

**Identifizierung und Adressierung
von Targets zur Therapie der
Calcific Aortic Valve Disease -
Die Rolle des TGF- β 1-Signalwegs und
des Adiponektin-Rezeptorsystems**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Julia Kistner
aus Hagen

Düsseldorf, Juni 2021

aus der Klinik für Herzchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg
2. Gutachter Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2021

„Glück und Zuversicht vermag man selbst in Zeiten der Dunkelheit zu finden.
Man darf bloß nicht vergessen ein Licht leuchten zu lassen.“

Albus Dumbledore

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	VI
III.	Tabellenverzeichnis	IX
IV.	Abkürzungsverzeichnis	X
V.	Zusammenfassung	XIII
VI.	Abstract	XV
1	Einleitung	1
1.1	Die Aortenklappe	1
1.1.1	Entwicklung und Lage der Aortenklappe	1
1.1.2	Anatomie und Physiologie der Aortenklappe	2
1.2	<i>Calcific Aortic Valve Disease (CAVD)</i>	3
1.2.1	Pathogenese und Epidemiologie der CAVD	3
1.2.2	Therapie der CAVD	6
1.3	Targetidentifizierung und Wirkstoffdesign als initiale Schritte der Medikamentenentwicklung	7
1.3.1	Identifizierung von Targets	7
1.3.2	Das targetbasierte Design von Wirkstoffen	9
1.3.3	Präklinische und klinische Testung von Wirkstoffen	9
1.4	Der TGF- β 1-Signalweg	10
1.4.1	Komponenten und Aktivierung	10
1.4.2	Liganden und Modulatoren	12
1.4.2.1	Das Zytokin TGF- β 1	12
1.4.2.2	Der niedermolekulare Wirkstoff Pirfenidon	13
1.4.3	Wirkungsspektrum	14
1.5	Das Adiponektin-Rezeptorsystem	16
1.5.1	Komponenten und Aktivierung	16
1.5.2	Liganden	18
1.5.2.1	Das Adipozytokin Adiponektin	18
1.5.2.2	Der niedermolekulare Wirkstoff AdipoRon	20
1.5.3	Wirkungsspektrum	21
1.6	Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Humane Aortenklappentaschen	25
2.1.2	Ovine Aortenklappentaschen	25

2.1.3	Zellkulturreagenzien.....	25
2.1.4	Stimulationsagenzien.....	26
2.1.5	Antikörper.....	26
2.1.5.1	Primärantikörper.....	26
2.1.5.2	Sekundärantikörper.....	27
2.1.6	Chemikalien.....	27
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	29
2.1.8	Molekularbiologische Kits.....	30
2.1.9	Geräte.....	31
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Humane Aortenklappentaschen.....	33
2.2.1.1	Gewinnung der Aortenklappentaschen.....	33
2.2.1.2	Klassifizierung des Degenerationsstatus der humanen Aortenklappentaschen.....	33
2.2.1.3	Auswahl der Patienten.....	34
2.2.1.4	Patientenkohorte.....	34
2.2.2	Aufreinigung und Analyse von RNA.....	35
2.2.2.1	RNA-Isolation aus humanen Aortenklappentaschen.....	35
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung und Reverse Transkription.....	35
2.2.2.3	Primerdesign und -sequenzen.....	36
2.2.2.4	Quantitative Realtime PCR (qPCR).....	37
2.2.3	<i>In vitro</i> -Versuche mit ovinen Aortenklappentaschen.....	38
2.2.3.1	Isolation oviner Aortenklappentaschen.....	38
2.2.3.2	Isolation oviner valvulärer Interstitialzellen (VICs).....	39
2.2.3.3	Kultivierung und Stimulation der Aortenklappentaschen.....	39
2.2.3.4	Kultivierung und Stimulation der VICs.....	41
2.2.3.5	Morphologische Analyse der Aortenklappentaschen.....	41
2.2.3.6	Morphologische Analyse der VICs.....	41
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	42
2.2.4.1	Herstellung von Gewebe- und Zelllysaten.....	42
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
2.2.4.3	Immunoblotanalyse zur Bestimmung der Proteinexpression.....	43
2.2.4.4	Kalziumquantifizierung.....	43
2.2.4.5	Quantifizierung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in konditionierten Kulturüberständen.....	44
2.2.5	Histologie.....	44
2.2.5.1	4'-6'-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)-Färbung.....	45
2.2.5.2	Alizarinrotfärbung und -extraktion.....	45
2.2.5.3	ALP-Färbung.....	45
2.2.5.4	Von Kossa-Färbung.....	46
2.2.6	Immunhistochemie.....	46

2.2.6.1	TUNEL Assay.....	46
2.2.7	Transelektronenmikroskopie.....	47
2.2.8	Statistische Analyse.....	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Wirkung von TGF- β 1 auf Fibrose und Kalzifizierung im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell	48
3.1.1	Regulation von SMAD3 und SMAD7 sowie Autoinduktion von TGF- β 1 als Indikatoren einer effektiven TGF- β 1-Signaltransduktion in AOK-Gewebe.....	48
3.1.2	TGF- β 1 induziert eine fibrotisch nicht-kalzifizierte Morphologie des AOK-Gewebes.....	50
3.1.3	TGF- β 1 erhöht die Zelldichte sowie RNA- und Proteingehalte in AOK-Gewebe	56
3.1.4	TGF- β 1 inhibiert Apoptose und stimuliert die Proliferation von VICs in AOK-Gewebe ...	58
3.1.5	TGF- β 1 induziert die profibrotisch-myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe.....	59
3.1.6	TGF- β 1 inhibiert die prokalzifizierend-osteoblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe.....	61
3.1.7	TGF- β 1 blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition der SMAD1/5/8-Aktivierung und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs	63
3.1.8	Kollagen Typ I als Zellsubstrat moduliert die Wirkung von TGF- β 1 auf die Kalzifizierung isolierter VICs.....	65
3.2	Wirkung von Pirfenidon auf Fibrose und Kalzifizierung im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell	67
3.2.1	Antifibrotische Wirkung von Pirfenidon im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell	67
3.2.1.1	Zellbasiertes 2D-CAVD-Modell	67
3.2.1.1.1	Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung.....	67
3.2.1.1.2	Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung ..	69
3.2.1.1.3	Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung.....	69
3.2.1.2	Gewebebasiertes 3D-CAVD-Modell	71
3.2.1.2.1	Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie.....	71
3.2.1.2.2	Pirfenidon blockiert die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung.....	72
3.2.1.2.3	Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung in AOK-Gewebe.....	73
3.2.1.2.4	Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe	74

3.2.2	Antikalzifizierende Wirkung von Pirfenidon im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell	75
3.2.2.1	Zellbasiertes 2D-CAVD-Modell	75
3.2.2.1.1	Pirfenidon inhibiert dosisabhängig die VIC-Kalzifizierung	75
3.2.2.2	Gewebebasiertes 3D-CAVD-Modell	77
3.2.2.2.1	Pirfenidon inhibiert die Kalzifizierung des AOK-Gewebes.....	77
3.2.2.2.2	Pirfenidon inhibiert die myofibroblastoide VIC-Differenzierung im Kontext der Kalzifizierung des AOK-Gewebes.....	80
3.2.2.2.3	Pirfenidon blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition des BMP-2-SMAD1/5/8- und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs	82
3.3	Das Adiponektin-Rezeptorsystem als neues Target für die Prävention und Therapie der CAVD.....	84
3.3.1	Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems im Verlauf der CAVD-Pathogenese.....	84
3.3.1.1	Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin in humanen AOK-Biopsien ...	84
3.3.1.1.1	Quantifizierung der mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin	84
3.3.1.2	Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.....	87
3.3.2	Wirkung von AdipoRon auf Fibrose und Kalzifizierung im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.....	88
3.3.2.1	Initiale Wirksamkeitsprüfung von AdipoRon in ovinen VICs durch Messung der AMPK-Aktivierung	88
3.3.2.2	Einfluss von AdipoRon auf Fibrose im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.....	90
3.3.2.2.1	AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie	90
3.3.2.2.2	AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Sekretion.....	91
3.3.2.3	Einfluss von AdipoRon auf Kalzifizierung im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.....	92
3.3.2.3.1	AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im zellbasierten 2D-CAVD-Modell	92
3.3.2.3.2	AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell	93
4	Diskussion	97
4.1	TGF- β 1 fördert die Fibrose und inhibiert gleichzeitig die Kalzifizierung von als 3D-CAVD-Modell kultiviertem AOK-Gewebe	97
4.2	Pirfenidon inhibiert umfassend die CAVD-Progression im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell	108

4.3	Trotz Suppression des Adiponektin-Rezeptorsystems im Verlauf der CAVD-Pathogenese bleibt seine <i>in vitro</i> -Adressierung in CAVD-Modellen ohne therapeutischen Effekt	113
5	Literaturverzeichnis.....	117
6	Publikationen	143
7	Eidesstattliche Erklärung.....	145
8	Danksagung	146

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt des Herzens und Position der Herzklappen.	1
Abbildung 2: Aufbau und Organisation der Aortenklappe.	2
Abbildung 3: Entstehung und Progression der CAVD.	4
Abbildung 4: Pathophysiologie der CAVD.	6
Abbildung 5: Entwicklungsprozess vom Target zum Medikament.	8
Abbildung 6: Darstellung der Signalkaskade des TGF- β 1-Signalwegs.	11
Abbildung 7: Strukturformel (A) und Vermarktungsname (B) von Pirfenidon.	14
Abbildung 8: Komponenten und Funktionen des Adiponektin-Rezeptorsystems.	17
Abbildung 9: Molekularer Aufbau und posttranslationale Modifikation von Adiponektin.	19
Abbildung 10: Strukturformel von AdipoRon.	20
Abbildung 11: Progression der CAVD-Pathogenese.	33
Abbildung 12: Übersicht über das 3D-CAVD-Modell mit ovinen Aortenklappentaschen.	38
Abbildung 13: Regulation von SMAD3 und SMAD7 sowie Autoinduktion von TGF- β 1 als Indikatoren einer effektiven TGF- β 1-Signaltransduktion in AOK-Gewebe.	49
Abbildung 14: TGF- β 1 induziert eine fibrotisch nicht-kalzifizierte Morphologie des AOK- Gewebes.	51
Abbildung 15: TGF- β 1 induziert eine fibrotisch nicht-kalzifizierte Mikroanatomie des AOK- Gewebes.	53
Abbildung 16: Fortgeschrittene Kalzifizierung des AOK-Gewebes ist mit dem Zelltod von VICs und der Auflösung der Kollagen Typ I-Struktur der EZM verbunden.	54
Abbildung 17: Fortgeschrittene Fibrose des AOK-Gewebes ist mit Kompaktierung der VICs und Verdichtung der EZM-Kollagenstruktur verbunden.	55
Abbildung 18: TGF- β 1 erhöht die Zelldichte sowie RNA- und Proteingehalte in AOK-Gewebe.	57
Abbildung 19: TGF- β 1 inhibiert Apoptose und stimuliert die Proliferation von VICs in AOK- Gewebe.	58
Abbildung 20: TGF- β 1 induziert die profibrotisch-myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe.	60
Abbildung 21: TGF- β 1 inhibiert die prokalzifizierend-osteoblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe.	62
Abbildung 22: TGF- β 1 blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition der SMAD1/5/8-Aktivierung und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.	64
Abbildung 23: Kollagen Typ I als extrazelluläres Matrixsubstrat moduliert die Wirkung von TGF- β 1 auf die Kalzifizierung isolierter VICs.	66

Abbildung 24: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung.	68
Abbildung 25: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung.	69
Abbildung 26: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung.	70
Abbildung 27: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie.	71
Abbildung 28: Pirfenidon blockiert die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung.	73
Abbildung 29: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung in AOK-Gewebe.	74
Abbildung 30: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe.	75
Abbildung 31: Pirfenidon inhibiert dosisabhängig die VIC-Kalzifizierung.	76
Abbildung 32: Pirfenidon inhibiert die Kalzifizierung des AOK-Gewebes.	78
Abbildung 33: Pirfenidon inhibiert die Kalzifizierung des AOK-Gewebes.	80
Abbildung 34: Pirfenidon inhibiert die myofibroblastoide VIC-Differenzierung im Kontext der Kalzifizierung des AOK-Gewebes.	81
Abbildung 35: Pirfenidon blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition des BMP-2-SMAD1/5/8- und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.	82
Abbildung 36: Quantifizierung der mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin in humanen AOK-Biopsien.	85
Abbildung 37: Die Regulation der Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems während der CAVD-Pathogenese verläuft diabetesunabhängig.	86
Abbildung 38: Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.	88
Abbildung 39: Initiale Wirksamkeitsprüfung von AdipoRon in ovinen VICs durch Messung der AMPK-Aktivierung.	89
Abbildung 40: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie.	91
Abbildung 41: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Sekretion.	92
Abbildung 42: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im zellbasierten 2D-CAVD-Modell.	93
Abbildung 43: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.	95

Abbildung 44: AdipoRon inhibiert nicht den Einbau von kalziumhaltigen Hydroxyapatit in die EZM von ovinem AOK-Gewebe.....96

Abbildung 45: Schematische Übersicht über die Effekte von TGF- β 1 im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.....98

Abbildung 46: Schematische Übersicht über den Mechanismus der SMAD7-vermittelten Interaktion von TGF- β 1- und BMP-2-Signalweg im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell.101

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zellkulturreagenzien.....	25
Tabelle 2: Verwendete Stimulationsagenzien.	26
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper.....	26
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper.....	27
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien.	27
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.....	29
Tabelle 7: Verwendete molekularbiologische Kits.....	30
Tabelle 8: Verwendete Geräte.....	31
Tabelle 9: Patientenkohorte für die Analyse der AOK-Taschen.	35
Tabelle 10: Primersequenzen für die qPCR humaner Gene.	36
Tabelle 11: Primersequenzen für die qPCR oviner Gene.	36
Tabelle 12: Reaktionsansatz sowie Temperatur- und Zeitprofil der qPCR.	37

IV. Abkürzungsverzeichnis

18S	Ribosomale Nukleinsäure 18S
ADR	AdipoRon
ALP	Alkaline Phosphatase
α -SMA	<i>α-Smooth-Muscle-Actin</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
AOK	Aortenklappe
APN	Adiponektin
APPL1	<i>Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, pH domain, and leucine zipper-containing protein 1</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
β -GP	β -Glycerolphosphat
BMP-2	<i>Bone morphogenic protein 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaMKK- β	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CAVD	<i>Calcific Aortic Valve Disease</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
enos	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	<i>et cetera</i>

EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HMW	<i>High molecular weight</i>
HSP47	<i>Heat shock protein 47</i>
IFN- β	Beta-Interferon
IFN- γ	Gamma-Interferon
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LKB1	Leberkinase B1
LMW	<i>Low molecular weight</i>
LP(a)	Lipoprotein (a)
MMP-9	Matrixmetallopeptidase 9
MMW	<i>Medium molecular weight</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
N.S.	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFD	Pirfenidon
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PGC1 α	<i>Proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor κ-B-ligand</i>
RE	Relative Einheit

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPL13A	<i>60S ribosomal protein L13a</i>
RUNX-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMAD	<i>small mothers against decapentaplegic homolog</i>
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation
TBST	<i>Tris-buffered Saline</i> und Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VIC	Valvuläre Interstitialzellen

V. Zusammenfassung

Die *Calcific aortic valve disease* (CAVD) ist die häufigste erworbene Herzklappenerkrankung und durch fortschreitende Fibrose und Kalzifizierung der Aortenklappe charakterisiert. Die CAVD-Progression wird durch die myofibroblastoide und osteoblastoide Differenzierung valvulärer Interstitialzellen (VICs) vorangetrieben. Aufgrund der komplexen Pathogenese ist bislang keine medikamentöse CAVD-Therapie verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden in drei Teilprojekten zum einen mechanistische Aspekte der CAVD-Pathogenese und zum anderen die antifibrotische bzw. antikalzifizierende Wirkung von *Small Molecule Drugs* als potentielle CAVD-Therapeutika untersucht. Dabei standen der TGF- β 1-Signalweg und das Adiponektin-Rezeptorsystem im Fokus der Analysen.

Teilprojekt I: Der Nachweis erhöhter TGF- β 1-Gewebekonzentrationen in stenosierten Aortenklappen (AOK) deutet auf eine wesentliche Beteiligung des Zytokins TGF- β 1 an der CAVD-Pathogenese. Jedoch konnten *in-vitro*-CAVD-Modelle unter Verwendung isolierter VICs bislang keine klaren Hinweise für die genaue Rolle von TGF- β 1 liefern. Unter Verwendung von ovinen AOK-Taschen als gewebebasiertes 3D-CAVD-Modell konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass TGF- β 1 die expressionelle und proliferative Aktivierung sowie die myofibroblastoide Differenzierung der VICs durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD3 intensiviert und so über die verstärkte Sekretion von Kollagen Typ I eine dominante Gewebefibrose auslöst. In diesem Kontext erhöhte TGF- β 1 zudem die VIC-Gehalte an rauem Endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparaten und sekretorischen Vesikeln sowie die VIC-Zelldichte. Gleichzeitig wirkte TGF- β 1 durch Inhibition der Aktivierung von SMAD1/5/8 und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs antiapoptotisch und blockierte die osteoblastoide VIC-Differenzierung. Insgesamt führten diese Effekte zu einer Blockade der Kalzifizierung des AOK-Gewebes und der damit verbundenen Auflösung des Kollagenfasernetzwerks. Stattdessen kam es in Anwesenheit von TGF- β 1 zu einer starken Fibrose des AOK-Gewebes. Diese Daten stellen eine generelle Krankheitsphasen-unabhängige CAVD-fördernde Rolle von TGF- β 1 in Frage.

Teilprojekt II: Das bereits zur Therapie der idiopathischen Lungenfibrose zugelassene *Small Molecule Drug* Pirfenidon wirkt nachweislich antifibrotisch, indem es die TGF- β 1-induzierte Kollagenproduktion, die Synthese von fibrinogenen Zytokinen sowie das fibrotische EZM-Remodelling inhibiert. Diese Mechanismen sind ebenfalls für die

CAVD relevant, weshalb die Wirkung von Pirfenidon auf die CAVD-Pathogenese im VIC-basierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell untersucht wurde. Im Kontext der Fibrose-Entstehung blockierte Pirfenidon konzentrationsabhängig durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung die TGF- β 1-induzierte Hochregulation von Kollagen Typ I sowie die myofibroblastoide VIC-Differenzierung. Es zeigte sich zudem, dass Pirfenidon die Aktivierung sowohl der BMP-2-SMAD1/5/8- als auch der kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalachse inhibiert, die zusammen zur osteoblastoiden VIC-Differenzierung und der damit einhergehenden AOK-Gewebekalzifizierung beitragen. Somit stellt Pirfenidon aufgrund seiner bekannten antifibrotischen und erstmalig in dieser Arbeit nachgewiesenen antikalzifizierenden Effekte einen vielversprechenden Wirkstoffkandidaten für die medikamentöse Therapie der CAVD dar.

Teilprojekt III: Das Adipozytokin Adiponektin und sein ubiquitär exprimiertes Rezeptorsystem (AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin) vermitteln neben protektiven metabolischen und immunmodulatorischen auch antifibrotische und antikalzifizierende Effekte. In früheren Patientenstudien zeigte sich, dass die kardiovaskuläre Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems bei Adipositas und Diabetes Typ 2 als CAVD-Risikofaktoren supprimiert ist und der Schweregrad einer AOK-Stenose negativ mit den Adiponektin-Plasmakonzentrationen korreliert. Daher wurde in dieser Arbeit zum einen die expressionelle Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems während der klinischen CAVD-Pathogenese und darüber hinaus *in vitro* Effekte des Adiponektin-Rezeptoragonisten AdipoRon auf Fibrose und Kalzifizierung in 2D- und 3D-CAVD-Modellen analysiert. Bei der Expressionsanalyse des Adiponektin-Rezeptorsystems in humanen AOK zeigte sich mit fortschreitender CAVD-Pathogenese – unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes Typ 2 als metabolischer Komorbidität – eine zunehmende Suppression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin. *In vitro* konnte jedoch nur im 3D-CAVD-Modell und ausschließlich für AdipoR2 eine Herabregulation der Expression in fibrotischen und kalzifizierten AOK-Taschen beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich weder im 2D- noch im 3D-CAVD-Modell eine Wirkung von AdipoRon auf die TGF- β 1-induzierte profibrotische Expression von Kollagen Typ I bzw. osteoblastoide VIC-Differenzierung und Hydroxyapatit-Akkumulation unter prokalzifizierenden Kulturbedingungen. Damit bleibt trotz Suppression des Adiponektin-Rezeptorsystems im klinischen Verlauf der CAVD seine aktivierende Adressierung in *in vitro*-CAVD-Modellen ohne therapeutische Effekte.

VI. Abstract

Calcific aortic valve disease (CAVD) is the most frequent acquired heart valve disease and is characterized by progressive valvular fibrosis and calcification. CAVD progression is driven by myofibrotic and osteoblastic differentiation of valvular interstitial cells (VICs). However, because of its complex pathogenesis there is currently no drug-based CAVD therapy available. In the present thesis mechanistic aspects of CAVD pathogenesis as well as anti-fibrotic and anti-calcific effects of small molecule drugs as potential CAVD therapeutics were investigated in three subprojects, with focusing the TGF- β 1 signaling pathway and the adiponectin receptor system.

Subproject I: Expression data from patient biopsies suggest that TGF- β 1 is implicated in CAVD pathogenesis. However, CAVD models using isolated VICs failed to deliver clear evidence on the role of TGF- β 1. Employing cultures of aortic valve leaflets in a tissue-based three-dimensional (3-D) CAVD model, we could show that TGF- β 1 intensifies expressional and proliferative activation along with myofibroblastic differentiation of VICs thus triggering dominant fibrosis through activation of transcription factor SMAD3 and increased secretion of collagen type I. In this context TGF- β 1 increased VIC contents of rough endoplasmatic reticulum, Golgi apparatus and secretory vesicles as well as VIC density. Simultaneously, by inhibiting SMAD1/5/8 activation and canonical Wnt/ β -catenin signaling TGF- β 1 acts anti-apoptotic and attenuates osteoblastic VIC differentiation thus blocking valvular tissue calcification and associated disintegration of collagen fibers. Instead, TGF- β 1 induced development of fibrosis. These findings question a general disease phase-independent CAVD-promoting role of TGF- β 1.

Subproject II: Pirfenidone is a small molecule drug with well-known anti-fibrotic impact, which is approved for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Its anti-fibrotic effects are attributed to inhibiting TGF- β 1-induced collagen production, synthesis of fibrinogenic cytokines and fibrotic ECM remodelling. As these mechanisms are also relevant for CAVD, effects of pirfenidone on CAVD pathogenesis were investigated in VIC-based 2-D and tissue-based 3-D CAVD models. With regard to emergence of fibrosis pirfenidone dose-dependently attenuated the TGF- β 1-induced upregulation of collagen type I expression and myofibroblastic VIC differentiation by inhibiting the activation of transcription factor SMAD3. Furthermore pirfenidone inhibited the activation of the BMP-2-SMAD1/5/8 as well as canonical Wnt/ β -catenin signaling,

which both contribute to osteoblastic VIC differentiation and associated valvular calcification. Thus, due to its anti-fibrotic and – first time shown in this thesis – anti-calcific effects pirfenidone is a promising candidate for the drug-based treatment of CAVD.

Subproject III: The adipocytokine adiponectin and its ubiquitously expressed receptor system (AdipoR1, AdipoR2 and T-Cadherin) mediates protective metabolic and immunomodulatory effects as well as anti-fibrotic and anti-calcific effects. Moreover, previous patient studies revealed that cardiovascular expression of the adiponectin receptor system is suppressed in the context of CAVD risk factors obesity and diabetes type 2, while in patients suffering from aortic stenosis adiponectin plasma levels have been shown to correlate inversely with disease severity. Thus, regulation of adiponectin receptors during clinical CAVD pathogenesis as well as *in vitro*-effects of addressing the adiponectin receptor system with the receptor agonist AdipoRon on CAVD progression were evaluated in 2-D and 3-D CAVD models. Expression levels of AdipoR1, AdipoR2 and T-Cadherin were increasingly diminished in calcified aortic valves compared to their normal counterparts and tended to decrease with proceeding CAVD pathogenesis, which was independent of diabetes type 2 as metabolic comorbidity. However, *in vitro* only a downregulation of AdipoR2 expression could be demonstrated in fibrotic and calcific aortic valve leaflets in the tissue-based 3-D CAVD model. In 2-D and 3-D CAVD models AdipoRon neither inhibited the TGF- β 1-induced synthesis of the ECM component collagen type I nor the procalcific culture-induced osteoblastic VIC differentiation and the associated hydroxyapatite accumulation. Overall, these results demonstrate that despite suppression of the adiponectin receptor system during clinical CAVD pathogenesis, *in vitro*-targeting of the receptor system in CAVD models has no disease-modifying effects.

