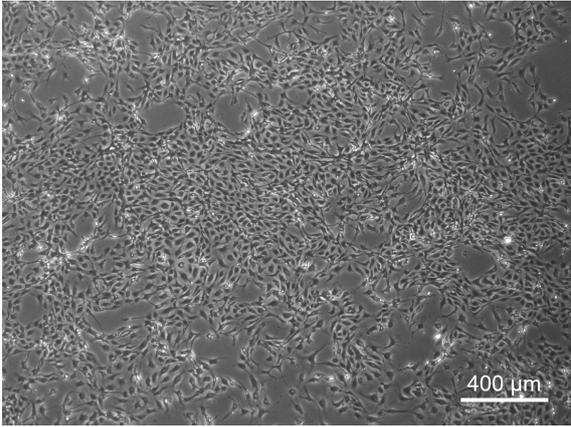


Abb. 21: ECov5 Tier1 Versuch2 VEGF

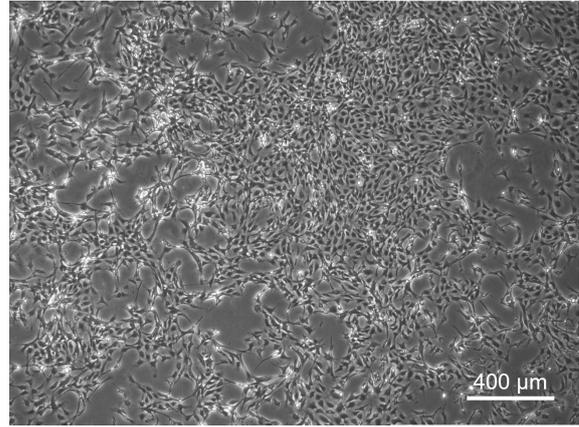


Abb. 22: ECov5 Tier1 Versuch2 VEGF+β-GP

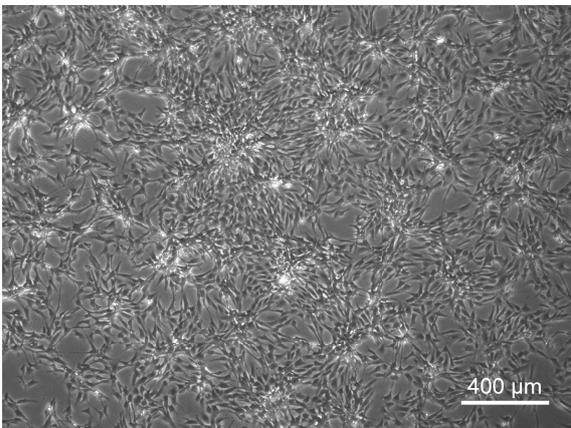


Abb. 23: ECov5 Tier1 Versuch2 TGFβ₁

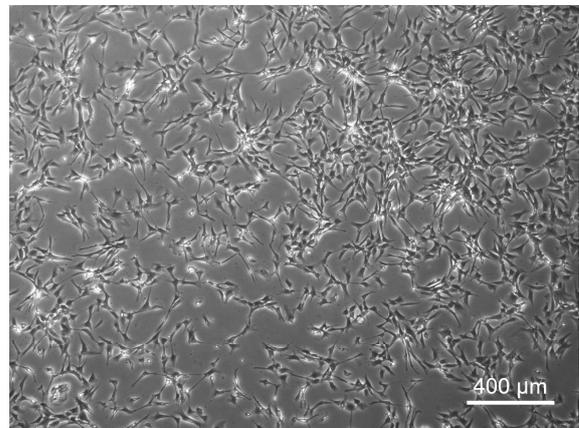


Abb. 24: ECov5 Tier1 Versuch2 TGFβ₁+β-GP

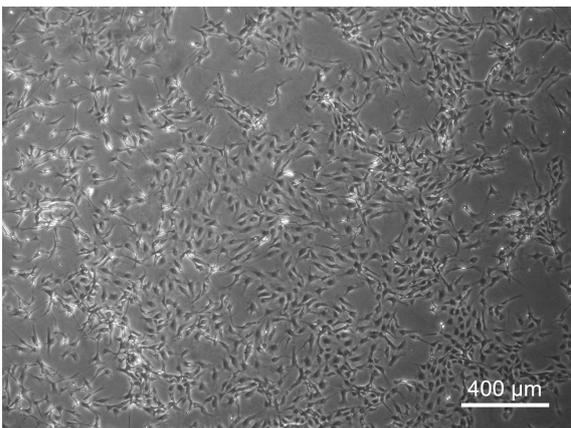


Abb. 25: ECov5 Tier1 Versuch2 BGN

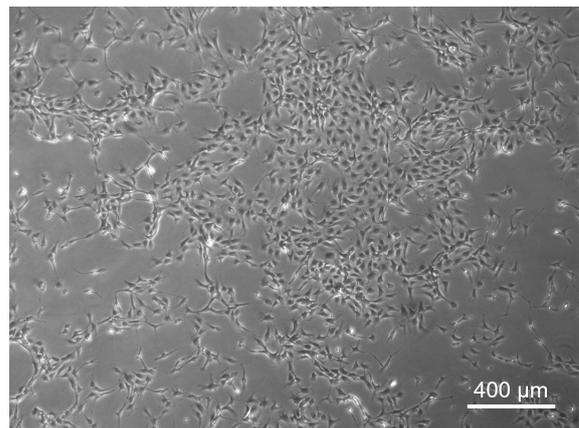


Abb. 26: ECov5 Tier1 Versuch2 HA

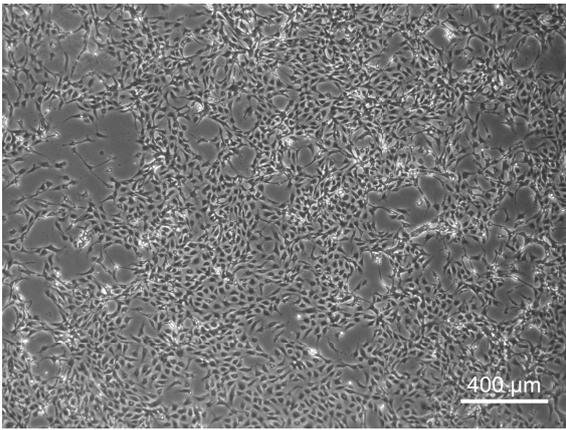


Abb. 27: ECov5 Tier1 Versuch2 VEGF+BGN

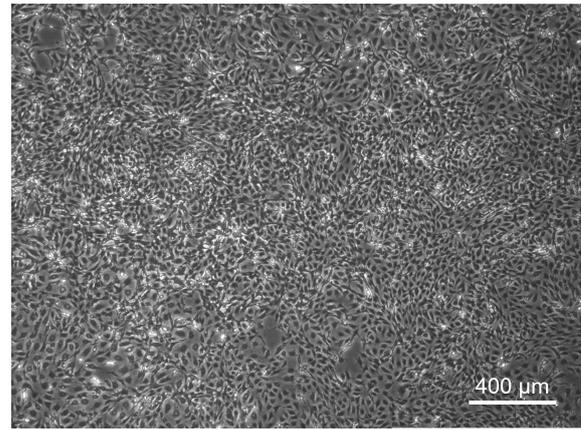


Abb. 28: ECov5 Tier1 Versuch2 VEGF+HA

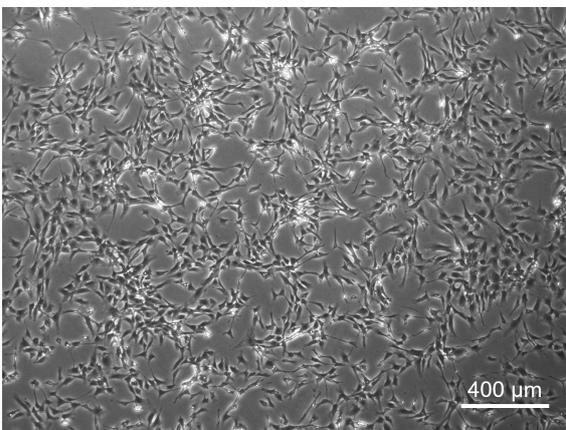


Abb. 29: ECov5 Tier1 Versuch2 TGFβ₁+BGN

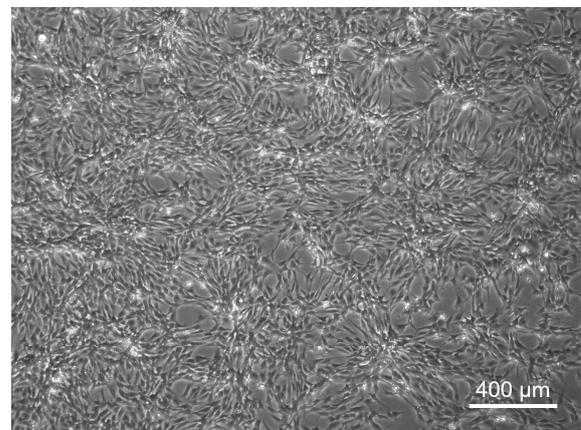


Abb. 30: ECov5 Tier1 Versuch2 TGFβ₁+HA

Die Zellen von Schaf 2 zeigen ein spärlicheres Wachstum als jene von Schaf 1. Jedoch lassen sich auch hier bei Stimulation mit TGFβ₁ ein sternförmiges Wachstumsmuster und langgestreckte Zellausläufer erkennen. Wachstum und Knotenbildung sind bei simultaner Stimulation mit TGFβ₁ und HA vergleichbar dem bei Stimulation mit TGFβ₁ alleine, bei simultaner Stimulation mit TGFβ₁ und β-GP bzw. BGN ist beides abgeschwächt. Die simultane Stimulation mit VEGF und HA resultiert in einer deutlichen erhöhten Zelldichte und z.T. leichter Knotenbildung gegenüber der Kontrolle bzw. Stimulation mit VEGF oder HA alleine. Die Stimulation mit β-GP führt zur Bildung von Zellkonglomeraten mit beginnender Knotenbildung.

3.3.1.3 ECov5 Tier3 Versuch3 (Schaf 3)

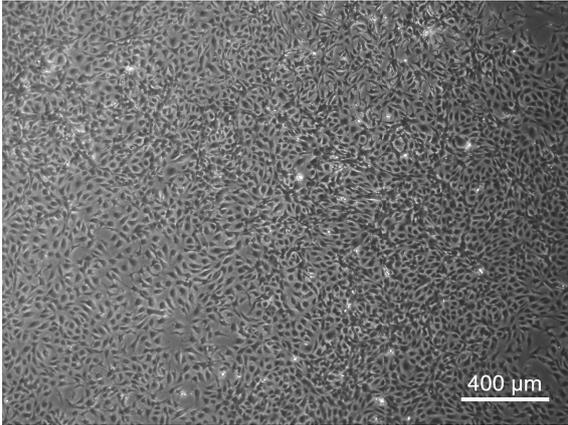


Abb. 31: ECov5 Tier3 Versuch3 Kontrolle

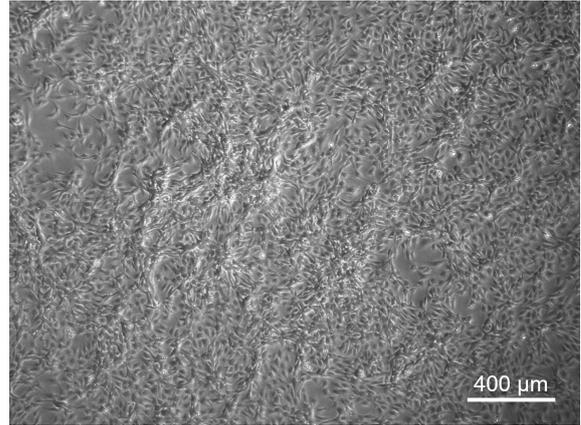


Abb. 32: ECov5 Tier3 Versuch3 β -GP

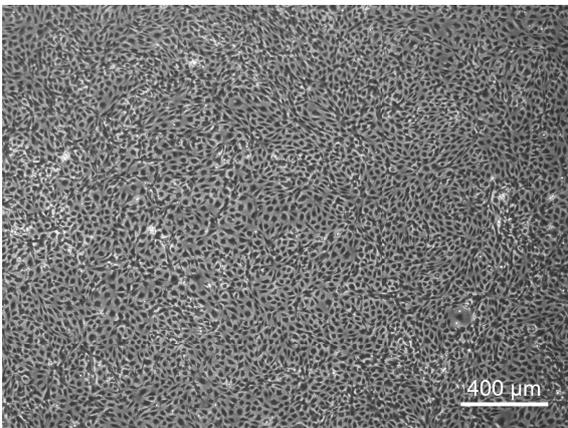


Abb. 33: ECov5 Tier3 Versuch3 VEGF

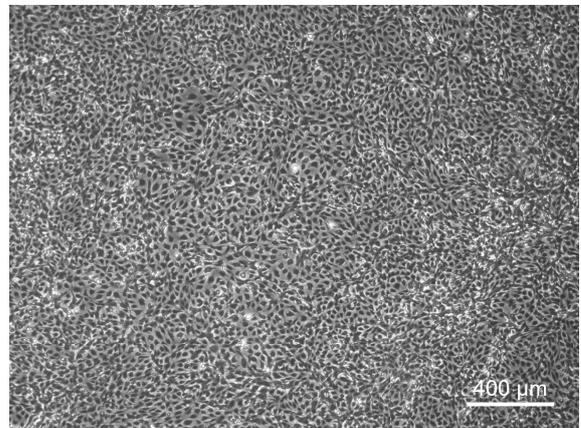


Abb. 34: ECov5 Tier3 Versuch3 VEGF+ β -GP

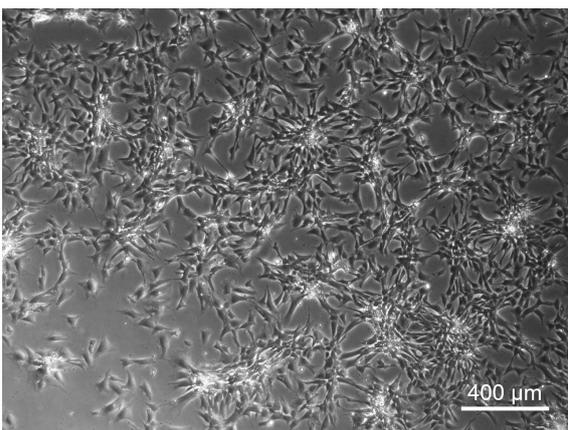


Abb. 35: ECov5 Tier3 Versuch3 TGF β_1

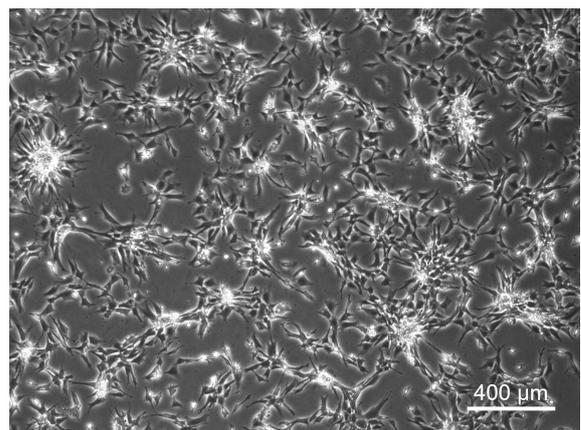


Abb. 36: ECov5 Tier3 Versuch3 TGF β_1 + β -GP

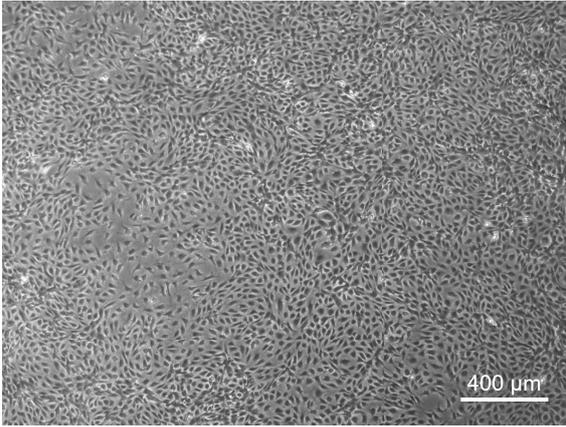


Abb. 37: ECov5 Tier3 Versuch3 BGN

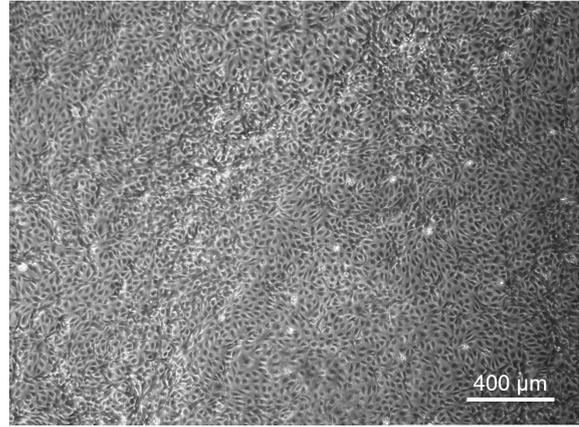


Abb. 38: ECov5 Tier3 Versuch3 HA

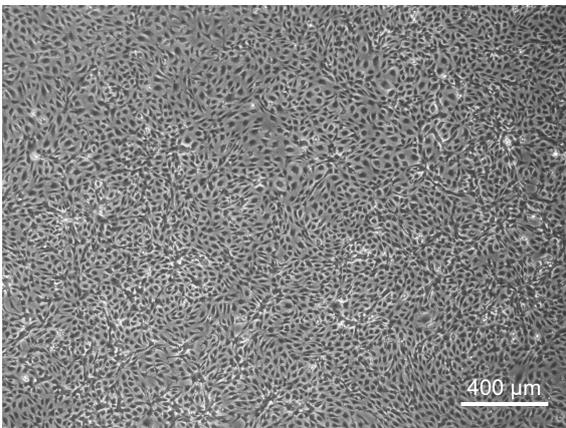


Abb. 39: ECov5 Tier3 Versuch3 VEGF+BGN

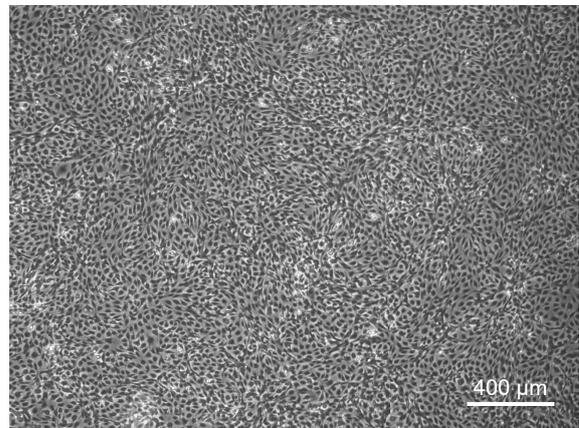


Abb. 40: ECov5 Tier3 Versuch3 VEGF+HA

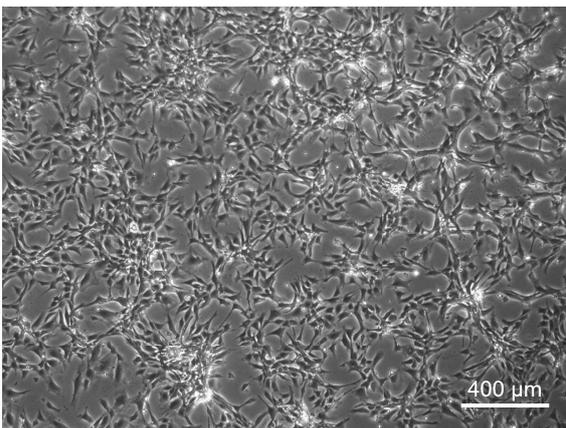


Abb. 41: ECov5 Tier3 Versuch3 TGFβ₁+BGN

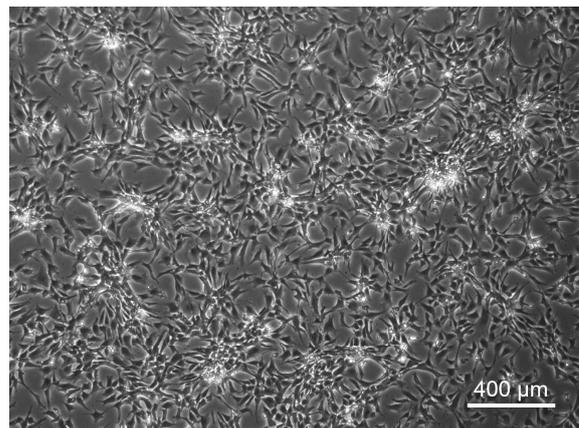


Abb. 42: ECov5 Tier3 Versuch3 TGFβ₁+HA

Auch die Zellen von Schaf 3 bilden bei Stimulation mit TGFβ₁ das bei den anderen Schafen bereits beobachtete sternförmige, knotenartige Wachstumsmuster aus. Bei simultaner Stimulation mit TGFβ₁ und β-GP finden sich im Zentrum der Knoten mehr tote Zellen als bei Stimulation mit TGFβ₁ alleine. Die Stimulation mit VEGF bzw. HA resultiert in einer erhöhten Zelldichte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die OVEC bei Stimulation mit $TGF\beta_1$ ein auffälliges Wachstumsmuster ausbilden, welches sich am ehesten als sternförmig oder knotenartig beschreiben lässt. Eine verstärkte Tendenz zur Ausbildung eines derartigen Musters zeigte sich auch bei Stimulation mit β -GP. Eine weitere Gemeinsamkeit besteht in einer Erhöhung der Zelldichte bei Stimulation mit VEGF.

3.3.2 HVEC

Es werden die Bilder von jeweils einem der drei Versuche, welche pro Patient durchgeführt wurden, gezeigt.

3.3.2.1 EC8 Versuch2 (Patient 1)

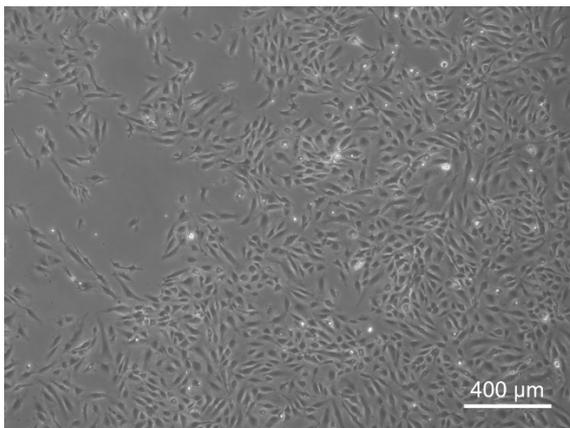


Abb. 43: EC8 Versuch2 Kontrolle

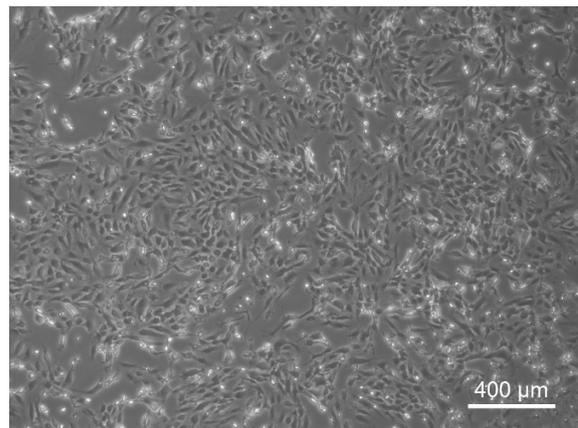


Abb. 44: EC8 Versuch2 β -GP

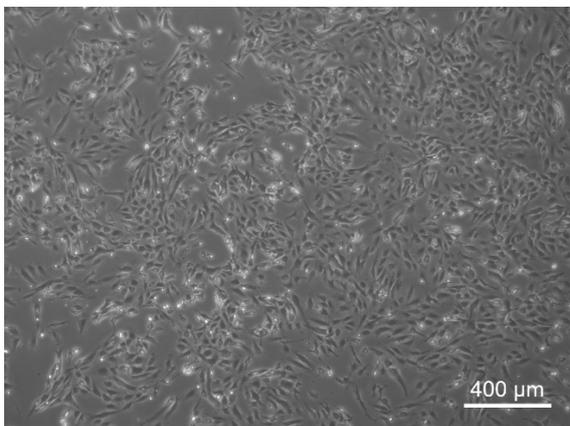


Abb. 45: EC8 Versuch2 VEGF

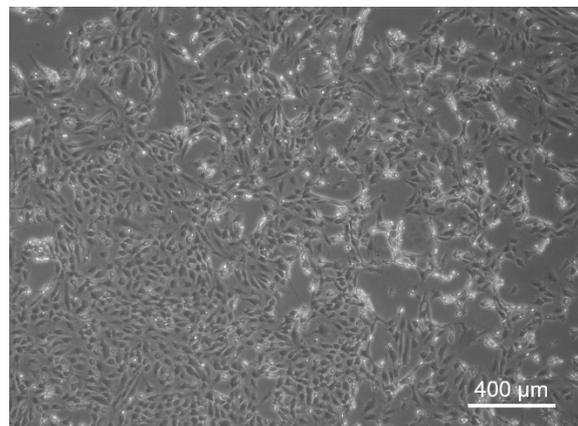


Abb. 46: EC8 Versuch2 VEGF+ β -GP

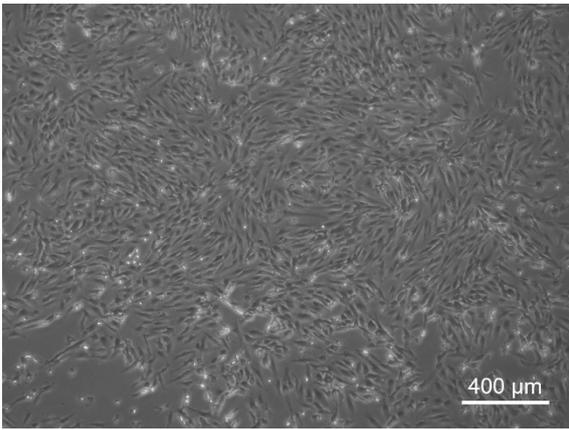


Abb. 47: EC8 Versuch2 TGFβ₁

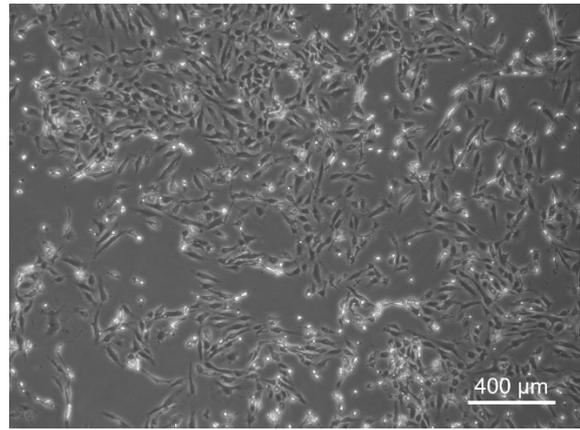


Abb. 48: EC8 Versuch2 TGFβ₁+β-GP

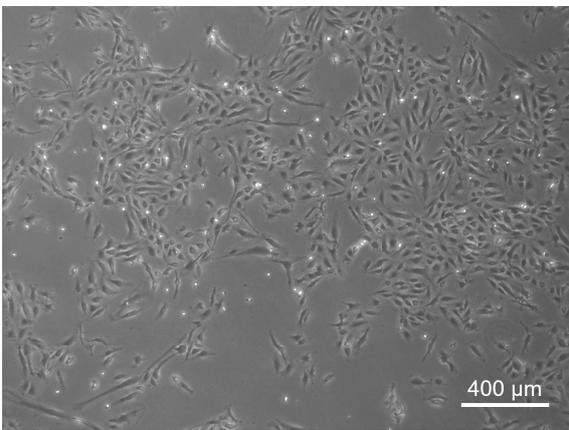


Abb. 49: EC8 Versuch2 BGN

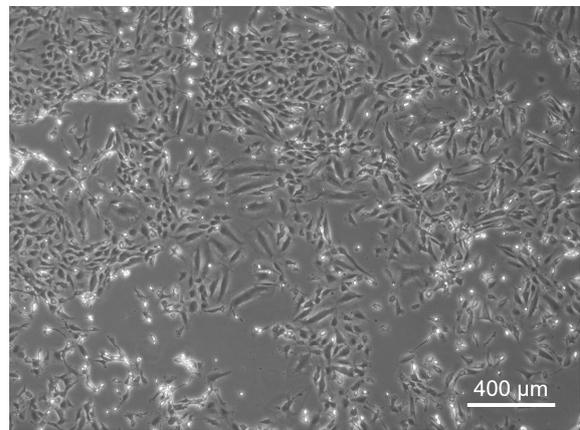


Abb. 50: EC8 Versuch2 HA

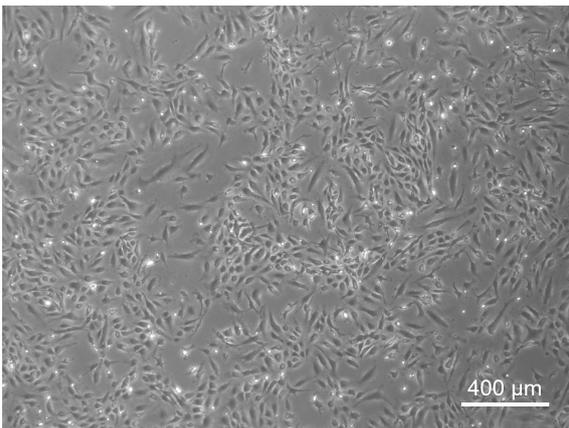


Abb. 51: EC8 Versuch2 VEGF+BGN

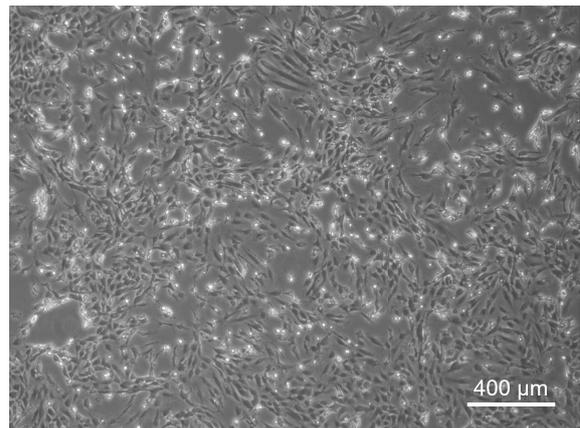


Abb. 52: EC8 Versuch2 VEGF+HA

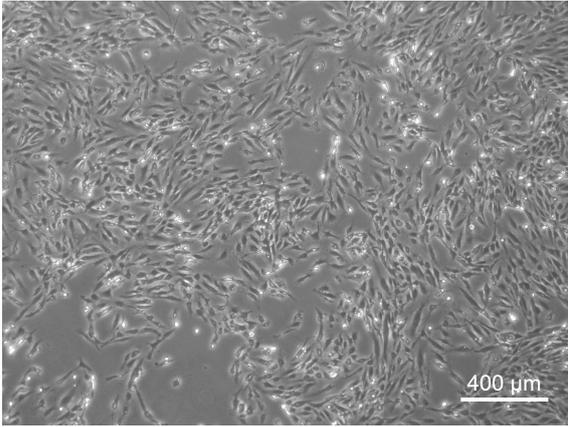


Abb. 53: EC8 Versuch2 TGFβ₁+BGN

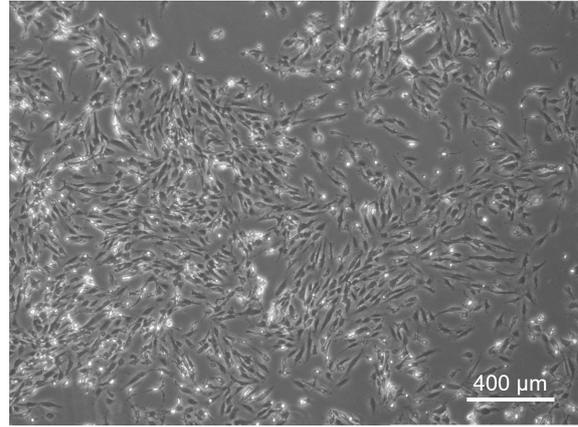


Abb. 54: EC8 Versuch2 TGFβ₁+HA

Im Vergleich zu dem leicht aufgelockerten Kopfsteinpflaster-Wachstumsmuster, welches die Zellen von Patient 1 unter Kontrollbedingungen ausprägen, zeigt sich bei Stimulation mit TGFβ₁ ein wirbelartiges, fibroblastenähnliches Wachstumsmuster. Dabei erscheinen die Zelleiber verlängert und verschmälert. Bei Stimulation mit BGN bzw. HA treten vereinzelt auffallend dicke und lange Zellen auf.

3.3.2.2 EC10 Versuch1 (Patient 2)

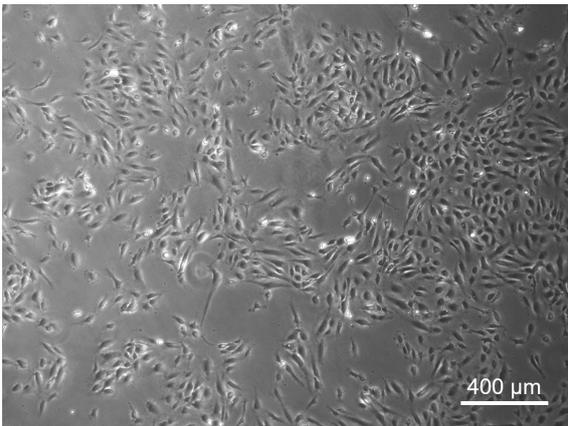


Abb. 55: EC10 Versuch1 Kontrolle

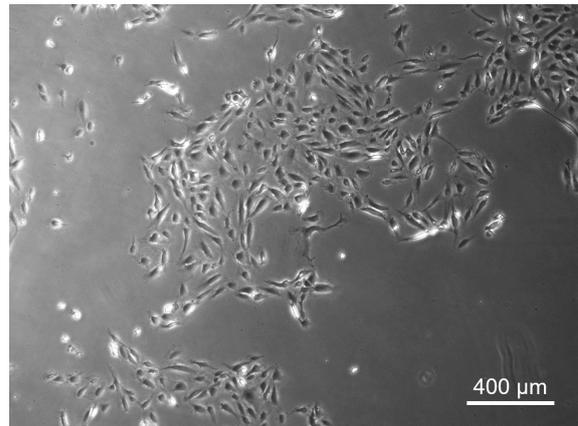


Abb. 56: EC10 Versuch1 β-GP

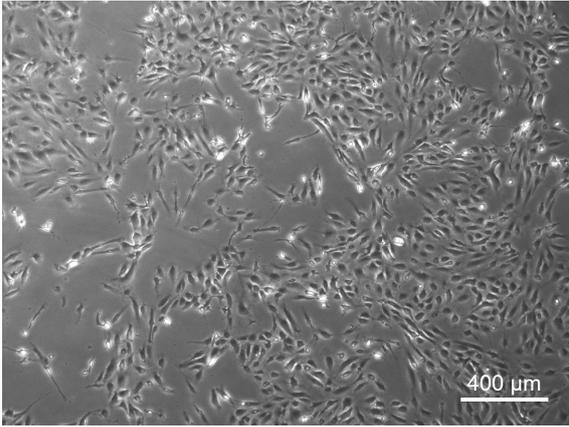


Abb. 57: EC10 Versuch1 VEGF

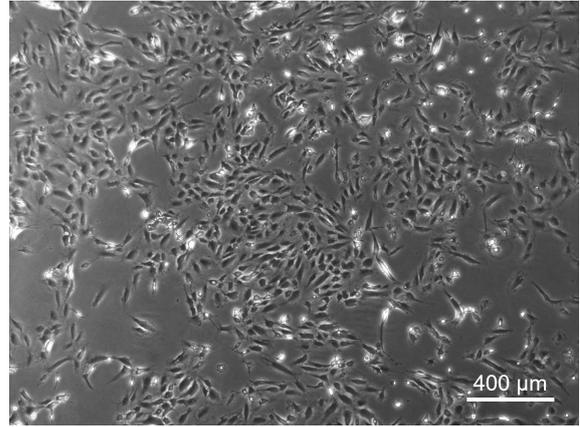


Abb. 58: EC10 Versuch1 VEGF+β-GP

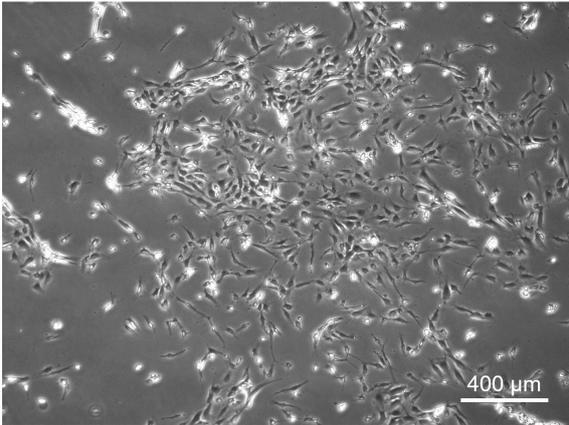


Abb. 59: EC10 Versuch1 TGFβ₁

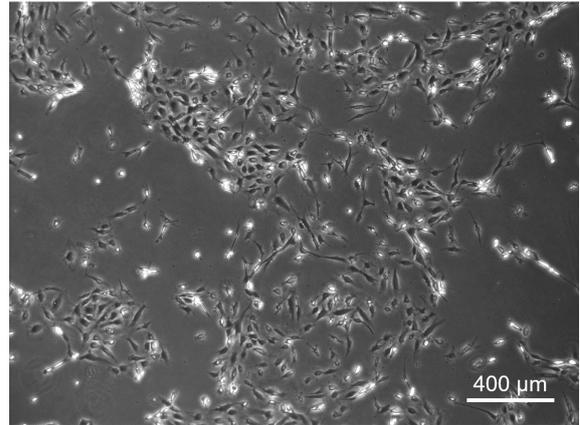


Abb. 60: EC10 Versuch1 TGFβ₁+β-GP

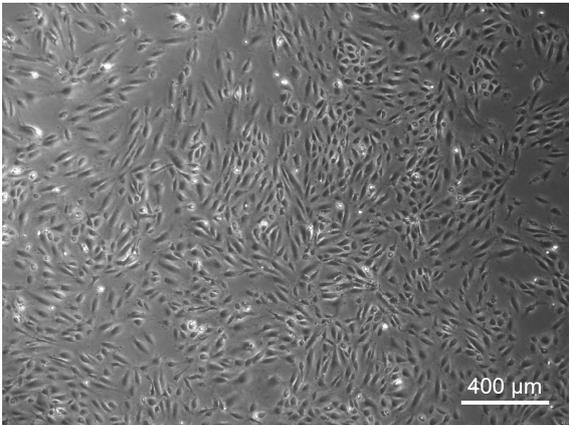


Abb. 61: EC10 Versuch1 BGN

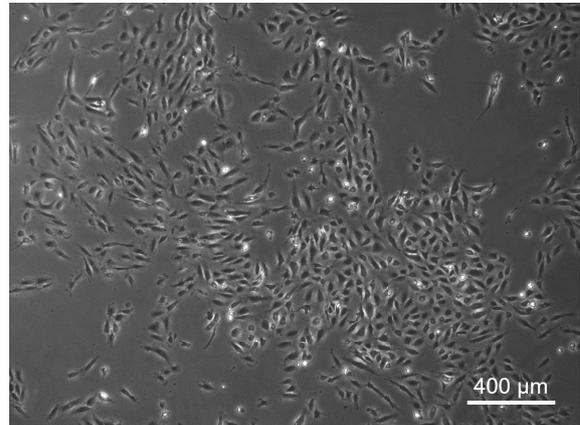


Abb. 62: EC10 Versuch1 HA

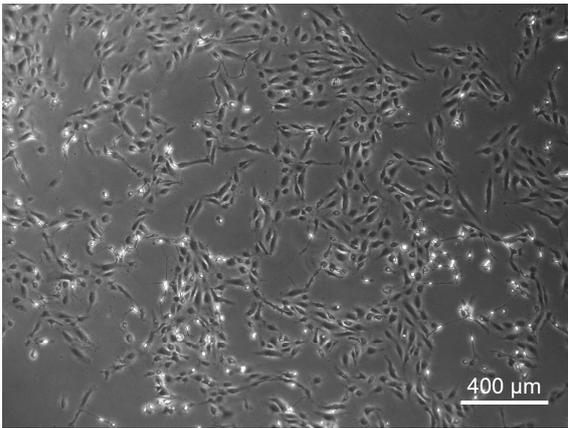


Abb. 63: EC10 Versuch1 VEGF+BGN

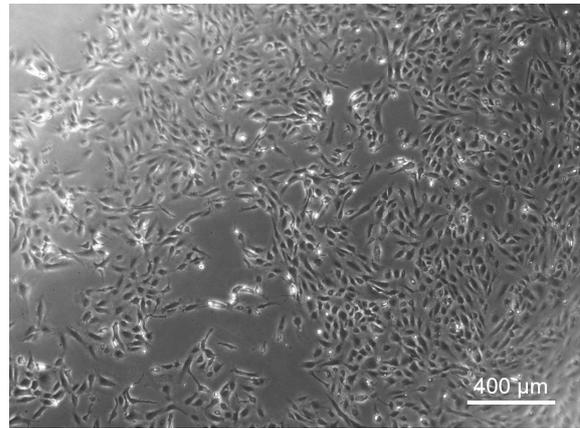


Abb. 64: EC10 Versuch1 VEGF+HA

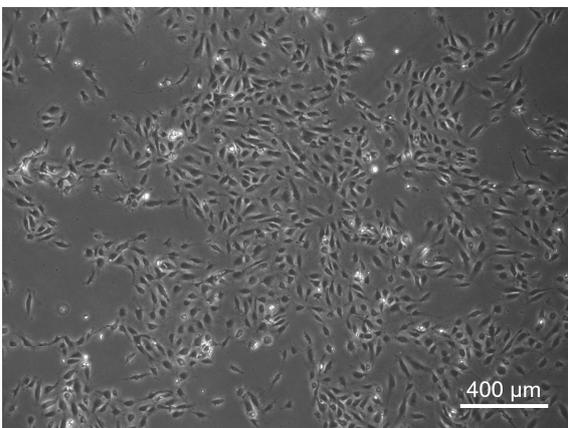


Abb. 65: EC10 Versuch1 TGFβ₁+BGN

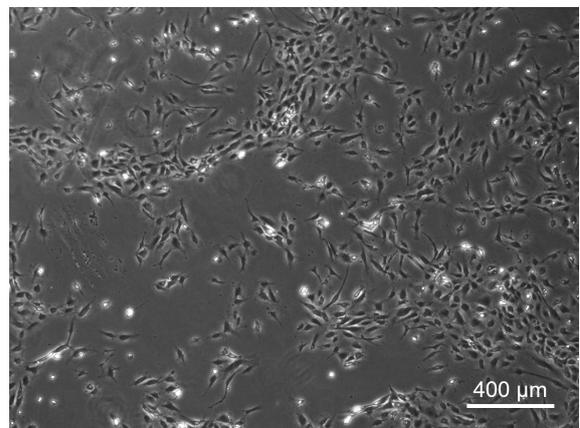


Abb. 66: EC10 Versuch1 TGFβ₁+HA

Die Zellen von Patient 2 zeigen in Reaktion auf die Stimulation keine deutliche Veränderung ihrer Morphologie.

3.3.2.3 EC14 Versuch2 (Patient 3)

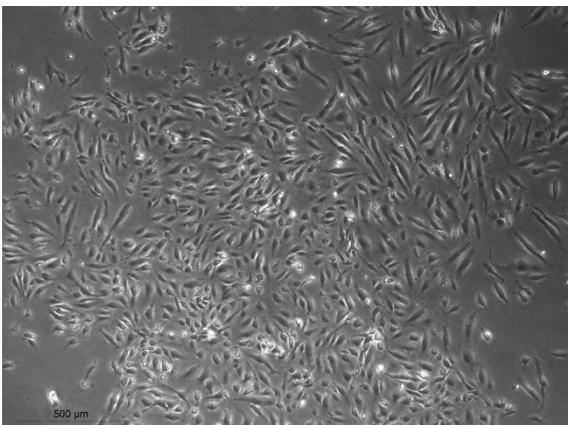


Abb. 67: EC14 Versuch2 Kontrolle

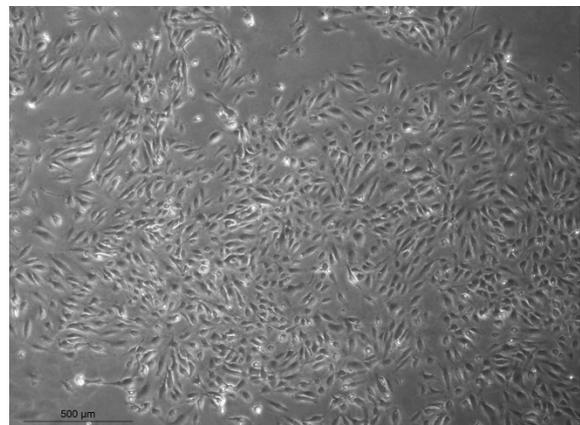


Abb. 68: EC14 Versuch2 β-GP

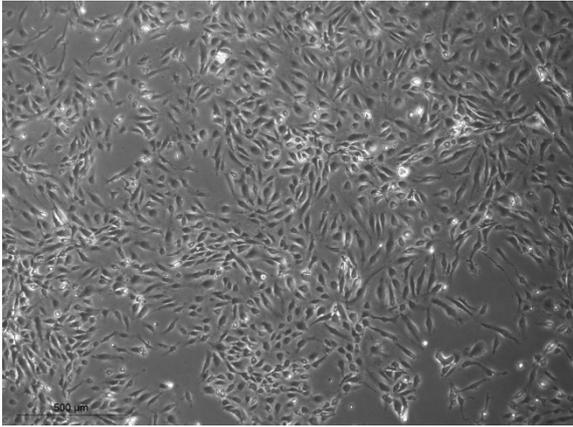


Abb. 69: EC14 Versuch2 VEGF

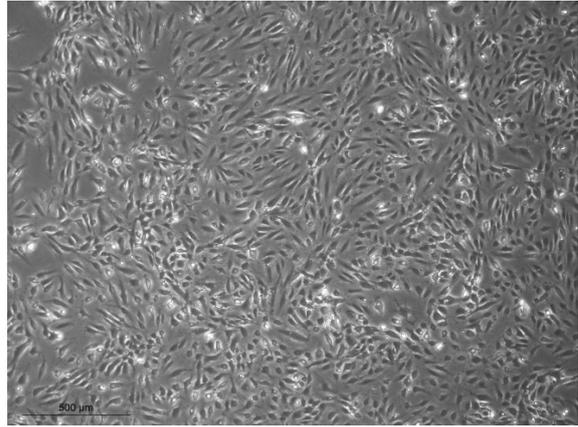


Abb. 70: EC14 Versuch2 VEGF+β-GP

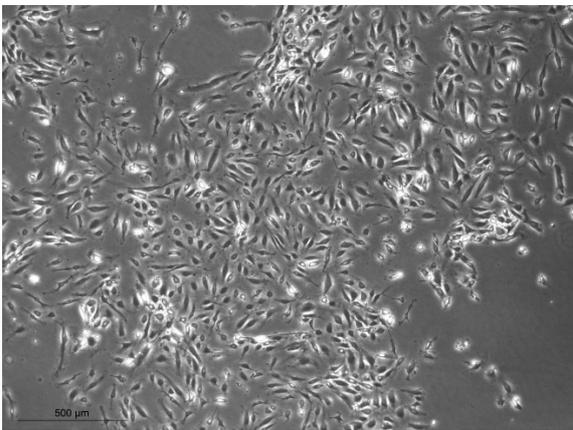


Abb. 71: EC14 Versuch2 TGFβ₁

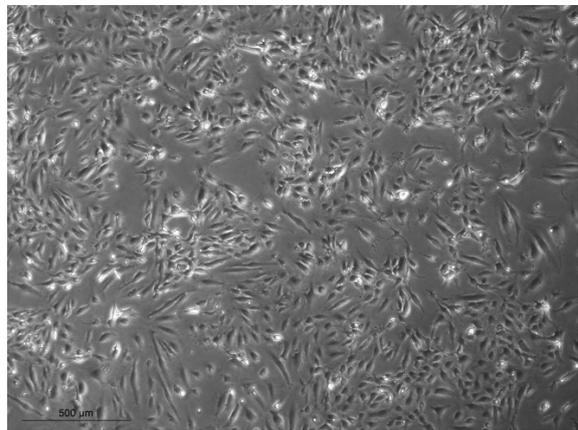


Abb. 72: EC14 Versuch2 TGFβ₁+β-GP

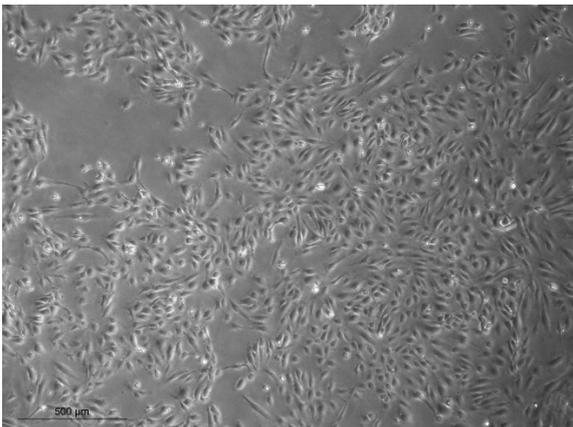


Abb. 73: EC14 Versuch2 BGN

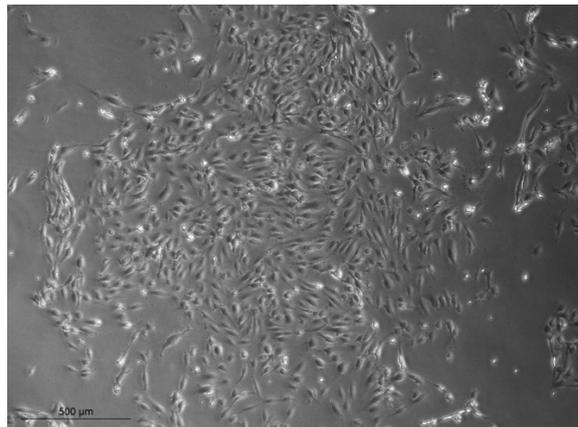


Abb. 74: EC14 Versuch2 HA

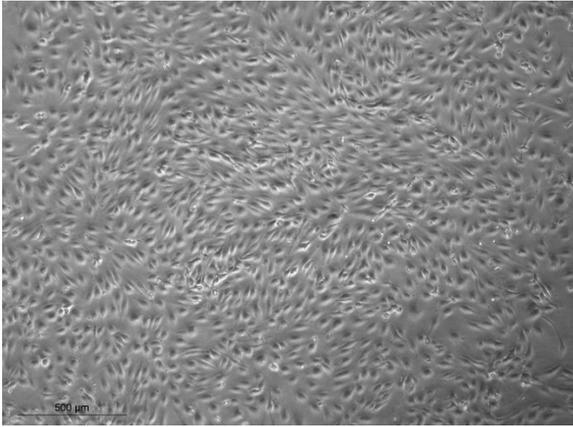


Abb. 75: EC14 Versuch2 VEGF+BGN

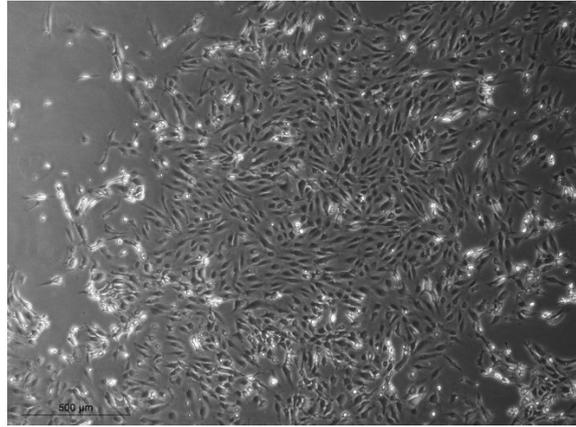


Abb. 76: EC14 Versuch2 VEGF+HA

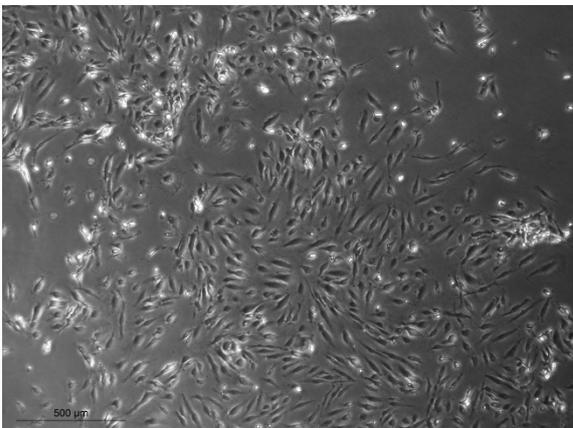


Abb. 77: EC14 Versuch2 TGFβ₁+BGN

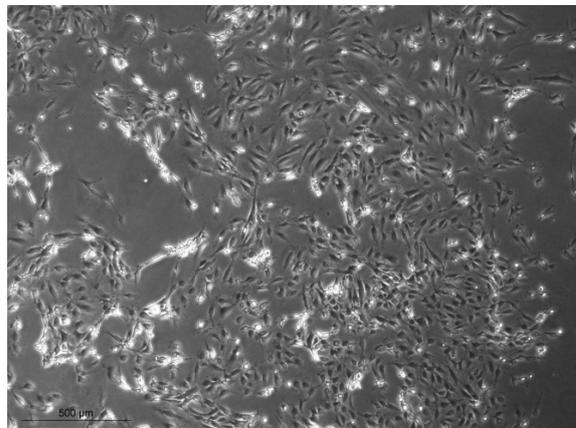


Abb. 78: EC14 Versuch2 TGFβ₁+HA

Die Stimulation der Zellen von Patient 3 mit VEGF und BGN resultiert in einer erhöhten Zelldichte. Ansonsten bewirkt die Zugabe der verschiedenen Substanzen keine deutlichen Veränderungen der Zellmorphologie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Morphologie der HVEC durch die Stimulation größtenteils kaum beeinflusst wird. Lediglich die Zellen von Patient 1 zeigen als Reaktion auf die Stimulation mit TGFβ₁ eine Veränderung im Wachstumsmuster hin zu einer wirbelartigen, fibroblastenähnlichen Anordnung.

3.3.3 HUVEC

Von den drei durchgeführten Versuchen mit dieser Zelllinie wird exemplarisch einer gezeigt.