1 Einleitung

1.1 Die Aortenklappe

1.1.1 Entwicklung und Lage der Aortenklappe

Die Entwicklung der vier Herzklappen beginnt bereits im frühen Embryonalalter. So wird die Valvulogenese durch Einfalten des Endokards in der 5. - 7. Lebenswoche des Embryos ausgelöst [1], [2]. Der dreischichtige Aufbau der Herzklappen wird erst im späten Stadium der Embryonalentwicklung angelegt. In diversen Studien wurde gezeigt, dass die Signalwege der Valvulogenese auch bei der Gewebedegeneration adulter Herzklappen eine Rolle spielen [3].

Die Herzklappen ermöglichen den unidirektionalen Blutfluss durch Herz und Körper, wobei man aufgrund ihrer Position und ihrer strukturellen Anatomie zwischen Segelklappen (Atrioventrikularklappen) und Taschenklappen (Semilunarklappen) unterscheiden kann [4]. Die beiden Segelklappen verbinden die Atrien mit den Ventrikeln und werden als Mitralklappe (linke Herzhälfte) und Trikuspidalklappe (rechte Herzhälfte) bezeichnet (Abbildung 1). Die Taschenklappen sind zwischen den Ventrikeln und den ableitenden Gefäßen des Herzens lokalisiert. Aorta und linke Herzhälfte werden durch die Aortenklappe (AOK), und Pulmonalarterie und rechte Herzhälfte durch die Pulmonalklappe verbunden.

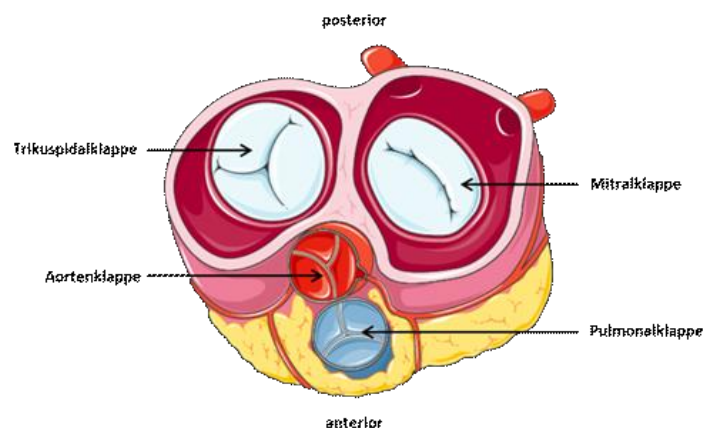


Abbildung 1: Querschnitt des Herzens und Position der Herzklappen. Die vier Herzklappen ermöglichen den unidirektionalen Blutfluss während der Herzkontraktion. Dabei regeln Pulmonal- und Trikuspidalklappe den Blutfluss im Lungenkreislauf und Aorten- und Mitralklappe den Blutfluss im Körperkreislauf.

1.1.2 Anatomie und Physiologie der Aortenklappe

Die gesunde AOK regelt den Blutfluss vom linken Ventrikel zur Aorta und öffnet bzw. schließt sich mit jedem Herzschlag etwa 100.000 mal pro Tag [5]. Die AOK und die Pulmonalklappe sind trikuspid und setzen sich aus drei halbmondförmigen Taschen (*Valvulae semilunares*) zusammen. Steigt der Druck in den ableitenden Gefäßen (Aorta und Pulmonalarterie) öffnen sich die Klappen. Mit abfallendem Druck im Ventrikel am Ende der ventrikulären Systole schließen sie sich wieder [6].

Die trikuspiden AOK-Taschen sind in verschiedene Schichten gegliedert, welche sich durch ihre distinkte Struktur und Funktion unterscheiden. Von der Aorten- zur Ventrikelseite bezeichnet man die drei Schichten als Fibrosa, Spongiosa und Ventricularis [7]. Die Oberfläche der Taschen umgibt eine Endothelzellschicht, welche mit der darunterliegenden Schicht aus valvulären Interstitialzellen (VICs) interagiert [8]. Die extrazelluläre Matrix (EZM) der Fibrosa zeichnet sich durch ihre dichte Durchsetzung mit Kollagenfibrillen aus, woraus sich die straffe äußere Beschaffenheit der AOK-Tasche ergibt. Die Spongiosa enthält eine lose Matrix aus Proteoglykanen und fungiert als Pufferung während der Taschenbewegung zwischen den äußeren beiden Schichten. Die Ventricularis besteht aus radial angeordnetem Elastin, welches die Flexibilität der Taschen beim Öffnen und Schließen der Klappe gewährleistet (Abbildung 2) [8], [9]. VICs sind der Hauptzelltyp der AOK, in Kooperation mit den Endothelzellen regulieren sie in allen drei Schichten die Homöostase und Integrität der Klappentaschen.

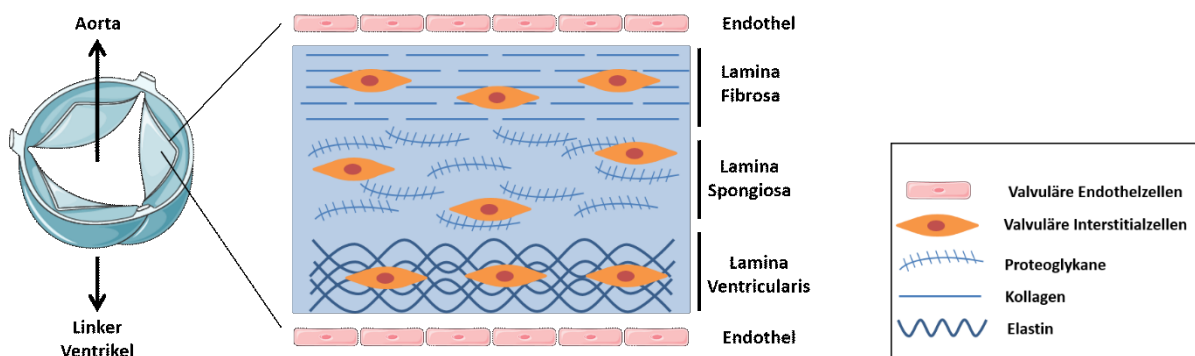


Abbildung 2: Aufbau und Organisation der Aortenklappe. Die drei Taschen der Aortenklappe sind in drei Schichten (Fibrosa, Spongiosa und Ventricularis) organisiert, welche nach außen von einer Endothelzellschicht begrenzt sind. Die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix variiert innerhalb der Schichten, wobei die valvulären Interstitialzellen in allen drei Schichten zu finden sind (Modifiziert nach [8]).

Die AOK-Tasche ist aufgrund ihrer Lokalisation zwischen der Aorta und dem linken Ventrikel hohen Druckbelastungen und mechanischem Scherstress ausgesetzt, da sich mit jedem Herzschlag die Taschen stark dehnen und durch den Blutfluss pulsatile und oszillierende Scherkräfte auf die Oberfläche der Klappe einwirken [10]. Um diesen enormen Belastungen standhalten zu können, weisen die Taschen eine funktionsspezifische Struktur und Zusammensetzung aus verschiedenen Zelltypen sowie EZM-Molekülen auf.

Eine gesunde, morphologisch unveränderte AOK-Tasche ist transparent und nicht vaskularisiert, sodass die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung allein durch Diffusion gewährleistet wird [11]. Die Degeneration der AOK resultiert im Wesentlichen aus dem Umbau der EZM und dem Zerfall der Gewebestruktur, was progressiv letztendlich zum Funktionsverlust der AOK führt [12]. Hierbei können zwei Arten von Funktionsstörungen unterschieden werden. Bei der AOK-Insuffizienz kommt es durch den unvollständigen Verschluss der Klappe zum Rückfluss des Blutes in den linken Ventrikel. Die AOK-Stenose hingegen ist durch eine Verengung der Klappenöffnung gekennzeichnet, was zu einem Blutrückstau vor der Klappe sowie einer verminderten Ejektionsfraktion führt [13]. Beide Klappenvitien können auch kombiniert auftreten. Mit einer Prävalenz von 0,4 % der Gesamtbevölkerung und immerhin 1,7 % bzw. 3 % der Menschen über 65 bzw. 75 Jahren ist die AOK-Stenose das dritthäufigste kardiovaskuläre Krankheitsbild in westlichen Industrieländern [14]. Darüber hinaus wird in den nächsten 25 Jahren mit einer Verdoppelung der Prävalenz der AOK-Stenose bzw. *Calcific Aortic Valve Disease* (CAVD) gerechnet [15]. Aufgrund seiner komplexen Pathogenese ist derzeit jedoch keine medikamentöse CAVD-Therapie verfügbar [5]. Der Ersatz stenotischer AOK über eine chirurgische Operation oder eine Transkatheter-Implantation ist die einzig wirksame therapeutische Option [16], [17]. So gab es allein in Deutschland im Jahr 2018 34.915 Ersatzoperationen für stenotische AOK [18].

1.2 *Calcific Aortic Valve Disease* (CAVD)

1.2.1 Pathogenese und Epidemiologie der CAVD

Als eine der häufigsten Herzerkrankungen in westlichen Industrieländern zeichnet sich die CAVD durch einen progressiven Verlauf aus, der von leichten fibrotischen

Verdickungen ohne Beeinträchtigung des Blutstroms (AOK-Sklerose) bis hin zur starken Kalzifizierung mit massiver Einschränkung der Beweglichkeit der Klappentaschen (AOK-Stenose) reichen kann [19]. Die AOK-Stenose wurde zuerst durch Lazare Riviere im Jahre 1663 beschrieben [19]. Anfang der 1900er Jahre wurde die CAVD unter anderem durch Monckeberg als passiver degenerativer Prozess deklariert, der mit rheumatischem Fieber oder Alterungsprozessen verbunden ist und bei dem Serum-Kalzium an die Klappenoberfläche gelangt und als Knötchen an die Taschen bindet [20], [21]. Heutzutage wird die CAVD als aktiver Prozess mit einer progressiven Kaskade aus zellulären Veränderungen beschrieben, die zu fibrotischen Verdickungen und schließlich zu einer intensiven Kalzifizierung der Taschen führen [22]. Zunehmendes Alter, männliches Geschlecht, Bluthochdruck und verschiedene genetische Veranlagungen wurden als starke CAVD-Risikofaktoren identifiziert [8], [24] (Abbildung 3). Darüber hinaus steigern erhöhte Plasmaspiegel von Glukose, Lipiden und entzündungsfördernden Mediatoren, die mit Stoffwechselstörungen wie Adipositas, Diabetes Typ 2 und dem metabolischem Syndrom assoziiert sind, das Risiko an CAVD zu erkranken, weiter [24].

VIC-Differenzierungsprozesse spielen eine essentielle Rolle bei der CAVD-Progression. Verschiedene VIC-Phänotypen können im Verlauf der CAVD-Pathogenese identifiziert werden, d.h. die ursprüngliche Fibroblasten-ähnlichen quieszenten VICs differenzieren zu aktivierten Myofibroblasten bzw. Osteoblasten, welche die Entwicklung von Fibrose bzw. Kalzifizierung vermitteln [25].

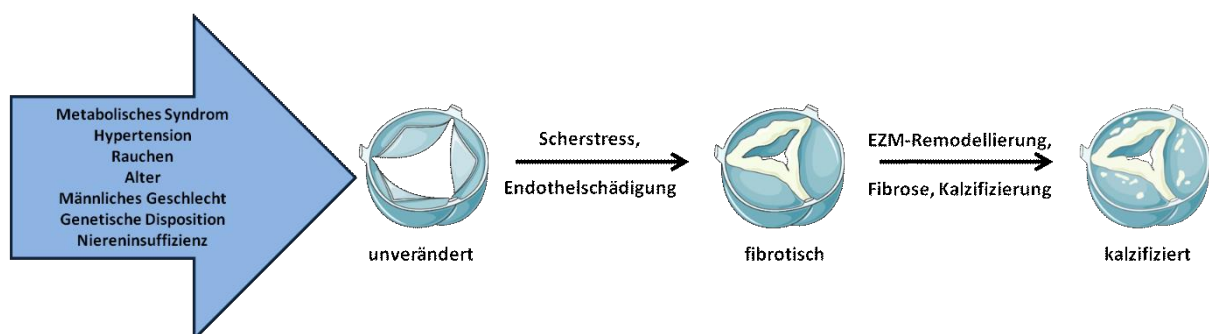


Abbildung 3: Entstehung und Progression der CAVD. Die CAVD ist eine Erkrankung der AOK mit progressivem Verlauf. Zu den potentiellen Risikofaktoren ihrer Entstehung zählen das metabolische Syndrom, Bluthochdruck, Rauchen, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht, Niereninsuffizienz sowie genetische Dispositionen. Aus gesunden, unveränderten AOK-Taschen geht zunächst durch Schersstress und Endothelschäden ein fibrotischer Phänotyp der AOK-Taschen hervor. Durch fortschreitende Fibrose und EZM-Remodellierung resultiert schließlich ein kalzifizierter Phänotyp der AOK-Taschen (Modifiziert nach [8]).

Mechanistisch gesehen, resultiert die CAVD aus einem aktiven entzündlichen und fibrokalzifizierenden Prozess (Abbildung 4). Eine Verletzung der äußeren Endothelzellschicht durch mechanischen Stress, Lipidderivate oder Zytokine löst die Pathogenese der CAVD aus, indem die Infiltration von Lipoproteinen wie dem *low density lipoprotein* (LDL) und dem Lipoprotein (a) (LP(a)) ermöglicht wird [22], [26]. Nach ihrer oxidativen Modifikation innerhalb der AOK werden LDL und LP(a) zytotoxisch und lösen intensive Entzündungsreaktionen aus, die zur Infiltration von Makrophagen und T-Zellen sowie zur wesentlichen Freisetzung von proinflammatorischen und profibrotischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β und *transforming growth factor* (TGF)- β führen [27], [28]. Auf diese Weise wird die Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen VICs zu Myofibroblasten induziert, die zunehmend Kollagen produzieren und absondern, was im Zusammenhang mit erhöhten zirkulierenden Angiotensin-II-Konzentrationen weiter verstärkt wird. Zusammen mit gleichzeitig auftretenden Änderungen der Aktivitätsmuster von Matrixmetalloproteinasen induzieren diese Prozesse eine fibrotische Remodellierung, d.h. eine Verdickung und Versteifung des AOK-Gewebes [23]. Die frühe Mikrokalzifizierung der AOK wird durch die durch infiltrierte Makrophagen-induzierte Sekretion von Mikrovesikeln ausgelöst, die entzündungsfördernde Zytokine und Kalziummineralkeime enthalten [7]. Die Mikrokalzifizierung wird durch die Differenzierung von Myofibroblasten zu Osteoblasten in einer anhaltenden proinflammatorischen und profibrotischen Klappenmikroumgebung verstärkt. Dieser Prozess wird durch prokalzifizierende Faktoren wie TNF- α , Osteoprotegerin (OPG), *receptor activator of nuclear factor κ -B-ligand* (RANKL), *Runt-related transcription factor 2* (RUNX-2) und Wnt3 vermittelt [9], [29], [30]. Osteoblasten tragen zur Kalzifizierung der AOK-Taschen bei, indem sie große Mengen proosteogener Faktoren wie Osteocalcin, *bone morphogenic protein* (BMP)-2 und alkalischer Phosphatase (ALP) freisetzen [31].

Dieser Umbau der AOK-Struktur ist ein progressiver Prozess und hat die Einlagerung von Kalziumkristallen zur Folge, was seinerseits wiederum zu mechanischem Stress und inflammatorischen Prozessen führt, welche die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der VICs weiter anregen. Schließlich wird ein Kreislauf aus aktivierten VICs, Inflammation und Kalzifizierung in Gang gesetzt, der eine klinische Therapie der CAVD erfordert [26], [32].

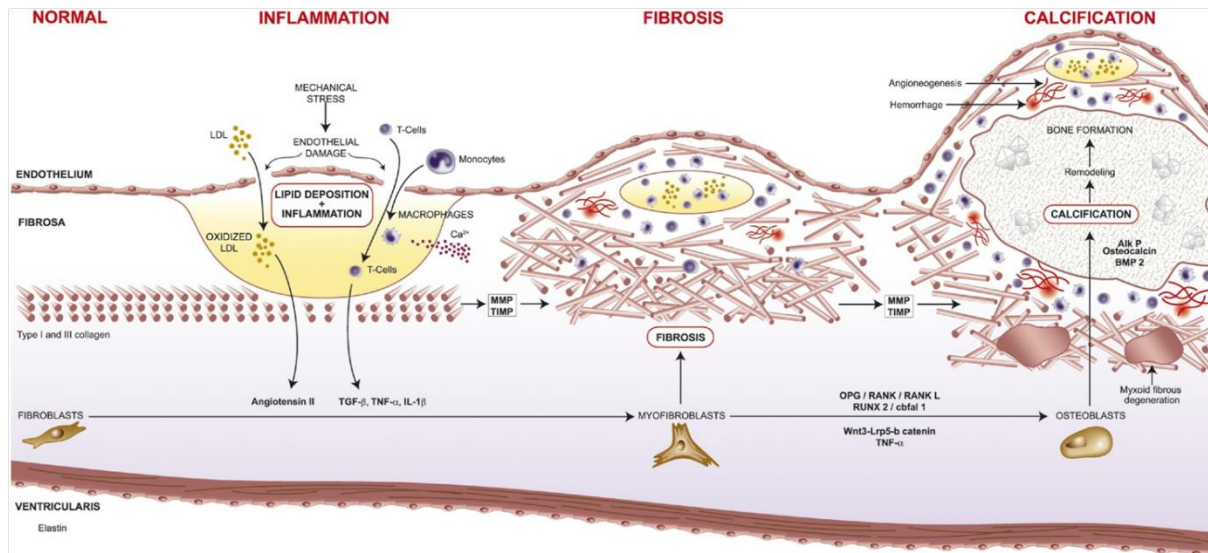


Abbildung 4: Pathophysiologie der CAVD. Die CAVD resultiert aus einer komplexen mehrstufigen Pathogenese. Histopathologische und klinische Daten zeigen, dass CAVD ein aktiver und vielfältiger Prozess ist, der die Ablagerung und Akkumulation von Lipoproteinen, chronische Entzündung, die osteoblastoide Differenzierung von valvulären Interstitialzellen sowie die Fibrose und Kalzifizierung der AOK-Taschen umfasst (Modifiziert nach [31]).

1.2.2 Therapie der CAVD

Bei Patienten mit einer leichten AOK-Stenose, wird eine konservative, nicht-invasive Therapie im Zuge von Verlaufskontrollen gewählt. In diesem Stadium werden in erster Linie die Begleiterkrankungen der AOK-Stenose, wie beispielsweise ein erhöhter Blutdruck oder die beginnende Herzinsuffizienz medikamentös mit ACE-Hemmern, Diuretika etc. behandelt. Bei weiterer Progression der CAVD kommt es zu einer zunehmenden Verengung der AOK-Öffnungsfläche, woraus eine Symptomatik der Patienten mit auftretenden Synkopen, anstrengungsbedingte Dyspnoe bis hin zur *Angina pectoris* resultiert, die einen invasiven Ersatz der AOK erfordern [33]. Ohne adäquate Therapie kann die AOK-Stenose zu einer Herzinsuffizienz und zum plötzlichen Herztod führen. Ohne operative Therapie liegt die durchschnittliche Überlebensrate bei 50 % nach 2 Jahren bzw. 20 % nach 5 Jahren [34].

Der operative Klappenersatz erfolgt durch eine Klappenprothese und kann entweder durch mechanische oder biologische Klappenprothesen erfolgen. Mechanische Klappenprothesen bestehen aus einem langlebigen widerstandsfähigen Material, wie Carbon oder Titan und zeichnen sich durch ihre lange Haltbarkeit von mehreren Jahrzehnten aus [35], [36]. Nachteil der mechanischen Klappenprothese ist die Notwendigkeit einer lebenslangen Antikoagulation [37]. Alternativ zu den

mechanischen Klappenprothesen werden biologische Klappenprothesen eingesetzt. Da sie aus humanem oder tierischem Gewebe bestehen, wird hier keine Antikoagulation benötigt. Aufgrund ihres biologischen Materials unterliegen diese Klappenprothesen, ähnlich wie die nativen Aortenklappen, degenerativen Prozessen und verfügen daher nur über eine Haltbarkeit von etwa 10 bis 15 Jahren [38]. Jedoch eignen sich nicht alle Patienten für den operativen Klappenersatz am offenen Herzen unter Einsatz einer Herzlungenmaschine. Hierzu zählen vor allem Patienten in einem höheren Alter, mit fortgeschrittener linksventrikulärer Dysfunktion sowie mit relevanten Begleiterkrankungen. Für diese Patienten kommt eine Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) infrage. Die TAVI-Prothese soll im Vergleich zum offenen operativen AOK-Ersatz das Risiko und die Morbidität sowie die Rekonvaleszenzdauer und die postoperativen Komplikationen der Patienten minimieren [39], [40].

Aufgrund der komplexen Pathogenese der CAVD sind die medikamentösen Therapieoptionen deutlich begrenzt. So wurde die Wirkung von Statinen, die üblicherweise zur Behandlung hoher Cholesterinspiegel eingesetzt werden, in verschiedenen randomisierten Studien mit hohen Fallzahlen in Bezug auf eine potentielle Verzögerung der Progression der AOK-Stenose getestet [41]. Diese Theorie wurde jedoch für alle Studien widerlegt und es konnten keinen inhibierenden Effekte auf die Progression der Krankheit nachgewiesen werden [42]–[45]. So bleibt momentan als einzige Therapieoption der klappenprothetische Ersatz der stenosierten AOK.

1.3 Targetidentifizierung und Wirkstoffdesign als initiale Schritte der Medikamentenentwicklung

1.3.1 Identifizierung von Targets

Die weltweit stetige Zunahme von chronischen Erkrankungen, Infektionskrankheiten aber auch kardiovaskulären Ereignissen lässt einen hohen Bedarf an neuen innovativen Wirkstoffen bestehen. Am Anfang des Prozesses der Arzneimittelentwicklung steht die Suche nach einem Angriffspunkt (Target), an dem das neue Medikament ansetzen kann (Abbildung 5). Bei dieser Suche stehen die Signalwege der Zellen im Fokus, da sie Hinweise auf dysregulierte biochemische Prozesse und damit den Ursprung der Krankheit liefern können [46]. Meistens handelt

es sich bei potentiellen Targets um Rezeptoren oder Enzyme, die zelluläre Bindungsstellen für Botenstoffe liefern bzw. die chemische Umwandlung von Stoffen katalysieren [47]. Arzneimittel können auf zweierlei Weisen auf diese Angriffspunkte wirken. Entweder blockieren bzw. deaktivieren sie diese Proteine oder sie verstärken deren Funktion [48]. Diese Proteine, die potentiell Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen, lassen sich über Microarrays identifizieren. Mittels RNA-Interferenz werden die möglichen Zielproteine deaktiviert und analysiert, ob sich die krankheitsspezifischen Prozesse auf Zellebene ändern. Ist dies der Fall, kommt das blockierte Protein als Angriffsziel für ein Medikament in Betracht [49].