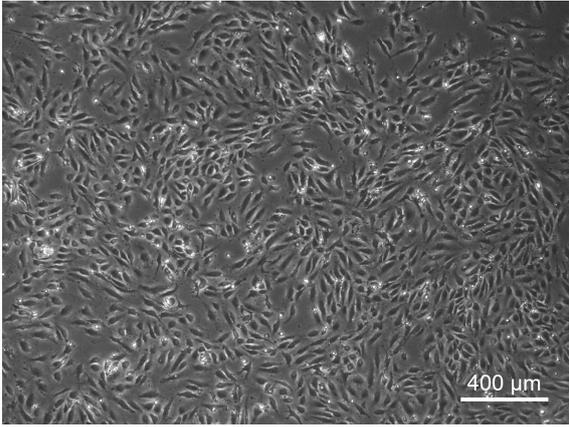


Abb. 79: HUVEC Versuch2 Kontrolle

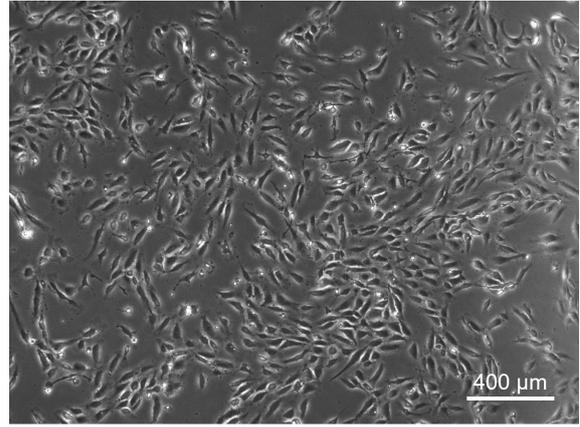


Abb. 80: HUVEC Versuch2 β-GP

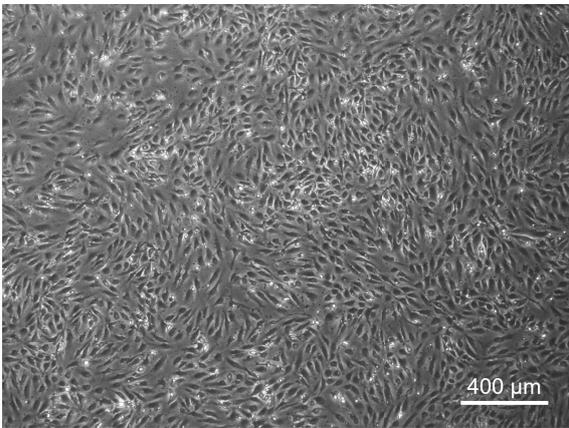


Abb. 81: HUVEC Versuch2 VEGF

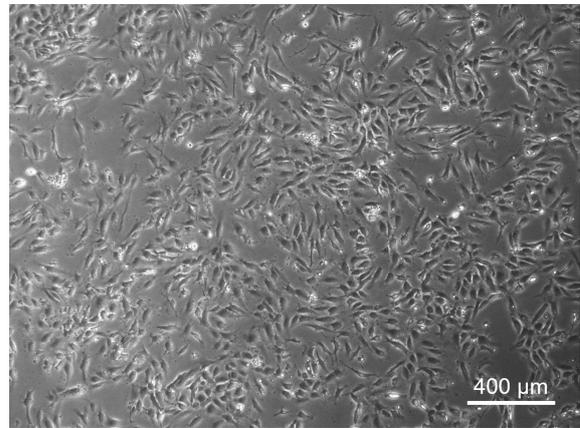


Abb. 82: HUVEC Versuch2 VEGF+β-GP

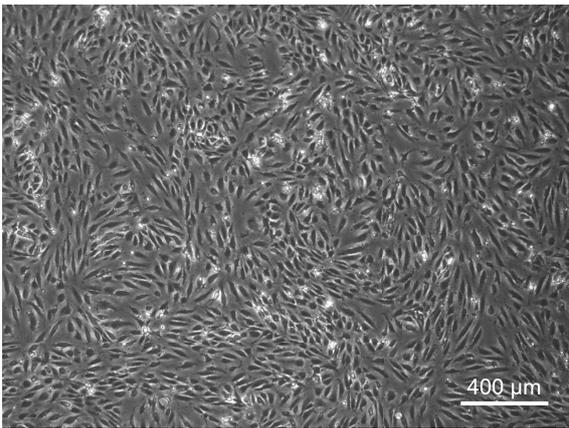


Abb. 83: HUVEC Versuch2 TGFβ₁

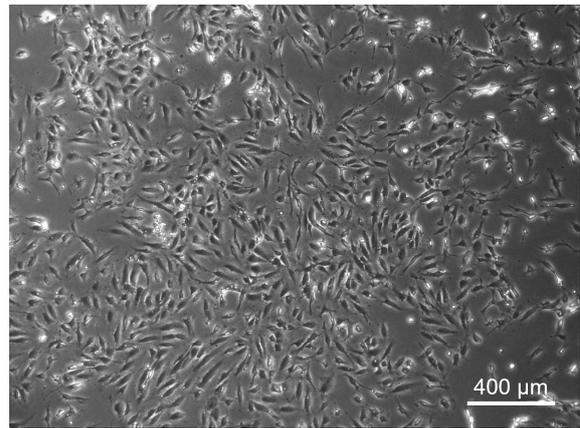


Abb. 84: HUVEC Versuch2 TGFβ₁+β-GP

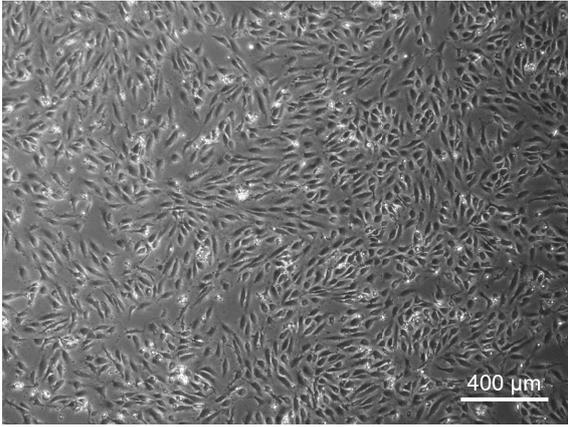


Abb. 85: HUVEC Versuch2 BGN

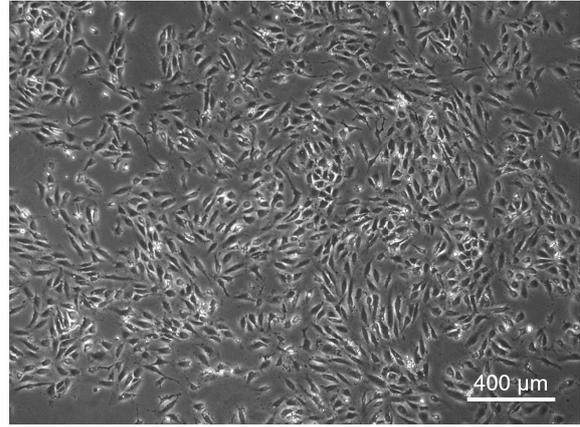


Abb. 86: HUVEC Versuch2 HA

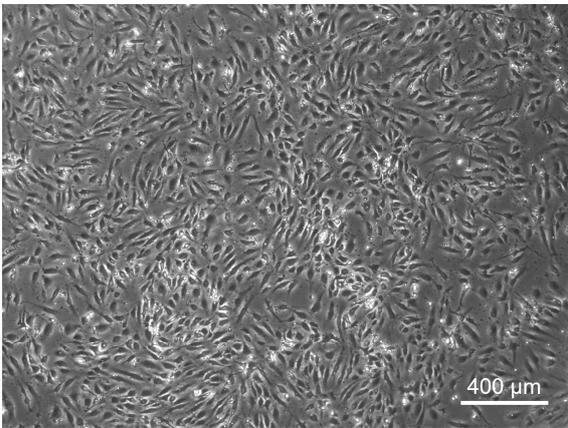


Abb. 87: HUVEC Versuch2 VEGF+BGN

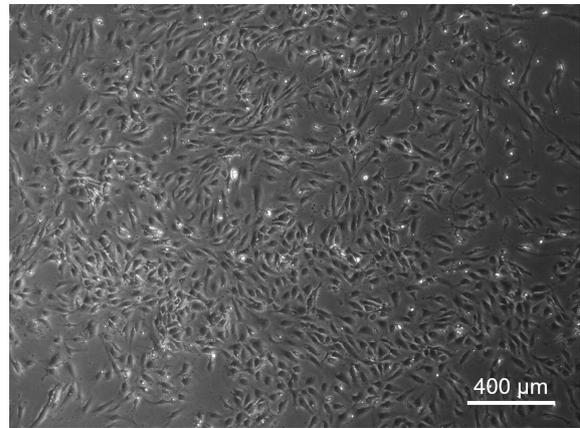


Abb. 88: HUVEC Versuch2 VEGF+HA

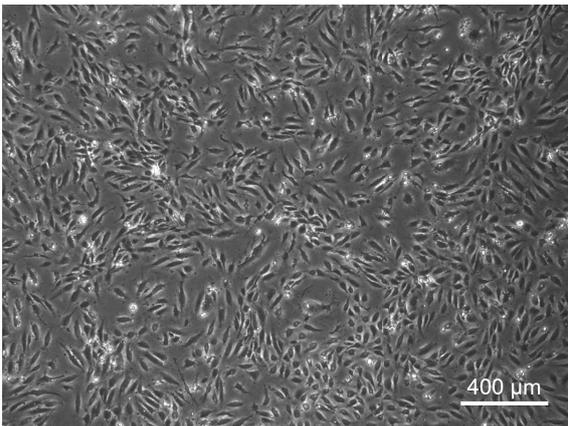


Abb. 89: HUVEC Versuch2 TGFβ₁+BGN

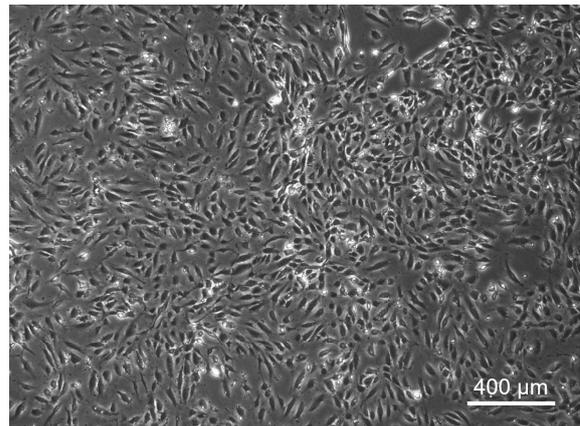


Abb. 90: HUVEC Versuch2 TGFβ₁+HA

Die HUVEC zeigen in Reaktion auf die Stimulation keine deutliche Veränderung ihrer Morphologie. Die beiden anderen durchgeführten Versuche zeigen ein vergleichbares Bild.

3.4 PCR-Ergebnisse

3.4.1 Genexpression in humanen Aortenklappen

Jeweils 10 makroskopisch unveränderte, fibrotische und kalzifizierte Aortenklappen wurden hinsichtlich ihrer Expression der EMT/EndoMT-Marker *Snai1*, *Snai2*, *Smad2* und *Twist1* sowie der Kalzifizierungsmarker Osteopontin (OPN, Genname: *SPP1*) und Osteocalcin (OCN, Genname: *BGLAP*) untersucht. Die Daten des entsprechenden Patientenkollektivs sind in Tabelle 7 auf S. 40 aufgeführt.

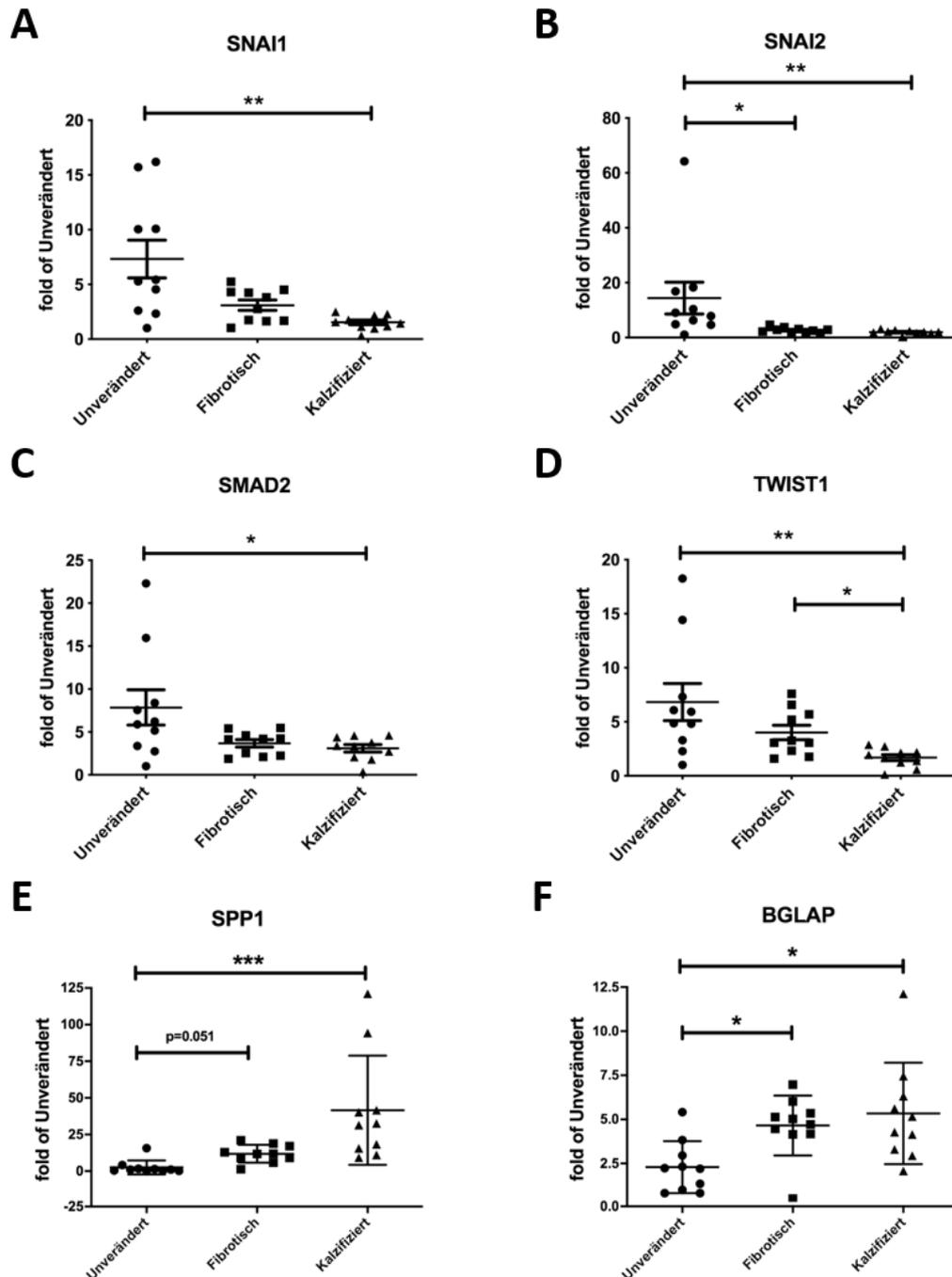


Abb. 91: Genexpression makroskopisch unveränderter, fibrotischer und kalzifizierter humaner Aortenklappen (n=10)

Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass sich die *Snai1*-Expression in den in Abb. 91A gezeigten Gruppen signifikant unterscheidet ($p = 0,0019$). Die Expression von *Snai1* ist in den makroskopisch unveränderten Klappen signifikant höher ($p = 0,0012$) als in den kalzifizierten Klappen (Unverändert: $7,319 \pm 1,720$; Fibrotisch: $3,093 \pm 0,475$; Kalzifiziert: $1,535 \pm 0,213$).

Die *Snai2*-Expression schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 91B gezeigten Gruppen ($p = 0,0011$). *Snai2* ist in den makroskopisch unveränderten Klappen signifikant höher exprimiert als in den fibrotischen ($p = 0,0267$) oder in den kalzifizierten ($p = 0,0011$) Klappen (Unverändert: $14,34 \pm 5,795$; Fibrotisch: $2,666 \pm 0,315$; Kalzifiziert: $1,972 \pm 0,246$).

Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass sich die *Smad2*-Expression in den in Abb. 91C gezeigten Stichproben signifikant unterscheidet ($p = 0,0387$). Die Expression von *Smad2* ist in den makroskopisch unveränderten Klappen signifikant höher ($p = 0,0412$) als in den kalzifizierten Klappen (Unverändert: $7,852 \pm 2,060$; Fibrotisch: $3,676 \pm 0,435$; Kalzifiziert: $3,093 \pm 0,438$).

Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass sich die *Twist1*-Expression in den in Abb. 91D gezeigten Stichproben signifikant unterscheidet ($p = 0,0023$). Bezüglich der Expression von *Twist1* besteht sowohl zwischen den makroskopisch unveränderten und kalzifizierten ($p = 0,0024$) als auch zwischen den fibrotischen und kalzifizierten ($p = 0,0358$) Klappen ein signifikanter Unterschied (Unverändert: $6,822 \pm 1,716$; Fibrotisch: $4,009 \pm 0,664$; Kalzifiziert: $1,687 \pm 0,279$).

Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass sich die *SPP1*-Expression in den in Abb. 91E gezeigten Gruppen signifikant unterscheidet ($p = 0,0001$). Die Expression von *SPP1* ist in den kalzifizierten Klappen hochsignifikant gegenüber jener in den unveränderten Klappen gesteigert ($p < 0,0001$). Zudem besteht eine annähernd signifikante Expressionserhöhung von *SPP1* in den fibrotischen Klappen im Vergleich zu den unveränderten Klappen ($p = 0,0509$) (Unverändert: $2,595 \pm 1,506$; Fibrotisch: $11,86 \pm 1,905$; Kalzifiziert: $41,52 \pm 11,78$).

Auch die *BGLAP*-Expression in den in Abb. 91F gezeigten Gruppen unterscheidet sich laut Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p = 0,0099$). Die Expression von *BGLAP* ist in den kalzifizierten Klappen signifikant gegenüber jener in den unveränderten Klappen gesteigert ($p = 0,0213$). Darüber hinaus ist *BGLAP* auch in den fibrotischen Klappen signifikant höher exprimiert als in den unveränderten ($p = 0,0309$) (Unverändert: $2,292 \pm 0,465$; Fibrotisch: $4,651 \pm 0,536$; Kalzifiziert: $5,340 \pm 0,910$).

3.4.2 Ergebnisse der Stimulationsversuche, geordnet nach Genen

Pro Zelltyp und Gen wurden jeweils 12 Ergebnis-Gruppen miteinander verglichen, die unterschiedlichen Versuchsbedingungen entsprachen.

3.4.2.1 *SNAI1*

3.4.2.1.1 OVEC

Laut dem Kruskal-Wallis-Test schwanken die MW der *Snai1*-Expression in OVEC zwischen den in Abb. 92 A gezeigten Bedingungen annähernd signifikant ($p = 0,0598$). Testet man den Median der Ergebnisgruppe TGF β 1 mithilfe des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests gegen 1 und damit gegen die Kontrolle, ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0195$). Zudem ist im 95%-Konfidenzintervall vom TGF β 1-MW der Wert 1 nicht enthalten ($KI_{TGF\beta 1} = [1,077; 2,53]$).

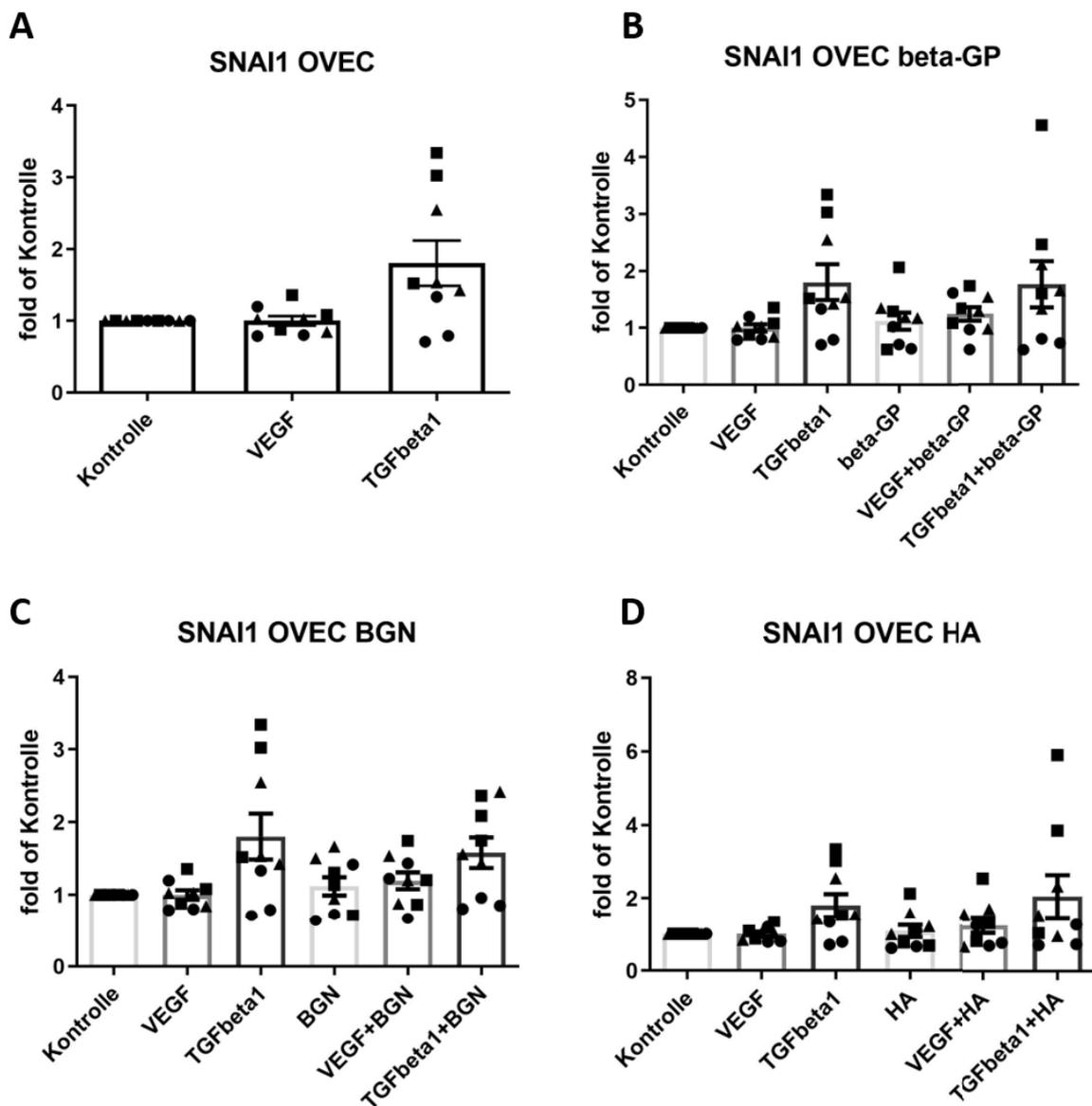


Abb. 92: *SNAI1*-Expression in OVEC

In Abb. 92 B-D bestehen hinsichtlich der *Snai1*-Expression in OVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

3.4.2.1.2 HVEC

Die *Snai1*-Expression in HVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 93 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0002$). Es besteht ein signifikanter Expressionsunterschied sowohl zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit TGF β 1 ($p = 0,0006$) als auch zwischen Stimulation mit VEGF und Stimulation mit TGF β 1 ($p = 0,0024$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $1,118 \pm 0,138$; TGF β 1: $2,373 \pm 0,263$)

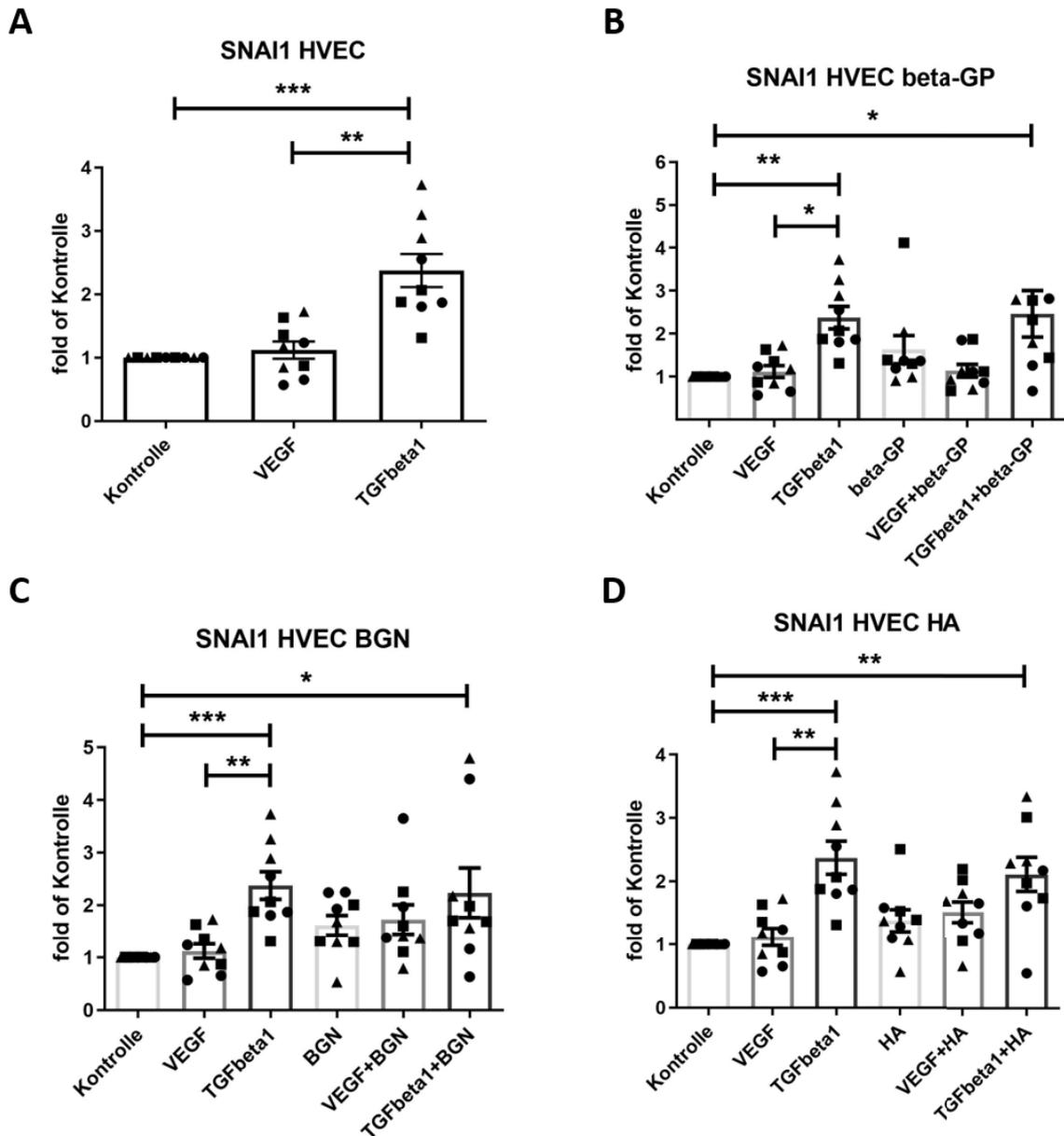


Abb. 93: SNAI1-Expression in HVEC

Die *Snai1*-Expression in HVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 93 B gezeigten Gruppen ($p = 0,0002$). Es bestehen signifikante Expressionsunterschiede zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGF β 1 ($p = 0,0029$), zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGF β 1 + β -GP ($p = 0,0401$) sowie zwischen den

Gruppen „VEGF“ und „TGFβ1“ ($p = 0,0115$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $1,118 \pm 0,138$; TGFβ1: $2,373 \pm 0,263$; TGFβ1 + β-GP: $2,465 \pm 0,545$)

Die *Snai1*-Expression in HVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 93 C gezeigten Gruppen ($p = 0,0004$). Es bestehen signifikante Expressionsunterschiede zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGFβ1 ($p = 0,0009$), zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGFβ1 + BGN ($p = 0,0381$) sowie zwischen den Gruppen „VEGF“ und „TGFβ1“ ($p = 0,0098$). Bei Durchführung des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests zeigt sich, dass der Median der *Snai1*-Expression bei Stimulation mit BGN signifikant von 1 verschieden ist ($p = 0,0273$). Im 95%-Konfidenzintervall der BGN-Gruppe ist zudem 1 nicht enthalten. (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $1,118 \pm 0,138$; TGFβ1: $2,373 \pm 0,263$; BGN: $1,616 \pm 0,187$; TGFβ1 + BGN: $2,233 \pm 0,472$; $KI_{BGN} = [1,184; 2,047]$).

Die *Snai1*-Expression in HVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 93 D gezeigten Gruppen ($p < 0,0001$). Es bestehen signifikante Expressionsunterschiede zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGFβ1 ($p = 0,0004$), zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGFβ1 + HA ($p = 0,0042$) sowie zwischen den Gruppen „VEGF“ und „TGFβ1“ ($p = 0,0070$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $1,118 \pm 0,138$; TGFβ1: $2,373 \pm 0,263$; TGFβ1 + HA: $2,111 \pm 0,270$)

3.4.2.1.3 HUVEC

Die *Snai1*-Expression in HUVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 94 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0036$). Es besteht ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit TGFβ1 ($p = 0,0190$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; TGFβ1: $4,933 \pm 0,570$)

In Abb. 94 B-D bestehen keine darüber hinaus gehenden signifikanten Expressionsunterschiede.

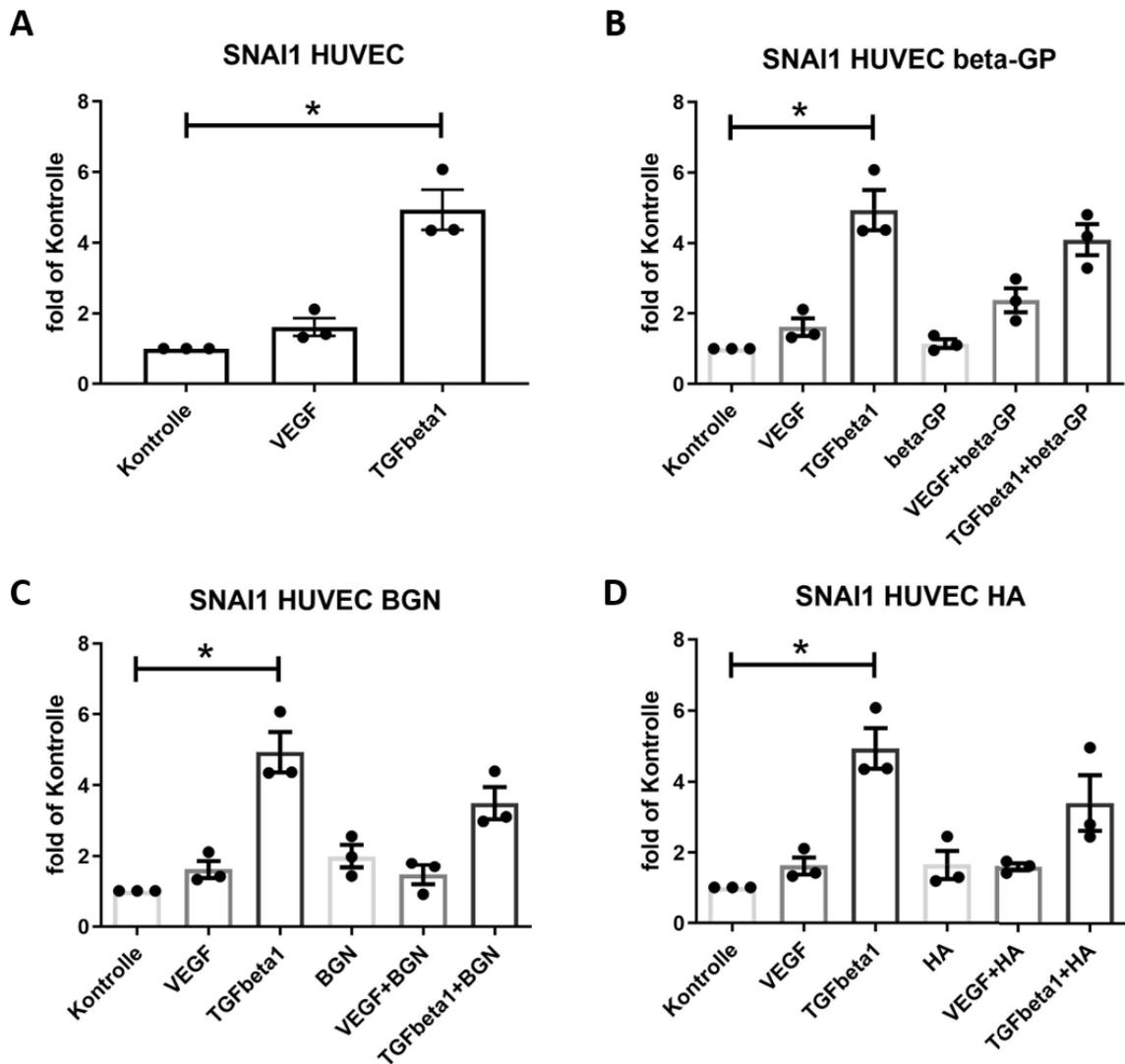


Abb. 94: SNAI1-Expression in HUVEC

3.4.2.2 SNAI2

3.4.2.2.1 OVEC

Die *Snai2*-Expression in OVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 95 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0230$). Bei Stimulation mit TGF β 1 besteht eine signifikante Expressionsminderung gegenüber der Kontrolle ($p = 0,0255$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; TGF β 1: $0,696 \pm 0,108$)

Laut Kruskal-Wallis-Test schwankt die *Snai2*-Expression in OVEC ebenfalls signifikant zwischen den in Abb. 95 B gezeigten Gruppen ($p = 0,0359$). Der Post-hoc-test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Bedingungen.

In Abb. 95 C und D bestehen hinsichtlich der *Snai2*-Expression in OVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

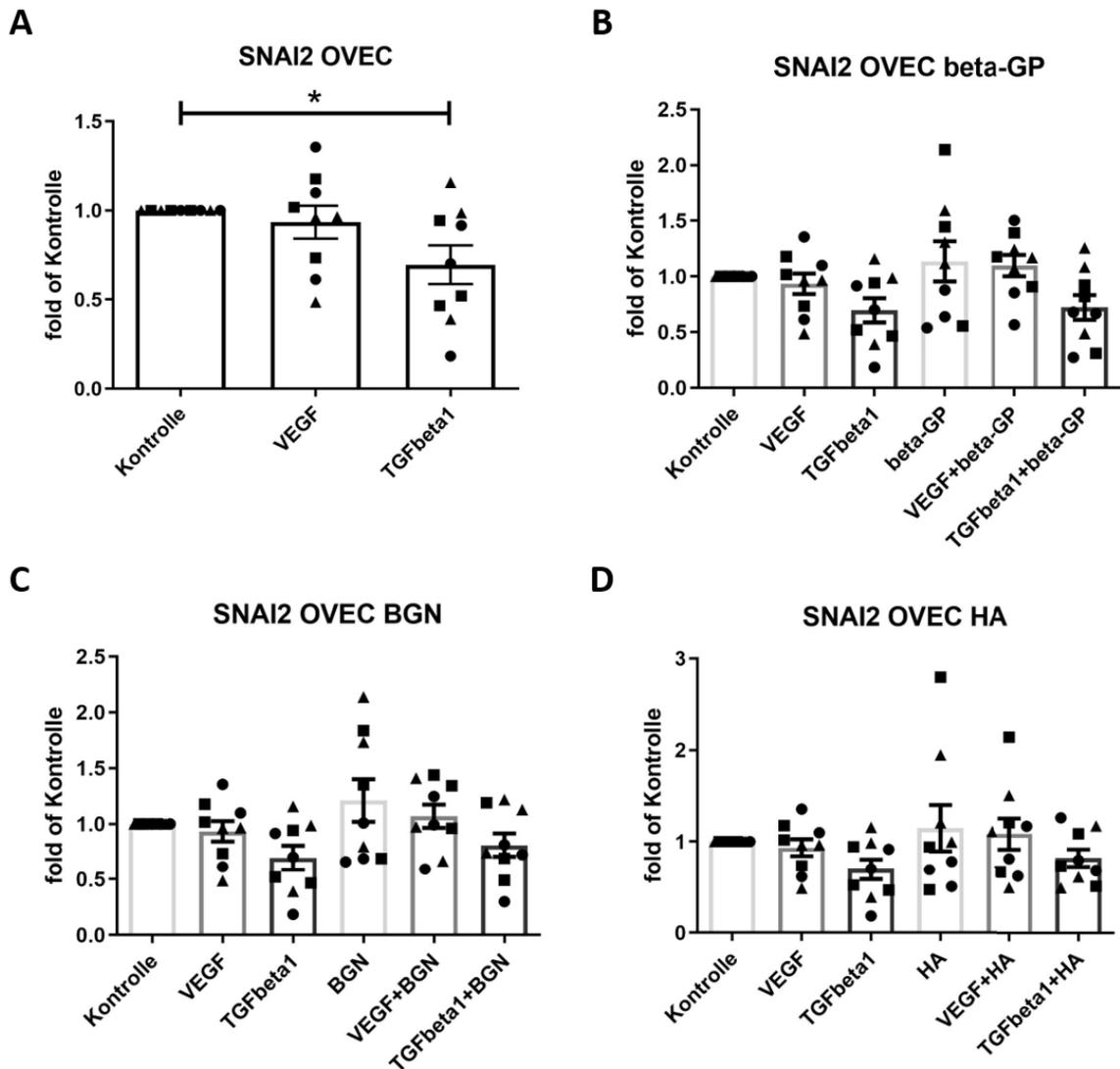


Abb. 95: SNAI2-Expression in OVEC

3.4.2.2.2 HVEC

Die *Snai2*-Expression in HVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 96 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0179$). Es besteht eine signifikante Expressionssteigerung bei Stimulation mit TGF β 1 gegenüber der Kontrolle ($p = 0,0213$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; TGF β 1: $1,847 \pm 0,299$)

In Abb. 96 B, C und D bestehen hinsichtlich der *Snai2*-Expression in HVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

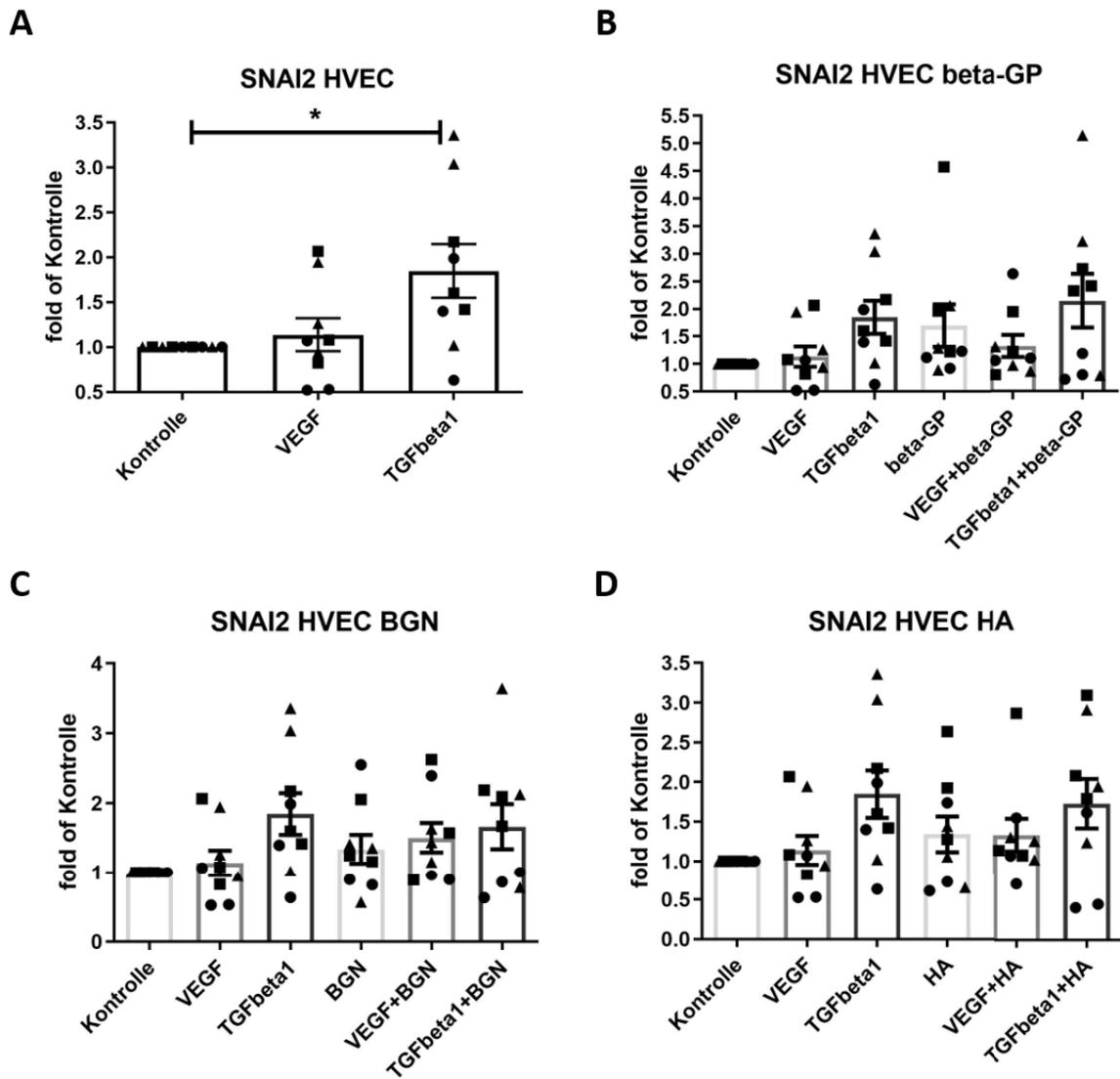


Abb. 96: SNAI2-Expression in HVEC

3.4.2.2.3 HUVEC

In Abb. 97 bestehen hinsichtlich der *Snai2*-Expression in HUVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

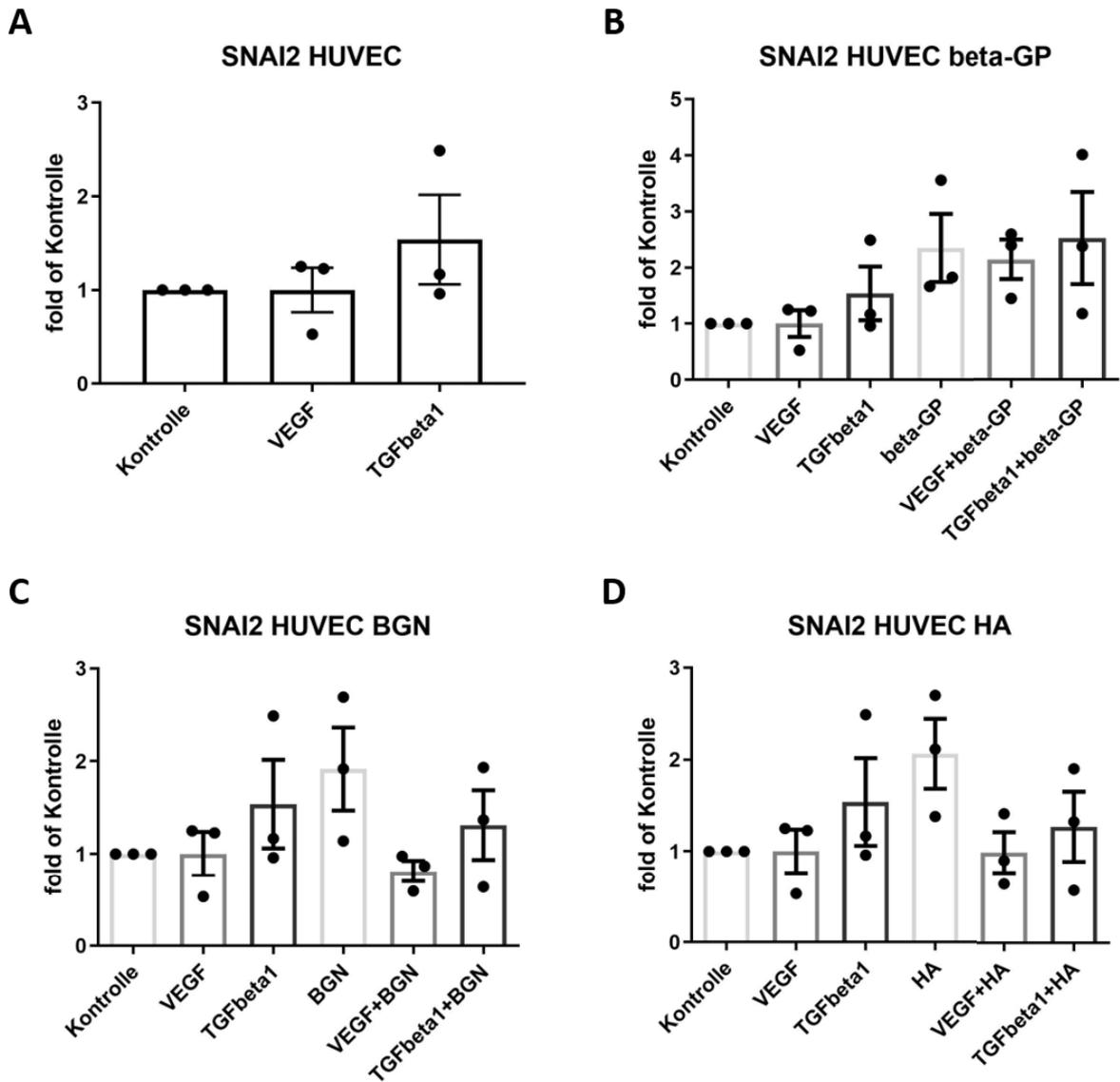


Abb. 97: SNAI2-Expression in HUVEC

3.4.2.3 SMAD2

3.4.2.3.1 OVEC

In Abb. 98 bestehen hinsichtlich der *Smad2*-Expression in OVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

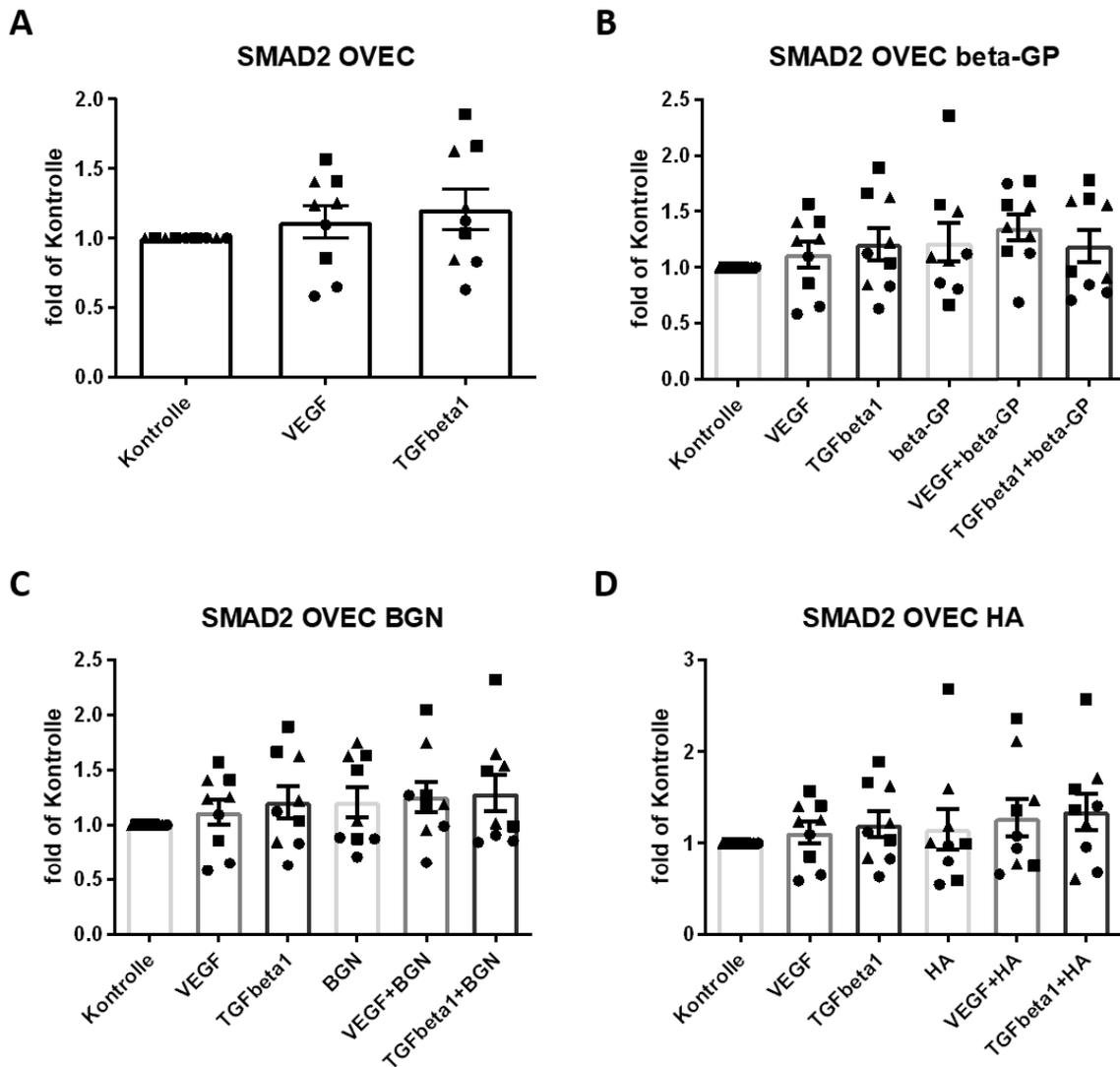


Abb. 98: SMAD2-Expression in OVEC

3.4.2.3.2 HVEC

In Abb. 99 A, B und D bestehen hinsichtlich der *Smad2*-Expression in HVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

Bezüglich der Abb. 99 C zeigt sich bei Durchführung des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests, dass der Median der *Smad2*-Expression in HVEC bei Stimulation mit BGN signifikant von 1 verschieden ist ($p = 0,0391$). Im 95%-Konfidenzintervall des BGN-MW ist 1 nicht enthalten. (Kontrolle: 1 ± 0 ; BGN: $1,347 \pm 0,102$; $KI_{BGN} = [1,111; 1,582]$)

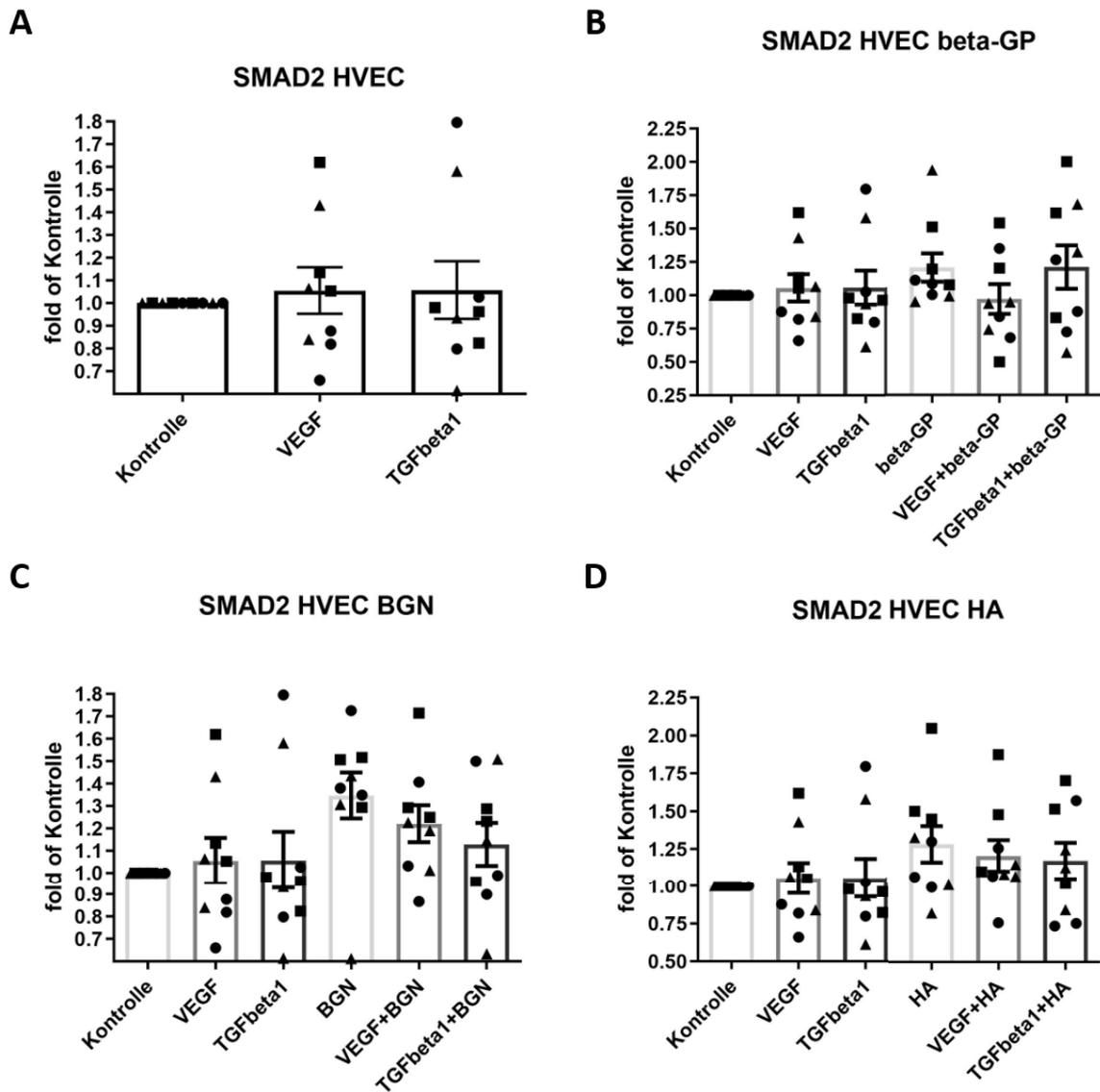


Abb. 99: SMAD2-Expression in HUVEC

3.4.2.3.3 HUVEC

Die *Smad2*-Expression in HUVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 100 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0464$). Es besteht ein annähernd signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit TGF β 1 ($p = 0,0688$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; TGF β 1: $1,588 \pm 0,180$)

In Abb. 100 B-D bestehen hinsichtlich der *Smad2*-Expression in HUVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

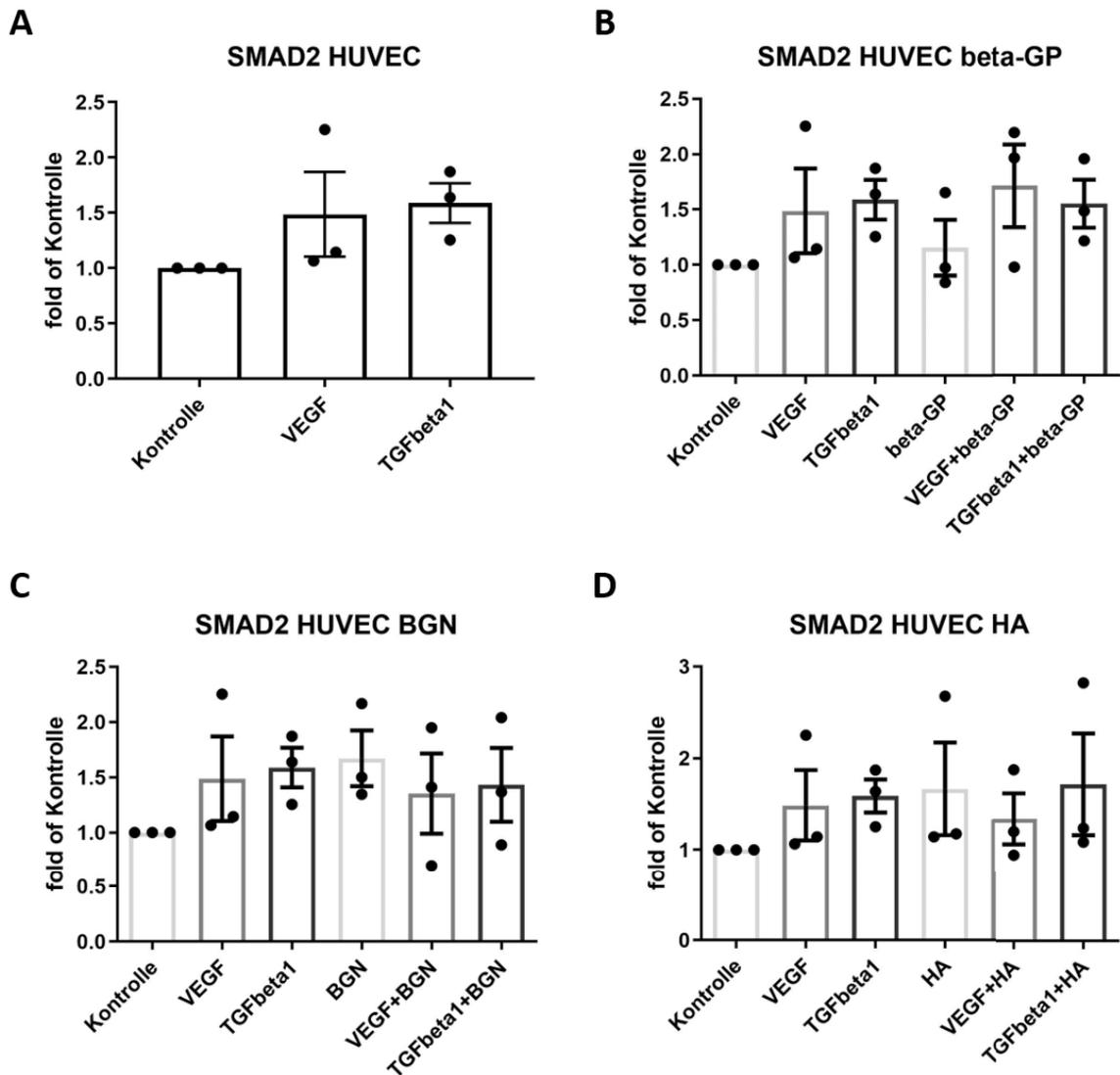


Abb. 100: SMAD2-Expression in HUVEC

3.4.2.4 TWIST1

3.4.2.4.1 OVEC

In Abb. 101 bestehen hinsichtlich der *Twist1*-Expression in OVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

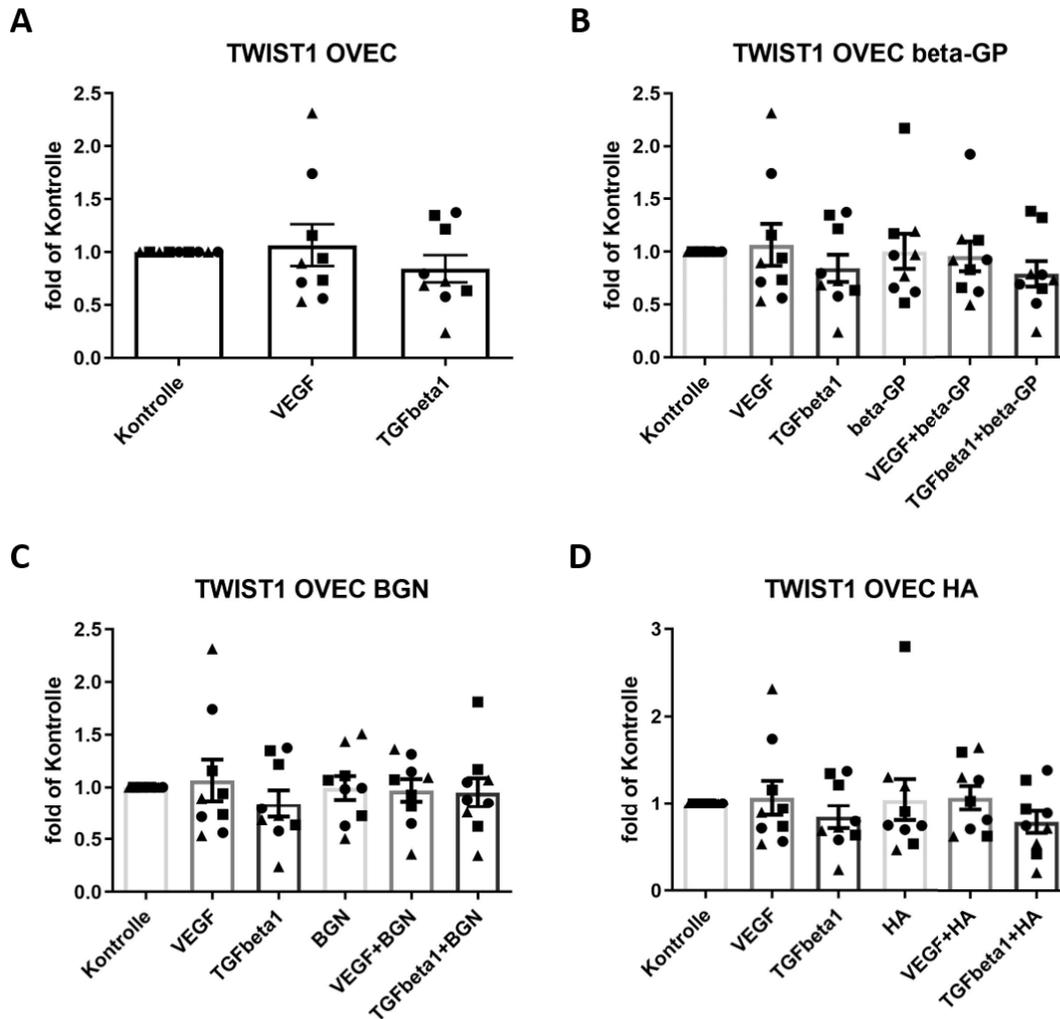


Abb. 101: TWIST1-Expression in OVEC

3.4.2.4.2 HVEC

Twist1 wurde im Falle der HVEC nicht in die Auswertung einbezogen, da die Expression sich nicht bei allen Versuchen bestimmen ließ. Bei den auswertbaren Versuchen zeigten sich zumeist sehr hohe Ct-Werte (> 35).

3.4.2.4.3 HUVEC

Auch im Falle der HUVEC wurde *Twist1* nicht mit in die Auswertung einbezogen, da dessen Expression zumeist gar nicht bestimmbar war. Bei messbarer Expression zeigten sich zumeist sehr hohe C_T -Werte (> 34).