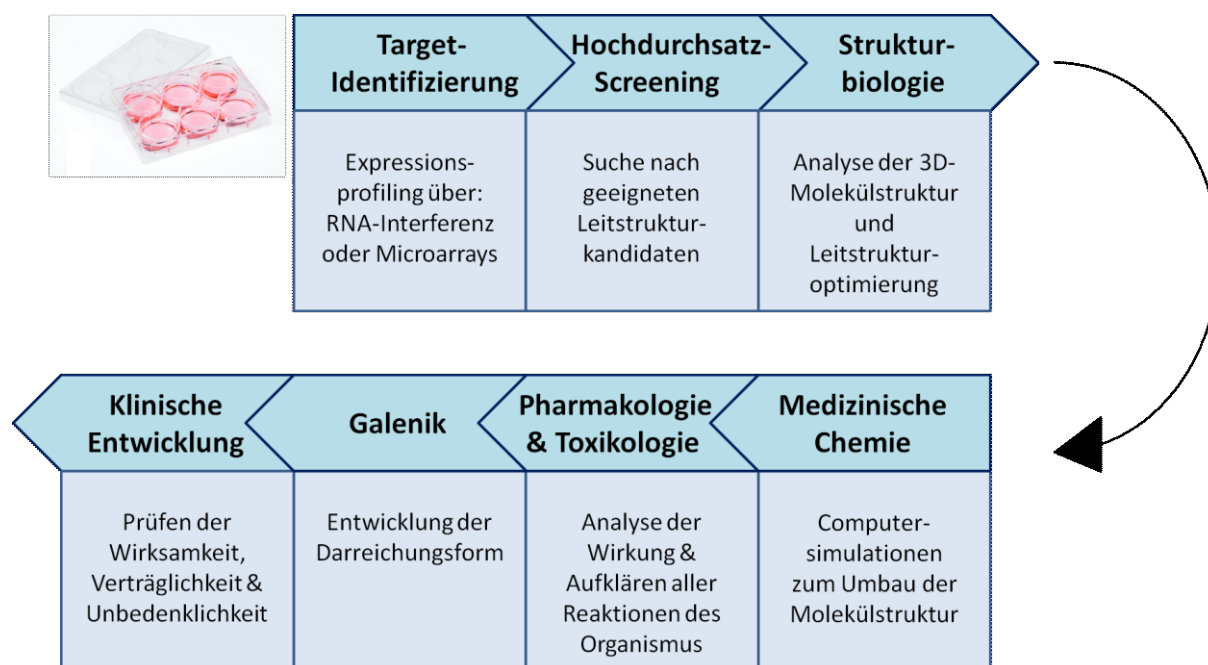


Abbildung 5: Entwicklungsprozess vom Target zum Medikament. Die Entwicklung eines neuen Medikaments ist ein vielstufiger Prozess, der mit der Identifizierung eines potentiellen therapeutischen Targets für die relevante Krankheit beginnt. Nach der Identifizierung des Targets werden seine adressierenden Wirkstoffe identifiziert. Dies erfolgt mittels Hochdurchsatzscreenings und strukturbiochemischen Analysen, bei denen geeignete Leitstrukturkandidaten gesucht und optimiert werden. Die Aufgabe der medizinischen Chemie besteht darin, die Molekülstruktur zu modifizieren und die Wirkungsweise der Leitstruktur zu optimieren, damit der Wirkstoffkandidat in pharmakologischen und toxikologischen Analysen weiter getestet werden kann. Im darauffolgenden Arbeitsschritt der Galenik wird für das potentielle Medikament eine geeignete Darreichungsform entwickelt. In anschließenden klinischen Entwicklungen werden dann mit Hilfe von Computersimulationen (*in silico*), Zellkulturstudien (*in vitro*) und Tiermodellen (*in vivo*) die Wirksamkeit, Verträglichkeit sowie die Unbedenklichkeit analysiert. Ein optimales Target sollte wirksam und sicher sein sowie die klinischen und kommerziellen Anforderungen erfüllen.

1.3.2 Das targetbasierte Design von Wirkstoffen

Ist ein Target erfolgreich identifiziert, werden im nächsten Schritt Leitstrukturen, d.h. Substanzen, die als Ausgangsbasis für einen neuen therapeutischen Wirkstoff dienen, gesucht [50]. In einem Hochdurchsatzscreening werden mit kleinsten Substanzmengen viele tausend chemische Verbindungen aus einer Wirkstoffbibliothek nach geeigneten Leitstrukturkandidaten gesucht [49]. Zur Analyse der mit der Anlagerung einer Substanz einhergehenden Wirkung auf das Target werden fluoreszenzbasierte Nachweisverfahren genutzt. In Verdünnungsreihen werden die Wirkstärken der potentiellen Verbindungen getestet [50]. Wirkstarke Kandidaten werden in der computerbasierten Chemie auf weitere zu den Bindetaschen der Targetproteine passende Strukturen untersucht [46].

Für die im nächsten Schritt stattfindende Leitstrukturoptimierung wird durch Computerberechnungen vorausgesagt, welche molekulare Substanzveränderung die Bindungsfähigkeit an das Target verbessert, aber auch welche biophysikalischen oder toxischen Folgen die Strukturveränderung haben könnte [48], [50]. In der medizinischen Chemie wird das Molekülgerüst der Leitstrukturkandidaten systematisch umgebaut und verschiedene chemische Gruppen entfernt oder angebaut, um Nebenwirkungen ausschließen zu können [46]. Außerdem wird gewährleistet, dass die Leitstruktur nicht abgebaut wird, bevor sie ihre Wirkung entfalten kann und dass sie wasserlöslich ist, damit sie überhaupt in den Körper gelangt [47].

1.3.3 Präklinische und klinische Testung von Wirkstoffen

Die präklinische Entwicklung wird von der Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt, mit dem Ziel alle physiologischen sowie toxischen Effekte des Wirkstoffs aufzuklären. Dabei stehen drei Vorgehensweisen zur Verfügung: Anhand von Computerprogrammen (*in silico*) werden physiologische Prozesse simuliert, um ungeeignete Kandidaten auszuschließen. In *in vitro*-Versuchen wird der Wirkstoff dann in Zell- oder Gewebekulturen oder Bakterien getestet. In Tierversuchen (*in vivo*) wird die Wirkung der Substanz in einem komplexen Gesamtorganismus erfasst [46], [48]. Im Verfahren der Galenik wird aus dem Wirkstoff ein dosierfähiges, sicheres und

gebrauchsfertiges Produkt gemacht [46]. Die Verträglichkeit und Wirkung des potentiellen Arzneimittels wird schließlich in den klinischen Studien an humanen Probanden getestet, was über die finale Zulassung des Wirkstoffs als Medikament entscheidet [47], [50].

1.4 Der TGF- β 1-Signalweg

1.4.1 Komponenten und Aktivierung

Der TGF- β 1-Signalweg spielt in vielen Prozessen, wie der Kontrolle von zellulären Funktionen, der Embryonalentwicklung sowie der Gewebemöostase eine koordinative und regulatorische Rolle. Die TGF- β -Familie umfasst unter anderem Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, *bone morphogenic proteins* (BMPs) sowie Aktivin/Inhibin, welche durch Bindung an spezifische Transmembranrezeptoren die Expression von zugehörigen Zielgenen modulieren. Diese Zytokine spielen beim Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Apoptose, EZM-Produktion, Immunantwort sowie bei der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle [51], [52].

Hauptkomponenten des TGF- β 1-Signalwegs sind die beiden Rezeptor-Serin/Threonin-Proteinkinasen (Rezeptor I und II) sowie die Rezeptorsubstrate, welche von den SMAD (*small mothers against decapentaplegic homolog*)-Proteinen gebildet werden und in den Zellkern translozieren. Der Ligand bildet zusammen mit dem Rezeptor einen Komplex, der die SMADs aktiviert und diese dann Heterodimere bilden, welche die Transkription regulieren [53] (Abbildung 6).

Im basalen Zustand drückt die, nach ihrer Basensequenz aus Glycin und Serin benannte, GS-Region des Rezeptors I gegen die Kinasedomäne, wodurch es zu einer Verschiebung des katalytischen Zentrums kommt [54]. Nach Komplexbildung mit Liganden wie TGF- β 1, BMP-2 oder Aktivin/Inhibin wird die GS-Region durch den Rezeptor II autophosphoryliert, was schließlich in der Aktivierung der Rezeptor I-Kinase resultiert. Diese Kinase phosphoryliert daraufhin die Rezeptor-assoziierten SMAD-Moleküle (SMAD2/3 im TGF- β 1/Aktivin-Signalweg und SMAD1/5/8 im BMP-Signalweg).

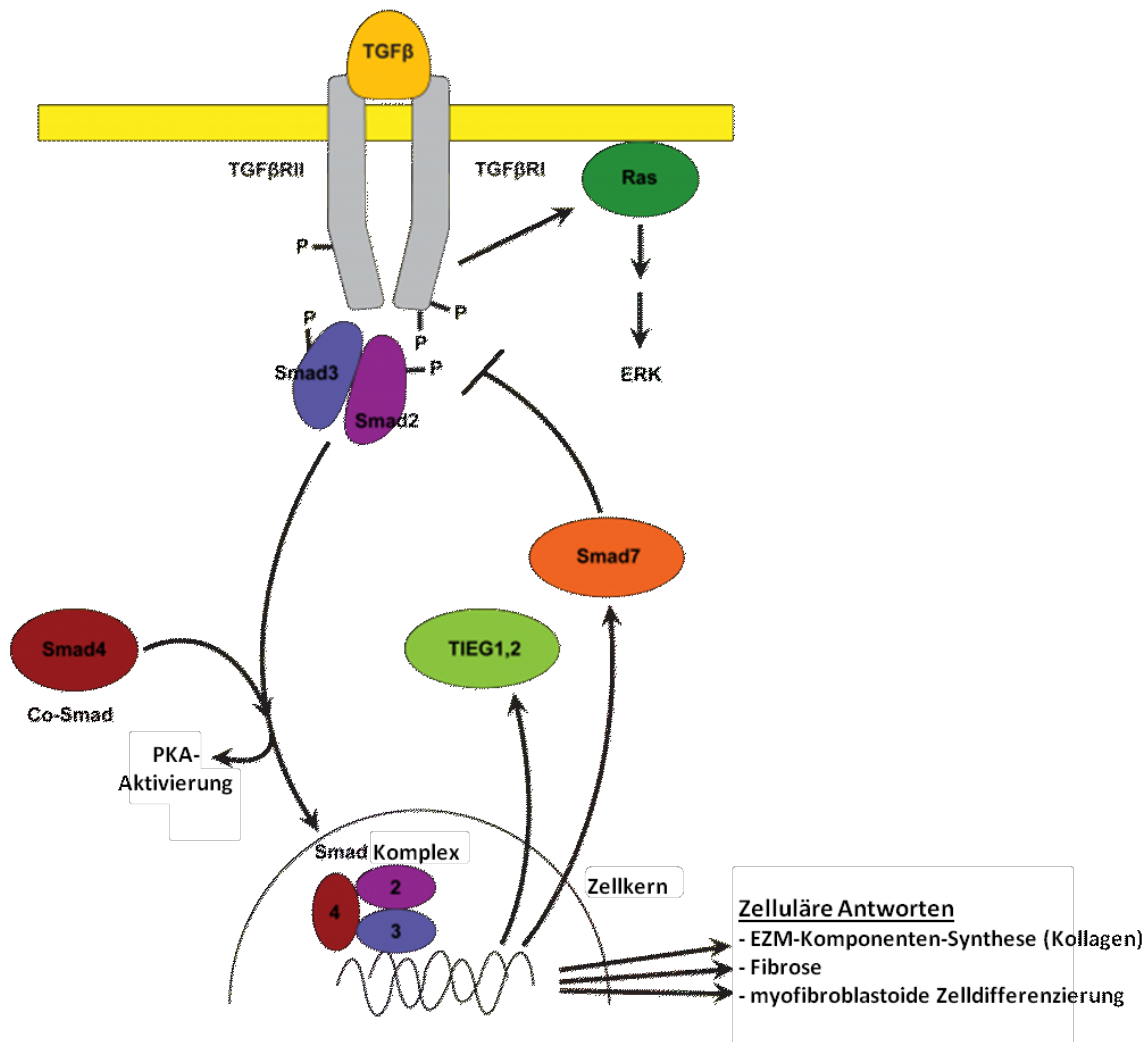


Abbildung 6: Darstellung der Signalkaskade des TGF- β 1-Signalwegs. Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt durch Liganden-induzierte Oligomerisierung der Rezeptor-Serin/Threoninkinasen (RI und RII) und anschließenden Phosphorylierung der zytosomatischen SMAD-Signalmoleküle (SMAD2 und SMAD3). Nach Phosphorylierung der SMAD-Moleküle kommt es zur Heterodimerbildung mit dem Co-SMAD (SMAD4) und zur Translokation in den Zellkern. Die jeweiligen Zielgene werden durch Assoziation des SMAD-Komplexes mit den spezifischen DNA-bindenden Cofaktoren transkribiert und es erfolgt die Transkription von mRNAs, die an unzähligen Prozessen, wie der Synthese von EZM-Komponenten, der myofibroblastoiden Differenzierung von Fibroblasten oder der Entstehung von Fibrose, beteiligt sind (Modifiziert nach [55]).

Die Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung der sogenannten R-SMADs erfolgt am carboxyterminalen Ende und erlaubt ihre Translokation in den Zellkern. Auf dem Weg in den Zellkern kommt es zur Ausbildung eines heteromeren Komplexes der aktivierten R-SMADs mit SMAD4. SMAD4 wird als Co-SMAD klassifiziert, da es selbst kein Rezeptorsubstrat darstellt, für die Induktion der Zielgentranskription aber essentiell ist. Die R-SMADs und Co-SMADs sind jeweils aus einer konservierten amino- und carboxyterminalen Domäne aufgebaut, zwischen denen sich eine Verbindungsregion mit vielen regulatorischen Stellen befindet. Die aminoterminal Domäne besitzt die

Fähigkeit DNA zu binden, wohingegen die carboxyterminale Domäne transkriptionale Aktivität besitzt [56]. Im Zellkern kommt es durch rezeptorvermittelte Phosphorylierung zur Aktivierung dieser beiden Domänen. Nach Assoziation des SMAD-Komplexes mit spezifischen Cofaktoren und Bindung an die DNA, erfolgt die Transkription der Zielgene [57].

Um als intrazelluläre Mediatoren im TGF- β 1-Signalweg wirken zu können, müssen die SMADs in Kontakt mit den Rezeptoren treten, die Phosphorylierung durchlaufen, aktivierte Komplexe bilden und in den Zellkern akkumulieren. Neben diesen R-SMADs und Co-SMADs gibt es eine dritte SMAD-Gruppe, die antagonistisch wirkt und die TGF- β 1-Signalübertragung hemmt. Dieser Gruppe gehören in Vertebraten SMAD6 und SMAD7 an. Diese inhibitorischen SMADs vermitteln eine negative Rückkopplung im TGF- β 1-Signalweg und setzen andere regulatorischen Impulse in Gang [58]. SMAD7 inhibiert die Phosphorylierung der R-SMADs indem es die intrazelluläre Domäne des Rezeptors I blockiert [59],[60]. Im basalen Zustand ist SMAD7 im Zellkern lokalisiert und wandert nach TGF- β 1-Stimulus ins Zytoplasma [61]. SMAD6 hingegen inhibiert ausschließlich den BMP-Signalweg, indem es die Phosphorylierung des R-SMADs SMAD1 verhindert [62], [63].

1.4.2 Liganden und Modulatoren

1.4.2.1 Das Zytokin TGF- β 1

Transforming growth factor 1 (TGF- β 1) ist eine von drei Isoformen des Zytokins TGF- β und gehört der Familie der multifunktionellen Wachstumsfaktoren an [64]. TGF- β 1 wurde 1978 von De Larco und Todaro entdeckt und vermittelt viele biologische Effekte auf Epithel, Endothel, lymphatisches, myelotisches und mesenchymales Gewebe [65]. TGF- β 1 wird durch proteolytische Spaltung aus dem C-Terminus des 391 Aminosäuren-langen Prohormons synthetisiert und liegt schließlich als Homodimer aus zwei identischen 112 Aminosäuren-langen Polypeptidketten vor, die über Disulfidbrücken stabilisiert werden. Das aktive TGF- β 1 bleibt nach der Sekretion nicht kovalent mit dem aminoterminalen TGF- β 1-Propeptid assoziiert, da es in diesem Komplex nicht von den Signalrezeptoren erkannt wird [66]. Das dimere Protein hat ein Molekulargewicht von 25 kDa und kann erst in dieser Form biologisch wirksam werden [67], [68].

TGF- β 1 wird durch das Gen TGFB1 kodiert und liegt in den meisten Zellen in latenter Form vor. Das sekretierte Protein TGF- β 1 weist ein breites Wirkungsspektrum auf und reguliert das Zellwachstum, die Proliferation und Differenzierung sowie die Apoptose, Wundheilung und Immunreaktionen [69]–[76]. TGF- β 1 reguliert außerdem Fibroseprozesse im Herzen und induziert dabei die Differenzierung von Kardiofibroblasten bzw. VICs in aktivierte Myofibroblasten [77], [78]. Auch für die EZM-Remodellierung ist TGF- β 1 von großer Bedeutung, da es die Synthese der Matrixkomponenten Kollagen, Fibronectin, Tenascin und Proteoglykan stimuliert und die Degeneration der Matrix durch abbauende Enzyme verhindert [79], [80]. TGF- β 1 und seine beiden Rezeptoren TGF- β 1-R1 und -R2 haben zudem eine Schlüsselfunktion in der epithelial-mesenchymalen Transition, die durch SMAD2, -3 und -4 induziert bzw. durch SMAD7 inhibiert wird [81]. Neben der SMAD-abhängigen Signaltransduktion wirkt TGF- β 1 auch über SMAD-unabhängige Signalwege [82]. Beide Arten der TGF- β 1-aktivierten Signalwege können zur Induktion von Gewebefibrose führen, was in einer Aktivierung der Myofibroblasten, einer exzessiven EZM-Produktion sowie der Inhibition der EZM-Degradation resultiert [83]. Das TGF- β 1/SMAD-Signaling ist ebenfalls in die Orientierung, Differenzierung, Entwicklung und Proliferation von Osteoblasten involviert [84].

1.4.2.2 Der niedermolekulare Wirkstoff Pirfenidon

Pirfenidon ist ein antiinflammatorisch und antifibrotisch wirkender niedermolekularer Wirkstoff (*small molecule drug*), welcher zur Therapie von idiopathischer pulmonaler Fibrose eingesetzt wird [85]–[89]. Das phenylsubstituierte Pyridinon Pirfenidon hat ein Molekulargewicht von 185,22 g/mol [90]. Es wurde 2011 als orales klinisches Therapeutikum in Deutschland zugelassen und wird seitdem von der Firma Roche unter dem Handelsnamen *Esbriet* vermarktet [91], [92].

In Zellkulturexperimenten konnte bislang gezeigt werden, dass Pirfenidon die Fibroblastenproliferation reduziert, die TGF- β 1-induzierte Kollagenproduktion inhibiert und die Produktion von fibrinogenen Mediatoren wie z.B. TGF- β 1 und PDGF (*platelet derived growth factor*) reduziert [88], [93]. In Studien mit humanen pulmonalen Fibroblasten konnte zudem gezeigt werden, dass Pirfenidon die TGF- β 1-induzierte Kollagensynthese über die Inhibition der Hochregulation des Chaperons HSP47- (*heat*

shock protein 47) konzentrationsabhängig hemmt [94].

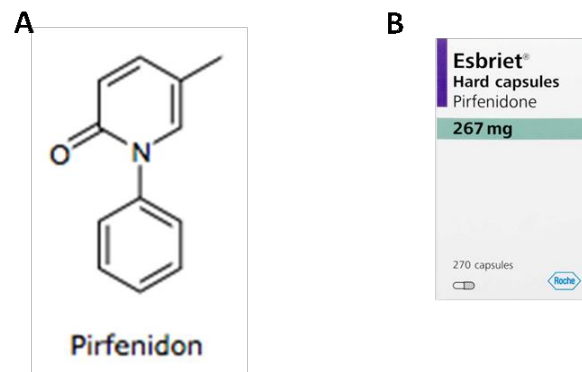


Abbildung 7: Strukturformel (A) und Vermarktungsname (B) von Pirfenidon.

Zu den weiteren Effekten von Pirfenidon zählt eine Inhibition der Fibroblastenmigration sowie der TGF- β 1-induzierten Differenzierung in Myofibroblasten durch Abschwächen der TGF- β 1-induzierten Phosphorylierung von SMAD3 in Fibroblasten [84]. Auf Basis dieser Effekte konnte in Patienten mit pulmonaler Fibrose eine Inhibition der Fibroseprogression sowie eine Verbesserung der Lungenfunktion durch Pirfenidon-Behandlung beobachtet werden [84]–[86]. Im Kontext von Entzündung reduziert Pirfenidon die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β [97].

1.4.3 Wirkungsspektrum

Der TGF- β 1-Signalweg ist ein wichtiger Regulator von Wachstums- und Differenzierungsprozessen sowie endokrinen Funktionen. Außerdem reguliert er die adulte Homöostase durch Regulation der Zellproliferation, -überleben, Differenzierung und Migration, weshalb TGF- β 1 in vielen Geweben des humanen Organismus exprimiert wird. Dazu zählen Endothel- und Epithelzellen, Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten, aber auch Thrombozyten und Mesenchymzellen [98]. Abweichende Signalaktivitäten, wie Mutationen oder Fehlregulationen, sind mit Krebs, kardiovaskulären, muskuloskeletalen und fibrotischen Erkrankungen assoziiert [99], [100], [101].

Als Wachstumsfaktor weist TGF- β 1 sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Zellproliferation auf. Der spezifische Effekt von TGF- β 1 ist konzentrationsabhängig. In geringeren Konzentrationen hemmt TGF- β 1 das Wachstum von Glattmuskelzellen, Fibroblasten und Chondrozyten, wohingegen es höheren Konzentrationen zu einer verstärkten Proliferation der Zellen anregt [102]. Dieser Mechanismus der Rückkopplungsreaktion erfolgt über PDGF, dessen Synthese und Sekretion durch niedrige TGF- β 1-Konzentrationen vermittelt werden [103].

Die EZM ist von enormer Bedeutung für die Zelladhäsion und -migration, die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung. Diesbezüglich konnte eine entscheidende Rolle von TGF- β 1 auf die Synthese und den Abbau der EZM nachgewiesen werden. Zudem können die EZM-Komponenten die TGF- β 1-Sekretion steuern und somit dessen Aktivität regulieren. TGF- β 1 kann außerdem die Synthese der Matrixkomponenten Kollagen, Fibronectin, Tenascin, Elastin sowie Decorin und Biglykan kontrollieren [104]. Mechanistisch reduziert TGF- β 1 die Synthese und Sekretion verschiedener Proteasen der EZM, wie beispielsweise Kollagenase und Plasminogen-Aktivator, und steigert stattdessen die Synthese der Inhibitoren dieser Enzyme, was insgesamt die Proteolyse der EZM verringert [105]. Dieser Einfluss des TGF- β 1-Signalwegs auf die EZM ist bei der Wundheilung von Vorteil, kann sich aber auch in verschiedenen Krankheitsbildern äußern. So sind eine anhaltend erhöhte TGF- β 1-Expression sowie die assoziierte exzessive EZM-Akkumulation charakteristische Begleiterscheinungen von pulmonaler Fibrose und Glomerulonephritis [106], [107].

Auch auf die Gewebekalzifizierung, insbesondere im Kontext der CAVD, konnte ein Einfluss von TGF- β 1 bzw. des TGF- β 1-Signalwegs nachgewiesen werden. So wurden in stenosierten im Vergleich zu gesunden humanen AOK erhöhte TGF- β 1-Gewebekonzentrationen nachgewiesen [108]. Stenosierte AOK sind Merkmal für die Progression der CAVD, sodass man annehmen kann, dass es einen Zusammenhang zwischen erhöhten TGF- β 1-Konzentrationen und dieser Erkrankung gibt. Ebenso gilt TGF- β 1 als einer der Hauptregulatoren von Fibroseprozessen und der Differenzierung der VICs in aktivierte Myofibroblasten, welches ein bedeutendes Stadium im Krankheitsverlauf der CAVD einnimmt [31]. Nachgewiesen ist die Beteiligung von TGF- β 1 an der Progression der CAVD, allerdings finden sich diesbezüglich in der Literatur kontroverse Ansichten über die Rolle dieses Zytokins. Mehrere *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass TGF- β 1 als proosteogener Faktor agiert und die

Kalzifizierung sowie die Differenzierung der VICs in Osteoblasten fördert [108]–[113]. Mechanistisch geht man davon aus, dass die Matrixkomponente Biglycan, die vermehrt in kalzifizierten AOK nachgewiesen wurde, die osteogene Zelldifferenzierung über eine vermehrte Expression von TGF- β 1 und BMP-2 fördert [114]. Die Studie von Cloyd et al. klassifiziert TGF- β 1 allerdings als Inhibitor der Kalzifizierung unter prokalzifizierenden Zellkulturbedingungen. Stattdessen konnte eine verstärkende Wirkung auf die Fibrose der Zellen nachgewiesen werden. So führte die Stimulation mit TGF- β 1 zur verstärkten Produktion einer kollagenreichen EZM und zur Ausbildung eines Myofibroblasten-artigen Phänotyps der VICs [115]. Dieser profibrotische Effekt der TGF- β 1-Behandlung in VICs sowie die Differenzierung der VICs in aktivierte Myofibroblasten konnten in weiteren *in vitro*-Studien nachgewiesen werden [24], [116]. Mechanistisch erfolgt die inhibierende Wirkung über die Hemmung von BMP-2 sowie des bei der Kalzifizierung aktiven Wnt/ β -Catenin-Signalwegs [117]–[119].

Darüber hinaus wirkt der TGF- β 1-Signalweg auf die Apoptose, Hämatopoese, Immunmodulation, Tumorentstehung, Embryogenese sowie den Knochenstoffwechsel [66], [120]–[124].