3.4.2.5 SPP1

3.4.2.5.1 OVEC

Die *SPP1*-Expression in OVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 102 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0006$). Es besteht ein signifikanter

Expressionsunterschied sowohl zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit TGFβ1 ($p = 0,0005$) als auch zwischen Stimulation mit VEGF und Stimulation mit TGFβ1 ($p = 0,0278$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $0,857 \pm 0,130$; TGFβ1: $0,392 \pm 0,084$)

Die *SPP1*-Expression in OVEC schwankt laut Kruskal Wallis-Test ebenfalls signifikant zwischen den in Abb. 102 B gezeigten Gruppen ($p < 0,0001$). Es bestehen signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen „TGFβ1“ und „β-GP“ ($p < 0,0001$), „β-GP“ und „TGFβ1 + β-GP“ ($p < 0,0001$) sowie „VEGF + β-GP“ und „TGFβ1 + β-GP“ ($p = 0,0143$). Zudem besteht ein annähernd signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit TGFβ1 ($p = 0,0563$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; TGFβ1: $0,392 \pm 0,084$; β-GP: $2,132 \pm 0,536$; VEGF + β-GP: $1,296 \pm 0,219$; TGFβ1 + β-GP: $0,442 \pm 0,093$)

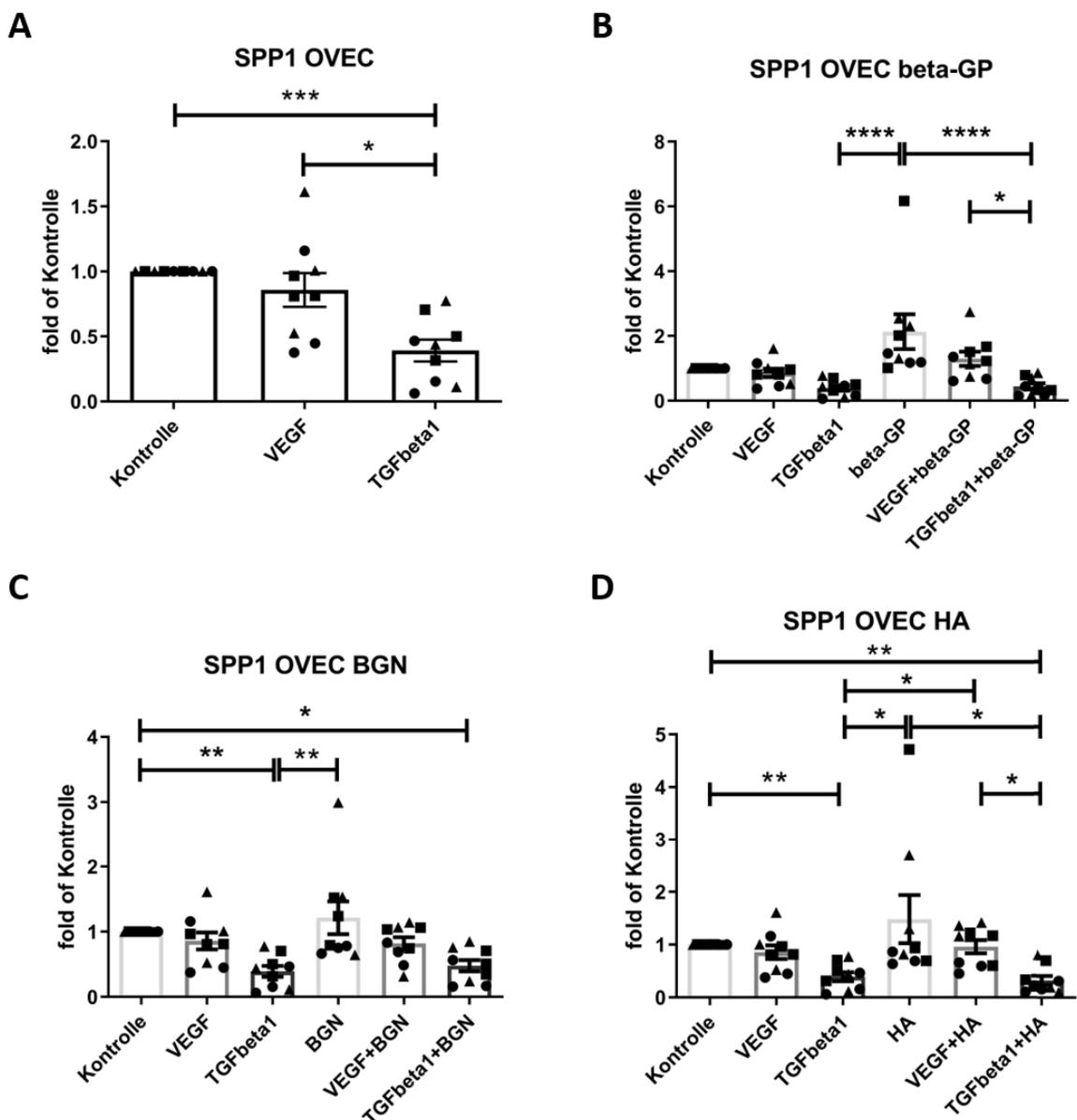


Abb. 102: SPP1-Expression in OVEC

Die *SPP1*-Expression in OVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 102 C gezeigten Gruppen ($p = 0,0002$). Es bestehen signifikante Expressionsunterschiede zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGF β 1 ($p = 0,0026$), zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGF β 1 + BGN ($p = 0,0230$), sowie zwischen den Gruppen „TGF β 1“ und „BGN“ ($p = 0,0098$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; TGF β 1: $0,392 \pm 0,084$; BGN: $1,214 \pm 0,252$; TGF β 1 + BGN: $0,478 \pm 0,087$)

Auch zwischen den in Abb. 102 D gezeigten Gruppen schwankt die *SPP1*-Expression in OVEC laut Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p < 0,0001$). Es bestehen signifikante Expressionsunterschiede zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGF β 1 ($p = 0,0070$), zwischen der Kontrolle und Stimulation mit TGF β 1 + HA ($p = 0,0025$), sowie zwischen den Gruppen „TGF β 1“ und „HA“ ($p = 0,0363$), „HA“ und „TGF β 1 + HA“ ($p = 0,0143$) sowie „VEGF + HA“ und „TGF β 1 + HA“ ($p = 0,0168$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; TGF β 1: $0,392 \pm 0,084$; HA: $1,483 \pm 0,457$; VEGF + HA: $0,960 \pm 0,126$; TGF β 1 + HA: $0,326 \pm 0,086$)

3.4.2.5.2 HVEC

Im Falle der HVEC wurde *SPP1* nicht in die Auswertung einbezogen, da dessen Expression sich nicht bei allen Versuchen bestimmen ließ. Bei den auswertbaren Versuchen zeigten sich zumeist sehr hohe C_T -Werte (> 35).

3.4.2.5.3 HUVEC

Die *SPP1*-Expression in HUVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 103 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0464$). Es besteht ein annähernd signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit VEGF ($p = 0,0688$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $0,328 \pm 0,187$)

Die *SPP1*-Expression in HUVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 103 B gezeigten Gruppen ($p = 0,0459$). Der Dunn's-Test ergab keine Signifikanzen bei paarweisem Vergleich der einzelnen Gruppen.

Zwischen den in Abb. 103 C gezeigten Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede der *SPP1*-Expression in HUVEC. Die Gruppe „TGF β 1 + BGN“ enthält nur 2 n, da in der 3. Probe auch bei mehrfacher Messung keine Expression von *SPP1* nachweisbar war.

In den in Abb. 103 D gezeigten Gruppen schwankt die *SPP1*-Expression in HUVEC laut Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p = 0,0251$). Es besteht ein annähernd signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Gruppen „HA“ und „TGF β 1 + HA“ ($p = 0,0687$). (HA: $1,139 \pm 0,155$; TGF β 1 + HA: $0,205 \pm 0,119$)

Trotz fehlender Signifikanz im Post-hoc-Test lässt sich beim Vergleich der MW der in Abb. 103 A-D gezeigten Gruppen die Tendenz erkennen, dass die Expression von *SPP1* in HUVEC sowohl bei alleiniger oder zusätzlicher Stimulation mit VEGF als auch – in noch etwas stärkerem Maße – bei alleiniger oder zusätzlicher Stimulation mit TGF β 1 abgesenkt ist. (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF $0,328 \pm 0,187$, TGF β 1: $0,396 \pm 0,125$; β -GP: $1,930 \pm 0,571$; VEGF+ β -GP: $0,855 \pm 0,262$; TGF β + β -GP: $0,474 \pm 0,170$; BGN: $0,960 \pm 0,315$;

VEGF ± BGN: $0,501 \pm 0,097$; TGFβ+BGN: $0,171 \pm 0,047$; HA: $1,139 \pm 0,155$; VEGF+HA: $0,433 \pm 0,095$; TGFβ+HA: $0,205 \pm 0,119$)

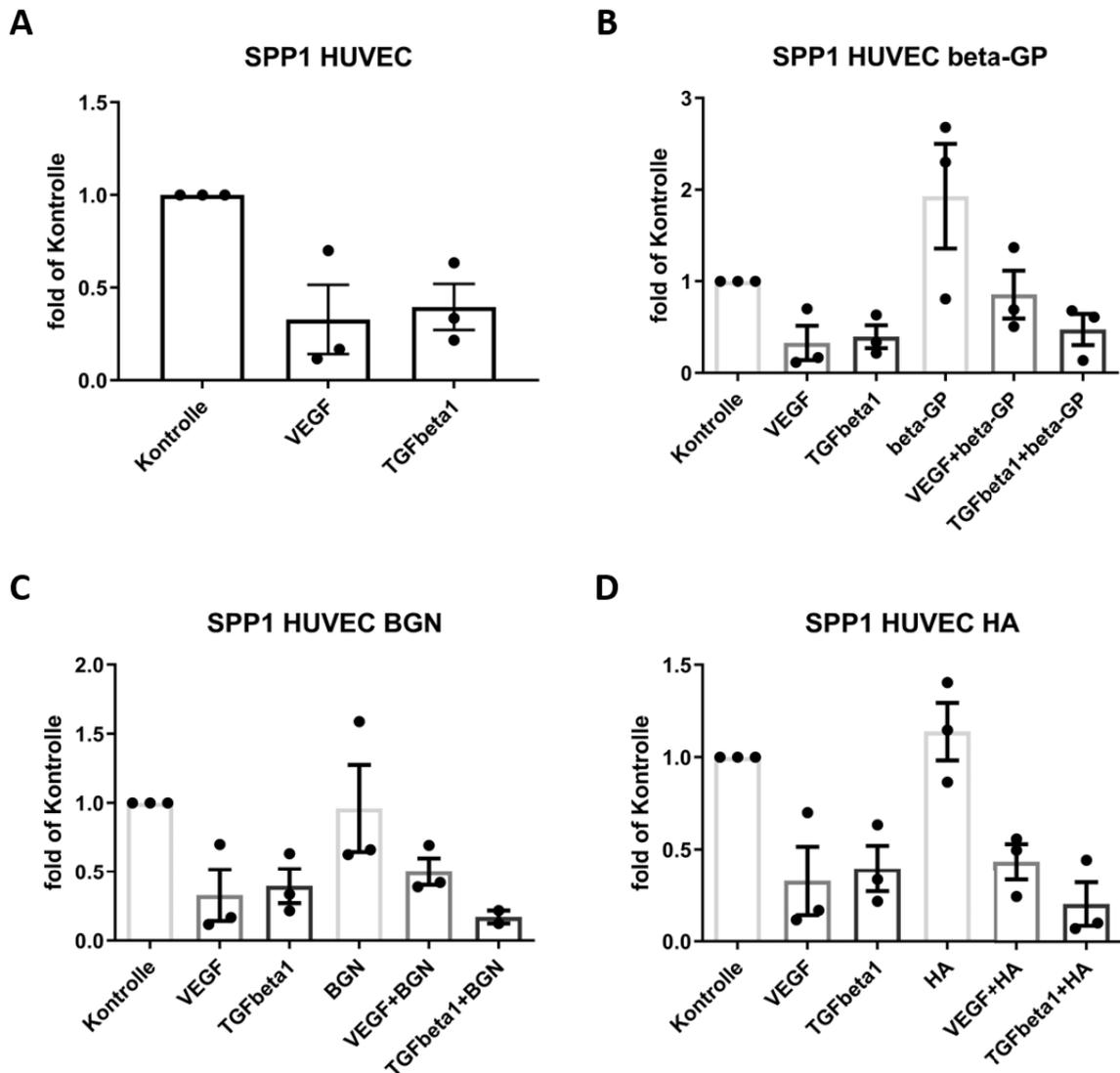


Abb. 103: SPP1-Expression in HUVEC

3.4.2.6 BGLAP

3.4.2.6.1 OVEC

Im Falle der OVEC wurde *BGLAP* nicht in die Auswertung einbezogen, da es sich nicht bei allen Versuchen bestimmen ließ. Bei den auswertbaren Versuchen zeigten sich durchweg sehr hohe C_t -Werte (meist ca. 34, z.T. auch über 36).

3.4.2.6.2 HVEC

In Abb. 104 A und B bestehen hinsichtlich der *BGLAP*-Expression in HVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

Zwischen den in Abb. 104 C gezeigten Gruppen schwankt die *BGLAP*-Expression in HVEC laut Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p = 0,0196$). Es bestehen signifikante Expressionsunterschiede zwischen der Kontrolle und Stimulation mit BGN ($p = 0,0401$) sowie zwischen der Kontrolle und Stimulation mit VEGF + BGN ($p = 0,0381$). Vergleicht man die Expression bei Stimulation mit VEGF und VEGF + BGN isoliert mittels Mann-Whitney-Test ergibt sich auch hier ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0400$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $1,122 \pm 0,097$; BGN: $1,474 \pm 0,123$; VEGF + BGN: $1,486 \pm 0,123$)

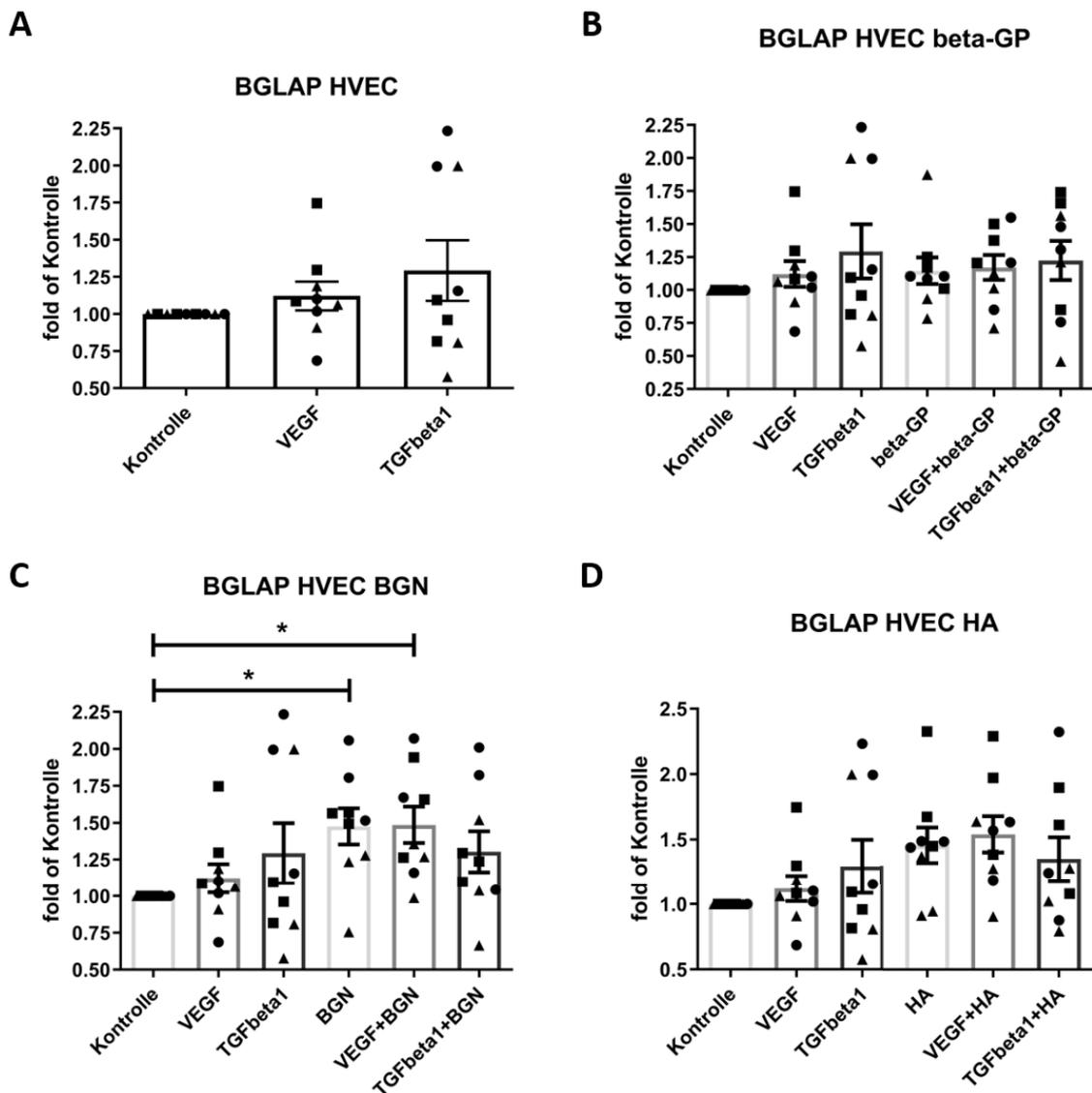


Abb. 104: BGLAP-Expression in HVEC

Laut dem Kruskal-Wallis-Test schwankt die *BGLAP*-Expression in HVEC zwischen den in Abb. 104 D gezeigten Bedingungen nur annähernd signifikant ($p = 0,0645$). Der Vergleich der MW lässt jedoch die Tendenz erkennen, dass *BGLAP* bei Stimulation mit HA höher exprimiert ist als in der Kontrolle (Kontrolle: 1 ± 0 ; HA: $1,451 \pm 0,137$). Tatsächlich zeigt sich bei Durchführung des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests, dass der Median der Ergebnisse bei Stimulation mit HA signifikant von 1 verschieden ist ($p = 0,0195$). Im 95%-Konfidenzintervall

des HA-MW ist 1 nicht enthalten ($KI_{HA} = [1,134; 1,768]$). Auch bei isoliertem Vergleich der Expression bei Stimulation mit VEGF und bei Stimulation mit VEGF + HA mittels Mann-Whitney-Test ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0400$). (VEGF: $1,122 \pm 0,097$; VEGF + HA: $1,535 \pm 0,139$)

3.4.2.6.3 HUVEC

Die *BGLAP*-Expression in HUVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 105 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0464$). Es besteht ein annähernd signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit $TGF\beta_1$ ($p = 0,0688$). (Kontrolle: 1 ± 0 ; $TGF\beta_1$: $1,727 \pm 0,254$)

In Abb. 105 B-D bestehen hinsichtlich der *BGLAP*-Expression in HUVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

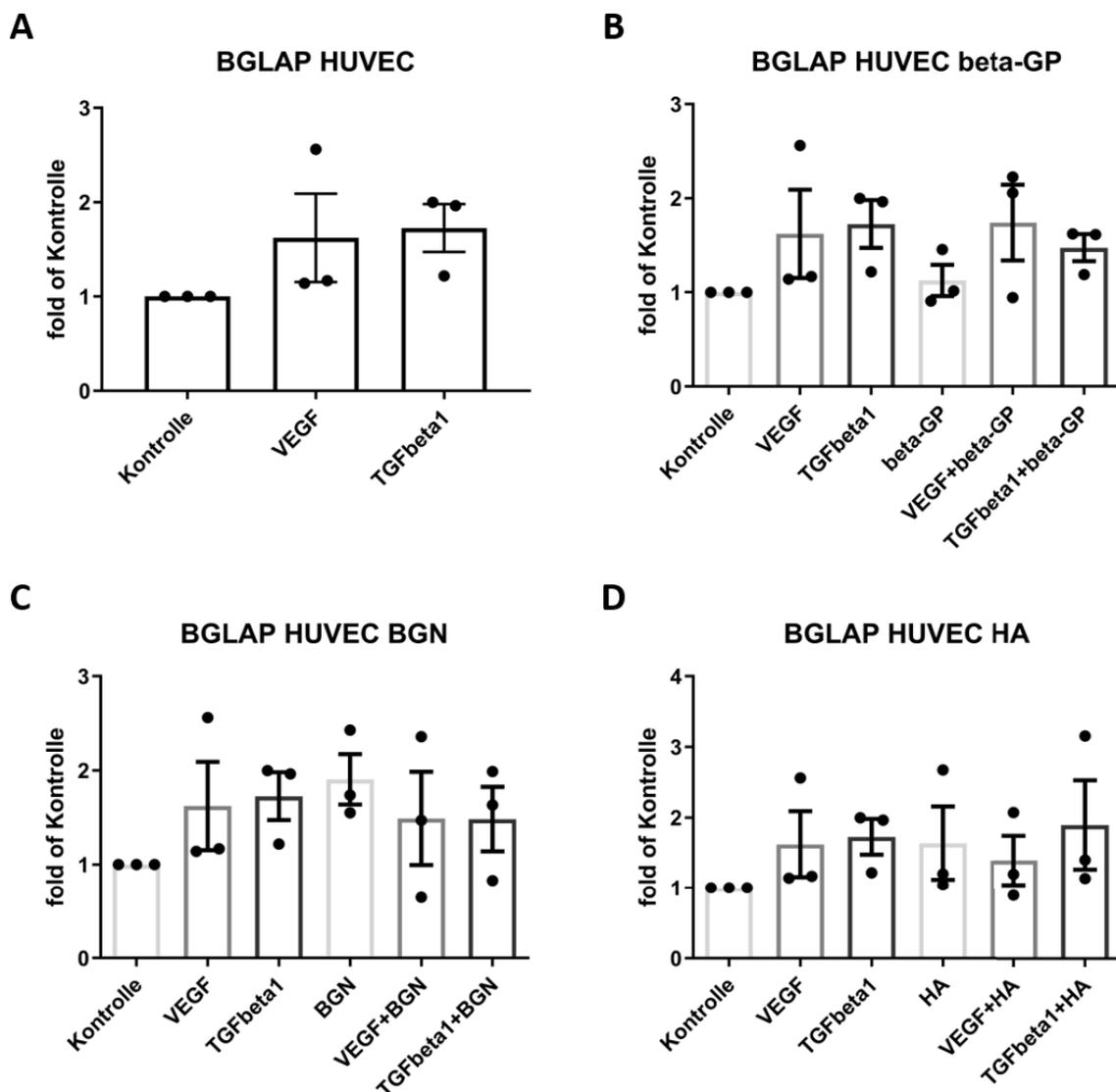


Abb. 105: *BGLAP*-Expression in HUVEC

3.5 Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse, geordnet nach Zelltyp

Untersucht wurde die Expression von α -SMA und CD31 auf Proteinebene. Es wurden jeweils 12 Ergebnis-Gruppen miteinander verglichen, die unterschiedlichen Versuchsbedingungen entsprachen.

3.5.1 OVEC

Exemplarisch sind in Abb. 106 die Western-Blot-Ergebnisse vom zweiten Versuchsdurchlauf mit den Zellen von Schaf 3 dargestellt.

Zu erkennen ist eine konstante Expression des Referenzproteins.

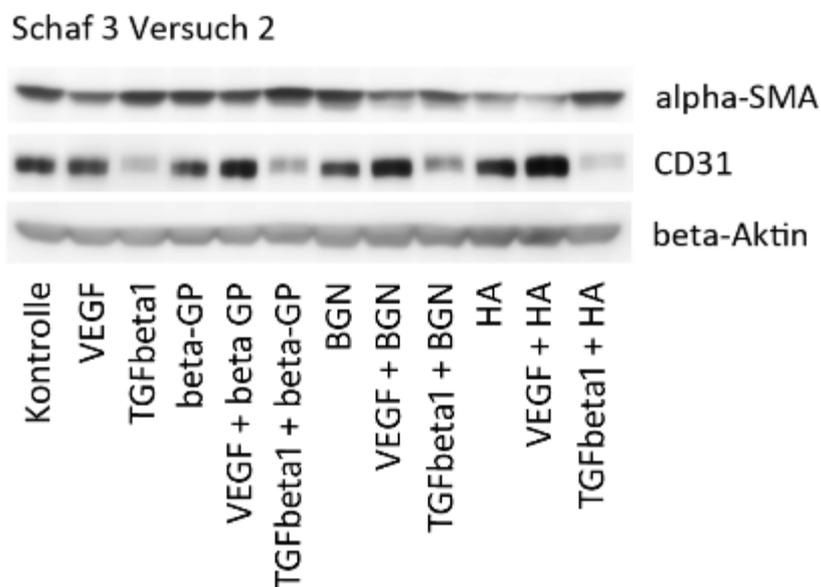


Abb. 106: Proteinexpression in OVEC

3.5.1.1 α -SMA

In Abb. 107 bestehen hinsichtlich der α -SMA-Expression in OVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

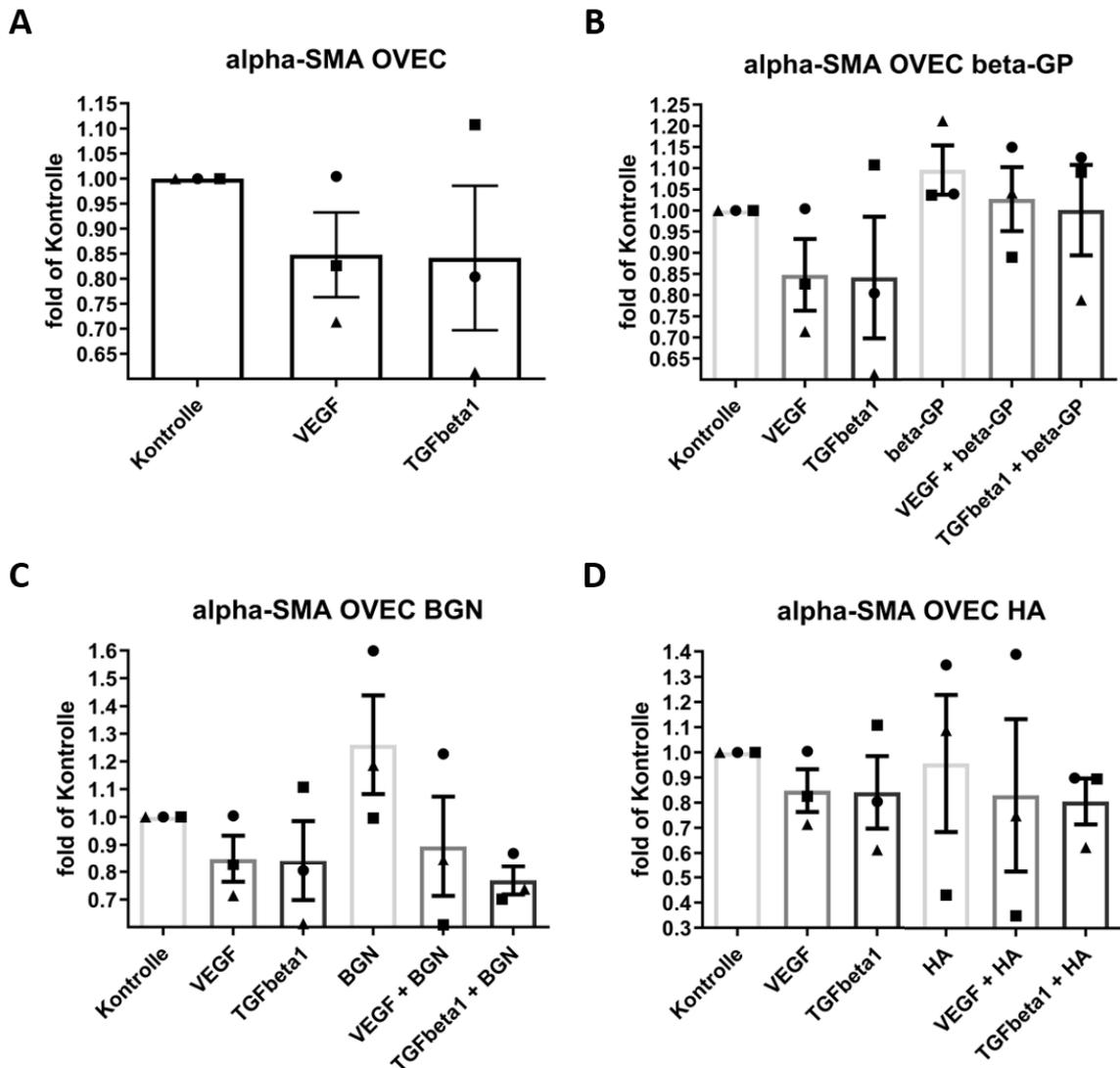


Abb. 107: α -SMA-Expression in OVEC

3.5.1.2 CD31

In Abb. 108 A-C bestehen hinsichtlich der CD31-Expression in OVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

in Abb. 108 D schwankt die CD31-Expression in OVEC laut Kruskal-Wallis-Test annähernd signifikant zwischen den gezeigten Gruppen ($p = 0,0521$).