1.5 Das Adiponektin-Rezeptorsystem

1.5.1 Komponenten und Aktivierung

Das Rezeptorsystem des Adipozytokins Adiponektin setzt sich aus zwei Rezeptoren (AdipoR1 und AdipoR2) sowie dem Co-Rezeptor (T-Cadherin/CDH13) zusammen. Die beiden Rezeptoren sind ubiquitär in nahezu allen Geweben, wie dem vaskulären Endothel, Herz, Gehirn, Leber, Nieren, Skelettmuskeln sowie in diversen Typen von Immunzellen exprimiert [125], [126]. AdipoR1 und -R2 sind aus sieben Transmembranhelices mit einem extrazellulären C-terminalen Ende und einer intrazellulären N-Domäne aufgebaut [127]–[131]. Beide Rezeptoren sind unterschiedlich stark in den verschiedenen Geweben exprimiert. So wird AdipoR1 vermehrt im Skelettmuskel und Herzkreislaufsystem exprimiert, wohingegen AdipoR2 vorwiegend in der Leber exprimiert wird [132], [133]. Der Co-Rezeptor T-Cadherin ist ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche ohne intrazelluläre Domäne, welches über Kalzium-vermittelte adhäsive Zell-Zell-Interaktionen wirkt und sich als Co-Rezeptor durch eine hohe Affinität für die zwei höher-molekularen Isoformen von Adiponektin

auszeichnet [134]. Es wird von diversen Zelltypen wie Endothel- und Glattmuskelzellen exprimiert, besonders stark von Zellen des kardiovaskulären Systems [135], [136].

Beide Rezeptoren unterscheiden sich auch durch ihre Bindungsaffinität für die verschiedenen Adiponektin-Isoformen. So bindet AdipoR1 bevorzugt globuläres Adiponektin, wohingegen AdipoR2 sowohl globuläres als auch die höher molekularen Adiponektin-Formen bindet [132]. Die Aktivität der beiden Rezeptoren wird durch das Ausbilden von Homo- und Heterooligomeren auf der Zelloberfläche bestimmt. AdipoR1 und -R2 weisen eine Homologie von 67 % in ihrer Aminosäuresequenz auf und können sowohl als Homodimere als auch als Heterodimere agieren. Die Dissoziation der Multimere erfolgt unmittelbar nach der Ligandenbindung [137].

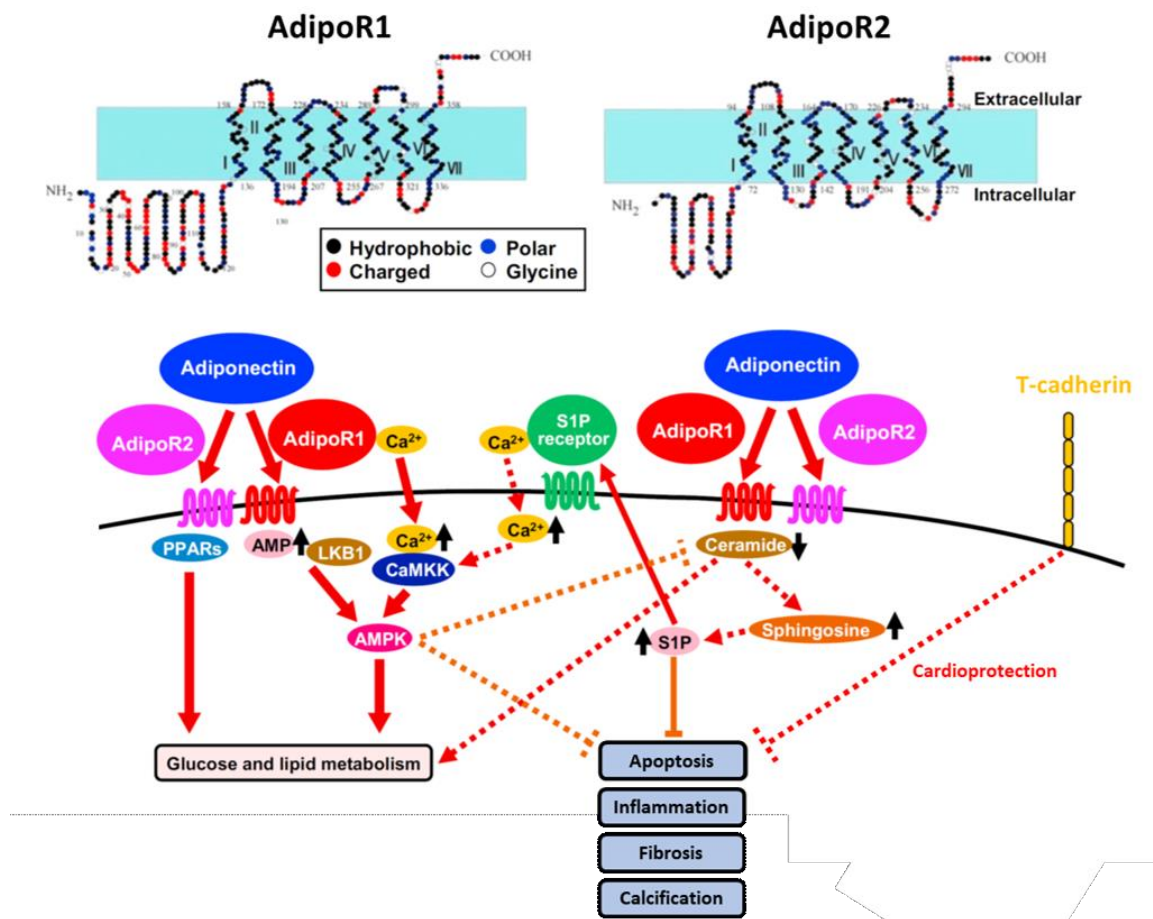


Abbildung 8: Komponenten und Funktionen des Adiponektin-Rezeptorsystems. Die beiden Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 weisen eine hohe Homologie auf und werden als Transmembranproteine klassifiziert, wobei sich das N-terminale Ende zellintern und der C-Terminus außerhalb der Zelle befindet. AdipoR1 und AdipoR2 fungieren als Adiponektin-Rezeptoren, die eine erhöhte 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)- sowie peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-Aktivität vermitteln, die zur Modulation des Glukose- und Lipidstoffwechsels sowie der Inhibition von Inflammation, Apoptose, Fibrose und Kalzifizierung führen. T-Cadherin, ein Zelloberflächenglykoprotein ohne Transmembran- und intrazelluläre Domäne, wurde als essentieller Co-Rezeptor für die Vermittlung kardiovaskulärer Effekte, die durch Adiponektin induziert wurden, identifiziert (Modifiziert nach [138]).

AdipoR1 und -R2 durchlaufen nach Bindung eine Konformationsänderung, in deren Folge die intrazelluläre Domäne mit diversen Signalmolekülen interagiert [139]. Ein wichtiger Interaktionspartner von AdipoR1 und -R2 ist das Adaptorprotein APPL1 (*Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, pH Domain, and Leucine Zipper-Containing Protein 1*), welches weitere Signalmoleküle aktiviert [140]. Dazu gehören unter anderem AMPK und PPAR [141]. Infolge der AMPK-Aktivierung kommt es zur Induktion verschiedener metabolischer Prozesse, wie vermehrter Insulinfreisetzung, Inhibition der Lipidsynthese sowie Stimulation der Glukoseaufnahme [142]. Insbesondere in der Leber konnten die Effekte von Adiponektin über den AMPK-Signalweg auf die Regulation der Glukoneogenese gezeigt werden [143], [144]. Zudem aktiviert Adiponektin den transkriptionellen Co-Aktivatoren PGC1 α (*proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*) und verstärkt damit die mitochondriale Proliferation und den Energiemetabolismus [145]. Im Hinblick auf den PPAR-Signalweg führt die Aktivierung durch Adiponektin zur vermehrten Expression von PPAR- α und daraus resultierend auch der Acetyl-CoA-Oxidase, was zur Steigerung der Fettsäureoxidation und des Energieverbrauchs führt [129], [146], [147], [148]. Dies hat außerdem Einfluss auf die Glukoseaufnahme in der Leber und eine verbesserte Insulinsensitivität [149].

Neben den bereits erwähnten Signalmechanismen ist zusätzlich die Beteiligung von Adiponektin an der Kalziumfreisetzung in Myozyten über die Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase Kinase (CaMKK- β) und der Adenosinmonophosphat (AMP-)/Leberkinase B1 (LKB1) bekannt, was letztlich die gesteigerte Biogenese von Mitochondrien induziert [145], [150]. Das Adiponektin-Rezeptorsystem aktiviert zudem Ceramid-induzierte Signalwege und vermittelt auf diese Weise die pleiotropen Effekte von Adiponektin [141], [151], [152].

1.5.2 Liganden

1.5.2.1 Das Adipozytokin Adiponektin

Adiponektin wurde Mitte der 1990er Jahre erstmals von vier unabhängigen Gruppen beschrieben [126], [153]–[156]. Adiponektin wird hauptsächlich von Adipozyten exprimiert und ins Plasma sekretiert. Es wird daher als Adipozytokin klassifiziert [126], [153], [154]. Ferner wird es in geringen Mengen von Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten sowie bestimmten Skelettmuskel- und Endothelzellen exprimiert [127],

[133], [157], [158]. Im humanen Organismus zirkuliert Adiponektin mit einer hohen Plasmakonzentration von 5 – 30 µg/ml, wobei Frauen einen höheren Plasmaspiegel als Männer aufweisen [159].

Das humane Adiponektin-Gen (Symbol ADIPOQ) ist auf dem q-Arm von Chromosom 3 an Position 27 (3q27) lokalisiert und umfasst 17 kb genomische DNA mit drei Exons [160]. Auf Proteinebene setzt sich das Adiponektin-Monomer aus 244 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ~ 30 kDa zusammen und ist aus vier Domänen aufgebaut: Dem N-terminalen Signalpeptid, einer zwischen den Spezies variablen Domäne, einer Kollagen-ähnlichen Domäne und der C-terminalen Komplementfaktor C1q-ähnlichen globulären Domäne, die an die Adiponektin-Rezeptoren bindet (Abbildung 9) [161], [129].

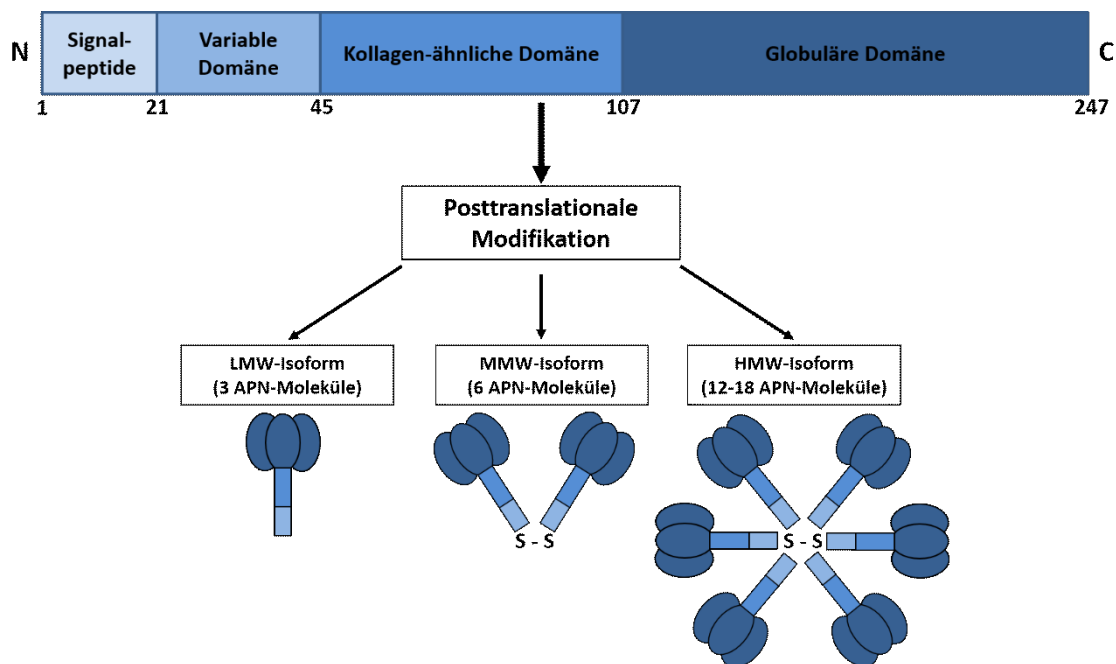


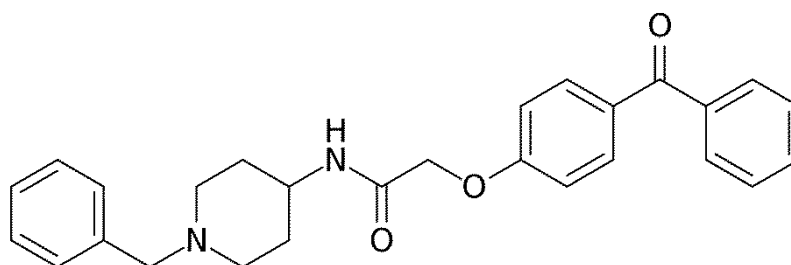
Abbildung 9: Molekularer Aufbau und posttranslationale Modifikation von Adiponektin. Adiponektin (APN) setzt sich aus vier Domänen zusammen: Das N-terminale Signalpeptid, die variable Domäne, welche innerhalb der Spezies variiert, die Kollagen-ähnliche Domäne und die C-terminale globuläre Domäne. Aus dem monomeren Adiponektin werden durch posttranslationale Modifikationen drei Isoformen gebildet. Die Hydroxylierung von vier konservierten Prolinresten in der Kollagen-ähnlichen Domäne führt zur Ausbildung der trimeren LMW-Isoform. Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten in der variablen Domäne vermitteln die Ausbildung von Adiponektin-Hexameren (MMW-Isoform). Die polymere HMW-Adiponektin-Isoform entsteht durch Hydroxylierung und Glykosylierung der vier konservierten Lysinreste in der Kollagen-ähnlichen Domäne (Modifiziert nach [162]).

Aus dem Adiponektin-Monomer werden durch posttranslationale Modifikationen drei Isoformen gebildet, die anschließend sekretiert werden und im Plasma zirkulieren: Das

trimere *low-molecular weight* (LMW) Adiponektin, welches aus drei Adiponektin Monomeren aufgebaut ist, die über eine Disulfidbrücke der Cysteinreste in der Region der variablen Domäne stabilisiert sind. Disulfidbrückenbildung zwischen zwei Trimeren führt zur Ausbildung eines Hexamers, welches als *middle molecular weight* (MMW) Adiponektin bezeichnet wird. Das *high molecular weight* (HMW) Adiponektin ist aus mehreren Hexameren zusammengesetzt [163], [164]. Die Zahl und Anordnung der Adiponektin-Moleküle ist ausschlaggebend für ihre Affinität zu den Rezeptoren AdipoR1 und -R2 bzw. ihre Wirkung.

1.5.2.2 Der niedermolekulare Wirkstoff AdipoRon

AdipoRon wurde 2013 von der Arbeitsgruppe um Okada-Iwabu et al. bei einem Screening zur Identifizierung niedermolekularer Substanzen, die eine hohe Bindungsaffinität für AdipoR1 und -R2 aufweisen sowie eine effektive Aktivierung der AMPK induzieren, entdeckt [165]. Dazu wurden in einer Studie niedermolekulare Stoffe aus einer Substanzbibliothek der Universität von Tokio gescreent, die die Adiponektin-Rezeptoren mit einer hohen Affinität binden und aktivieren. Ebenfalls wurde die Wirkungsabhängigkeit der niedermolekularen Substanzen vom Adiponektin-Rezeptorsystem analysiert, indem die Rezeptoren einzeln durch *small interfering RNA* (siRNA) supprimiert wurden und anschließend die Phosphorylierung der AMPK nach Stimulation mit den verschiedenen Substanzen in Muskelfasern untersucht wurde. Der vielversprechendste Kandidat wurde AdipoRon genannt. Die Stimulation mit AdipoRon führte zu einer konzentrationsabhängig verstärkten Phosphorylierung der AMPK, ähnlich wie durch Adiponektin.



AdipoRon

Abbildung 10: Strukturformel von AdipoRon.

Als synthetischer Adiponektin-Rezeptoragonist bindet und aktiviert es somit mit einer ähnlichen Affinität AdipoR1 und -R2 [166] und wirkt damit auf den AMPK- und PPAR α -Signalweg [167], [168]. Molekular handelt es sich bei AdipoRon um eine zellpermeable Benzylpiperidinylacetyl-Verbindung [142].

In Tier- und Zellkulturstudien konnte eine Verbesserung der Insulinresistenz und Glukoseintoleranz durch AdipoRon, basierend auf Mechanismen an denen das Adiponektin-Rezeptorsystem und der metabolische Masterregulator AMPK beteiligt sind, nachgewiesen werden [139], [165], [169], [170]. Neben diesen antidiabetischen Effekten konnten kardioprotektive Effekte durch AdipoRon-Behandlung nachgewiesen werden. So mindert es die postischämische myokardiale Apoptose und wirkt antioxidativ [167], [168], [171]. Außerdem reduziert es die, durch Bluthochdruck induzierte, kardiale Hypertrophie, Dysfunktion und Fibrose [147], [172]–[175].

Als synthetischer Wirkstoff lässt sich AdipoRon im Gegensatz zu Adiponektin einfach und kostengünstig produzieren und oral verabreichen, was es damit zu einem vielversprechenden Kandidaten für die medizinisch-therapeutische Anwendung Adiponektin-Rezeptor-abhängiger protektiver Effekte macht.

1.5.3 Wirkungsspektrum

Das Adiponektin-Rezeptorsystem ist durch ein breites Wirkungsspektrum gekennzeichnet. Mittels Aktivierung von AMPK und PPAR α reguliert Adiponektin den Metabolismus und nimmt Einfluss auf die Glukose- und Lipidhomoöstatik, indem es die Glukoneogenese in der Leber reduziert und die Fettsäureoxidation in Leber und Skelettmuskel erhöht [148], [176]. Seine insulinsensitivierenden Eigenschaften und die blutzuckersenkende Wirkung sind auf ein Zusammenspiel mit dem PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)-Signalweg zurückzuführen [132], [177]. Die Adiponektin-Plasmalevel korrelieren negativ mit dem Körpergewicht und sind daher bei Patienten mit Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes Typ 2 reduziert [178], [179].

Neben den metabolischen Effekten erweist sich Adiponektin auch als vaskuloprotektiv, indem es antiinflammatorische Effekte über die Suppression der NF κ B-Aktivierung hervorruft und die ROS-Bildung sowie die iNOS-Hochregulation inhibiert [162], [180], [181]. Zudem fördert Adiponektin die Angiogenese, Neoangiogenese und

Revaskularisierung nach ischämischen Verletzungen, was durch Aktivierung der Endothelzelldifferenzierung in kapillarähnliche Strukturen über AMPK und eNOS erfolgt [182], [183].

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Effekten wirkt Adiponektin immunmodulatorisch. *In vitro* inhibiert es Phagozytose und reduziert die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6, IFN- β und IFN- γ in Makrophagen [184]–[186]. Außerdem vermindert Adiponektin die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B.

Darüber hinaus geht von dem aktivierten Adiponektin-Rezeptorsystem eine kardioprotektive Wirkung aus. So sind erniedrigte Adiponektin-Plasmalevel mit einem erhöhten Risiko für einen Myokardinfarkt verbunden [187]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Adiponektin die Entzündung inhibiert und den oxidativen Stress im Herzen nach Ischämie/Reperfusion reduziert [188], [189]. Nach Myokardinfarkt regelt Adiponektin die Integrität der Kardiomyozyten in der Infarktregion und stabilisiert so die umgebaute EZM [190]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Adiponektin die myokardiale Apoptose, Fibrose sowie Hypertrophie nach Myokardinfarkt inhibiert und ein Zusammenhang zwischen niedrigen Adiponektin-Plasmaleveln und dem verstärkten Auftreten von koronarer Herzkrankheit, Hypertrophie sowie Myokardinfarkt besteht [134], [187], [191]–[194].

Hinsichtlich Fibrose konnte gezeigt werden, dass Adiponektin das Angiotensin II-induzierte kardiale Remodelling über eine AMPK- und PPAR-vermittelte Inhibition der TGF- β 1- und Kollagenexpression in kardialen Fibroblasten inhibiert [195]. Der antifibrotische Effekt von Adiponektin ist zudem auf die Inhibition der TGF- β 1-Signaltransduktion und Hochregulation von Matrixmetallopeptidase 9 (MMP-9) in Kardiomyozyten, Kardiofibroblasten sowie Immunzellen zurückzuführen [196], [197]. Bezüglich der Gewebekalzifizierung zeigte sich, dass niedrige Adiponektin-Plasmalevel mit einer erhöhten Prävalenz der Aortenkalzifizierung in älteren Patienten einhergeht. Mechanistisch inhibiert Adiponektin die vaskuläre Kalzifizierung über die AMPK-vermittelte Inhibition der osteoblastoiden vaskulären Glattmuskelzelldifferenzierung, was in einer erniedrigten RUNX-2- und ALP-Expression resultiert [198].

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zum einen das Erlangen eines besseren mechanistischen Verständnisses der CAVD-Pathogenese und zum anderen die Analyse der Effekte von *Small Molecule Drugs* mit antifibrotischer bzw. antikalzifizierender Wirkung auf den Verlauf der CAVD-Pathogenese. Im Fokus der Analysen stehen dabei der TGF- β 1-Signalweg sowie das Adiponektin-Rezeptorsystem.

Die Promotionsarbeit verfolgt die Zielsetzung in drei separaten Teilprojekten:

Teilprojekt 1: Klinische Daten deuten darauf hin, dass das Zytokin TGF- β 1 an der Pathogenese der CAVD beteiligt ist, da in stenosierten im Vergleich zu nicht erkrankten humanen AOK erhöhte TGF- β 1-Gewebekonzentrationen nachweisbar sind. Allerdings lieferten bisherige *in vitro*-Studien zur genaueren Untersuchung der Wirkung von TGF- β 1 unter Verwendung isolierter VICs als 2D-CAVD-Modell widersprüchliche Ergebnisse. Vor diesem Hintergrund sollen die Effekte von TGF- β 1 in einem gewebebasierten 3D-CAVD-Modell untersucht werden, das die Kultivierung von ovinen AOK-Taschen unter prokalzifizierenden Medienbedingungen beinhaltet. Die zugehörigen Untersuchungen umfassen morphologisch-histologische Analysen des AOK-Gewebes hinsichtlich der Wirkung von TGF- β 1 auf Fibrose, Kalzifizierung, Zellviabilität und –proliferation sowie Expressions- bzw. Aktivitätsanalysen von VIC-Differenzierungsmarkern und Transkriptionsfaktoren des TGF- β 1-, BMP-2- und kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

Teilprojekt 2: Das bereits zur Therapie der idiopathischen Lungenfibrose zugelassene *Small Molecule Drug* Pirfenidon wirkt nachweislich antifibrotisch, indem es die TGF- β 1-induzierte Kollagenproduktion, die Synthese von fibrinogenen Zytokinen sowie den fibrotischen EZM-Umbau inhibiert. Diese Mechanismen sind ebenfalls für die CAVD relevant, weshalb die Wirkung von Pirfenidon auf die CAVD-Pathogenese im VIC-basierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell analysiert werden soll. Die zugehörigen Untersuchungen umfassen morphologisch-histologische Analysen des AOK-Gewebes hinsichtlich der Wirkung von Pirfenidon auf Fibrose, Kalzifizierung, Zellviabilität und –proliferation sowie Expressions- bzw. Aktivitätsanalysen von VIC-Differenzierungsmarkern und Transkriptionsfaktoren des TGF- β 1-, BMP-2- und kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

Teilprojekt 3: Das Adipozytokin Adiponektin und sein ubiquitär exprimiertes Rezeptorsystem (AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin) vermitteln neben protektiven metabolischen und immunmodulatorischen auch antifibrotische und antikalzifizierende Effekte. In früheren Patientenstudien zeigte sich zudem, dass die kardiovaskuläre Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems bei Adipositas und Diabetes Typ 2 als CAVD-Risikofaktoren supprimiert ist und der Schweregrad einer AOK-Stenose negativ mit den Adiponektin-Plasmakonzentrationen korreliert. Vor diesem Hintergrund soll zum einen die expressionelle Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems während der klinischen CAVD-Pathogenese und darüber hinaus *in vitro* Effekte des Adiponektin-Rezeptoragonisten AdipoRon auf Fibrose und Kalzifizierung in 2D- und 3D-CAVD-Modellen analysiert werden. Die zugehörigen Untersuchungen umfassen zum einen eine mRNA-Expressionsanalyse des Adiponektin-Rezeptorsystems in AOK mit normalem, fibrotischem und kalzifiziertem Phänotyp aus Patienten mit und ohne Diabetes Typ 2 als Komorbidität sowie zum anderen die Expressionsanalytik des Adiponektin-Rezeptorsystems in ovinen AOK, die als 3D-CAVD-Modell kultiviert werden. Darüber hinaus werden morphologisch-histologische Analysen des AOK-Gewebes hinsichtlich der Wirkung von AdipoRon auf Fibrose und Kalzifizierung sowie Expressions- bzw. Aktivitätsanalysen von VIC-Differenzierungsmarkern und Transkriptionsfaktoren des TGF- β 1-Signalwegs durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Aortenklappentaschen

Die Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf führt mit der Genehmigung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität (Studennummer der Ethikvoten: 3428, 4412R und 4567) seit 2010 eine BioBank mit AOK-Gewebe von Patienten nach AOK-Ersatz oder Herztransplantationen. Dabei liegt entsprechend der Deklaration von Helsinki („Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen“ [199]) für jedes Probengewebe eine unterschriebene Patientenaufklärung vor, in der der Patient zur Spende seiner AOK zu Forschungszwecken eingewilligt hat.