In allen Teilabbildungen der Abb. 108 lässt sich anhand der MW bei fehlender Signifikanz die Tendenz erkennen, dass die Expression von CD31 in OVEC bei alleiniger oder zusätzlicher Stimulation mit VEGF erhöht und bei alleiniger oder zusätzlicher Stimulation mit TGF β 1 abgesenkt ist. (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF: $1,257 \pm 0,158$; TGF β : $0,777 \pm 0,192$; β -GP: $0,857 \pm 0,188$; VEGF+ β -GP: $1,287 \pm 0,205$; TGF β + β -GP: $0,55 \pm 0,216$; BGN: $0,89 \pm 0,243$; VEGF+BGN: $1,31 \pm 0,347$; TGF β +BGN: $0,59 \pm 0,182$; HA: $1,01 \pm 0,18$; VEGF+HA: $1,463 \pm 0,317$; TGF β +HA: $0,527 \pm 0,135$)

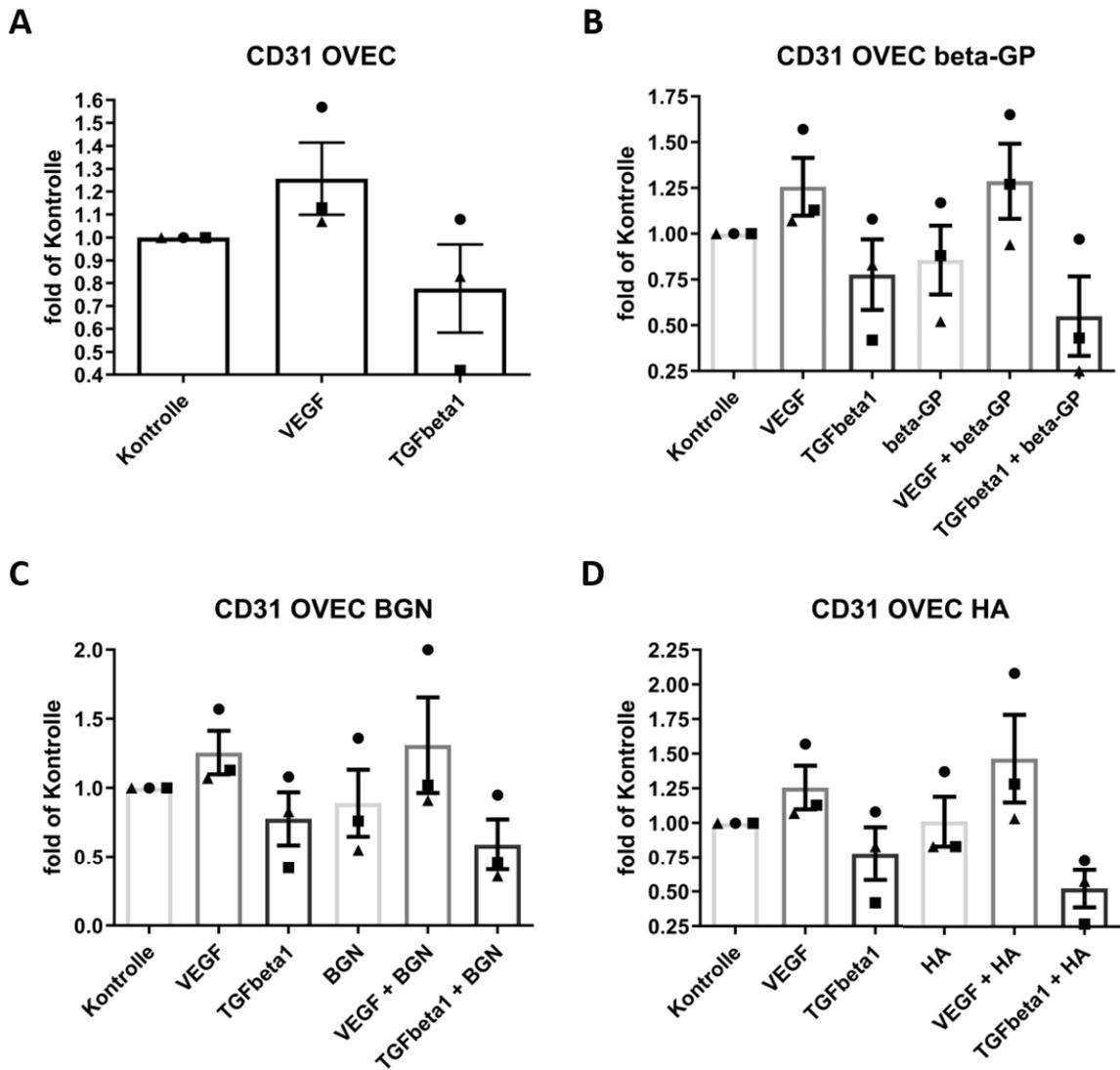


Abb. 108: CD31-Expression in OVEC

3.5.2 HVEC

In Abb. 109 sind die Western-Blot-Ergebnisse vom ersten Versuchsdurchlauf mit den Zellen von Patient 2 dargestellt.

Auch hier zeigt das Referenzprotein keine Schwankungen.

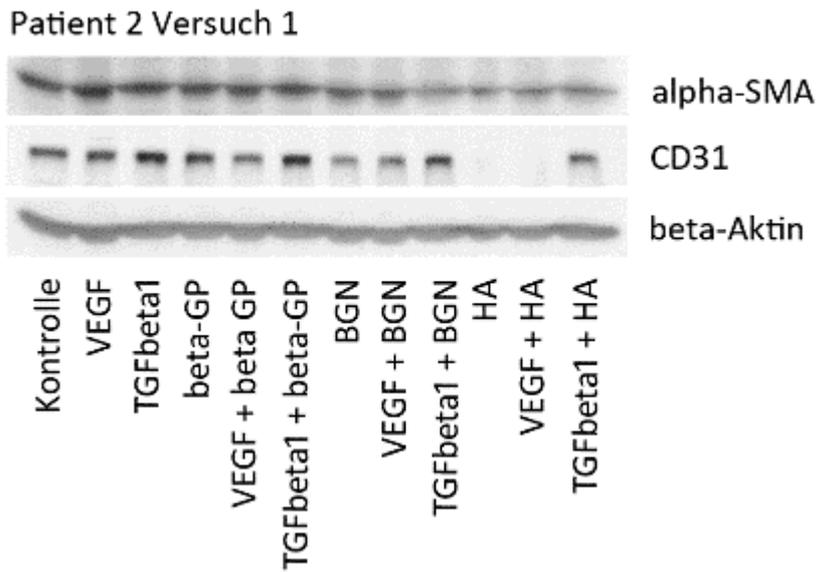


Abb. 109: Proteinexpression in HVEC

3.5.2.1 α -SMA

In Abb. 110 A, C und D bestehen hinsichtlich der α -SMA-Expression in HVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

In Abb. 110 B schwankt die α -SMA-Expression in HVEC laut Kruskal-Wallis-Test annähernd signifikant zwischen den gezeigten Gruppen ($p = 0,0581$).

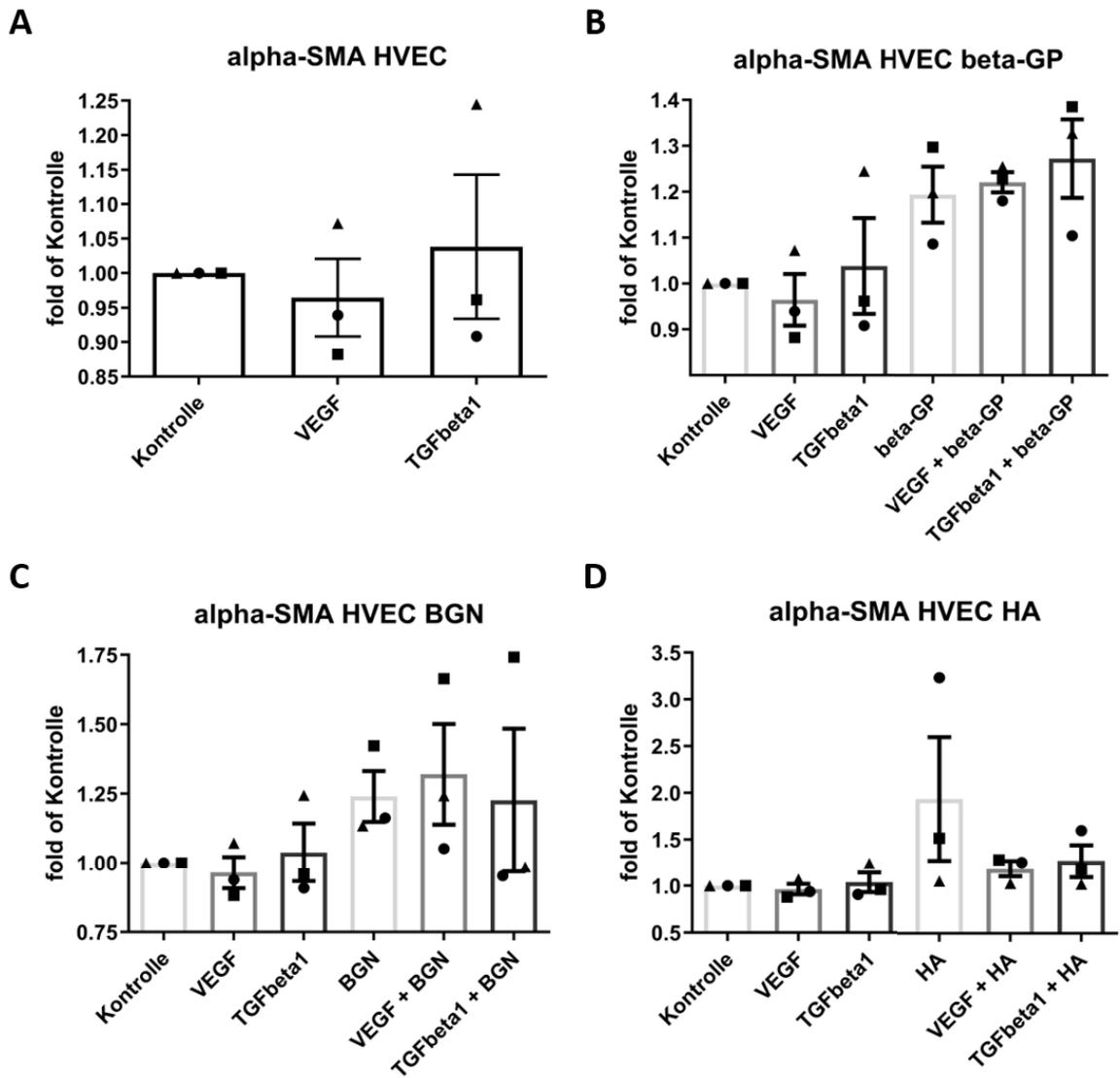


Abb. 110: α -SMA-Expression in HVEC

3.5.2.2 CD31

In Abb. 111 A-D bestehen hinsichtlich der CD31-Expression in HVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen.

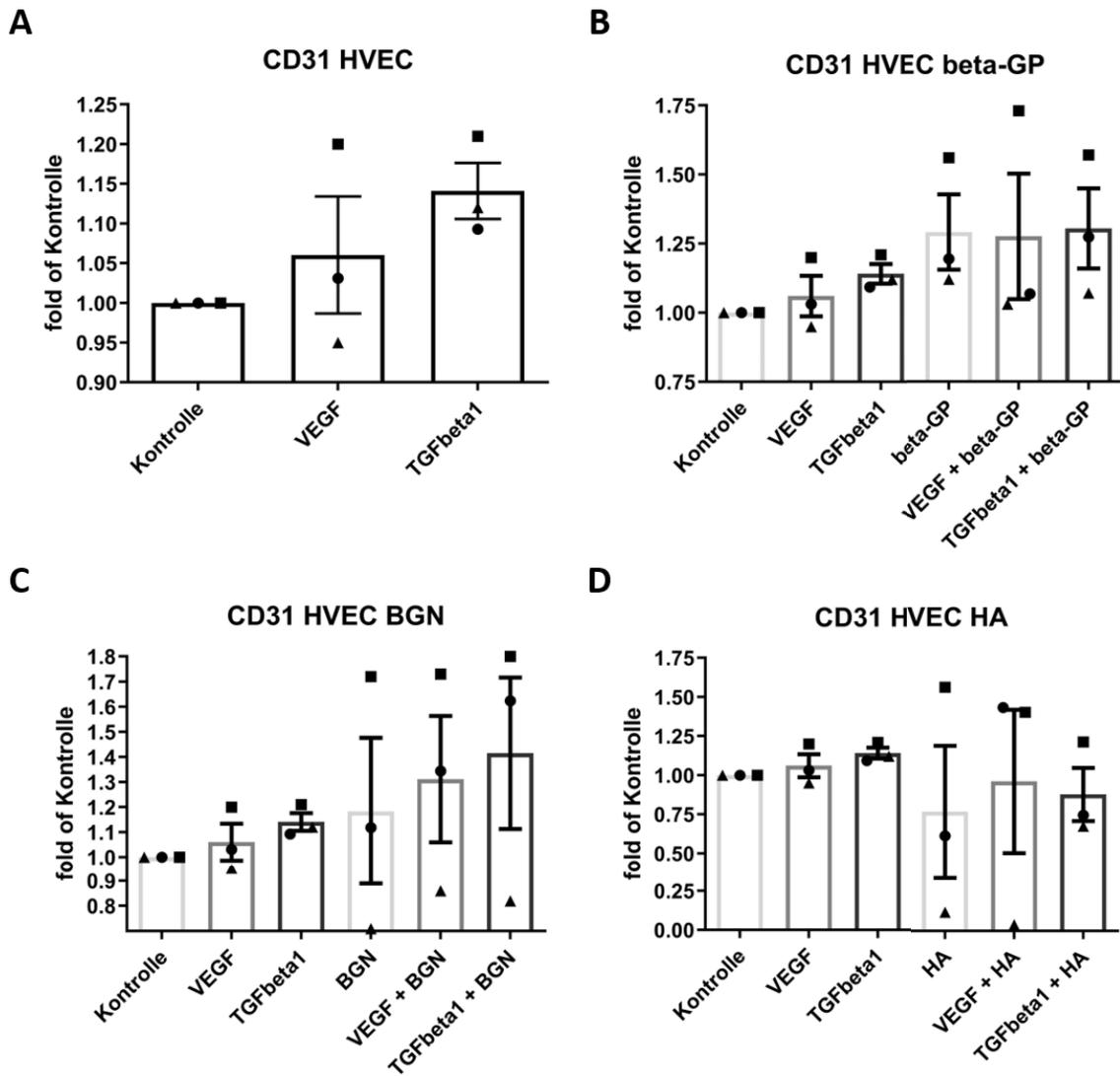


Abb. 111: CD31-Expression in HVEC

3.5.3 HUVEC

Exemplarisch sind in Abb. 112 die Western-Blot-Ergebnisse vom zweiten Versuchsdurchlauf mit den HUVEC dargestellt.

Das Referenzprotein zeigt eine konstante Expression.

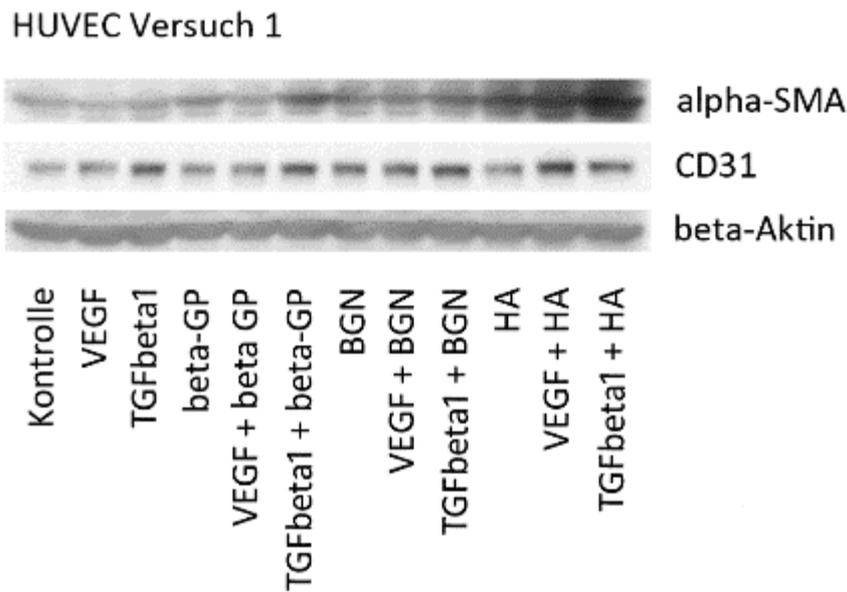


Abb. 112: Proteinexpression in HUVEC

3.5.3.1 α -SMA

In Abb. 113 A, B und C bestehen hinsichtlich der α -SMA-Expression in HUVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen

Hingegen schwankt die α -SMA-Expression in HUVEC laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 113 D gezeigten Gruppen ($p = 0,0227$). Wenngleich der Dunn's-Test keine Signifikanzen beim Vergleich der einzelnen Bedingungen ergab, lässt sich anhand der MW eine Tendenz zur Expressionserhöhung von α -SMA bei Stimulation mit HA \pm VEGF bzw. TGF β 1 im Vergleich zur Kontrolle erkennen (Kontrolle: 1 ± 0 ; HA: $1,364 \pm 0,079$; VEGF + HA: $1,684 \pm 0,080$; TGF β 1 + HA: $1,757 \pm 0,088$). Dies spiegelt sich auch in den jeweiligen 95%-Konfidenzintervallen wider, welche den Kontrollwert 1 nicht enthalten ($KI_{HA} = [1,023; 1,705]$ $KI_{VEGF + HA} = [1,338; 2,029]$; $KI_{TGF\beta 1 + HA} = [1,378; 2,136]$).

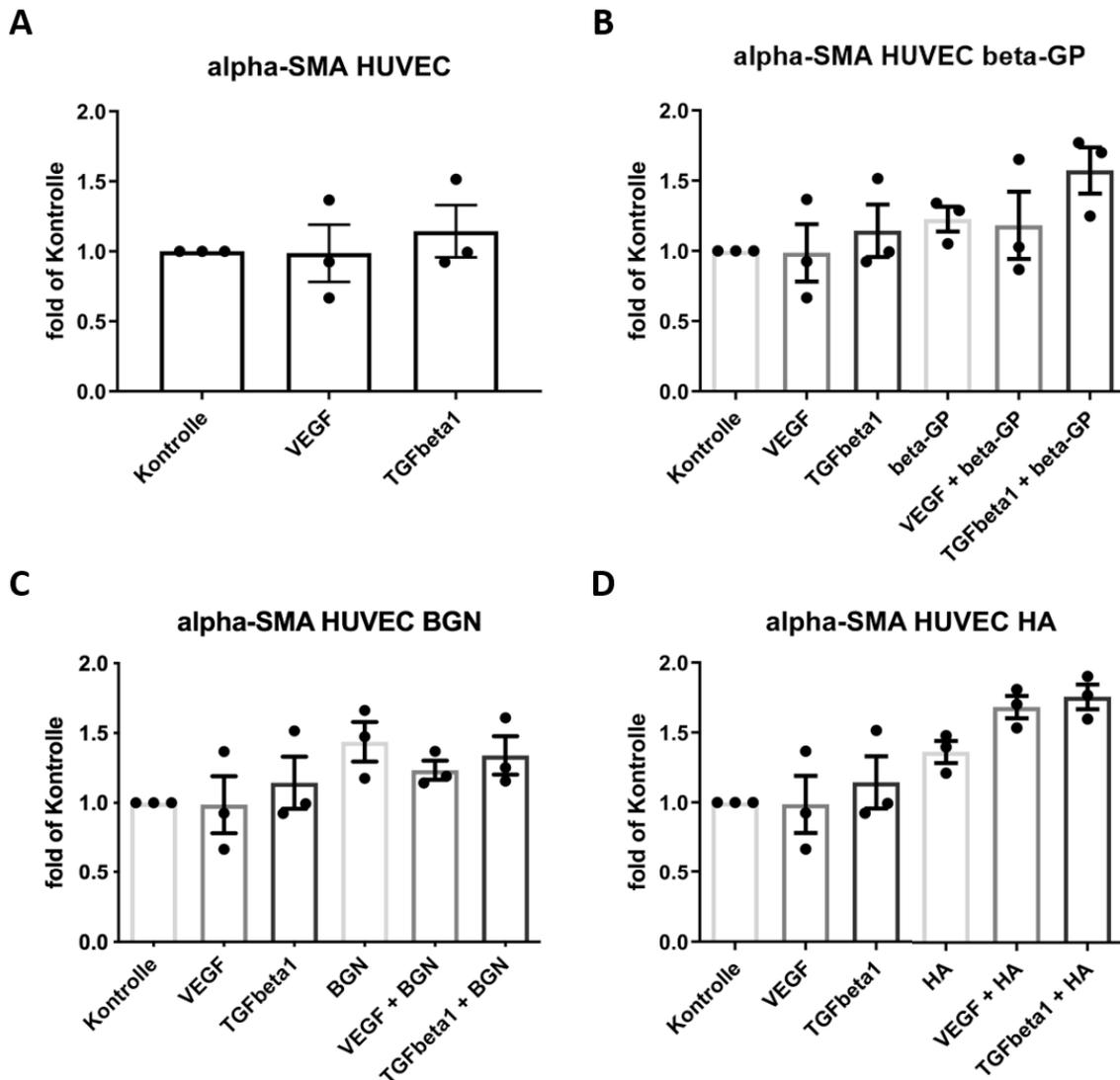


Abb. 113: α -SMA-Expression in HUVEC

3.5.3.2 CD31

Die CD31-Expression in HUVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 114 A gezeigten Gruppen ($p = 0,0464$). Das 95%-Konfidenzintervall der Gruppe „VEGF“ enthält den Kontrollwert 1 nicht, was auf eine Expressionserhöhung von CD31 bei Stimulation mit VEGF hindeutet ($KI_{VEGF} = [1,112; 1,535]$).

In Abb. 114 B und C bestehen laut Kruskal-Wallis-Test hinsichtlich der CD31-Expression in HUVEC keine signifikanten Unterschiede zwischen den gezeigten Bedingungen. Bei fehlender Signifikanz lässt sich anhand der MW eine Tendenz zur Expressionserhöhung von CD31 bei Stimulation mit BGN im Vergleich zur Kontrolle erkennen (Kontrolle: 1 ± 0 ; BGN: $1,48 \pm 0,101$). Dies wird dadurch unterstrichen, dass in dem 95%-Konfidenzintervall von BGN die 1 nicht enthalten ist ($KI_{BGN} = [1,047; 1,913]$).

Die CD31-Expression in HUVEC schwankt laut Kruskal-Wallis-Test signifikant zwischen den in Abb. 114 D gezeigten Gruppen ($p = 0,0431$). Es besteht ein signifikanter

Expressionsunterschied zwischen der Kontrollbedingung und Stimulation mit VEGF + HA
 ($p = 0,0325$) (Kontrolle: 1 ± 0 ; VEGF + HA: $1,597 \pm 0,114$).

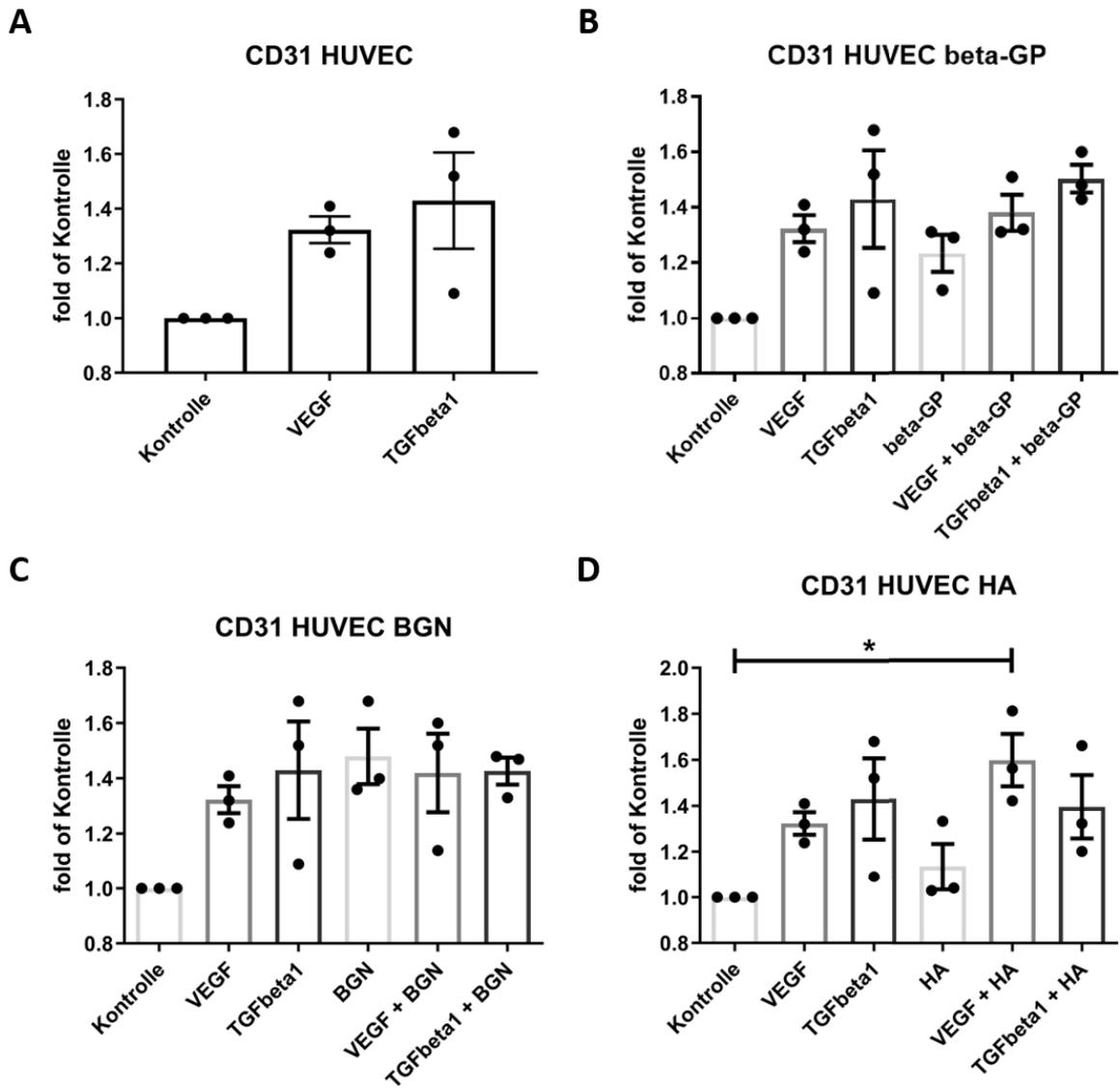


Abb. 114: CD31-Expression in HUVEC

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Methodenetablierung: Isolation von EC aus ovinen Klappen

4.1.1.1 Transportart

Der ausbleibende Isolationserfolg bei Transport der Herzen in einer Kühltasche lässt sich auf mehrere Arten erklären. Zum einen lässt sich vermuten, dass die Kühlung auf diese Weise nicht suffizient genug war, um den Stoffwechsel der empfindlichen EC so weit zu senken, dass sie die Zeit bis zur Isolation überstehen konnten. Zudem wurde das Herz bei diesem Vorgehen nicht gespült und war somit voller Blutkoagel. In einer solchen Umgebung neigen verschiedenste Zelltypen verstärkt dazu, abzusterben [82]. Bei Transport der Herzen in eisgekühlter Jonosteril-Infusionslösung fand dagegen automatisch ein Durchspülen der Herzen statt. Darüber hinaus scheint auch die Kühlung suffizient gewesen zu sein, da die Isolation der EC erfolgreich war. Allerdings fanden sich bei dieser Methode in den ersten Tagen der Kultivierung mehr tote Zellen als bei der dritten Variante, dem Transport der vor Ort herausgeschnittenen Klappen in eisgekühltem EC-Medium. Dies mag daran liegen, dass die Nährstoffversorgung der zu isolierenden EC während des Transportes in EC-Medium besser gewesen sein könnte als in Jonosteril-Infusionslösung.

4.1.1.2 Verarbeitung der präparierten Klappensegel im Labor

Wie im Methodenteil geschildert, entsprach die Vorgehensweise, die Klappensegel vor der Inkubation in Collagenase A zu zerschneiden, der von Paranya et al. geschilderten [52]. Da bis zu Beginn der Versuche für die vorliegende Arbeit laborintern keinerlei Erfahrungen hinsichtlich der Isolation von EC aus Herzklappen vorhanden waren, wurde das Vorgehen von Paranya et al. als Richtschnur gewählt. Hinter der Variante, die Klappensegel ohne Behandlung mit Collagenase A auszusäen, stand die Idee, zu testen, ob die EC bei diesem Vorgehen selbstständig aus den Klappen auswachsen würden. Wie im Ergebnisteil beschrieben, kam es bei beiden genannten Methoden zu Verunreinigungen mit Fibroblasten, nicht jedoch bei Inkubation intakter Klappensegel in Collagenase A. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei letzterem Vorgehen weniger Schnittflächen vorhanden sind, an welchen das Klappeninterstitium mit der Collagenase sowie mit der Kultivierungsfläche in Kontakt kommt. Somit ist bei dieser Methode die Wahrscheinlichkeit, dass VIC aus dem Inneren der Klappe herausgelöst werden bzw. daraus hervorzunehmen, geringer als bei den anderen beiden.

4.1.1.3 Serumgehalt des Mediums

Dem besseren Wachstum der EC bei aufgestocktem Serumgehalt des Nährmediums liegt wahrscheinlich eine bessere Nährstoffversorgung zugrunde. Gegenüber dem handelsüblichen Medium mit 2 % FCS bietet das aufgestockte Medium mit 10 % FCS insgesamt physiologischere Bedingungen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten hat sich in der Literatur der Konsensus herausgebildet, dass EndoMT im Rahmen verschiedener fibrosierender Erkrankungen eine bedeutsame pathogenetische Rolle spielt. So existieren unter anderem eindrucksvolle Hinweise auf eine Beteiligung von EndoMT an kardialer Fibrosierung [51]. Bislang blieb jedoch ungeklärt, inwieweit sich die gewonnenen Erkenntnisse speziell auf Erkrankungen der Aortenklappe übertragen lassen.

4.2.1 Molekularbiologische Analyse von Patientenmaterial

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte molekularbiologische Analyse makroskopisch unveränderter wie auch degenerierter Aortenklappen vermag Zweifel an jener Übertragbarkeit zu wecken. So wäre es unter der Prämisse, dass EndoMT in die Pathogenese valvulärer Fibrosierung und Kalzifikation eingebunden ist, primär zu erwarten, dass Gene, welche im Rahmen von EndoMT aktiv sind, in den makroskopisch degenerierten Klappen signifikant höher exprimiert werden als in den unveränderten. Dies ist jedoch nicht der Fall, im Gegenteil: Die degenerierten Klappen zeigen eine mehrheitlich signifikant geringere Expression von *Snai1*, *Snai2*, *Twist1* und *Smad2* als die unveränderten Klappen. Dabei liegen die Genexpressionslevel der fibrotischen Klappen zwischen denen der unveränderten und der kalzifizierten Klappen. Es besteht eine inverse Korrelation zur Expression der Kalzifizierungsmarker Osteopontin und Osteocalcin, deren Level erwartungsgemäß positiv mit dem Grad der makroskopischen valvulären Verkalkung korrelierten. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivierung EndoMT-spezifischer Gene mit zunehmendem Schädigungsgrad der Klappen abnimmt. Dieses Erkenntnis widerspricht der zuvor entwickelten Hypothese diametral.