2.1.2 Ovine Aortenklappentaschen

Die ovinen AOK-Taschen wurden aus Herzen von etwa sechs bis acht Monate alten Lämmern (*Ovis aries*) von einem örtlichen Schlachthof (Laame GmbH & Co. KG, Wuppertal) isoliert.

2.1.3 Zellkulturreagenzien

Tabelle 1: Verwendete Zellkulturreagenzien.

Zellkulturreagenz	Hersteller
Amphotericin B	Cheplapharm Arzneimittel (Greifswald, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco (Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA))
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PBS	Gibco (Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA))
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA))
Trypsin EDTA	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.4 Stimulationsagenzien

Tabelle 2: Verwendete Stimulationsagenzien.

Stimulationsagenz	Hersteller
AdipoRon	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β -Glycerolphosphat-Disodium-Pentahydrat (β -GP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Pirfenidon	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1)	R&D Systems (Minneapolis, USA)

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Inkubation	Hersteller, Artikelnummer
α -SMA	Maus	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Sigma Aldrich (St. Louis, USA), #A5228
AMPK	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling (Denvers, USA), #2603
β -Catenin	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling (Denvers, USA), #8480
GAPDH	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling (Denvers, USA), #2118
Kollagen Typ 1	Maus	1:1000 in 5% Milchpulver/TBST	ü. N., 4 °C	Sigma Aldrich (St. Louis, USA), #C2456
P-AMPK	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling (Denvers, USA), #2535
P-SMAD1/5/8	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling (Denvers, USA), #13820

P-SMAD3	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling (Denvers, USA), #C25A9
SMAD3	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling (Denvers, USA), #9523
Vimentin	Meer- schweinchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland), #Gp53

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Inkubation	Hersteller, Artikelnummer
Goat-anti-rabbit IgG (H+L)	Ziege	1:5000 in 5% BSA/TBST	60 min, RT	Dianova (Hamburg, Deutschland), #111-035-003
Goat-anti- mouse IgG + IgM (H+L)	Ziege	1:5000 in 5% BSA/TBST oder Milchpulver/TBST	60 min, RT	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA), #115-035-044
Goat-anti- Guinea pig IgG (H+L)	Ziege	1:5000 in 5% BSA/TBST	60 min, RT	Dianova (Hamburg, Deutschland), #106-035-003

2.1.6 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Alizarinrot S	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Aceton	VWR Chemicals (Radnor, USA)
Acrylamid/Bisacrylamid 40%	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ammonium Persulfat 10%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Bovines Serumalbumin Fraction V	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroform	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Destilliertes Wasser	Otto Fischar GmbH und Co. KG (Saarbrücken, Deutschland)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol (100%, 96% und 70%)	Otto Fischar GmbH und Co. KG (Saarbrücken, Deutschland)
Formaldehyd-Lösung 37%	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glukose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kryomedium	VWR Chemicals (Radnor, USA)
Lysepuffer	Cell Signaling Technology (Denvers, USA)
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	VWR Chemicals (Radnor, USA)
Natriumcacodylat-Pufferlösung (0,1 M)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Natriumcarbonat	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Nitroblue Tetrazolium	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Osmium(VIII)-oxid (OsO ₄)	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Phosphor-Wolframsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
PhosSTOP (Phosphataseinhibitor)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNAse Away	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
RNase-freies Wasser	Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)
Roti-Histokit	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
SDS Pellets	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Silbernitrat	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Spurr's Epoxidharz	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (Temed)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Tris-Base	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
TRIzol Reagent	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tween-20	Merck Millipore (Burlington, USA)
Uranylacetat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Xylol	VWR Chemicals (Radnor, USA)

2.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.

Lösungen und Puffer	Anwendung	Zusammensetzung
Alizarinrot S-Lösung	Alizarinrotfärbung	2% (w/v) Alizarinrot S; pH 4,1-4,3
ALP-Färbelösung	ALP-Färbung	2,5 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat in 0,5 ml Dimethylformamid 5 mg Nitroblue Tetrazolium in 35 ml 0,05 M Tris (pH 9,5) 80 µl 1 M Magnesiumchlorid

Blockierungslösung	Immunoblot	TBS-Tween 5% Bovines Serumalbumin bzw. Magermilchpulver
Kulturmedium	Zellkultur	500 ml DMEM 10% Fötale Kälberserum (FCS) 1% Penicillin/Streptomycin 1% Nicht essentielle Aminosäuren
Lämmli-Probenpuffer	Immunoblot	375 mM Tris-HCl pH 6,8 60% (v/v) Glycerin 12,6% SDS-Pellets 600 mM DTT 0,9% Bromphenolblau
Laufpuffer	SDS-Page	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 1% SDS-Pellets
Lysepuffer	Kalziumassay	20 mM Tris-HCl pH 7,5 0,1% Tween
Natriumcarbonat- Formaldehydlösung	Von Kossa-Färbung	150 ml Aqua dest. 50 ml Formaldehyd 10 g Natriumcarbonat
Sammelgelpuffer	SDS-Page	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Tris-buffered saline (TBS)	Immunoblot	100 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween	Immunoblot	TBS 0,1% (v/v) Tween-20
Transferpuffer	SDS-Page	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20% Methanol
Trenngelpuffer	SDS-Page	1,5 mM Tris-HCl pH 8,8
Zellysepuffer	Proteinlyse	10 x PhosSTOP 10 x Cell Lysis Buffer (Cell Signaling) 7 x Complete Mini add H ₂ O

2.1.8 Molekularbiologische Kits

Tabelle 7: Verwendete molekularbiologische Kits.

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology (Waltham, USA)

Calcium Assay Kit	Abnova (Taipeh, Taiwan)
GoTaq qPCR Master Mix	Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)
Lactatdehydrogenase-Cytotoxicity Assay Kit	Pierce Biotechnology (Waltham, USA)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNA Isolation Kit: RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TUNEL Assay Click-it Plus (Alexa Fluor 594)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

2.1.9 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland), BP 10S
Autoklav	Systemec (Linden, Deutschland), V-100
Digitalkamera	Canon (Kamata, Japan), PowerShot SX20 IS
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen (Carlsbad, USA), Novex XCell SureLook Mini-Cell
Gelimager	GE-Healthcare (Chicago, USA), Amersham 600
Heizblock	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Thermomixer compact
Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Heracell 240i
Homogenisator	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Pellet Pestles Cordless Motor, TYP D-8, Micra GmbH (Heitersheim, Deutschland)
Kryostat	Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland), CM1950
LED-Lichttisch	Kaiser Fototechnik (Buchen, Deutschland), slimlite
Lichtmikroskop	Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland), DM2000
Magnetrührer	VWR (Darmstadt, Deutschland), AREX
Mikroplattenleser	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz), infinite M1000 Pro

Mikroskopkamera	Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland), DFC 425C
Morada-Kamera	Emsis (Münster, Deutschland)
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare (Boston, USA)
pH-Meter	inoLab (Dinslaken, Deutschland), pH Level 1
Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Foster City, USA), StepOnePlus
Rollenmischer	Stuart Equipment (Staffordshire, UK), SRT 1
Spannungsquelle	Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK), EPS 301
Sterilbank	Gelaire (Sydney, Australien), BSB 4
Thermozykler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland), T3000
Transmissionselektronenmikroskop	Hitachi (Tokio, Japan), H7100 TEM
Ultracut	Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland), EM UC7
Vortexmischer	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG (Schwabach, Deutschland), REAX 2000
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland), 1092
Zentrifugen	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), 5804 R Heraeus (Hanau, Deutschland), Megafuge 1.0 Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Sprout Minizentrifuge

2.2 Methoden

2.2.1 Humane Aortenklappentaschen

2.2.1.1 Gewinnung der Aortenklappentaschen

Im Anschluss an die operative Entnahme der humanen AOK-Taschen wurden diese makroskopisch klassifiziert bzw. bei nicht eindeutig homogener Klassifikation entsprechend präpariert, um sie den drei Gruppen (unverändert, fibrotisch oder kalzifiziert) zuordnen zu können. Die Probengewinnung wurde dokumentarisch mit einer Digitalkamera festgehalten und anschließend die Taschen kryokonserviert, um sie langfristig in einem Flüssigstickstofftank bei -170 °C lagern zu können.

2.2.1.2 Klassifizierung des Degenerationsstatus der humanen Aortenklappentaschen

Um die gewonnenen Patientenproben einem Degenerationsgrad der AOK zuzuordnen, wurden diese makroskopisch in unveränderte, fibrotische oder kalzifizierte AOK-Taschen eingeteilt (Abbildung 11).

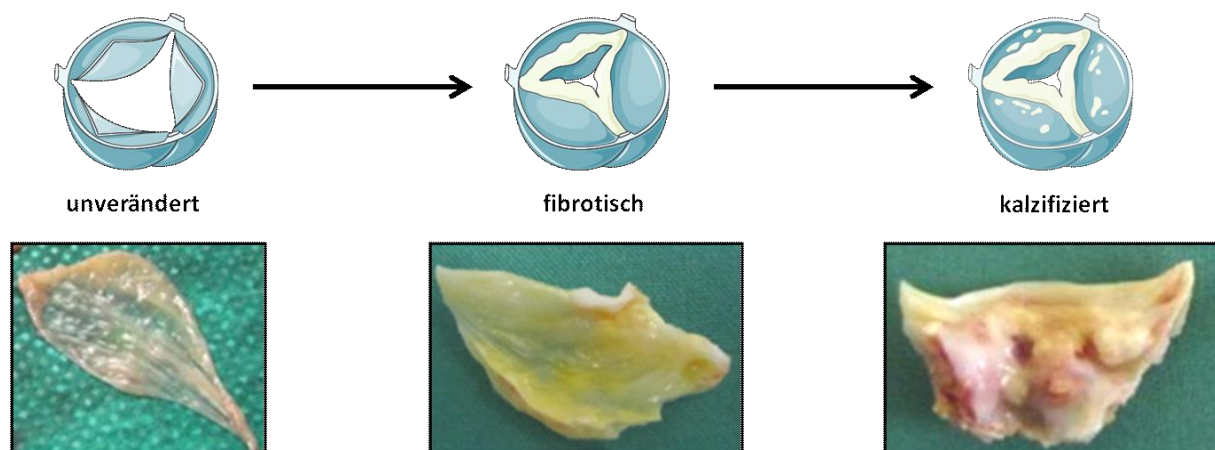


Abbildung 11: Progression der CAVD-Pathogenese. Unter der schematischen Darstellung des CAVD-Verlaufs ist die Progression anhand von humanen AOK bzw. AOK-Taschen abgebildet. Die unveränderte (gesunde) AOK-Tasche ist in ihrer Morphologie klar und transparent sowie funktionell elastisch und flexibel. Eine fibrotische AOK-Tasche zeichnet sich durch eine Gewebeverdichtung und im späteren Stadium auch Verdickung durch extrazelluläre Matrixumbauten aus. Dies hat bereits eine Auswirkung auf die AOK-Öffnungsfläche sowie die Funktion zu verzeichnen. Die kalzifizierte AOK-Tasche weist sowohl an den Rändern, als auch in der Basis der AOK deutliche Kalkeinlagerungen auf. Außerdem zeichnet sich die AOK-Tasche komplett durch einen Flexibilitätsverlust aus und es kann zur Bildung von Gefäßstrukturen kommen. Dadurch kommt es insgesamt zu einem ausgeprägten Funktionsverlust der AOK, was eine Reposition der AOK durch eine Klappenprothese erfordert.

Die unveränderten AOK-Taschen wurden in der Regel bei orthotopen Herztransplantationen isoliert und wiesen makroskopisch keinerlei Verdickungen oder äußerlich sichtbare Strukturveränderungen auf. Die fibrotischen AOK-Taschen zeichneten sich durch eine verdickte Struktur und fehlende Transparenz aus, waren jedoch frei von Kalzifizierungsherden. Als kalzifiziert wurden AOK-Taschen eingestuft, die großflächige Verdickungen durch Kalzifizierung und insgesamt auch starke morphologische Veränderungen zeigten.

2.2.1.3 Auswahl der Patienten

Zu jedem Patienten, dessen AOK-Taschen in die BioBank aufgenommen wurden, sind entsprechende Patientendaten, wie Demographie, Erkrankungen sowie funktionelle Daten erhoben und der BioBank hinzugefügt worden. Vorab wurden Patienten mit anatomischen Besonderheiten, wie einer bikuspiden AOK ausgeschlossen, da bei diesen Patienten veränderte hämodynamische Verhältnisse vorherrschen, die eine Degeneration der AOK beschleunigen [200]. Ebenso wurden Patienten mit viralen Infektionen (HIV, Hepatitis C), aktiver Endokarditis oder rheumatischer Herzkrankheit in den Versuchen nicht berücksichtigt. Die Auswahl der Spender erfolgte retrospektiv und entsprechend der tabellarisch-aufgeführten Kriterien nicht randomisiert (Tabelle 9).

Um den potentiellen Einfluss von Diabetes Typ 2 (T2D) auf die Degeneration der AOK zu untersuchen, wurde die Kohorte in Nicht-Diabetiker (ND) und T2D aufgeteilt. Die Diagnose des Diabetes wurde entweder durch den Arztbrief oder entsprechend den Kriterien der Deutschen Diabetes Gesellschaft mit einem HbA1c-Wert $\geq 6,5$ % während des Klinikaufenthaltes ermittelt [201]. Eine Insulinpflichtigkeit der Diabetes-Behandlung blieb in diesen Versuchen unberücksichtigt. Typ 1-Diabetiker wurden aus der Studie ausgeschlossen, da sich der zugrundeliegende Pathomechanismus zu stark von dem des T2D unterscheidet [202].

2.2.1.4 Patientenkohorte

Zur Untersuchung der mRNA-Expression diverser Degenerationsmarker sowie der Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems wurde eine gesamte Patientenkohorte

von 93 Spendern aufgestellt. Von jedem Spender wurde die RNA-Isolation aus einer kompletten AOK-Tasche durchgeführt. Lag keine homogene Klassifikation der AOK-Tasche vor, beispielsweise bei Taschen mit nur partiellen Kalzifizierungen, wurden die AOK-Taschen nicht für die Versuche berücksichtigt. Wie bereits beschrieben (Kapitel 2.2.1.2) wurde die Kohorte in unveränderte (n = 13), fibrotische (n = 40) und kalzifizierte AOK-Taschen (n = 40) gruppiert. Weiterführend wurde diese Kohorte in Nicht-Diabetiker und Typ 2-Diabetiker unterteilt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Patientenkohorte für die Analyse der AOK-Taschen.

	Unverändert (n = 13)	Fibrotisch (n = 40)	Kalzifiziert (n = 40)
Geschlecht (männlich)	7	23	23
Alter	59 ± 11	73 ± 8	75 ± 4
Grad der Aorteninsuffizienz	AI 0	AI I-III	AI II-III
Grad der Aortenstenose	AS 0	AS I-II	AS II-III
Typ 2-Diabetiker	6	20	20

2.2.2 Aufreinigung und Analyse von RNA

2.2.2.1 RNA-Isolation aus humanen Aortenklappentaschen

Die kryokonservierten AOK-Taschen wurden mit einem gekühlten Metallmörser manuell und anschließend mit einem Gewebehomogenisator mechanisch in TRIzol zerkleinert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* nach Herstellerangaben. Zum Ende wurde die RNA in 50 µl Ribonuklease-freiem H₂O aufgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung und Reverse Transkription

Die Qualitäts- sowie die Quantitätsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mit dem Mikroplattenleser bei einer Absorption von 230, 260 und 280 nm.

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte über das *Quantitect Reverse Transcription Kit* nach Herstellerangaben, wobei 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben und auf eine Endkonzentration von 8 ng/µl eingestellt wurde.

2.2.2.3 Primerdesign und -sequenzen

Mit der Software *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) wurden die gewünschten Primersequenzen entworfen und mit der Primer-BLAST-Software von NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) auf ihre Spezifität überprüft. Um eine Amplifikation der genomischen DNA zu verhindern, wurden die designten Primer Exongrenzen-übergreifend erstellt und die Primersequenz mit der Gesamt-mRNA der entsprechenden Spezies abgeglichen. Die Primer wurden über *Eurofins Scientific* (Luxemburg, Luxemburg) bezogen und die jeweiligen Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 10 und 11 aufgelistet.

Tabelle 10: Primersequenzen für die qPCR humaner Gene.

Humane Zielgene	Gensymbol	F: Vorwärtsprimer (5' → 3')
		R: Rückwärtsprimer (3' → 5')
18S ribosomale RNA (endogene Kontrolle)	18 S	F: CGGGACTAAGACGGGAATCCT R: GGCCTCACTAAACCATCCAA
Adiponectin Receptor 1	ADIPOR1	F: GCATCTTCCGCATTTCATA R: GCATGGTCAAGATTCCCA
Adiponectin Receptor 2	ADIPOR2	F: AGGGCTTTATGGGCATGT R: CATGAGGGATCACTCGC
CDH13 / T-Cadherin	CDH13	F: AGCCAGCTGAATTCATTG R: AGTATGGGCTCGAGACC
Kollagen Typ 1	COL1A1	F: ATGACTATGAGTATGGGGAAGCA R: TGGGTCCCTCTGTTACTACTTT
Osteopontin	SPP1	F: TTGCAGTGATTTGCTTTTGC R: GCCACAGCATCTGGGTATTT

Tabelle 11: Primersequenzen für die qPCR oviner Gene.

Ovine Zielgene	Gensymbol	F: Vorwärtsprimer (5' → 3')
		R: Rückwärtsprimer (3' → 5')
60S-ribosomales Protein L13a (endogene Kontrolle)	RPL13 A	F: GATCCCACCACCCTATGACA R: CTTCAGACGCACAACCTTGA
Adiponectin Receptor 1	ADIPOR1	F: CTTCCCTGGAAAATTCGACA R: GAGACGCCGTAGAAGTGGAC
Adiponectin Receptor 2	ADIPOR2	F: GCGCCTGTTTTAAGA CATT R: CAGGCACAGGAAGAACACACA

CDH13 / T-Cadherin	CDH13	F: TGACACGGAAGCTTGGACAGA R: GAGAGTCCTGCCGTTGACAT
Cyclin D1	CCND1	F: CGAGAAGCTGTGCGTCTACA R: CGCCAGGTTCCAATTGAGTT
Dickkopf 1	DKK1	F: ACCTTGGATGGGTAAGTCTGAGA R: TCTAGCACAAACACAGCCCTG
Kollagen Typ 1	COL1A1	F: AAGACATCCCACCAGTCACC R: TAAGTTCGTGCGAGATCACG
Lipoproteinrezeptor-verwandtes Protein 6	LRP6	F: ACAGACCTCGAGCCATTGTG R: AGAGGACCTCCCGTTCTGTT
Osteocalcin	BGLAP	F: GAAGAGACTCAGGCGCTACC R: GCTCATCACAGTCAGGGTTG
SMAD1/5/8	SMAD1/5/8	F: AAGGAGGTGTGCATCAACCC R: GCTAAGAGGCTGTGCTGAGG
SMAD3	SMAD3	F: CACCAGATGAACCACAGCAT R: CGGCTCACAGTAGGTGACAG
SMAD6	SMAD6	F: AACCCCTACCATTTTCAGCCG R: TCCAGTGGCTTGTACTCGTC
SMAD7	SMAD7	F: CCCGATGGATTTTCTCAAAC R: AGGGGCCAGATAATTCGTT
TGF- β 1	TGF- β 1	F: GAGCCAGAGGCGGACTACTA R: TCGGACGTGTTGAAGAACAT

2.2.2.4 Quantitative Realtime PCR (qPCR)

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression der humanen sowie ovinen AOK-Taschen wurde die qPCR mittels *GoTaq PCR Master Mix* nach Herstellerangaben durchgeführt. Jede Probe wurde in Duplikaten oder Triplikaten gemessen und das in Tabelle 12 abgebildete Temperatur- und Zeitprofil verwendet.

Tabelle 12: Reaktionsansatz sowie Temperatur- und Zeitprofil der qPCR.

Komponenten	Volumen für eine Reaktion
Sybrgreen (Mastermix + CXR)	5,0 μ l
H ₂ O	2,7 μ l
Primer vorwärts	0,15 μ l
Primer rückwärts	0,15 μ l
cDNA	1,5 μ l (4 ng/Well)

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Inkubation	50 °C	120 s	1
Enzymaktivierung	95 °C	120 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Primerhybridisierung und -elongation	60 °C	30 s	
Schmelzkurve	Standardprotokoll des jeweiligen Gerätes		

Die Quantifizierung erfolgte mit der *StepOne Plus Software* (Version 2.3, Applied Biosystems) und nach der Δ CT-Methode. Dabei wurde die mRNA-Expression der einzelnen Proben auf die Expression der jeweiligen Kontrollprobe bezogen. Bei den humanen AOK-Taschen wurde als endogene Kontrolle 18S ribosomale RNA (18S) und bei den ovinen AOK-Taschen 60S ribosomale RNA (RPL13A) verwendet.

2.2.3 *In vitro*-Versuche mit ovinen Aortenklappentaschen

2.2.3.1 Isolation oviner Aortenklappentaschen

Zur Isolation der ovinen AOK-Taschen wurde zunächst durch Entfernen der Herzspitze (*Apex cordis*), Öffnen des linken Ventrikels sowie Einschneiden der Aorta entlang der Kommissuren die AOK freigelegt, sodass die einzelnen Taschen herauspräpariert werden konnten. Die AOK-Taschen wurden bis zur Fixierung in eisgekühlter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelagert. Zur statischen Kultivierung wurden die AOK-Taschen auf Kunststoffringen (\varnothing 1,7 cm) mit vier rostfreien Nadeln pro AOK-Tasche aufgespannt und unter passiver Spannung bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert (Abbildung 12).

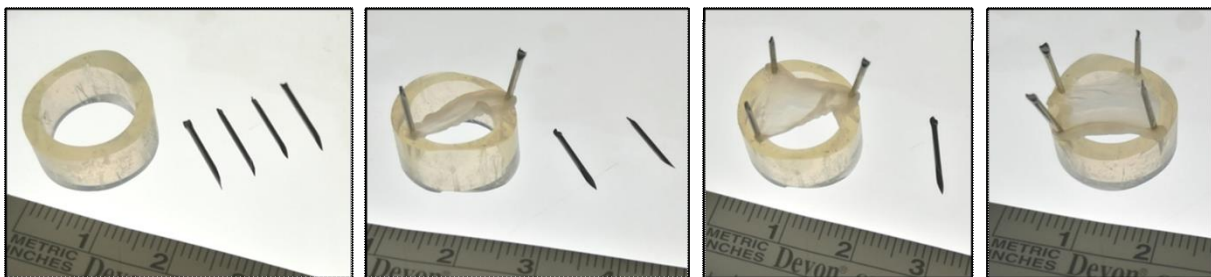


Abbildung 12: Übersicht über das 3D-CAVD-Modell mit ovinen Aortenklappentaschen. Nach Isolation der ovinen AOK wurden die AOK-Taschen unter sterilen Bedingungen aufgespannt. Dazu wurde zunächst eine Ecke der AOK-Tasche mit einer rostfreien Nadel auf einem Kunststoffring fixiert. Im Folgenden wurden drei weitere Nadeln zum vollständigen Aufspannen der AOK-Tasche verwendet und schließlich das Konstrukt in Kultur gebracht.

2.2.3.2 Isolation oviner valvulärer Interstitialzellen (VICs)

Zur Isolation der ovinen VICs wurden die AOK-Taschen, wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, isoliert und anschließend mittels Präparierbesteck in etwa 1 mm² große Fragmente zerkleinert und in eine Zellkulturflasche (75 cm²) mit ausreichend 10% DMEM und 450 mg/dl Glukose zum Auswandern der VICs überführt. Die VICs wurden bis Passage drei bei 37 °C und 5% CO₂ aufgezogen und anschließend bis zur späteren Stimulation kryokonserviert.

2.2.3.3 Kultivierung und Stimulation der Aortenklappentaschen

Die aufgespannten AOK-Taschen wurden jeweils in 10 ml DMEM und 450 mg/dl Glukose mit 1 µg/ml Amphotericin B unter drei verschiedenen Bedingungen in 6-Well-Platten für vier Wochen kultiviert. Der Medienwechsel wurde alle 3,5 Tage durchgeführt und die konditionierten Kulturüberstände wurden gesammelt.

Schemata der Kultivierung:

Effekte von TGF-β1 auf die myofibroblastoide und osteoblastoide VIC-Differenzierung

1. Kulturmedium
2. Kulturmedium + 10 mM β-GP + 1,5 mM CaCl₂
3. Kulturmedium + 10 mM β-GP + 1,5 mM CaCl₂ + 5 ng/ml TGF-β1

Medium 1 fungierte als Basalkulturbedingung (Kontrolle). Durch Kultivierung in Medium 2 konnte in unserer Forschungsgruppe, orientiert an Publikationen, bereits erfolgreich eine CAVD-typische Kalzifizierung der AOK-Taschen induziert werden [203]. Durch Kultivierung in Anwesenheit von TGF-β1 wurde dessen Einfluss auf die Kalzifizierung der AOK-Taschen analysiert. Gleiche Volumina von 4 mM HCl/ 0,1% BSA dienten als Vehikelkontrolle zur TGF-β1-Behandlung. Der Medienwechsel wurde alle 3,5 Tage für eine Kultivierungsdauer von vier Wochen durchgeführt.

Effekte von Pirfenidon auf die myofibroblastoide und osteoblastoide VIC-Differenzierung

Zur Analyse der Effekte von Pirfenidon auf Fibrose und Kalzifizierung wurden die AOK-Taschen unter folgenden Bedingungen für vier Wochen in 6-Well-Platten kultiviert. Als

Vehikelkontrolle wurde steriles Wasser verwendet. Der Medienwechsel wurde alle 3,5 Tage für eine Kultivierungsdauer von vier Wochen durchgeführt.

Effekte von Pirfenidon auf Fibrose

1. Kulturmedium
2. Kulturmedium + 5 ng/ml TGF- β 1
3. Kulturmedium + 5 ng/ml TGF- β 1 + 1 mg/ml Pirfenidon

Effekte von Pirfenidon auf Kalzifizierung

1. Kulturmedium
2. Kulturmedium + 10 mM β -GP + 1,5 mM CaCl₂
3. Kulturmedium + 10 mM β -GP + 1,5 mM CaCl₂ + 1 mg/ml Pirfenidon

Effekte von AdipoRon auf die myofibroblastoide und osteoblastoide VIC-Differenzierung

Zur Analyse der Effekte von AdipoRon auf Fibrose und Kalzifizierung wurden die AOK-Taschen unter folgenden Bedingungen für vier Wochen in 6-Well-Platten kultiviert. Als Vehikelkontrolle fungierte hier DMSO. Der Medienwechsel wurde alle 3,5 Tage für eine Kultivierungsdauer von vier Wochen durchgeführt.

Effekte von AdipoRon auf Fibrose

1. Kulturmedium
2. Kulturmedium + 5 ng/ml TGF- β 1
3. Kulturmedium + 5 ng/ml TGF- β 1 + 100 μ M AdipoRon

Effekte von AdipoRon auf Kalzifizierung

1. Kulturmedium
2. Kulturmedium + 10 mM β -GP + 1,5 mM CaCl₂
3. Kulturmedium + 10 mM β -GP + 1,5 mM CaCl₂ + 100 μ M AdipoRon

Nach vier Wochen in Kultur wurden die AOK-Taschen entsprechend der weiteren Analysen geerntet. Dazu wurden die Überstände gesammelt und eine Spitze der AOK-Taschen in Kryomedium eingebettet sowie die restliche AOK-Tasche kryokonserviert.

2.2.3.4 Kultivierung und Stimulation der VICs

Für die *in vitro*-Experimente wurden die primären ovinen VICs in Passage 4 verwendet, wobei jedes Replikat für eine einzelne ovine Isolation steht. Zur Stimulation der ovinen VICs wurden diese in 96- bzw. 6-Well-Platten ausgesät und die Stimulation bei einer Konfluenz von 70 - 80% gestartet. Dazu wurden die VICs in Duplikaten mit 100 μ l (96-Well) bzw. 2 ml (6-Well) DMEM für 8 Tage im Hinblick auf Kalzifizierung (10 mM β -GP + 1,5 mM CaCl_2) sowie Fibrose (5 ng/ml TGF- β 1) in Ab- oder Anwesenheit von Pirfenidon (Konzentrationsbereich 0,125 - 1,0 mg/ml) kultiviert. Der Medienwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt.

Ebenso wurde der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF- β 1 und des synthetischen Adiponektin-Rezeptoragonisten AdipoRon auf Kalzifizierung im 2D-CAVD-Modell untersucht. Hierzu wurden die VICs unter prokalzifizierenden Bedingungen kultiviert und mit 5 ng/ml TGF- β 1 oder mit AdipoRon im Konzentrationsbereich von 6,25 - 50 μ M stimuliert.

Nach der 8-tägigen Kultivierung wurden die Zellen entsprechend der weiteren Analysen geerntet.

2.2.3.5 Morphologische Analyse der Aortenklappentaschen

Nach vier Wochen wurden die kultivierten AOK-Taschen aus dem Medium in PBS zum Waschen überführt und zur fotografischen Dokumentation auf einem Lichttisch mit einem Größenstandard nebeneinander platziert. Die Gewebeareale mit makroskopisch sichtbaren grauen Verfärbungen, welche aufgrund von Biomineralisierung entstehen, wurden quantifiziert und als Indikator für Gewebekalzifizierung bewertet. Zudem wurden Farbveränderungen, die aus einer modifizierten Lichttransmission resultierten, als Maßstab für die Gewebedichte ausgewertet. Die digitalen Bildanalysen wurden mit der Bildanalysesoftware *ImageJ Version 1.51j8* (National Institute of Health) durchgeführt.

2.2.3.6 Morphologische Analyse der VICs

Die Zelldichte und die Morphologie der kultivierten VIC wurden als Viabilitätskontrolle regelmäßig unter einem Inversmikroskop kontrolliert. Nach 8 Tagen in Kultur wurden

die VICs geerntet und Fotos der stimulierten Zellen mit einer Mikroskopkamera und der Software *Leica Application Suite* (Version 3.8, Leica Microsystems GmbH) aufgenommen.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gewebe- und Zelllysaten

Die Proteine wurden aus den vier Wochen kultivierten AOK-Taschen mittels Zellysepuffer, inklusive Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (*Complete Mini* und *PhosSTOP*) isoliert und mit Hilfe des *Pellet Pestles*-Homogenisators zerkleinert. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 g, 4 °C und für 15 min wurden die Lysate bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Zur Isolation der Proteine aus den kultivierten VICs wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend ebenfalls mittels Zellysepuffer inklusive Proteinase- und Phosphataseinhibitoren durch Abschaben der Zellen und Vortexen isoliert. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 g, 4 °C und für 15 min wurden die Lysate bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gewebe- und Zelllysaten erfolgte über den *Bicinchoninic acid* (BCA)-Assay nach Angaben des Herstellers. Für das Testverfahren wurde eine Standardreihe aus 0 - 2 µg/µl BSA, welches in dem entsprechenden Probenpuffer eluiert wurde, verwendet. Die Probenmessung wurde in Duplikaten durchgeführt und die photometrische Quantifizierung erfolgte in einem Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Magellan-Software (Tecan Group AG) durchgeführt.

2.2.4.3 Immunoblotanalyse zur Bestimmung der Proteinexpression

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurde die quantitative Analyse von Proteinen aus den Gewebe- und Zelllysaten vorgenommen und anschließend über Western Blot-Analyse auf die Expression und Aktivierung spezifischer Proteine untersucht. Für die Analyse wurden 30 µg der Gewebe- bzw. Zelllysate oder 50 µl des konditionierten Kulturmediums verwendet. Die Proteinauftrennung erfolgte mit einem Proteingrößenstandard über 7 - 10% Polyacrylamidgele.

Mittels Western Blot-Analyse wurden die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine detektiert und quantifiziert. Dazu wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel durch Elektrophorese mittels Tankblotverfahren auf eine 0,45 µm porige Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer je nach Primärantikörper abhängigen 5% Blockierlösung (BSA oder Milchpulver) inkubiert.

Die Proteinexpression und -aktivierung wurde über primäre Antikörper (Tabelle 3) sowie *horseradish Peroxidase*-konjugierte Sekundärantikörper (Tabelle 4) mittels Fluoreszenz-basierter Detektion quantifiziert.

Die Immundetektion der Proteinbanden erfolgte über das Chemilumineszenzverfahren und wurde am Gel-Imager visualisiert. Die Quantifizierung wurde mithilfe der ImageJ Software durchgeführt. Dabei wurde die, um den Hintergrund korrigierte, integrierte Intensität der einzelnen Banden als Maß für die Menge an exprimierten Proteinen herangezogen. Bei den Gewebe- und Zelllysaten wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle und zur Relativierung verwendet. Zur Ermittlung der Proteinaktivierung wurde die phosphorylierte Variante des Proteins zur Gesamt-Expression des Proteins relativiert. Die Kollagen Typ 1-Sekretion aus den Kulturüberständen wurde auf den jeweiligen Kontrollwert des Replikats normiert.

2.2.4.4 Kalziumquantifizierung

Um die durch die Stimulation hervorgerufenen Veränderungen im intrazellulären Kalziumniveau zu analysieren, wurden die kultivierten AOK-Taschen in einem Assay-spezifischen Lysepuffer homogenisiert. Anschließend wurde die Konzentration von

freiem Ca^{2+} in den Lysaten über das *Calcium Assay Kit* kolorimetrisch in einem Microplattenleser entsprechend den Anweisungen des Kit-Herstellers gemessen. Bei diesem Testverfahren bildet der im Kit enthaltene Farbstoff Phenolsulfonphtalein mit dem freien Ca^{2+} in den Lysaten einen stabilen blauen Komplex, welcher spektralphotometrisch bestimmt werden kann. Die Kalziumkonzentration der Proben wurde anhand des Standards (0 - 20 mg/dl in Tris-HCl-Puffer) berechnet und jeweils auf die Kontrollbedingung des zugehörigen Replikats normiert.

2.2.4.5 Quantifizierung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in konditionierten Kulturüberständen

Mit Hilfe des LDH-Assays können Rückschlüsse auf die Zytotoxizität der Stimulation getroffen werden, da es bei der Verletzung der Zellmembranen u.a. durch Stress zur Freisetzung des intrazellulären Enzyms Laktatdehydrogenase kommt. Bei diesem Testverfahren katalysiert die freigesetzte LDH die Oxidation von Laktat und die Reduktion von NAD^+ zu NADH. Dieses wird von der Reduktase verwendet um Luciferin zu bilden, welches durch Ultra-Glo™ rLuciferase zu einem Biolumineszenzsignal umgewandelt und anschließend gemessen werden kann.

Zur kolorimetrischen Messung der LDH-Aktivität wurden 50 μl der konditionierten Kulturüberstände der AOK-Taschen sowie der kultivierten VICs zum Erntezeitpunkt mittels *LDH-Cytotoxicity Assay Kit* nach Herstellerangaben verwendet und die Analyse der LDH-Gewebe- bzw. -Zellaktivität über die Magellan-Software (Tecan Group Ltd.) durchgeführt. Die LDH-Freisetzung in den Überständen wurde jeweils auf die Kontrollbedingung des zugehörigen Replikats normiert.

2.2.5 Histologie

Nach vier Wochen wurde jeweils ein kleines Areal der kultivierten AOK-Taschen in Kryomedium eingebettet und für die Gewebeanalysen durch verschiedene Färbungen zunächst 5 μm Schnitte am Kryostaten angefertigt.

2.2.5.1 4'-6'-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)-Färbung

Zur Analyse der Zellkernanzahl und -dichte in den AOK-Taschen, wurden diese mit DAPI-Lösung für 10 min inkubiert. Am Lichtmikroskop wurden Aufnahmen der DAPI-gefärbten Schnitte angefertigt und für jedes Spendertier wurden die DAPI-positiven Zellen in fünf gleichen Arealen pro Schnitt und Behandlung gezählt und quantifiziert. Die Anzahl der Zellkerne wurde jeweils auf die Kontrollbedingung des zugehörigen Replikats normiert.

2.2.5.2 Alizarinrotfärbung und -extraktion

Mit der Alizarinrot S-Färbung konnten Kalziumablagerungen in der VIC-Kultur sowie in den Gewebe-Kryoschnitten nachgewiesen werden. Das Färbeprinzip beruht auf der Chelatkomplexbildung des Alizarinrot S mit dem Kalziumphosphat, welches durch osteogene Differenzierung oder degenerative Prozesse in der EZM in den Zellen bzw. im Gewebe akkumuliert.

Die eingebetteten Kryoschnitte der AOK-Taschen bzw. die kultivierten Zellkulturplatten ohne Medienüberstände wurden zur Fixierung für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 2% Alizarinrot S-Lösung behandelt. Die Fotos wurden mit dem Lichtmikroskop aufgenommen und für die AOK-Taschen drei Schnitte pro Spendertier und Behandlung quantitativ ausgewertet. Der Anteil der Alizarinrot S-positiven Areale wurde jeweils auf die Kontrollbedingung des zugehörigen Replikats normiert.

2.2.5.3 ALP-Färbung

Die ALP-Färbung dient der Analyse der Osteoblastenaktivität und somit als direkter Nachweis für Kalzifizierung. Als Färbelösung wurde Nitroblue Tetrazolium/ 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate (NBT/BCIP) Substrat verwendet. Durch Abspaltung der Phosphatgruppe durch die ALP wird BCIP in Bromchlorinoxyl überführt. Dabei wird ein Proton freigesetzt, welches das gelbe NBT zum violetten Diformazan reduziert und dadurch beide Farbstoffe ausfallen, was in einer violetten Färbung resultiert [204].

Um die ALP auch im Gewebe der AOK-Taschen nachzuweisen, wurden die Kryoschnitte für 30 min bei 37 °C mit der NBT/BCIP-Lösung inkubiert. Die gefärbten

Schnitte wurden am Lichtmikroskop fotografiert und drei Schnitte pro Spendertier und Behandlung quantitativ ausgewertet. Der Anteil der ALP-positiven Areale wurde jeweils auf die Kontrollbedingung des zugehörigen Replikats normiert.

2.2.5.4 Von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung dient ebenfalls als Nachweis für Kalzifizierung, da die in der Färbelösung enthaltenen Silberionen mit dem Phosphat reagieren und durch Reduktion mit Hydrochinon als schwarzbraune Färbung sichtbar werden.

Dazu wurden die Gefrierschnitte zunächst für 8 min in eiskaltem Aceton entwässert und anschließend für 60 min in einer 5% Silbernitratlösung unter einer UV-Lampe inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Gefrierschnitte in einer Natriumcarbonat-Formaldehydlösung für 2 min reduziert. Nach erneutem Waschen wurden die Gefrierschnitte für 5 min in einer 5% Natriumthiosulfatlösung fixiert. Im Anschluss daran wurden die Gefrierschnitte gewaschen und für 10 min mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat angefärbt. Schließlich wurden die Gefrierschnitte nochmals gewaschen, mit der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und eingedeckt. Die gefärbten Schnitte wurden am Lichtmikroskop fotografiert und drei Schnitte pro Spendertier und Behandlung quantitativ ausgewertet. Der Anteil der von Kossa-positiven Areale wurde jeweils auf die Kontrollbedingung des zugehörigen Replikats normiert.

2.2.6 Immunhistochemie

2.2.6.1 TUNEL Assay

Der TUNEL Assay (*Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) visualisiert apoptotische Zellen innerhalb eines Gewebes, wobei die apoptotisch-induzierten DNA-Doppelstrangbrüche mittels *Click-it Plus TUNEL assay Alexa Fluor 594* an histologischen Kryoschnitten angefärbt wurden. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte über *ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI*. Aufnahmen der TUNEL-gefärbten Präparate wurden am Leica DM2000 erstellt. Für jedes Spendertier wurden die Ergebnisse von drei Aufnahmen jeweils innerhalb eines Areals pro Behandlungsgruppe quantifiziert.

2.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Nach vier Wochen wurden die kultivierten AOK-Taschen von drei verschiedenen Spendertieren in 2,5% Glutaraldehyd und 4% Formaldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) für acht Stunden bei 4 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) wurden die Proben mit 1% OsO₄ in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,4) für eine Stunde behandelt. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Natriumcacodylatpuffer für jeweils 10 min bei RT gewaschen und mit einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert (30%, 50%, 70% Aceton). Für die Kontrastierung wurden die Proben in 0,5% Uranylacetat/ 1% Phosphor-Wolframsäure in 70% Aceton für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Entwässerung wurde durch Eintauchen der Proben in 90% und 100% Aceton beendet. Anschließend wurden die Proben in Spurr's Epoxidharz eingebettet und für 24 Stunden bei 70 °C polymerisiert. Es wurden Ultradünnschnitte (70 nm) mittels *Ultracut EM* angefertigt. Die Aufnahmen wurden am Transmissionselektronenmikroskop bei 100 kV mit einer Morada-Kamera aufgenommen und sind in verschiedenen Arealen der präparierten Gewebeschnitte entstanden.

2.2.8 Statistische Analyse

Für die statistische Datenanalyse und graphische Darstellung wurde die Software GraphPad PRISM Version 6.07 verwendet. Für die einzelnen Spendertiere wurde eine Relativierung der experimentellen Daten der unterschiedlichen Behandlungsgruppen auf den Wert der jeweiligen Kontrollgruppe durchgeführt und die Daten wurden als Mittelwert + Standardabweichung in relativen Einheiten (RE) dargestellt. Für die Signifikanzberechnungen wurden ausschließlich nicht parametrische Analyseverfahren verwendet, wie der Kruskal-Wallis-Test sowie als post-hoc-Test der Mann-Whitney U-Test oder für paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen der zweiseitige Wilcoxon Test. Zusätzlich wurde für die kalkulierten Signifikanzen eine Holm-Bonferoni-Korrektur vorgenommen. Als statistisch signifikant wurden alle Werte $p \leq 0,05$ bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von TGF- β 1 auf Fibrose und Kalzifizierung im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

3.1.1 Regulation von SMAD3 und SMAD7 sowie Autoinduktion von TGF- β 1 als Indikatoren einer effektiven TGF- β 1-Signaltransduktion in AOK-Gewebe

Als zentraler Transkriptionsfaktor des TGF- β 1-Signalwegs spielt SMAD3 eine wichtige regulative Rolle bei der CAVD-Pathogenese und moduliert nach Aktivierung durch Phosphorylierung die Transkription der TGF- β 1-Zielgene [23], [84]. Die Analyse mittels Immunoblot (Abbildung 13 A) ergab, dass die Kultivierung von AOK-Taschen unter prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl₂) zu einer leichten Verringerung der SMAD3-Expression (- 23%) bei unveränderter Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Abbildung 13 B und C). In Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium zeigte sich eine signifikante Hochregulation des Phosphorylierungsstatus von SMAD3 (+ 160%), während die SMAD3-Expression weiter verringert wurde (- 49%). Die Analyse mittels qPCR ergab ein ähnliches Regulationsmuster der SMAD3-Expression auf mRNA- (Abbildung 13 D) und Proteinebene.

Die Analyse des inhibitorischen SMAD7, dessen Expression als negativer Rückkopplungsmechanismus zur Inhibition einer übermäßigen TGF- β 1-induzierten SMAD2- und SMAD3-Aktivierung hochreguliert wird [84], ergab, dass die SMAD7-Expression unter prokalzifizierenden Medienbedingungen nur geringfügig erhöht ist (Abbildung 13 E), während die Anwesenheit von TGF- β 1 eine fast vierfache Hochregulation der SMAD7-Expression induzierte.

Auch die Autoinduktion von TGF- β 1 ist ein weiterer Marker für die Aktivierung des TGF- β 1-Signalwegs (Abbildung 13 F). Im Vergleich zur Kontrollbedingung hatte die Kultivierung der AOK-Taschen unter prokalzifizierenden Medienbedingungen keinen Einfluss auf die TGF- β 1-Expression. Mit zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium war die Gewebeexpression von TGF- β 1 sowohl im Vergleich zur prokalzifizierenden als auch zur Kontrollbedingung signifikant hochreguliert.

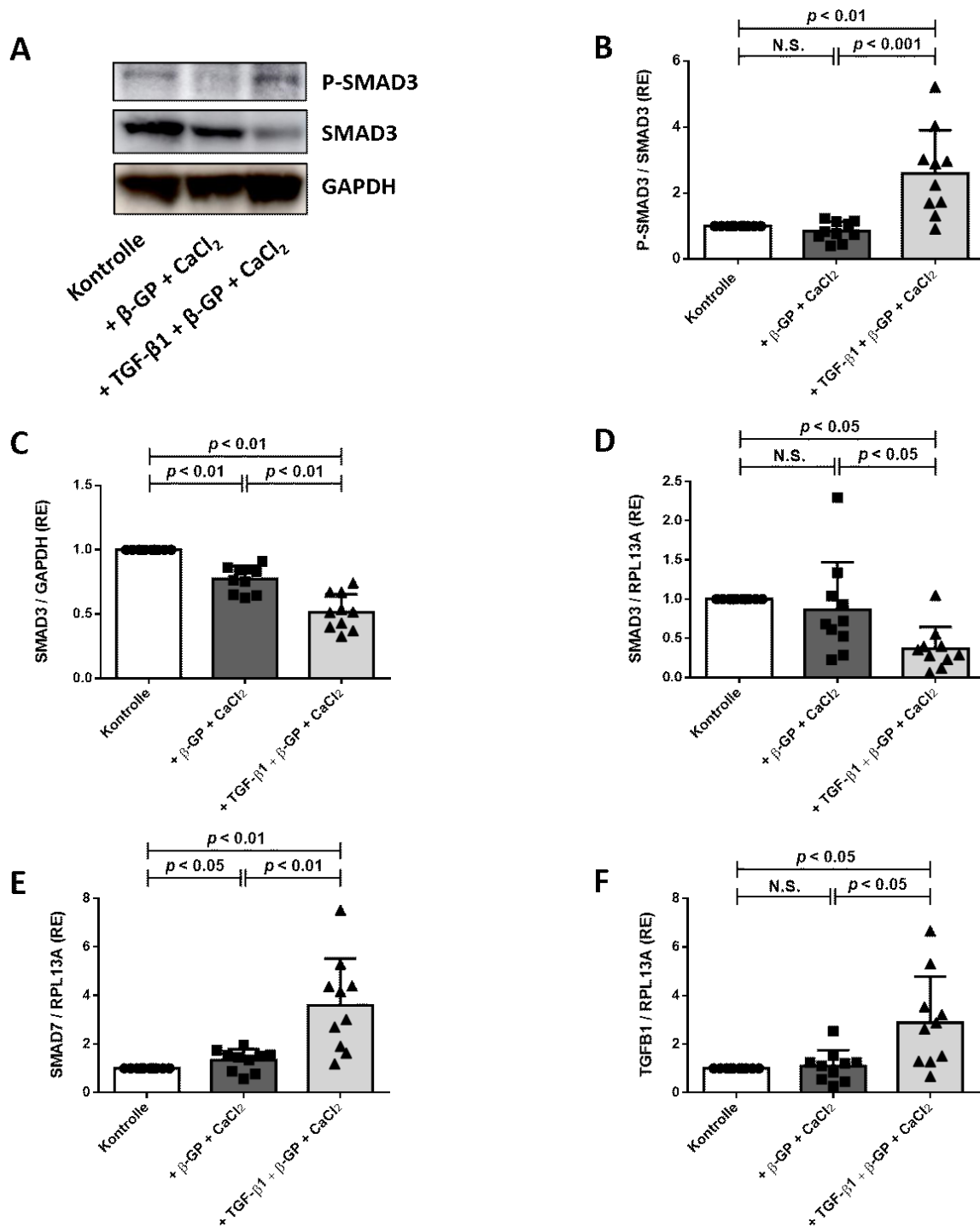


Abbildung 13: Regulation von SMAD3 und SMAD7 sowie Autoinduktion von TGF- β 1 als Indikatoren einer effektiven TGF- β 1-Signaltransduktion in AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalfizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. Die Aktivierung und Expression von SMAD3 wurde mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des Bandenmusters von P-SMAD3, SMAD3 (Molekulargewicht: 52 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von phosphoryliertem SMAD3 relativ zu Gesamt-SMAD3. (C) Quantifizierung der Expression von SMAD3 relativ zu GAPDH. (D) Quantifizierung der mRNA-Expression von SMAD3 relativ zu RPL13A mittels qPCR. (E) Quantifizierung der mRNA-Expression von SMAD7 relativ zu RPL13A mittels qPCR. (F) Quantifizierung der mRNA-Expression von TGF- β 1 (Genname: TGFB1) relativ zu RPL13A mittels qPCR. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

3.1.2 TGF- β 1 induziert eine fibrotische nicht-kalzifizierte Morphologie des AOK-Gewebes

Die makroskopische Analyse der Gewebemorphologie (Abbildung 14 A und B) ergab, dass die prokalzifizierenden Medienbedingungen zu großflächigen grauen Verfärbungen des AOK-Gewebes führten, welche vermutlich auf Biomineralisierung im Zuge der Kalzifizierung zurückzuführen sind [205]. Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium ergaben sich jedoch keine makroskopisch erkennbaren Anzeichen von Kalzifizierung der AOK-Taschen. Stattdessen war die Gewebemorphologie durch eine ausgeprägte homogene Verdickung und Verdichtung gekennzeichnet, also entsprechend typischen Manifestationen von Fibrose [206]. Diese visuellen Eindrücke stimmten mit den Ergebnissen der auf Lichttransmission-basierenden digitalen Analyse der Gewebedichte als Indikator für Veränderungen der Gewebemorphologie überein (Abbildung 14 C). Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen führte die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der Gewebedichte, vermutlich aufgrund der eingetretenen Biomineralisierung. Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium trat eine ähnliche Zunahme der Gewebedichte auf, was vermutlich auf einer Fibrose-assoziierten Verdickung und Verdichtung des AOK-Gewebes beruht.