Bei unvoreingenommener Betrachtungsweise lässt sich an dieser Stelle postulieren, EndoMT habe möglicherweise einen protektiven Effekt auf die valvuläre Homöostase und zeige deswegen in den unveränderten Klappen eine höhere Aktivität als in den degenerierten. Passend hierzu stellten Dahal et al. 2017 die Überlegung an, EndoMT könnte in frühen Stadien valvulärer Degeneration helfen, das Klappeninterstitium zu regenerieren und zu reparieren [68]. Paranya et al. äußerten bereits 2001 den interessanten Gedanken, dass Klappen-EC mit der Fähigkeit zu EndoMT möglicherweise eine spezielle Art von Vorläuferzellen darstellen. Die Autoren vermuteten, dass diese zur Erneuerung der valvulären Interstitialzellen und damit zur Aufrechterhaltung der Klappenarchitektur benötigt würden [52]. Doch warum sollte die eigene Proliferationskapazität der Interstitialzellen dafür nicht ausreichen? Hier lässt sich lediglich spekulieren: Kann es sein, dass dies an der besonderen Architektur der Klappensegel liegt? So besitzen die valvulären Interstitialzellen schließlich keine eigene Blutversorgung und werden durch Diffusion ernährt, während die außen liegenden EC ständig von Blut umspült werden [9]. Möglicherweise resultiert dies in einer gegenüber den Interstitialzellen größeren Proliferationskapazität der EC. Führt man diesen Gedanken nun weiter und stellt sich vor, der Nachschub an valvulären Interstitialzellen via EndoMT würde blockiert, erscheint es plausibel, dass die Klappenarchitektur durch eine dann desorganisierte Proliferation Schaden nimmt. So könnte es durch den Mangel an frischen Zellen zu einer verstärkten Ausschüttung von

Wachstumsfaktoren durch die Interstitialzellen mit konsekutiv überschießender Bindegewebsvermehrung kommen. Die Einsprossung von Gefäßen in die Klappensegel, welche bei der Progression von Aortenklappenstenosen eine kritische Rolle spielt [9], wäre initial möglicherweise Folge des erhöhten Proliferationsdruckes der Interstitialzellen mit hierdurch unphysiologisch hohem Sauerstoffbedarf. Logisch erklärbar ist, dass Sauerstoffmangel und Angiogenese mit zunehmender Entwicklung der Klappenfibrose durch die aufgrund der Bindegewebsvermehrung verbreiterte Diffusionsbarriere aggraviert werden und somit eine Art Teufelskreis entsteht [83].

Der im vorhergehenden Absatz entwickelten Hypothese, EndoMT wirke protektiv auf die valvuläre Homöostase, soll in der Folge die entgegengesetzte Annahme einer profibrotischen Wirkung von EndoMT auf Herzklappen gegenübergestellt werden.

Wie bereits geschildert, finden sich in der Literatur breit gefächerte Belege für eine Beteiligung von EndoMT an der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen. Insofern liegt die Vermutung, EndoMT trage ebenfalls zur verstärkten Bindegewebsbildung im Rahmen von Aortenklappenfibrose und -kalzifizierung bei, sehr nahe. Im Folgenden sollen daher Gründe erörtert werden, welche jene Annahme mit den obig geschilderten Ergebnissen der molekularbiologischen Herzklappenanalyse vereinen.

Woran könnte es also liegen, dass trotz profibrotischer Wirkung von EndoMT die hierfür spezifischen Gene in den makroskopisch degenerierten Klappen signifikant niedriger exprimiert werden als in den unveränderten? Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass die makroskopisch unveränderten Klappen aus erkrankten Herzen stammen, welche mittels Herztransplantation ersetzt werden mussten. Somit sollte die Bewertung der makroskopisch unveränderten Klappen als tatsächlich gesund kritisch hinterfragt werden. Denkbar ist, dass durch die beeinträchtigte Hämodynamik sowie molekularbiologische Prozesse im erkrankten Myokard auch Veränderungen im Bereich der Herzklappen angestoßen wurden. Eventuell könnten so auch die genannten EndoMT-Marker in diesen höher exprimiert sein, als sie es in Klappengewebe vollkommen herzgesunder Patienten wären. Ein möglicher ursächlicher Mechanismus hierfür wäre beispielsweise eine verstärkte myokardiale Expression des kardioprotektiv wirkenden Steuerungsmoleküls ErbB2, welches über NRG1 sowie den AKT-Signalweg EndoMT hochzuregulieren vermag [42]. Auch wenn anzunehmen wäre, dass in diesem Fall nicht primär die Herzklappen sondern das die Herzhöhlen auskleidende Endokard von jener Signalinduktion mitbetroffen wäre, könnte schließlich das Endothel der Klappenbasis in selbigen Prozess einbezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich also vermuten, dass aufgrund der Vorerkrankungen der Patienten aus der Gruppe der makroskopisch unveränderten Aortenklappen die Expression der EndoMT-spezifischen Gene in ihren Aortenklappen in Wahrheit zu hoch ist, um für gesundes Klappengewebe repräsentativ zu sein. Insofern wäre damit der Vergleich zur EndoMT-Aktivität in den fibrosierten und erkrankten Klappen verzerrt. Diese mögliche Verzerrung lässt sich leider bei der Untersuchung humaner Aortenklappen nur schwer vermeiden, da es kaum einen praktikablen Weg gibt, gesunde Herzklappen vollkommen herzgesunder Patienten zu akquirieren. Dies wäre nur durch Gewinnung von Klappen hirntoter Patienten oder alternativ im Tierversuchsmodell möglich, wobei in letzterem Fall für

einen äquivalenten Gruppenvergleich eine Methode gefunden werden müsste, Aortenklappenfibrose und -kalzifizierung künstlich zu erzeugen.

Festzuhalten ist, dass die Argumentation der letzten beiden Absätze zwar Zweifel an der Repräsentativität der unveränderten Aortenklappen als Gesundheitsgruppe zu erwecken vermag, jedoch nicht erklären kann, warum mit zunehmendem Schädigungsgrad die Expression der EndoMT-Marker immer geringer wird. Auch wenn sich außer bei dem Vergleich der *Twist1*-Expression die Werte zwischen den fibrosierten und den kalzifizierten Klappen nicht signifikant unterscheiden, ist doch diese Tendenz anhand der MW erkennbar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass mit zunehmendem Schädigungsgrad immer weniger intaktes Endothel mit der Fähigkeit, EndoMT durchlaufen zu können, vorhanden ist. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Annahme, dass der Körper bei zunehmender Schädigung der Klappen den potenziell profibrotischen Prozess EndoMT kompensatorisch herunterreguliert. Dies wiederum spräche jedoch tendenziell gegen eine maßgebliche Beteiligung von EndoMT an jenen degenerativen Prozessen.

4.2.2 Zellkultur-Stimulationsversuche

4.2.2.1 Morphologische Veränderungen

4.2.2.1.1 OVEC

Das sternförmig bzw. knotenartig imponierende Wachstumsmuster, welches die OVEC bei Stimulation mit TGF β 1 ausbildeten, erweckt bei Betrachtung den Eindruck, als würde hier anstelle des für EC typischen Kopfsteinpflaster-Wachstumsmusters eine gitternetzartige und möglicherweise dreidimensionale Struktur ausgebildet (Siehe bspw. Abb. 23 und Abb. 30 auf S. 46 f.). Prinzipiell spricht dies für eine Änderung des Phänotyps. Gemeinsam mit der anhand der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [52, 53, 58] entwickelten Annahme, TGF β 1 wirke auf Klappenendothelien EndoMT-induzierend, lässt sich das beschriebene Bild als morphologisches Korrelat von EndoMT bzw. einer Übergangsform der EC hin zu mesenchymalen Zellen interpretieren. Dazu passt grundsätzlich, dass es die Aufgabe mesenchymaler Zellen ist, im Gegensatz zu EC dreidimensionale Gefüge auszubilden und innerhalb dieser für Stabilität zu sorgen, wofür eine Gitternetzstruktur besonders geeignet scheint [84]. Diskutieren lässt sich, dass sich die postulierte dreidimensionale Wachstumskomponente anhand der aufgenommenen Durchlichtmikroskop-Bilder nicht beweisen lässt, da hierdurch lediglich zwei Dimensionen abgebildet werden. In diesem Zusammenhang ist die Durchführung weiterer Versuche zu erwägen. Beispielsweise könnte man die Stimulationsversuche bei Kultivierung der EC auf der Oberfläche einer dreidimensionalen Matrix wiederholen. Eine mögliche Fragestellung wäre dabei, ob es unter Stimulation mit TGF β 1 zu einem Einwachsen der EC in jene Matrix unter Ausbildung einer geordneten dreidimensionalen Struktur kommt. Interessant wäre dies insbesondere im Zusammenhang mit der in Abschnitt 4.2.1 erörterten These, Klappen-EC mit der Fähigkeit zu EndoMT seien möglicherweise wichtig für die Aufrechterhaltung der Klappenarchitektur. Verfolgt man die Argumentation aus Abschnitt 4.2.1 weiter und nimmt entsprechend den Ausführungen in dessen ersten beiden Absätzen an, EndoMT wirke protektiv auf die valvuläre Homöostase, könnte man die Verstärkung der beschriebenen morphologischen

Veränderungen bei simultaner Stimulation mit TGF β 1 und β -GP dahingehend interpretieren, dass EndoMT unter kalzifizierenden Umgebungsbedingungen protektiv hochreguliert wird.

Denkbar ist jedoch auch, dass es sich bei den gezeigten morphologischen Veränderungen um die beginnende Bildung kalzifizierender Knötchen handelt. Schließlich ist bekannt, dass bei Stimulation von VIC mit TGF β 1 + β -GP eine derartige Knötchenbildung ausgelöst wird [85]. Auch wenn jener Prozess für EC bislang nicht beschrieben wurde, drängt sich die Analogie bei Betrachtung der morphologischen Veränderungen auf. Für mögliche Folgeversuche böte sich daher nach äquivalenter Stimulation von Klappen-EC die Färbung der Zellpopulation mit Alizarin Red S zur Calciumdetektion an.

Die beobachtete Erhöhung der Zelldichte bei Stimulation mit VEGF lässt sich dadurch erklären, dass VEGF bekanntermaßen die Proliferation von EC steigert und ihre Apoptose hemmt [47]. Die teils beobachtete Tendenz zur weiteren Erhöhung der Zelldichte bei simultaner Stimulation mit VEGF und HA lässt sich zum einen durch die publizierte proliferationsfördernde Wirkung von HA erklären [70]. Zum anderen sind synergistische Wechselwirkungen zwischen VEGF und HA aus Forschungsarbeiten zum Thema Angiogenese bekannt [86].

Die darüber hinaus beobachteten Veränderungen im Wachstumsmuster bei verschiedenen Bedingungen erscheinen bei Vergleich der Versuchsdurchläufe zu inkonsistent, um ihnen eine wesentliche Bedeutung beizumessen.

4.2.2.1.2 HVEC

Die humanen HVEC zeigten unter Stimulation kaum morphologische Veränderungen. Einzig auffällig ist die Veränderung im Wachstumsmuster der Zellen von Patient 1 in Reaktion auf die Stimulation mit TGF β 1. Hier stellt sich wie schon bei den OVEC die Frage, ob es sich dabei um ein morphologisches Korrelat von EndoMT bzw. einer Übergangsform der EC hin zu mesenchymalen Zellen handelt.

4.2.2.1.3 HUVEC

Die HUVEC zeigten in Reaktion auf die Stimulation keine auffallenden Veränderungen ihrer Morphologie. Ein Erklärungsansatz hierfür wird im folgenden Absatz entwickelt.

4.2.2.1.4 Vergleich der verschiedenen Zelltypen

Die OVEC zeigten unter Stimulation deutlich ausgeprägtere morphologische Veränderungen als die HVEC und HUVEC.

Greift man zurück auf die in Abschnitt 4.2.1 entwickelte Theorie zum möglichen Zusammenhang zwischen EndoMT und valvulärer Homöostase, könnte spekuliert werden, dass Klappen-EC evtl. eine höhere Bereitschaft aufweisen, EndoMT zu durchlaufen als andere EC. Dies stellt einen Erklärungsansatz für die Diskrepanz im Ausmaß der Veränderungen zwischen den Zelltypen dar.

Bezüglich der zwei Zelltypen betreffenden morphologischen Veränderungen in Reaktion auf die Stimulation mit TGF β 1 ist folgende Beobachtung interessant: Zwar bildeten sowohl die

OVEC als auch die HVEC von Patient 1 spezifische Veränderungen im Wachstumsmuster aus, diese waren jedoch zwischen den Zelltypen verschieden: Sternförmig bzw. knotenartig bei den OVEC vs. wirbelartig bei den HVEC von Patient 1. Insgesamt ähnelt von beiden genannten letzteres Wachstumsmuster eher der Morphologie einer Fibroblastenkultur *in vitro* (s. insbes. S. 51, Abb. 47: EC8 Versuch2 TGF β_1). Insofern muss darüber nachgedacht werden, ob die beschriebenen morphologischen Veränderungen beide denselben Prozess repräsentieren. Vorstellbar ist, dass das zur Stimulation verwendete humane rekombinante TGF β_1 in OVEC zwar EndoMT initiiert, der Prozess evtl. aber anders als bei den humanen Zellen nicht seinem normalen Ablauf folgt, da die auslösende Substanz artfremd ist.

4.2.2.2 Veränderungen auf RNA-Ebene

4.2.2.2.1 OVEC

Bei Stimulation mit TGF β_1 zeigten die OVEC bei Anwendung des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests eine signifikante Erhöhung der *Snai1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Da die Induktion von *Snai1* durch TGF β_1 der klassischen EndoMT-Signalkaskade entspricht, kann angenommen werden, durch die Stimulation sei EndoMT initiiert worden [13]. Dies bekräftigt die These, OVEC seien fähig, jenen Prozess durchlaufen zu können.

Interessant ist, dass demgegenüber *Snai2* bei Stimulation mit TGF β_1 signifikant herunterreguliert wurde. Dies widerspricht der Erwartung, da anzunehmen war, es würde im Zuge einer EndoMT-Induktion genau wie *Snai1* heraufreguliert werden [13]. Mögliche Gründe hierfür werden in Abschnitt 4.2.2.2.4 erörtert.

Die Expression von *Smad2* zeigte keine Expressionsänderung bei Stimulation mit TGF β_1 . Zu erwarten war eigentlich eine Erhöhung der Expression, da laut Literatur *Smad2* TGF β_1 nach- und dem hier heraufregulierten *Snai1* vorgeschaltet sei [13, 17]. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei Erhöhung von *Snai1* *Smad2* bereits wieder herunterreguliert worden sein könnte, im Sinne eines negativen Feedbacks.

Auch *Twist1* zeigte bei Stimulation mit TGF β_1 entgegen der Erwartung keine Expressionsänderung.

Die Stimulation mit VEGF sowie auch die Stimulation mit β -GP, BGN bzw. HA einzeln oder in Kombination mit VEGF oder TGF β_1 beeinflusste die Expression der genannten Gene nicht signifikant. Es ist daher anzunehmen, dass diese Substanzen in der verwendeten Konzentration den Ablauf von EndoMT in OVEC nicht beeinflussen.

Interessanterweise zeigten die OVEC bei Stimulation mit TGF β_1 eine hoch signifikante Erniedrigung der Genexpression von OPN im Vergleich zur Kontrolle sowie eine signifikante Erniedrigung im Vergleich zur Stimulation mit VEGF. Auch im Falle einer Stimulation mit β -GP oder HA \pm VEGF bewirkte die zusätzliche Beigabe von TGF β_1 eine signifikante Absenkung des *SPP1*-Expressionsniveaus. Dies wird in Abschnitt 4.2.2.3 ausführlich diskutiert.

4.2.2.2.2 HVEC

Bei Stimulation mit TGF β 1 zeigten die HVEC eine hoch signifikante Erhöhung der *Snai1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle sowie eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Stimulation mit VEGF. Dies deutet wie bei den OVEC auf den Ablauf von EndoMT hin [13].

Zusätzlich zeigten die HVEC bei Stimulation mit TGF β 1 eine signifikante Erhöhung der *Snai2* Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dies bekräftigt die Annahme einer stattgehabten EndoMT-Induktion [13].

Wie im Falle der OVEC zeigte die Expression von *Smad2* auch bei den HVEC anders als erwartet keine Expressionserhöhung bei Stimulation mit TGF β 1. Wie bereits im letzten Kapitel diskutiert, scheint auch hier als Erklärung eine negative Feedbackschleife plausibel.

Interessanterweise zeigte sich dagegen bei Stimulation mit BGN eine Expressionserhöhung von *Smad2* im Vergleich zur Kontrolle. Auch *Snai1* wurde bei Zugabe von BGN im Vergleich zur Kontrolle höher exprimiert, während *Snai2* unbeeinflusst blieb. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass BGN eine EndoMT-induzierende Wirkung besitzt, was mit den Forschungsergebnissen von Dahal et al. übereinstimmt [68]. Wie bereits ausgeführt, ist laut Literatur *Smad2 Snai1* vorgeschaltet [13, 17]. Es ist daher denkbar, dass die infolge der Stimulation mit BGN erreichte *Snai1*-Induktion durch *Smad2* vermittelt wurde.

Die Stimulation mit VEGF sowie auch die Stimulation mit HA oder β -GP einzeln oder in Kombination mit VEGF oder TGF β 1 beeinflusste die Expression der genannten Gene nicht signifikant. Es ist daher anzunehmen, dass diese Substanzen in der verwendeten Konzentration den Ablauf von EndoMT in HVEC nicht beeinflussen.

Die Genexpression von OCN zeigte bei Stimulation mit BGN \pm VEGF sowie auch bei Stimulation mit HA \pm VEGF eine signifikante Expressionserhöhung, während die Stimulation mit VEGF alleine, TGF β 1 oder β -GP keinen Effekt hatte. Hierauf wird in Abschnitt 4.2.2.3.2 weiter eingegangen.

4.2.2.2.3 HUVEC

Bei Stimulation mit TGF β 1 zeigten die HUVEC eine signifikante Erhöhung der *Snai1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet wie bei den anderen Zelltypen auf den Ablauf von EndoMT hin [13].

Weitere Effekte der Stimulation erreichten nicht das Signifikanzniveau. Das Nichterreichen eines signifikanten Niveaus trotz zum Teil subjektiv auffallender Tendenzen ist hier sicherlich auch dadurch mitbegründet, dass nur drei Versuchsdurchläufe durchgeführt wurden. Entwickelt wurde dieses Vorgehen anhand der Annahme, dass die HUVEC einen homogenen Zellpool repräsentieren als die OVEC und HVEC, welche jeweils aus drei verschiedenen adulten Organismen isoliert wurden. Es wurde daher vermutet, dass die Ergebnisse der HUVEC-Stimulation eine geringere Schwankungsbreite aufweisen und somit eher ein signifikantes Niveau erreichen würden als die Stimulationsergebnisse der anderen Zelltypen. Diese Annahme lässt sich anhand der erzielten Ergebnisse jedoch nicht bestätigen.

4.2.2.2.4 Vergleich der verschiedenen Zelltypen

Am auffälligsten ist, dass *Snai2* bei Stimulation mit TGF β 1 in den OVEC signifikant herunterreguliert wurde, während es in den HVEC signifikant heraufreguliert wurde. Dies legt einen unterschiedlichen Ablauf von EndoMT in Abhängigkeit vom Zelltyp nahe. Einerseits mag es sein, dass Klappen-EC diesen Prozess auf andere Art durchlaufen als Gefäß-EC. Zum anderen könnte aber auch die Herkunft der verwendeten EC aus verschiedenen Spezies relevant sein. So oder so stellen die Ergebnisse die Vergleichbarkeit von Versuchen zu EndoMT mit unterschiedlichen Zelltypen in Frage.

Eine Erklärung für die vergleichsweise geringe Expressionsänderung der EndoMT-charakterisierenden Gene in OVEC könnte sein, dass humanes TGF β 1 verwendet wurde, da nicht ausgeschlossen ist, dass die artfremden OVEC hierauf evtl. weniger stark reagieren als die artgleichen humanen EC. Auch könnte es - wie bereits in Abschnitt 4.2.2.1.4 angedacht - sein, dass aufgrund dieser Speziesdivergenz humanes TGF β 1 in OVEC zwar EndoMT initiiert, der Prozess evtl. aber anders als bei den humanen Zellen nicht seinem normalen Ablauf folgt. Dies wäre ebenfalls ein Erklärungsansatz dafür, dass im Falle der OVEC bei Stimulation mit TGF β 1 zwar *Snai1* als eines der EndoMT-repräsentierenden Gene signifikant erhöht, *Snai2* als ein anderes jedoch signifikant erniedrigt war. Um dieser These nachzugehen wäre es interessant, in Folgeversuchen die Expressionsänderung der EndoMT-charakterisierenden Gene in OVEC bei Stimulation mit humanem TGF β 1 mit jener bei Stimulation mit ovinem TGF β 1 zu vergleichen.

Eine weitere Erklärung für die auffällig unterschiedliche Reagibilität der *Snai2*-Expression wäre eine unterschiedliche Beteiligung des Notch-Signalwegs je nach Zelltyp. Wie im Rahmen der Einleitung besprochen wurde, stellt *Snai2* ein spezifisches Target des Notch-Signalwegs dar, welcher im Rahmen der EMT- / EndoMT-Induktion synergistisch mit dem TGF β -Signalweg zusammenwirkt. Niessen et al. demonstrierten, dass TGF β 1 und TGF β 2 alleine keine wesentliche Induktion von *Snai2* bewirken [26], sodass im Falle der signifikanten Expressionssteigerung von *Snai2* bei Stimulation der HVEC mit TGF β 1 eine begleitende Notch-Induktion durch TGF β 1 vorliegen könnte. Demgegenüber kann vermutet werden, dass im Falle der signifikanten Herunter-Regulation von *Snai2* bei Stimulation der OVEC mit TGF β 1 eine solche Induktion von Notch durch TGF β 1 ausgeblieben oder sogar blockiert worden ist. Zur fundierten Evaluation dieser Annahme wären freilich weitere Experimente vonnöten.

4.2.2.3 Veränderungen der Kalzifizierungsmarker in den Stimulationsversuchen sowie in den erkrankten Aortenklappen

4.2.2.3.1 OPN

OPN ist ein Phosphoprotein, welches in den physiologischen Knochenstoffwechsel eingebunden ist. Pathologische Bedeutung besitzt es unter anderem in Zusammenhang mit Entzündungs- und Kalzifizierungsprozessen sowie bei der Progression von Tumorerkrankungen [87-90].

Im Rahmen der Kalzifizierung von Gefäßen sowie der Aortenklappe kommt es zu einer Expressionserhöhung von OPN sowohl im betroffenen Gewebe als auch im Serum [75, 87, 91, 92]. Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Expressionserhöhung von OPN in fibrosierten und kalzifizierten Aortenklappen stimmt mit diesen Forschungsergebnissen überein. Interessanterweise haben verschiedene Studien gezeigt, dass OPN im Zuge von Kalzifizierungsprozessen der Schadensbegrenzung dient, indem es die fortgesetzte Mineralisation der entsprechenden Läsionen hemmt [90, 93, 94]. Dazu wird es vor allem von glatten Muskelzellen sowie in geringerem Ausmaß von Makrophagen produziert. Die betroffenen glatten Muskelzellen durchlaufen im Rahmen dessen eine Veränderung ihres Phänotyps mit Verlust bestimmter glattmuskelspezifischer Marker, wie α -SMA und SM22-alpha [93]. Es kommt also in Verbindung mit der OPN-Produktion zu einer Abnahme von glatten Muskelzellen mit normalem Phänotyp. Paloian et al. zeigten zudem, dass bei OPN-knockout-Mäusen die Ausschaltung der OPN-Produktion bei hoher Phosphatbelastung des Organismus in einer ausgeprägten vaskulären Kalzifizierung speziell der medialen Gefäßwandschicht, welche reich an glatten Muskelzellen ist, resultiert. Währenddessen zeigten die Wildtyp-Mäuse unter derselben Phosphatbelastung keine Zeichen arterieller Kalzifizierung [90]. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die glatten Muskelzellen unter Inkaufnahme einer ausgeprägten phänotypischen Veränderung OPN produzieren, um ihre unmittelbare Umgebung vor Kalzifizierung zu schützen. Bereits an dieser Stelle lässt sich die Vermutung formulieren, der Körper könne dem damit einhergehenden Verlust an normal ausgebildeten glatten Muskelzellen begegnen, indem er via EndoMT neue generiert. Zur Untermauerung dieser Hypothese bietet sich an dieser Stelle ein Ausflug in die onkologische Forschung an:

Verschiedene Studien haben Hinweise dafür geliefert, dass OPN EMT-fördernd wirkt [95-99]. So wurde gezeigt, dass OPN über den PI3K / AKT – Signalweg Twist induziert [95] und darüber hinaus auch in den ERK1/2 – Signalweg eingreift [97]. Beide Signalwege sind in das den ErbB-Rezeptoren nachgeschaltete Netzwerk eingebunden, welches Einfluss auf den Ablauf von EMT nimmt [42]. Auch *Snai1* und *Snai2* scheinen durch OPN verstärkt exprimiert zu werden [98, 99].

Aufgrund der zahlreichen Ähnlichkeiten im Ablauf von EMT und EndoMT kann vermutet werden, dass OPN ebenfalls EndoMT-fördernd wirkt und somit wie oben postuliert dem mit der OPN-Produktion einhergehenden Verlust an normal ausgebildeten glatten Muskelzellen entgegenwirkt. Diese Annahme wird gestärkt durch eine Studie von Poggio et al., welche zeigen konnte, dass OPN die Migration von HUVEC und Aortenklappen-EC in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix fördert [83]. Für Folgeversuche böte sich daher die Stimulation von EC-Kulturen verschiedener Herkunft mit OPN an, mit nachfolgender Bestimmung der Expression EndoMT-spezifischer Transkriptionsfaktoren.

Die Stimulationsversuche, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, zeigten interessanterweise bei Stimulation mit TGF β 1 eine Erniedrigung der OPN-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Im Falle der OVEC erreichten diese Veränderungen ein signifikantes Niveau, im Falle der HUVEC nicht, jedoch war eine entsprechende Tendenz hier ebenfalls erkennbar. Dieser Effekt ließ sich auch bei zusätzlicher Beigabe von β -GP, BGN und HA beobachten. Da die morphologischen wie auch die Veränderungen der

Genexpression vermuten lassen, dass es durch TGF β 1 zu einer EndoMT-Induktion gekommen ist, lässt sich die gleichzeitige Erniedrigung von OPN bei Einbeziehung der oben geschilderten Forschungsergebnisse im Sinne eines negativen Feedbacks deuten. Dabei ist die hochsignifikante Erniedrigung der OPN-Expression bei simultaner Stimulation mit TGF β und β -GP gegenüber der OPN-Expression bei alleiniger Stimulation mit β -GP hinweisgebend darauf, dass jener Regulationsmechanismus selbst unter kalzifizierenden Umgebungsbedingungen greift.

Dieses Gleichgewicht scheint in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten fibrosierten und kalzifizierten Aortenklappen gestört zu sein. Der hochsignifikanten Erhöhung der OPN-Expression in den kalzifizierten Klappen steht eine signifikante Erniedrigung aller untersuchter EndoMT-spezifischer Transkriptionsfaktoren gegenüber, trotz der mutmaßlichen Fähigkeit von OPN, EndoMT induzieren zu können. Entweder hat OPN diese Fähigkeit also doch nicht oder es ist im Zuge der Klappendegeneration zu einer Störung im Wechselspiel zwischen OPN und EndoMT gekommen. Bereits in Abschnitt 4.2.1 wurde postuliert, EndoMT habe möglicherweise einen protektiven Effekt auf die valvuläre Homöostase. Bei einer Störung der EndoMT-Induktion könnte nun der im Rahmen der OPN-Produktion auftretende Verlust normal ausgebildeter glatter Muskelzellen aufgrund des fehlenden Ausgleichs via EndoMT einen wesentlichen Auslöser einer dann desorganisierten Proliferation mesenchymaler Zellen darstellen. Auch die Expression von TGF β könnte im Rahmen dessen aus dem Gleichgewicht geraten.

Es wurde vielfach beschrieben, dass die Expression von TGF β in fibrosierten Organen und auch in kalzifizierten Aortenklappen im Vergleich zum gesunden Zustand deutlich erhöht ist [100]. Auch wurde gezeigt, dass TGF β *in vitro* und *in vivo* Fibrosierungs- und Kalzifizierungsprozesse fördert [9, 101]. Anzunehmen ist jedoch, dass es dies nur unter besonderen Bedingungen tut, bspw. in unphysiologisch hohen Konzentrationen, da einem so zentralen, in vielfältigste Signalwege eingebundenen Steuerungsmolekül keine spezifisch schädliche Wirkung zugesprochen werden kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass es ebenso zahlreiche Studien gibt, welche TGF β einen protektiven Effekt im Rahmen der Arterioskleroseentwicklung zuschreiben [101]. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich im Rahmen des oben entwickelten Gedankenkonstrukts auflösen. So käme es möglicherweise bei einer TGF β -nachgeschalteten Störung der EndoMT-Induktion zu einer kompensatorischen Erhöhung von TGF β , welche bei unphysiologisch hoher Ausprägung adverse Effekte nach sich ziehen könnte. Gleichzeitig stehen die von Xu et al. zusammengefassten protektiven Effekte von TGF β [101] in Einklang mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Hypothese einer protektiven Komponente von EndoMT.