Darüber hinaus führte die Kultivierung der AOK-Taschen unter prokalzifizierenden Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Vergrößerung der durchschnittlichen Gewebefläche (Abbildung 14 D). Dieser Effekt ging jedoch mit der zusätzlichen Anwesenheit von TGF- β 1 verloren, da diese Kulturbedingung zu einer Verringerung der AOK-Taschengrößen im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

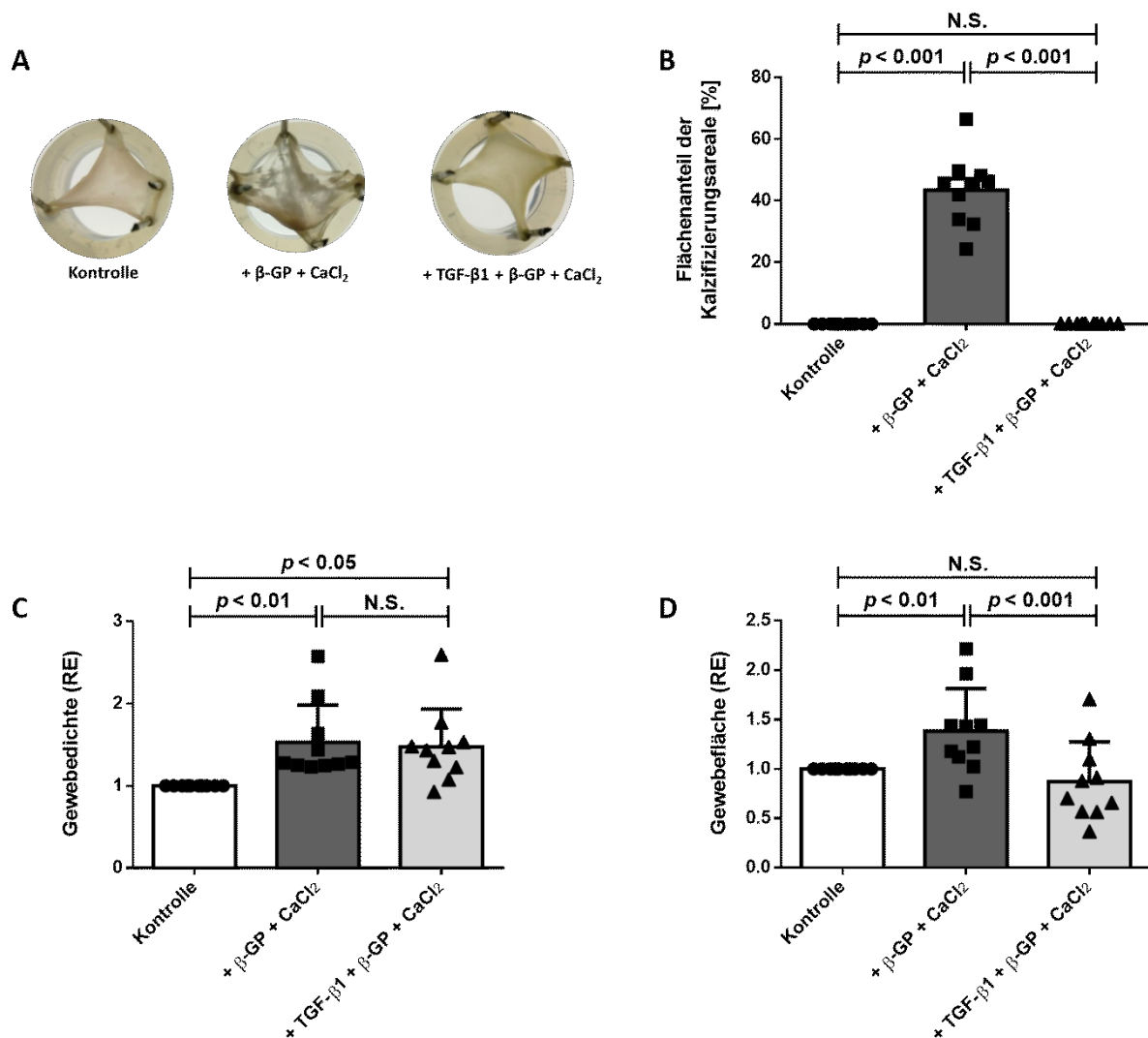


Abbildung 14: TGF- β 1 induziert eine fibrotisch nicht-kalzifizierte Morphologie des AOK-Gewebes. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von TGF- β 1 kultiviert. Die quantitative morphologische Analyse der AOK-Taschen erfolgte mittels digitaler Bildanalyse. (A) Repräsentatives Bild der AOK-Gewebemorphologie unmittelbar nach Ende der Kultivierung. (B) Der kalzifizierte Flächenanteil des AOK-Gewebes wurde durch digitale Bildanalyse von makroskopisch sichtbaren grauen Verfärbungen, die biomineralisierte Einlagerungen darstellen, quantifiziert. (C) Die Gewebedichten wurden durch digitale Bildanalyse von Farbänderungen, die aus einer modifizierten Lichtdurchlässigkeit resultierten, quantifiziert. (D) Die Gewebeflächen wurden durch digitale Bildanalyse der AOK-Taschen quantifiziert. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (C) und (D) in relativen Einheiten (RE) ($n = 10$).

Die ultrastrukturelle Analyse des AOK-Gewebes mittels Elektronenmikroskopie ergab, dass die Kultivierung unter prokalzifizierenden Medienbedingungen zu lokal unterschiedlich starken Graden der Gewebekalzifizierung führte (Abbildung 15). In Bereichen früher Kalzifizierung sind kleine kalzifizierte Areale in eine EZM eingebettet, die durch eine im Vergleich zum Kontrollgewebe leicht verringerte Kollagendichte gekennzeichnet sind. Darüber hinaus besitzen die VICs aufgrund von gewellten

Zellmembranen mit vielen Vertiefungen eine vergrößerte Oberfläche und sind durch eine erhöhte Prävalenz von Ribosomen-bedecktem rauem endoplasmatischem Retikulum (ER) gekennzeichnet, was insgesamt auf eine verstärkte expressionelle Aktivierung hindeutet. Im Gegensatz dazu wird in Bereichen fortgeschrittener Kalzifizierung die Gewebemorphologie von großflächigen, grau- bis schwarz- erscheinenden, kalzifizierten EZM-Einlagerungen dominiert. Die Kollagenfasern in unmittelbarer Nähe dieser großen Biomineralaggregate sind vollständig verschwunden und weisen ansonsten ein stark degeneriertes Erscheinungsbild auf, was durch das Fehlen von geordneten Strukturen charakterisiert ist (Abbildung 15, untere Reihe).

Im Gegensatz dazu verhindert die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium die Ausbildung aller gerade beschriebener Kalzifizierungsmerkmale und induziert stattdessen die Entwicklung von Gewebefibrose. In Arealen früher Fibrose sind die VICs beträchtlich vergrößert und weisen durch die stark gewellte Zellmembran eine extrem vergrößerte Zelloberfläche auf. Sie enthalten zudem viele Mitochondrien, raues ER und Golgi-Apparate, die insgesamt auf eine intensive Stoffwechsel-, Expressions- und Sekretionsaktivität hindeuten. Darüber hinaus sind die VICs von einer EZM umgeben, die von einem bereits verdichteten Netzwerk aus Kollagenfasern durchzogen wird. In Bereichen mit fortgeschrittener Fibrose wird die AOK-Gewebehistologie dagegen von einem extrem dichten Netzwerk eng aneinander liegender Kollagenfasern dominiert (Abbildung 15).

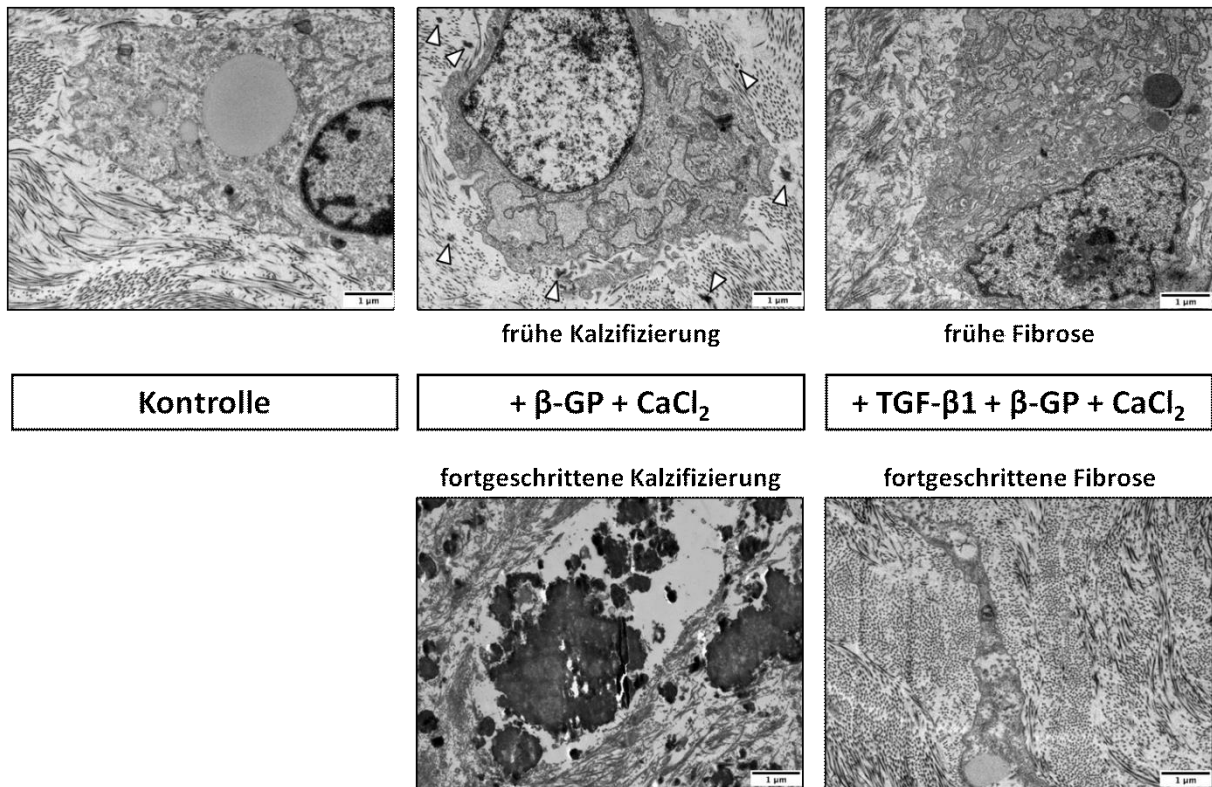


Abbildung 15: TGF- β 1 induziert eine fibrotisch nicht-kalzifizierte Mikroanatomie des AOK-Gewebes. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. Anatomische Übersichten der resultierenden AOK-Gewebehistologien wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie erstellt. Gezeigt werden repräsentative Bilder, die phänotypische Veränderungen der VICs und strukturelle Veränderungen der EZM im Stadium einer frühen bzw. fortgeschrittenen Gewebefibrose und -kalzifizierung abbilden. Im Vergleich zu Kontrollbedingungen (oben, links) führte die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen zu lokal unterschiedlichen Graden der Kalzifizierung. Obere, mittlere Aufnahme: In Bereichen früher Kalzifizierung sind kleine kalzifizierte Areale (weiße Pfeilspitzen) in die EZM eingebettet. Die VICs weisen eine vergrößerte Oberfläche auf und zeichnen sich durch ein hohes Vorkommen von rauem Endoplasmatischem Retikulum (ER) als Anzeichen für eine verstärkte expressionelle Aktivität aus. Untere, mittlere Aufnahme: Bereiche fortgeschrittener Kalzifizierung sind durch große Kalzifizierungsbereiche (großflächige schwarze Strukturen) gekennzeichnet. Kollagenfibrillen lösen sich in der Nähe dieser Biomineraleaggregate auf und sind ansonsten durch ein stark degeneriertes Erscheinungsbild gekennzeichnet. Die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium blockiert die Kalzifizierung und fördert stattdessen die Entwicklung einer Gewebefibrose. Obere, rechte Aufnahme: In Bereichen früher Fibrose sind die VICs deutlich vergrößert, weisen eine extrem vergrößerte Oberfläche auf und enthalten viele Mitochondrien, raues ER sowie Golgi-Apparate als Anzeichen für eine verstärkte metabolische, expressionelle und sekretorische Aktivität. Die EZM wird durch ein bereits verdichtetes Netzwerk von Kollagenfibrillen durchzogen. Untere, rechte Aufnahme: In Bereichen fortgeschrittener Fibrose sind kompaktierte VICs in ein extrem verdichtetes Kollagennetzwerk eingebettet. Elektronenmikroskopische Bilder wurden in Gewebeschnitten von ovinen AOK-Taschen aufgenommen (Repräsentative Aufnahmen; n = 3).

Ein genauerer Blick auf ultrastrukturelle Details zeigt, dass sich in Bereichen mit fortgeschrittener Gewebekalzifizierung große Zellfragmente (Abbildung 16 A, oben) sowie Ansammlungen von freien Organellen, welche Reste abgestorbener VICs darstellen (Abbildung 16 A, unten), unmittelbar in der Umgebung von dunklen Biomineralkörpern befinden, und sich keine intakten aktiven VICs nachweisen lassen.

Zudem erscheint das lokale Kollagennetzwerk stark aufgelöst, d.h. die Kollagenfasern sind in unmittelbarer Umgebung der kalzifizierten Areale nicht mehr nachzuweisen und ihre Dichte ist darüber hinaus erheblich verringert (Abbildung 16 B, oben). Außerdem verlaufen sie nicht mehr gleichmäßig angeordnet, und einzelne Fasern scheinen aneinander zu haften. Darüber hinaus erscheinen die Kollagenfasern weniger scharf definiert und zahlreiche freie Kollagenfibrillen sind erkennbar (Abbildung 16 B, unten).

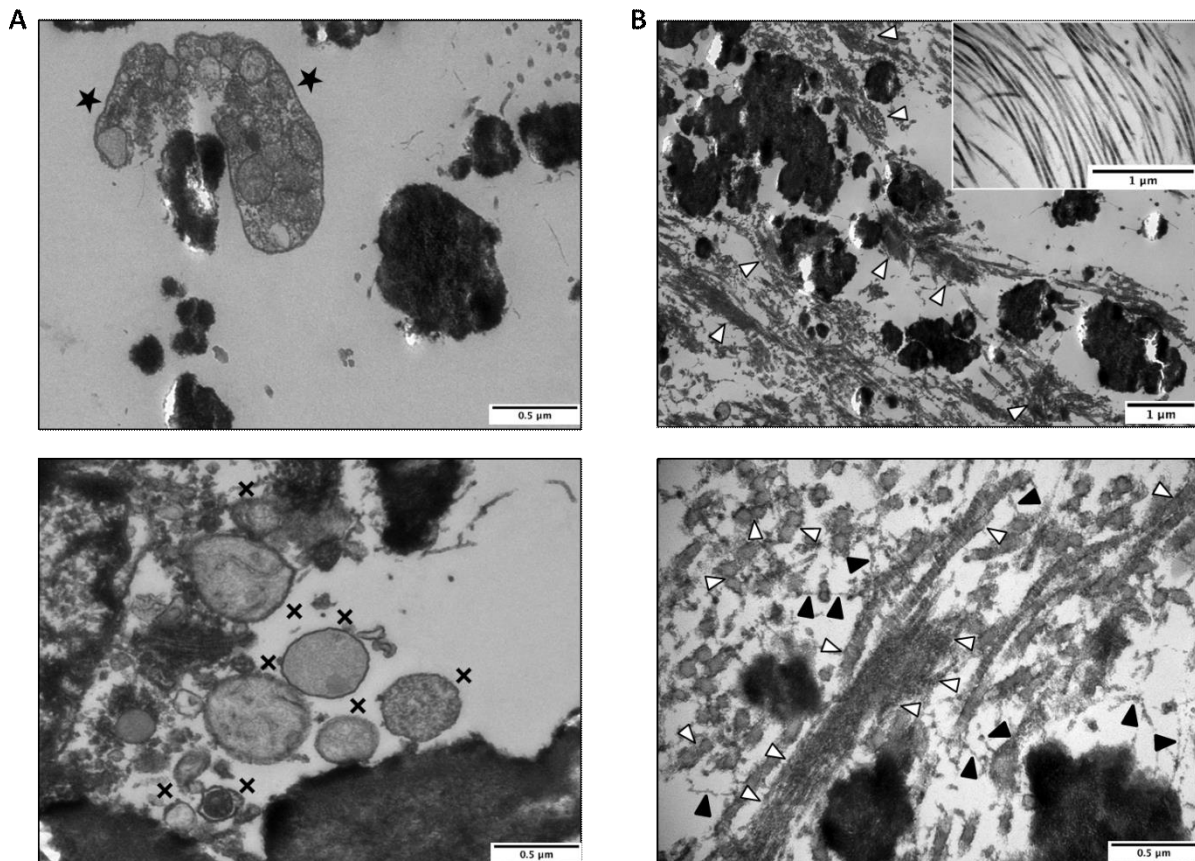


Abbildung 16: Fortgeschrittene Kalzifizierung des AOK-Gewebes ist mit dem Zelltod von VICs und der Auflösung der Kollagen Typ I-Struktur der EZM verbunden. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. Der Phänotyp von VICs sowie die Struktur des Kollagen Typ I-Netzwerks in Bereichen fortgeschrittener AOK-Gewebekalzifizierung wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert und repräsentative Bilder werden gezeigt. (A) Große Zellfragmente (oben, schwarze Sterne) sowie Ansammlungen freier Organellen repräsentieren Überreste abgestorbener VICs (unten, schwarze Kreuze) und sind dicht um die kalzifizierten Areale (großflächige schwarze Strukturen) angeordnet. (B) Das lokale Kollagennetzwerk ist stark zerfallen, d.h. die Kollagenfibrillen in unmittelbarer Umgebung der kalzifizierten Areale (großflächige schwarze Strukturen) sind verschwunden. Ansonsten ist ihre Dichte signifikant reduziert, sie verlaufen ungeordnet und einzelne Fibrillen haften zusammen (oben und unten, weiße Pfeilspitzen). Die Kollagenfibrillen erscheinen weniger scharf definiert und es sind zahlreiche freie Kollagen-Polypeptidketten zu erkennen (unten, schwarze Pfeilspitzen). Zum Vergleich zeigt der kleine Bildausschnitt in der oberen rechten Ecke das Kollagen Typ I-Netzwerk nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen. Elektronenmikroskopische Bilder wurden in Gewebeschnitten von ovinen AOK-Taschen aufgenommen (n = 3).

Im Gegensatz dazu sind in Bereichen mit fortgeschrittener AOK-Gewebefibrose die VICs eng in die EZM eingebettet und zeichnen sich durch Kompaktierung, eine reduzierte Oberfläche sowie ein stark verringertes Volumen des Zytoplasmas aus. Dieses liegt eng um den Zellkern und ist reich an rauem ER, Mitochondrien, Golgi-Apparaten und sekretorischen Vesikeln, was auf eine erhöhte expressionelle Aktivität hindeutet (Abbildung 17 A). Außerdem ist die Dichte des Kollagenfasernetzwerkes stark erhöht, die einzelnen Fasern erscheinen scharf definiert und verlaufen in geordneter Weise, während keine einzelnen Kollagenfibrillen nachweisbar sind (Abbildung 17 B).

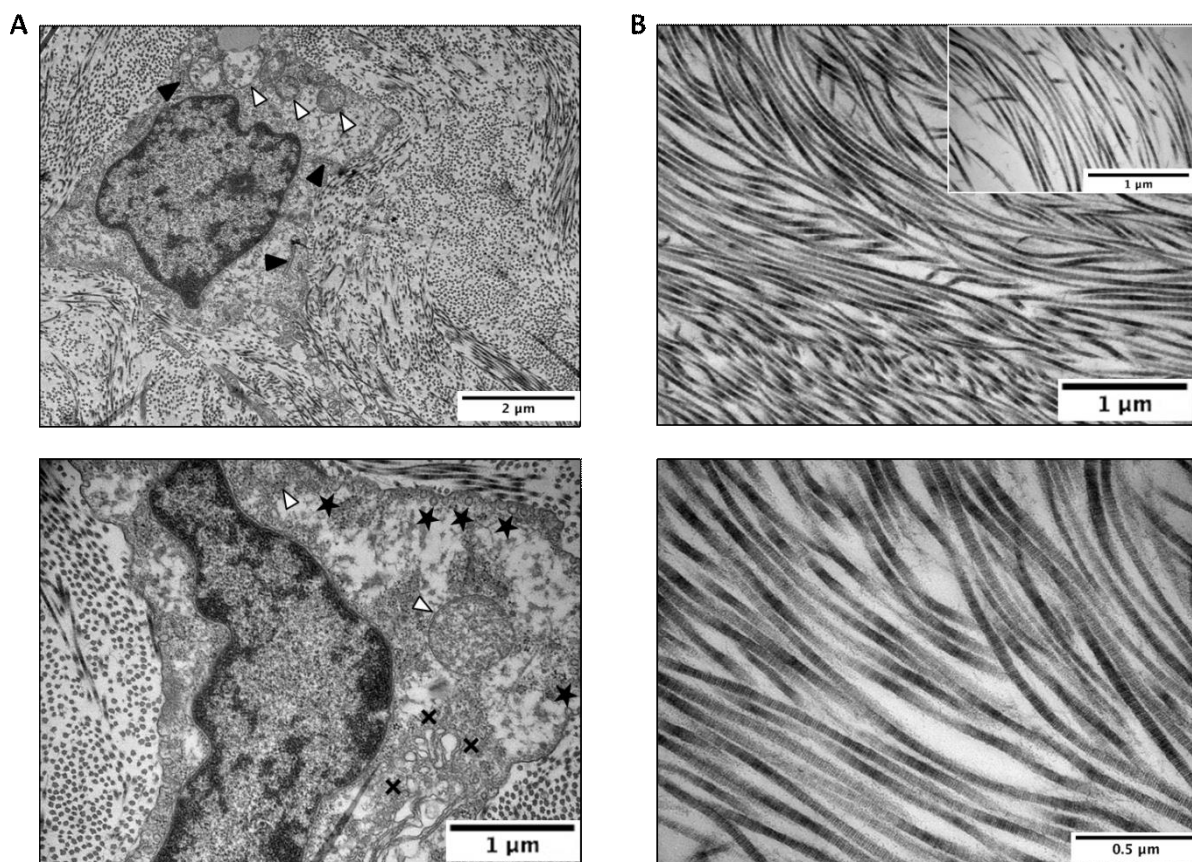


Abbildung 17: Fortgeschrittene Fibrose des AOK-Gewebes ist mit Kompaktierung der VICs und Verdichtung der EZM-Kollagenstruktur verbunden. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. Der VIC-Phänotyp und die Struktur des Kollagen Typ I-Netzwerkes in Bereichen fortgeschrittener AOK-Gewebefibrose wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert und repräsentative Bilder werden gezeigt. (A) Die VICs sind dicht in die EZM eingebettet und zeichnen sich durch kompaktierte Größe, reduzierte Oberfläche sowie ein deutlich verringertes zytoplasmatisches Volumen aus, was dennoch reich an rauem ER (oben, schwarze Pfeilspitzen), Mitochondrien (oben und unten, weiße Pfeilspitzen), Golgi-Apparaten (unten, schwarze Kreuze) und sekretorischen Vesikeln (unten, schwarze Sterne) als Anzeichen für eine hohe expressionelle Aktivität ist. (B) Die Dichte des Kollagennetzwerkes ist extrem erhöht, die einzelnen Fibrillen erscheinen scharf definiert und verlaufen geordnet, während keine einzelnen Kollagen-Polypeptidketten erkennbar sind. Zum Vergleich zeigt der kleine Bildausschnitt in der oberen rechten Ecke das Kollagen Typ I-Netzwerk nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen. Elektronenmikroskopische Bilder wurden in Gewebeschnitten von ovinen AOK-Taschen aufgenommen ($n = 3$).