4.2.2.3.2 OCN

OCN ist ein Vitamin-K-abhängiges Protein, welches physiologischerweise von Osteoblasten produziert wird [102]. Im Rahmen vaskulärer Kalzifizierungsprozesse kommt es zu einer erhöhten Expression von OCN im betroffenen Gewebe [75, 103-105]. Unklar ist bis heute, ob OCN dabei regulatorische Funktionen ausübt oder als Marker stattgehabter Knochenneubildung lediglich ein Symptom der Kalzifizierung darstellt. Es existieren jedoch Hinweise darauf, dass OCN u.a. über Beeinflussung des Glukosestoffwechsels einen

protektiven Effekt auf das Gefäßsystem haben könnte. Auch wurden Effekte in EC-Kulturen beobachtet, wo OCN über den PI3 / AKT – Signalweg die endothelial nitric oxide synthase (eNOS) heraufregulierte und bestimmte Stressreaktionen der Zellen abschwächte, wodurch ein direkter protektiver Effekt auf EC angedeutet wird [102]. Ein Zusammenhang zwischen OCN und EndoMT ist nicht bekannt, jedoch ist eine Wechselwirkung denkbar, da EndoMT ebenfalls u.a. über den PI3 / AKT – Signalweg beeinflusst wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Expressionserhöhung von OCN in kalzifizierten Aortenklappen im Vergleich zu den makroskopisch gesunden Aortenklappen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den oben geschilderten Forschungsergebnissen. Bemerkenswert ist, dass darüber hinaus auch in den fibrosierten Aortenklappen eine gegenüber der Gesundheitsgruppe signifikante Expressionserhöhung von OCN nachweisbar war, während sich die Expression von OCN zwischen fibrosierten und kalzifizierten Klappen nicht signifikant unterschied. Hieraus sind Überlegungen zur Rolle von OCN ableitbar: Der fehlende Expressionsanstieg von OCN zwischen fibrosierten und kalzifizierten Klappen widerspricht der Annahme, dass die Produktion von OCN lediglich eine symptomatische Folge der Verkalkung darstellt. Die Plausibilität einer regulativen Komponente von OCN wird dadurch gesteigert.

In den Stimulationsversuchen zeigte sich keine Korrelation zwischen EndoMT-Induktion und der Expression von OCN, sodass eine Verschaltung unwahrscheinlich anmutet. Dagegen zeigte sich eine signifikante Expressionserhöhung von OCN bei Stimulation der HVEC mit BGN oder HA. Beide Substanzen sind Bestandteile der ECM und bekannt dafür, modulierende Effekte zu haben [69]. Ausgehend von den vorliegenden Versuchsergebnissen ist es denkbar, dass OCN in diesem Zusammenhang eine Mediatorfunktion einnimmt.

4.2.2.4 Veränderungen auf Protein-Ebene

Es ist zunächst festzuhalten, dass die stimulationsbedingten Veränderungen auf Proteinebene kaum ein signifikantes Niveau erreichten. Ein denkbarer Grund hierfür wäre eine zu kurze Dauer der Stimulation. Dies könnte erklärungsgebend sein für die Diskrepanz zwischen vorhandenen signifikanten Veränderungen auf RNA-Ebene und der fehlenden Signifikanz der Veränderungen auf Protein-Ebene, da letztere schließlich durch erstere bedingt und somit diesen chronologisch nachgeschaltet sind.

Trotz des Nichterreichens eines signifikanten Niveaus können anhand der Expressionsänderungen pro Einzelfall gewisse qualitative Aussagen getroffen werden.

4.2.2.4.1 Ovine Aortenklappen-EC

Die Tendenz der Expressionsänderung von CD31 unter Stimulation mit VEGF oder TGF β 1 im Vergleich zur Kontrolle verhält sich im interindividuellen Vergleich komparabel: Beobachtbar war eine leichte Tendenz zur Expressionserhöhung von CD31 durch Stimulation mit VEGF sowie zur Expressionsminderung durch Stimulation mit TGF β 1. Diese Effekte wurden durch die zusätzliche Beigabe von β -GP, BGN bzw. HA nicht wesentlich beeinflusst. Wie bereits in der Einleitung berichtet, ist CD31 ein EC-Marker, wodurch Veränderungen seiner Expression repräsentativ sind für Veränderungen hin zu bzw. weg von

einem endothelialen Phänotyp der betreffenden Zelle [79]. Die genannten Ergebnisse stehen damit im Einklang mit der aus der Literatur ableitbaren Annahme, dass VEGF einen hemmenden und TGF β 1 einen fördernden Einfluss auf den Ablauf von EndoMT hat [13, 50].

Bezogen auf die Expression von α -SMA lassen sich keine interindividuell vergleichbaren Tendenzen der Expressionsänderung erkennen, im Gegenteil: Die Expressionsänderung verhält sich zum Teil gegenläufig, sodass hieraus keine Aussage abgeleitet werden kann.

4.2.2.4.2 Humane Venen-EC

Die Ergebnisse der CD31-Expression bei Stimulation mit VEGF oder TGF β 1 sowie bei zusätzlicher Zugabe von β -GP, BGN bzw. HA zeigten keine gerichtete Tendenz und zudem eine sehr große Schwankungsbreite, sodass aus diesen keine Aussage abgeleitet werden kann.

Auch die Expression von α -SMA lässt bei Stimulation mit VEGF bzw. TGF β 1 sowie bei Zugabe von β -GP, BGN oder HA keine deutlichen Tendenzen der Expressionsänderung erkennen.

4.2.2.4.3 HUVEC

Die HUVEC zeigten eine leichte Tendenz zur Expressionserhöhung von CD31 durch Stimulation mit VEGF oder BGN. Wie im Falle der OVEC wird hierdurch die aus der Literatur ableitbare Annahme, dass erhöhte Spiegel von VEGF einen hemmenden Einfluss auf den Ablauf von EndoMT haben, unterstrichen [50]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die signifikante Steigerung der CD31-Expression bei simultaner Stimulation der HUVEC mit VEGF und HA. Diese ist vereinbar mit den bereits in einem früheren Kapitel angesprochenen synergistischen Wechselwirkungen zwischen VEGF und HA [86].

Die Expression von α -SMA lässt bei Stimulation mit VEGF bzw. TGF β 1 \pm BGN oder β -GP keine interindividuell vergleichbaren Tendenzen der Expressionsänderung erkennen.

Interessanterweise ergibt sich bei Stimulation mit HA \pm VEGF oder TGF β 1 der Eindruck einer Tendenz zur Expressionserhöhung von α -SMA im Vergleich zur Kontrolle, sodass anhand dieser Ergebnisse eine EndoMT-induzierende Wirkung von HA in Betracht gezogen werden kann. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu der im Zusammenwirken von HA und VEGF erzielten Steigerung der CD31-Expression. Um diesen Widerspruch aufzulösen bietet sich die Hypothese an, dass HA als Bestandteil der ECM die Differenzierung sogenannter Hybridzellen unterstützen könnte, welche sowohl Charakteristika von EC als auch von myofibroblastoiden Zellen aufweisen. Auf diesen Zelltypus wird im folgenden Kapitel gesondert eingegangen.

4.2.2.4.4 Ko-expression von CD31 und α -SMA

Interessant ist, dass die Western Blots eine Ko-expression von CD31 und α -SMA zeigen, auch in der Kontrolle. Es mag an dieser Stelle eingewandt werden, dies könne ein Zeichen dafür sein, dass die EC-Population bereits vor Beginn der Stimulation nicht rein und frei von weiteren mesenchymalen Zellen gewesen sei. Um dieser Eventualität zu begegnen haben beispielsweise Paranya et al. im Rahmen ihrer 2001 veröffentlichten Arbeit mit rein klonalen

EC-Populationen gearbeitet. Nur solche Zellen, welche zugleich CD31-positiv und α -SMA-negativ waren, die für EC typische cobblestone-Morphologie ausbildeten und in Reaktion auf Behandlung mit Lipopolysacchariden E-selectin hochregulierten, wurden hier nach klonaler Expansion für die Stimulationsversuche verwendet [52]. Im Vergleich dazu mag die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit gewählte Herangehensweise, die isolierten Zellen rein aufgrund der Konsistenz ihrer cobblestone-Morphologie als EC zu charakterisieren, diskussionswert erscheinen. Als Argument für die Praktikabilität des gewählten Vorgehens sei angeführt, dass in den Fällen beobachteter Verunreinigung mit mesenchymalen Zellen im Rahmen der EC-Isolation die mesenchymalen Zellen die EC sehr rasch nach der Isolation überwuchert haben. Bei gründlicher Beobachtung der EC-Kulturen über mehrere Passagierungszyklen hinweg wurde bei stets ungestörter Ausbildung eines gleichmäßigen cobblestone-Wachstumsmusters daher eine Verunreinigung mit mesenchymalen Zellen als ausreichend unwahrscheinlich erachtet, um die Versuche mit jenen Zellen durchzuführen. Geht man dementsprechend primär von einem anderen Grund für die genannte Ko-expression aus, bietet sich ein weiterer Erklärungsansatz an:

So existieren aus der Forschung bezüglich EMT breit gefächerte Hinweise und Belege für das Vorkommen sogenannter Hybridzellen, welche phänotypische Charakteristika sowohl von Epithelzellen als auch von mesenchymalen Zellen aufweisen. Solchermaßen besitzen diese Zellen eine erhöhte Bereitschaft zur Umwandlung in beide genannte Zelltypen und repräsentieren ein Spektrum stabiler Zwischenstufen im Ablauf von EMT bzw. MET. Beobachtet wurden solche Zellen im Rahmen pathologischer Prozesse welche in Zusammenhang mit EMT stehen, z.B. Metastasierung und Fibrosierung, aber auch im Rahmen physiologischer Prozesse, beispielsweise der Wundheilung [106]. Aufgrund der vielfältigen Parallelen zwischen dem Ablauf von EMT und jenem von EndoMT liegt die Vermutung nahe, dass letzterer Prozess äquivalente Zwischenstufen hervorzubringen vermag. Die Existenz α -SMA exprimierender aortaler und mikrovaskulärer EC sowie α -SMA exprimierender HUVECs wurde bereits in vorangegangenen Studien demonstriert [107-111], was jene Annahme unterstützt. Greift man zurück auf die in Abschnitt 4.2.1 entwickelte Hypothese, EndoMT unterstütze die valvuläre Homöostase und laufe somit in physiologischer Weise in adulten Klappen-EC ab, erscheint das Vorhandensein von Hybridzellen auch im mikroskopisch einheitlichen Klappenendothel nicht abwegig.

Natürlich bleibt die Frage, ob es empfehlenswert ist, bei Vorhandensein solcher Zellen diese in die Versuche miteinzubeziehen. Als Argument hierfür sei das Streben nach möglichst naturnahen Umgebungsbedingungen in der Zellkultur genannt. So stellen klonale EC-Populationen aus einer einzigen Zelle hinsichtlich Künstlichkeit der Situation sicherlich eine Steigerung im Vergleich zur Kultivierung eines Gesamtverbundes an Zellen mit EC-typischem Wachstumsmuster dar, wenngleich natürlich die Umgebungsbedingungen in der Zellkultur von vorneherein hochartifizial sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein mögliches Vorliegen von Hybridzellen erklärungsgebend sein könnte für die beobachtete Ko-expression von CD31 und α -SMA in der Kontrolle. Um dieser Vermutung nachzugehen wären weitere Versuche nötig, welche ein ganz neues Forschungsfeld eröffnen würden. Letztlich ist nicht davon auszugehen, dass ein Vorliegen solcher Zellen den Vergleich der Gen- und Protein-Expressionslevel zwischen den

Stimulationsbedingungen bei identischen Ausgangsbedingungen verfälschen würde. Die Bewertung der Ergebnisse bliebe damit unverändert.

4.3 Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Bedeutung sowie Einflussfaktoren von EndoMT im Rahmen degenerativer Aortenklappenerkrankungen zu untersuchen. Sie wurde unter der Annahme begonnen, dass EndoMT dieser Pathologie zuträglich sei, da in der Literatur breit gefächerte Hinweise auf profibrotische Effekte von EndoMT existieren.

Umso überraschender stellen sich die im ersten Teil der Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Untersuchung humaner Aortenklappen dar. Hinsichtlich der bezüglich EndoMT relevanten Gene zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede zwischen den makroskopisch unveränderten und den degenerierten Aortenklappen. Diese erwecken den Eindruck, dass EndoMT einen protektiven Effekt gegenüber degenerativen Prozessen im Bereich der Aortenklappe haben könnte. Als mögliche Erklärung hierfür wurde die Theorie einer Beteiligung von EndoMT an der valvulären Homöostase aufgegriffen, welche Paranya et al. bereits im Jahr 2001 formuliert haben [52].

Der zweite Teil der Arbeit bestand in der Etablierung und anschließenden Nutzung eines Zellkulturmodells zum Ablauf von EndoMT. Zunächst wurden verschiedene Methoden der Zellisolation erprobt und verglichen. Im Rahmen der folgenden Stimulationsversuche ließen sich Faktoren identifizieren, welche Einfluss auf den Ablauf von EndoMT haben. So zeigten sich beim Vergleich der verschiedenen Versuchsbedingungen Unterschiede sowohl im Wachstumsmuster als auch in der Genexpression, welche die EndoMT-induzierende Wirkung von TGF β 1 unterstreichen und Hinweise auf eine mögliche EndoMT-induzierende Wirkung von BGN geben. Darüber hinaus legen die Ergebnisse einen unterschiedlichen Ablauf von EndoMT in Abhängigkeit vom Zelltyp nahe und stellen somit die Vergleichbarkeit von Versuchen zu EndoMT mit unterschiedlichen Zelltypen in Frage.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Erwartbares und Unerwartetes vereinen. Die Hypothese einer protektiven Funktion von EndoMT gegenüber valvulärer Degeneration ist sicherlich das spannendste Resultat, da sie einen neuen Blickwinkel auf jene Themen eröffnet.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. World Health Organisation. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. 2018 [cited 2020 24 September]; Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/.
2. Statistisches Bundesamt. *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2018*. [cited 2020 24 September]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
3. Daniel, W.G., et al., [*Aortic stenosis*]. *Clin Res Cardiol*, 2006. **95**(11): p. 620-41.
4. Lindman, B.R., et al., *Calcific aortic stenosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16006.
5. Otto, C.M., et al., *Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(3): p. 142-7.
6. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. *J Am Coll Cardiol*, 1997. **29**(3): p. 630-4.
7. Lindroos, M., et al., *Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(5): p. 1220-5.
8. Osnabrugge, R.L., et al., *Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(11): p. 1002-12.
9. Akahori, H., et al., *Mechanisms of aortic stenosis*. *J Cardiol*, 2018. **71**(3): p. 215-220.
10. Herold, G., ed. *Innere Medizin 2019*. 2018, Gerd Herold: Köln.
11. von Gise, A. and W.T. Pu, *Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease*. *Circ Res*, 2012. **110**(12): p. 1628-45.
12. Hay, E.D., *Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo*. *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, ed. B.R. Fleischmajer R. 1968, Baltimore: Williams and Wilkins.
13. Kovacic, J.C., et al., *Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease*. *Circulation*, 2012. **125**(14): p. 1795-808.
14. Combs, M.D. and K.E. Yutzey, *Heart valve development: regulatory networks in development and disease*. *Circ Res*, 2009. **105**(5): p. 408-21.
15. Heldin, C.H., M. Vanlandewijck, and A. Moustakas, *Regulation of EMT by TGFbeta in cancer*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(14): p. 1959-70.
16. Piera-Velazquez, S., Z. Li, and S.A. Jimenez, *Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders*. *Am J Pathol*, 2011. **179**(3): p. 1074-80.
17. Goumans, M.J., A.J. van Zonneveld, and P. ten Dijke, *Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis?* *Trends Cardiovasc Med*, 2008. **18**(8): p. 293-8.
18. Yoshimatsu, Y. and T. Watabe, *Roles of TGF-beta signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis*. *Int J Inflam*, 2011. **2011**: p. 724080.
19. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(10): p. 1512-20.
20. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(2): p. 76-83.
21. Battle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(2): p. 84-9.

22. Ikenouchi, J., et al., *Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 10): p. 1959-67.
23. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 155-66.
24. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. Cell Res, 2009. **19**(2): p. 156-72.
25. Derycke, L.D. and M.E. Bracke, *N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 463-76.
26. Niessen, K., et al., *Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization*. J Cell Biol, 2008. **182**(2): p. 315-25.
27. Savagner, P., K.M. Yamada, and J.P. Thiery, *The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol, 1997. **137**(6): p. 1403-19.
28. Zeisberg, M., et al., *BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 964-8.
29. Ying, X., Y. Sun, and P. He, *Bone Morphogenetic Protein-7 Inhibits EMT-Associated Genes in Breast Cancer*. Cell Physiol Biochem, 2015. **37**(4): p. 1271-8.
30. Molloy, E.L., et al., *BMP4 induces an epithelial-mesenchymal transition-like response in adult airway epithelial cells*. Growth Factors, 2008. **26**(1): p. 12-22.
31. Ma, L., et al., *Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning*. Development, 2005. **132**(24): p. 5601-11.
32. Miyazono, K., H. Suzuki, and T. Imamura, *Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors*. Cancer Sci, 2003. **94**(3): p. 230-4.
33. Yan, X., Z. Liu, and Y. Chen, *Regulation of TGF-beta signaling by Smad7*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(4): p. 263-72.
34. Song, R., et al., *BMP-2 and TGF-beta1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells*. J Mol Med (Berl), 2015. **93**(4): p. 403-12.
35. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.
36. Hunter, G.L., et al., *Coordinated control of Notch-Delta signalling and cell cycle progression drives lateral inhibition mediated tissue patterning*. Development, 2016.
37. Timmerman, L.A., et al., *Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation*. Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 99-115.
38. Donovan, J., et al., *Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in Hey2 mutant mice*. Curr Biol, 2002. **12**(18): p. 1605-10.
39. Fischer, A., et al., *The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development*. Genes Dev, 2004. **18**(8): p. 901-11.
40. Fischer, A., et al., *Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition*. Circ Res, 2007. **100**(6): p. 856-63.
41. Fu, Y., et al., *Differential regulation of transforming growth factor beta signaling pathways by Notch in human endothelial cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(29): p. 19452-62.
42. Sanchez-Soria, P. and T.D. Camenisch, *ErbB signaling in cardiac development and disease*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(9): p. 929-35.
43. Marín-García, J., *Signaling in the Heart*. 2011, Boston: Springer US.

44. Ingthorsson, S., et al., *HER2 induced EMT and tumorigenicity in breast epithelial progenitor cells is inhibited by coexpression of EGFR*. *Oncogene*, 2015.
45. Lindsey, S. and S.A. Langhans, *Epidermal growth factor signaling in transformed cells*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2015. **314**: p. 1-41.
46. Zhang, K., et al., *Synchronized Targeting of Notch and ERBB Signaling Suppresses Melanoma Tumor Growth through Inhibition of Notch1 and ERBB3*. *J Invest Dermatol*, 2016. **136**(2): p. 464-72.
47. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. *FASEB J*, 1999. **13**(1): p. 9-22.
48. Enciso, J.M., et al., *Elevated glucose inhibits VEGF-A-mediated endocardial cushion formation: modulation by PECAM-1 and MMP-2*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(4): p. 605-15.
49. Dor, Y., et al., *A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects*. *Development*, 2001. **128**(9): p. 1531-8.
50. Dor, Y., et al., *VEGF modulates early heart valve formation*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003. **271**(1): p. 202-8.
51. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. *Nat Med*, 2007. **13**(8): p. 952-61.
52. Paranya, G., et al., *Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(4): p. 1335-43.
53. Paruchuri, S., et al., *Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2*. *Circ Res*, 2006. **99**(8): p. 861-9.
54. Medici, D., et al., *Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells*. *Nat Med*, 2010. **16**(12): p. 1400-6.
55. Frid, M.G., V.A. Kale, and K.R. Stenmark, *Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis*. *Circ Res*, 2002. **90**(11): p. 1189-96.
56. Arciniegas, E., et al., *Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro*. *J Cell Sci*, 1992. **103 (Pt 2)**: p. 521-9.
57. Li, Z. and S.A. Jimenez, *Protein kinase Cdelta and c-Abl kinase are required for transforming growth factor beta induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(8): p. 2473-83.
58. Wylie-Sears, J., et al., *Mitral valve endothelial cells with osteogenic differentiation potential*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(3): p. 598-607.
59. Yang, J.H., J. Wylie-Sears, and J. Bischoff, *Opposing actions of Notch1 and VEGF in post-natal cardiac valve endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **374**(3): p. 512-6.
60. Barth, M., *The cell and molecular biological characterization of cell-cell junctions in mammalian heart valves*. 2011, Ruprecht-Karls-Universität: Heidelberg.
61. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. *Diab Vasc Dis Res*, 2019. **16**(3): p. 254-269.
62. Selig, J.I., *Die Rolle der extrazellulären Matrix in der degenerativen Aortenklappenerkrankung unter dem Einfluss von Diabetes*. 2018, Dissertationsschrift, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Landes- und Hochschulbibliothek Düsseldorf.
63. Ellam, T.J. and T.J. Chico, *Phosphate: the new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease*. *Atherosclerosis*, 2012. **220**(2): p. 310-8.
64. Amann, K., et al., *Hyperphosphatemia aggravates cardiac fibrosis and microvascular disease in experimental uremia*. *Kidney Int*, 2003. **63**(4): p. 1296-301.

65. Shioi, A., et al., *Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(11): p. 2003-9.
66. Babelova, A., et al., *Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(36): p. 24035-48.
67. Derbali, H., et al., *Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(6): p. 2638-45.
68. Dahal, S., et al., *Endothelial to mesenchymal transformation is induced by altered extracellular matrix in aortic valve endothelial cells*. *J Biomed Mater Res A*, 2017. **105**(10): p. 2729-2741.
69. Stephens, E.H., et al., *Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves*. *Cardiovasc Pathol*, 2011. **20**(6): p. 334-42.
70. West, D.C. and S. Kumar, *The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity*. *Exp Cell Res*, 1989. **183**(1): p. 179-96.
71. McCarthy, J.B., D. El-Ashry, and E.A. Turley, *Hyaluronan, Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Microenvironment in Malignant Progression*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. **6**: p. 48.
72. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(3): p. 349-60.
73. Grande-Allen, K.J., et al., *Glycosaminoglycan synthesis and structure as targets for the prevention of calcific aortic valve disease*. *Cardiovasc Res*, 2007. **76**(1): p. 19-28.
74. Gwanmesia, P., et al., *Opposite effects of transforming growth factor-beta1 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. **16**(12): p. 3737-46.
75. Kapelouzou, A., et al., *Serum and tissue biomarkers in aortic stenosis*. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2015. **2015**(4): p. 49.
76. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
77. Chistiakov, D.A., A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, *Endothelial PECAM-1 and its function in vascular physiology and atherogenic pathology*. *Exp Mol Pathol*, 2016. **100**(3): p. 409-15.
78. Woodfin, A., M.B. Voisin, and S. Nourshargh, *PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(12): p. 2514-23.
79. Piera-Velazquez, S., F.A. Mendoza, and S.A. Jimenez, *Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases*. *J Clin Med*, 2016. **5**(4).
80. Shinde, A.V., C. Humeres, and N.G. Frangogiannis, *The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. **1863**(1): p. 298-309.
81. Bio-Rad. *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual* [Instruction Manual] [cited 2020 24 September]; Available from: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>.
82. Coleman, L.S., *A hypothesis: factor VII governs clot formation, tissue repair and apoptosis*. *Med Hypotheses*, 2007. **69**(4): p. 903-7.

83. Poggio, P., et al., *Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls*. J Cell Physiol, 2011. **226**(8): p. 2139-49.
84. Kapandji, A.I., [*Connective tissue: big unifying element of the organism*]. Ann Chir Plast Esthet, 2012. **57**(5): p. 507-14.
85. Cloyd, K.L., et al., *Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell 'calcified' nodules*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48154.
86. Jung, Y.J., et al., *Hyaluronan-induced VEGF-C promotes fibrosis-induced lymphangiogenesis via Toll-like receptor 4-dependent signal pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **466**(3): p. 339-45.
87. Evrard, S., et al., *Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers*. Clin Chim Acta, 2015. **438**: p. 401-14.
88. Scatena, M., L. Liaw, and C.M. Giachelli, *Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2302-9.
89. Wai, P.Y. and P.C. Kuo, *Osteopontin: regulation in tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 103-18.
90. Paloian, N.J., E.M. Leaf, and C.M. Giachelli, *Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification*. Kidney Int, 2016. **89**(5): p. 1027-36.
91. Yu, P.J., et al., *Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **138**(1): p. 196-9.
92. Kapetanios, D., et al., *Vascular calcification biomarkers and peripheral arterial disease*. Int Angiol, 2016. **35**(5): p. 455-9.
93. Speer, M.Y., et al., *Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo*. J Exp Med, 2002. **196**(8): p. 1047-55.
94. Wada, T., et al., *Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin*. Circ Res, 1999. **84**(2): p. 166-78.
95. Yu, X., et al., *Osteopontin promotes hepatocellular carcinoma progression via the PI3K/AKT/Twist signaling pathway*. Oncol Lett, 2018. **16**(4): p. 5299-5308.
96. Liu, F., C. Bai, and Z. Guo, *The prognostic value of osteopontin in limited-stage small cell lung cancer patients and its mechanism*. Oncotarget, 2017. **8**(41): p. 70084-70096.
97. Li, Y., et al., *Osteopontin Promotes Invasion, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Endometrial Carcinoma Cell HEC-1A Through AKT and ERK1/2 Signaling*. Cell Physiol Biochem, 2015. **37**(4): p. 1503-12.
98. Li, N.Y., et al., *Osteopontin up-regulates critical epithelial-mesenchymal transition transcription factors to induce an aggressive breast cancer phenotype*. J Am Coll Surg, 2013. **217**(1): p. 17-26; discussion 26.
99. Ng, L., et al., *Post-operative plasma osteopontin predicts distant metastasis in human colorectal cancer*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126219.
100. Fisher, C.I., J. Chen, and W.D. Merryman, *Calcific nodule morphogenesis by heart valve interstitial cells is strain dependent*. Biomech Model Mechanobiol, 2013. **12**(1): p. 5-17.
101. Xu, S., A.C. Liu, and A.I. Gotlieb, *Common pathogenic features of atherosclerosis and calcific aortic stenosis: role of transforming growth factor-beta*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(4): p. 236-47.
102. Tacey, A., et al., *Potential Role for Osteocalcin in the Development of Atherosclerosis and Blood Vessel Disease*. Nutrients, 2018. **10**(10).

103. Tyson, K.L., et al., *Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(3): p. 489-94.
104. Levy, R.J., C. Gundberg, and R. Scheinman, *The identification of the vitamin K-dependent bone protein osteocalcin as one of the gamma-carboxyglutamic acid containing proteins present in calcified atherosclerotic plaque and mineralized heart valves*. *Atherosclerosis*, 1983. **46**(1): p. 49-56.
105. Fleet, J.C. and J.M. Hock, *Identification of osteocalcin mRNA in nonosteoid tissue of rats and humans by reverse transcription-polymerase chain reaction*. *J Bone Miner Res*, 1994. **9**(10): p. 1565-73.
106. Nieto, M.A., et al., *Emt: 2016*. *Cell*, 2016. **166**(1): p. 21-45.
107. Azuma, K., et al., *Presence of alpha-smooth muscle actin-positive endothelial cells in the luminal surface of adult aorta*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **380**(3): p. 620-6.
108. Ando, H., et al., *Cardiac microvascular endothelial cells express alpha-smooth muscle actin and show low NOS III activity*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1755-68.
109. Lu, X., et al., *Smooth muscle alpha-actin expression in endothelial cells derived from CD34+ human cord blood cells*. *Stem Cells Dev*, 2004. **13**(5): p. 521-7.
110. Jones, R., M. Jacobson, and W. Steudel, *alpha-smooth-muscle actin and microvascular precursor smooth-muscle cells in pulmonary hypertension*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(4): p. 582-94.
111. Kocher, O. and J.A. Madri, *Modulation of actin mRNAs in cultured vascular cells by matrix components and TGF-beta 1*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1989. **25**(5): p. 424-34.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg für die Überlassung meines Dissertationsthemas sowie die Bereitstellung aller notwendigen Ressourcen zur Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. med. Payam Akhyari danke ich für seine engagierte Betreuung, seine stetige Motivation sowie die Schaffung einer gut strukturierten Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Co-Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth. Ihrer umfassenden Betreuung sowie ihrer fachlich und emotional unschätzbaren Unterstützung ist die Fertigstellung dieser Arbeit maßgeblich zu verdanken.

Danken möchte ich auch allen Postdoktoranden, die während meiner Zeit im Labor ebenfalls dort tätig waren, für ihre praktische Anleitung und richtungsweisenden Ratschläge. Insbesondere danke ich Herrn Dr. rer. nat. Alexander Jenke und Herrn Dr. rer. nat. Antonio Pinto für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken sowie ihre Hilfestellung bei jeglichen diesbezüglichen Problemen.

Meinen Mitdoktoranden möchte ich für das angenehme Arbeitsklima sowie die gegenseitige Unterstützung danken. Namentlich nennen möchte ich hier Frau Dr. med. Svenja Klose, für die gute Einarbeitung zu Beginn meiner Labortätigkeit sowie die Bereitstellung von ihr aufgereinigter RNA für weitere Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Frau Dr. rer. nat. Jessica Selig danke ich für die ungemein freundschaftliche Zusammenarbeit und ihren immer guten Rat.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Gisela Müller für ihre Hilfe bei der praktischen Bewältigung der zahlreichen Versuchswiederholungen sowie für ihre außerordentlich gute Organisation der Abläufe im Labor.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner für ihre unerschöpfliche Unterstützung, Geduld und Motivation über all die Zeit.