3.1.3 TGF- β 1 erhöht die Zelldichte sowie RNA- und Proteingehalte in AOK-Gewebe

Eine erhöhte proliferative und expressionelle Aktivität von VICs sowie ein verstärkter Einbau von Strukturproteinen in die EZM sind Kennzeichen des CAVD-assoziierten fibrotischen Gewebeumbaus [14], [207]. Im Vergleich zu Kontrollbedingungen führte die Kultivierung von AOK-Gewebe unter prokalzifizierenden Bedingungen zu unverändertem RNA- (Abbildung 18 A) und leicht erhöhtem Proteingehalt (+ 25%) (Abbildung 18 B). Die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium induzierte jedoch eine signifikante Hochregulation der RNA- (mehr als das Fünffache) und Proteinkonzentrationen (mehr als das Zweifache) im AOK-Gewebe. Entsprechend zeigte sich in der Elektronenmikroskopie (Abbildung 18 C), dass die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu VICs führte, die sich durch einen erhöhten Gehalt an Ribosomen-besetzten rauen ER und Golgi-Apparaten auszeichnen, die aktiv in die Proteinexpression und -sekretion involviert sind. Diese Veränderungen, die auf eine erhöhte expressionelle VIC-Aktivierung hindeuten, wurden durch die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium weiter verstärkt. In Bezug auf die VIC-Zahlen (Abbildung 18 D) führte die Kultivierung unter prokalzifizierenden Medienbedingungen zu einer leicht verringerten durchschnittlichen Zelldichte (- 26%) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Im Gegensatz dazu induzierte das zusätzliche Vorhandensein von TGF- β 1 im Kulturmedium eine mehr als zweifache Zunahme der Zelldichte.

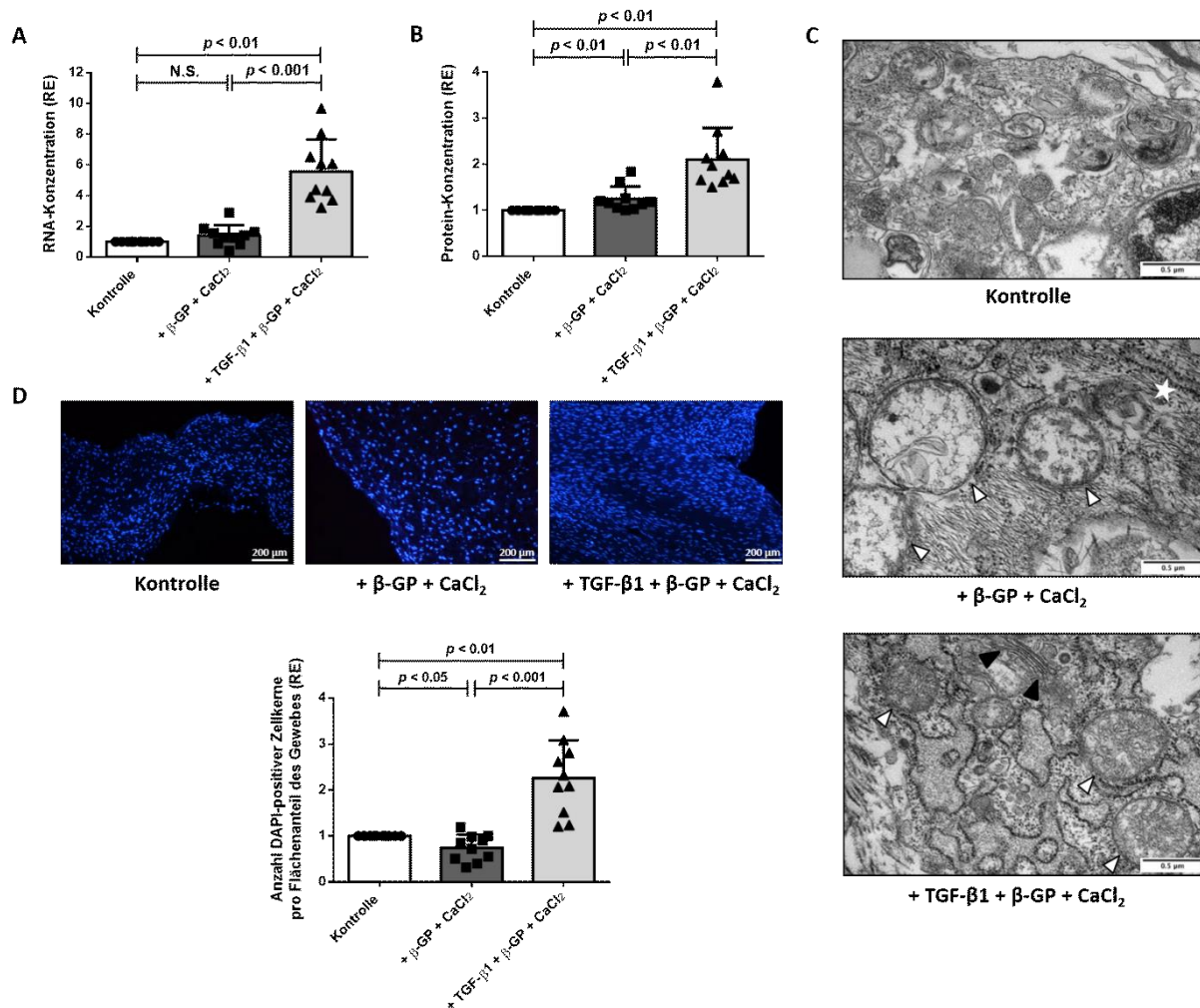


Abbildung 18: TGF- β 1 erhöht die Zelldichte sowie RNA- und Proteingehalte in AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalfizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. RNA- (A) und Proteinkonzentrationen (B) wurden in AOK-Gewebelysaten bestimmt. (C) Die expressionelle Aktivierung der VICs wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie visualisiert und repräsentative Bilder werden gezeigt. Im Vergleich zu Kontrollbedingungen (oben) führte die Kultivierung unter prokalfizierenden Bedingungen (Mitte) zu VICs, die sich durch ein erhöhtes Vorkommen von rauem ER (weißer Stern), Golgi-Apparaten (schwarze Pfeilspitzen) und Mitochondrien (weiße Pfeilspitzen) auszeichnen, was kennzeichnend für eine hohe expressionelle und metabolische Aktivität ist. Diese Änderungen wurden in Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium (unten) nochmals verstärkt. Elektronenmikroskopische Bilder wurden in Gewebeschnitten von ovinen AOK-Taschen aufgenommen (n = 3). (D) Die Zelldichte wurde mittels DAPI-Färbung von Gefrierschnitten sichtbar gemacht, was zu einer blauen Anfärbung der Zellkerne führte. Oben: Repräsentative Bilder des resultierenden DAPI-Färbemusters. Unten: Die Anzahl der DAPI-positiven Zellen wurde pro Flächeneinheit des Gewebes quantifiziert. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

3.1.4 TGF- β 1 inhibiert Apoptose und stimuliert die Proliferation von VICs in AOK-Gewebe

Da eine Verbindung zwischen der Kalzifizierung des AOK-Gewebes und einem erhöhten Auftreten von VIC-Apoptose existiert [208], wurde die Häufigkeit apoptotischer VICs mittels TUNEL-Assay analysiert (Abbildung 19 A). Es zeigten sich vergleichsweise niedrige VIC-Apoptoselevel nach der Kultivierung von AOK-Taschen unter Kontrollbedingungen. Im Gegensatz dazu induzierten prokalzifizierende Kulturbedingungen einen signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer VICs von 0,3% unter Kontrollbedingungen auf 12,3%. Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium verblieb die VIC-Apoptose jedoch auf Kontrollniveau.

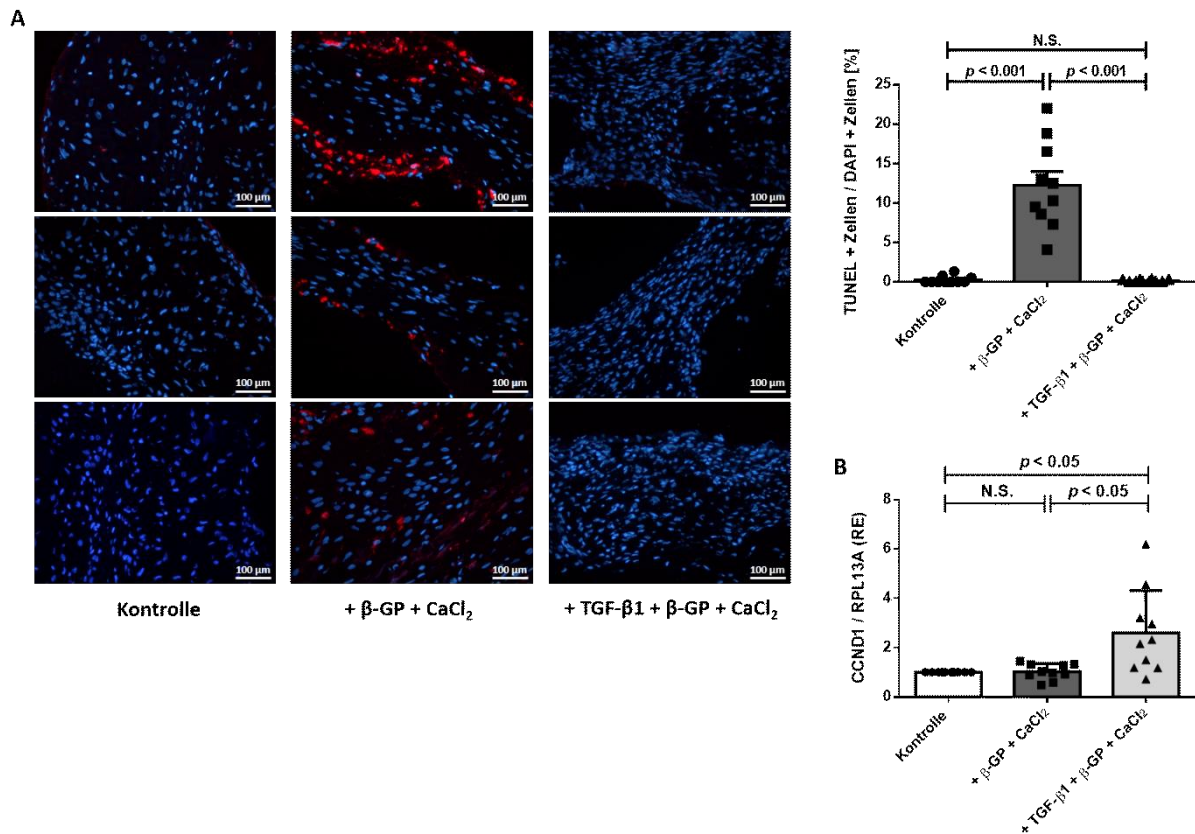


Abbildung 19: TGF- β 1 inhibiert Apoptose und stimuliert die Proliferation von VICs in AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. (A) Die Apoptose von VICs wurde mittels TUNEL-Assay quantifiziert. Links: Für jede Kulturbedingung sind drei repräsentative Overlay-Bilder von TUNEL-gefärbten (rot) und DAPI-gegengefärbten (blau) Zellkernen dargestellt. Rechts: Die Häufigkeiten der TUNEL-positiven Zellkerne wurden in Relation zu den DAPI-positiven Zellkernen quantifiziert. (B) Quantifizierung der mRNA-Expression von Cyclin D1 (Genname CCND1) relativ zu RPL13A mittels qPCR. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (B) in relativen Einheiten (RE) ($n = 10$).

Neben der Inhibition von Apoptose stimuliert TGF- β 1 zudem die Zellproliferation durch Mechanismen, die eine Hochregulation von Cyclin D1 beinhalten, wodurch eine kontinuierliche Progression von Zellzyklus und -proliferation ermöglicht wird [209]. Die Analyse der valvulären Cyclin D1-mRNA-Expression als etablierter Biomarker für aktiv proliferierende VICs ergab [210], dass sich die Cyclin D1-Expression unter prokalzifizierenden Kulturbedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht veränderte (Abbildung 19 B). Das zusätzliche Vorhandensein von TGF- β 1 im Kulturmedium induzierte jedoch eine signifikante, mehr als 2,5-fache Hochregulation der Expression von valvulärem Cyclin D1, was auf eine TGF- β 1-induzierte Stimulation der VIC-Proliferation hindeutet.

3.1.5 TGF- β 1 induziert die profibrotisch-myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe

Die Differenzierung von VICs in aktivierte Myofibroblasten während der CAVD-Pathogenese ist durch eine Hochregulation der α -SMA- und eine gleichzeitige Herabregulation der Vimentinexpression gekennzeichnet [31], [211]. Die Analysen mittels Immunoblot (Abbildung 20 A) ergaben, dass im Vergleich zu den Kontrollbedingungen die Kultivierung des AOK-Gewebes unter prokalzifizierenden Bedingungen zu einer signifikanten Hochregulation der α -SMA- (+ 60%) und einer gleichzeitigen Herabregulation der Vimentinexpression (- 37%) führte (Abbildung 20 B und C), woraus sich zusammen ungefähr eine dreifache Erhöhung des α -SMA/Vimentin-Expressionsverhältnisses ergab (Abbildung 20 D). Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium wurde die valvuläre Expression von α -SMA noch weiter signifikant erhöht (+ 140%) und die von Vimentin herabreguliert (- 61%), was insgesamt zu einem mehr als fünfzehnfachen Anstieg des α -SMA/Vimentin-Expressionsverhältnisses führte.

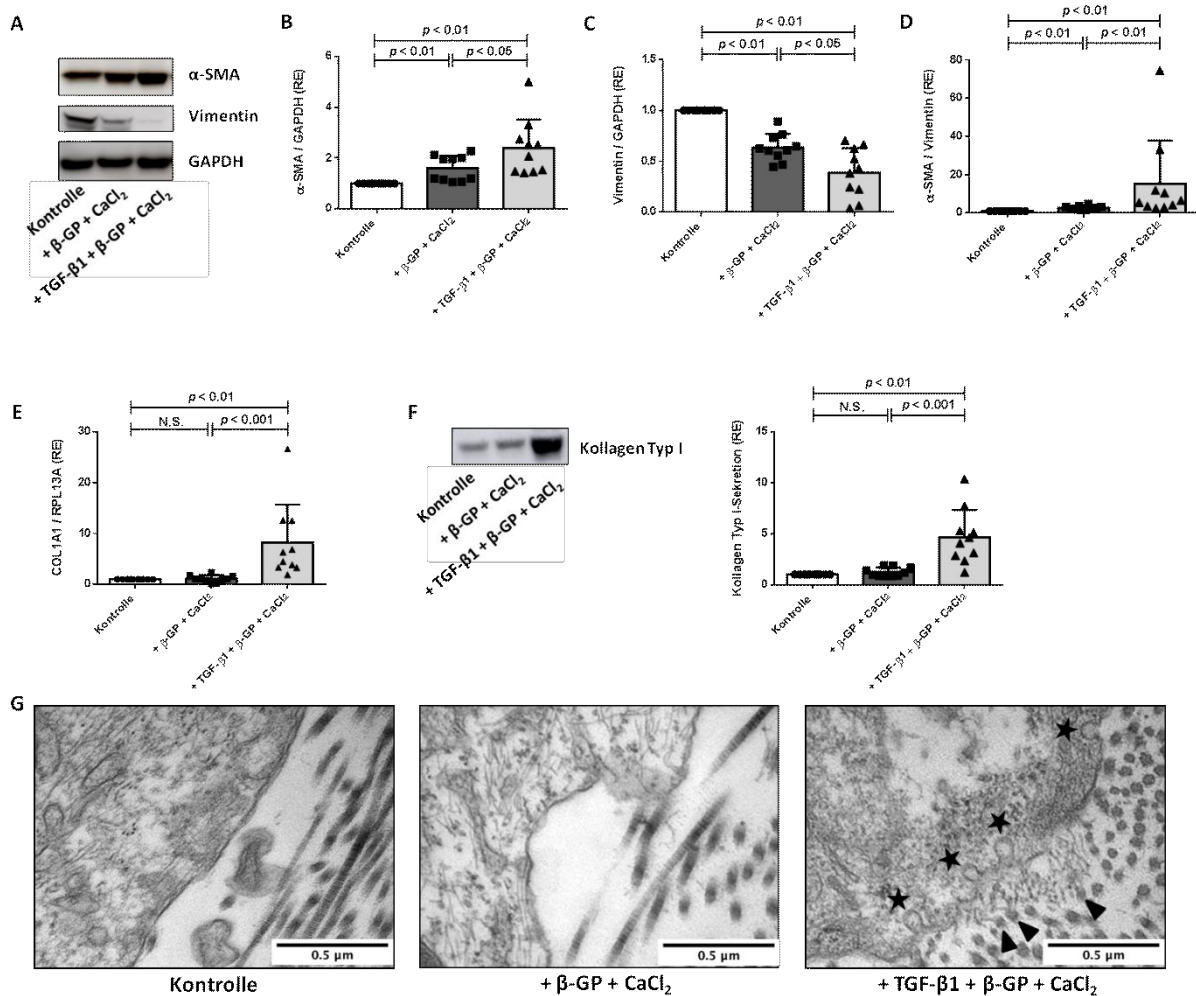


Abbildung 20: TGF-β1 induziert die profibrotisch-myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalfizierenden Bedingungen (+ β-GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF-β1 kultiviert. Die Expression von α-SMA und Vimentin wurde mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von α-SMA (Molekulargewicht: 42 kDa), Vimentin (Molekulargewicht: 57 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von α-SMA relativ zu GAPDH. (C) Quantifizierung der Expression von Vimentin relativ zu GAPDH. (D) Quantifizierung der Expression von α-SMA relativ zu Vimentin. (E) Quantifizierung der mRNA-Expression von Kollagen Typ I (Genname COL1A1) relativ zu RPL13A mittels qPCR. (F) Die Sekretion von Kollagen Typ I während der Kultivierung wurde mittels Immunoblot analysiert. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von Kollagen Typ I (Molekulargewicht: 120 kDa). Rechts: Quantifizierung der Kollagen Typ I-Sekretion. (G) Die Sekretion von Kollagen-Polypeptidketten aus VICs und ihr extrazellulärer Zusammenbau zu Kollagen Typ I-Fasern wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie visualisiert und repräsentative Bilder werden gezeigt. Elektronenmikroskopische Bilder wurden in Gewebeschnitten von ovinen AOK-Taschen aufgenommen (n = 3). Schwarze Sterne markieren Membranvesikel, welche filamentöse Kollagen Typ I-Fibrillen freisetzen und schwarze Pfeilspitzen markieren die Orte ihres Zusammenbaus zu Kollagen Typ I-Strängen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

Neben Veränderungen in der Expression der Zytoskelettproteine, werden Myofibroblasten durch eine hohe endogene Expression und Sekretion von Kollagenen charakterisiert [212]. Daher wurde die Expression und Sekretion von Kollagen Typ I, als die am häufigsten vorkommende EZM-Komponente in AOK [206], mittels qPCR

(Abbildung 20 E) und Immunoblotanalyse von konditionierten Medien (Abbildung 20 F) quantifiziert. Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen hatte die Kultivierung von AOK-Gewebe unter prokalzifizierenden Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression und Sekretion von Kollagen Typ I. Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium zeigte sich jedoch eine mehr als achtfache Hochregulation der Kollagen Typ I-Expression, die von einer fast fünffachen Hochregulation der Kollagen Typ I-Sekretion begleitet wurde. Dementsprechend ergab die Analyse von AOK-Gewebe mittels Elektronenmikroskopie (Abbildung 20 G), dass TGF- β 1 eine Freisetzung von Kollagen-Polypeptidketten aus den VICs sowie ihren anschließenden extrazellulären Zusammenbau zu Kollagen Typ I-Fibrillen auslöst. Im Gegensatz dazu konnte für AOK-Gewebe, das nur unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen kultiviert wurde, solche Prozesse nicht beobachtet werden.

3.1.6 TGF- β 1 inhibiert die prokalzifizierend-osteoblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe

Die Differenzierung von VICs in Osteoblasten während der CAVD-Pathogenese geht typischerweise mit dem Einbau von kalziumhaltigem Hydroxyapatit in die Kollagenfibrillen der EZM als Ursprung der Gewebekalzifizierung einher [213]. Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen führte die Kultivierung von AOK-Gewebe unter prokalzifizierenden Bedingungen zu einer deutlichen Kalzifizierung, was durch eine ausgeprägte Alizarinrotfärbung belegt wurde (Abbildung 21 A). Zudem war die Gewebeexpression des Osteoblastenmarkers Osteocalcin [9] signifikant hochreguliert (Abbildung 21 B). Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium waren jedoch fast keine Alizarinrot-positiven Gewebebereiche vorhanden, d.h. die Kalzifizierung wurde inhibiert und die Expression von Osteocalcin sogar unter das Kontrollniveau herabreguliert.

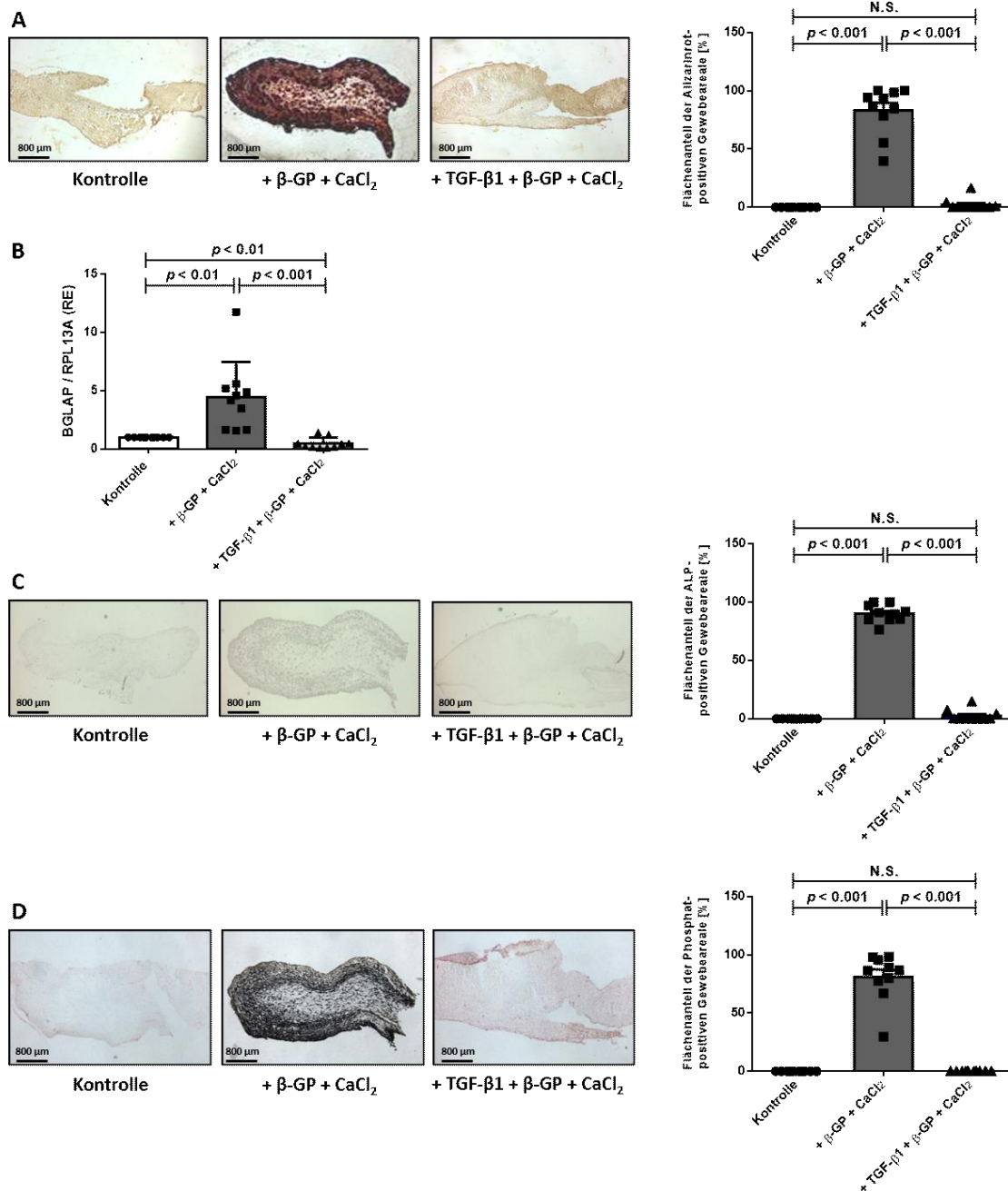


Abbildung 21: TGF- β 1 inhibiert die prokalfifizierend-osteoblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalfifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. (A) Die Kalzifizierung des Gewebes wurde mittels Alizarinrotfärbung von Gefrierschnitten sichtbar gemacht, was zu einer rötlichen Färbung des kalziumhaltigen Hydroxyapatits führte. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Alizarinrotfärbemusters. Rechts: Quantifizierung des Alizarinrot-positiven Anteils mittels digitaler Bildanalyse. (B) Quantifizierung der mRNA-Expression von Osteocalcin (Genname: BGLAP) relativ zu RPL13A mittels qPCR. (C) Die ALP-Gewebeaktivität wurde mittels einer NBT/BCIP-Färbung sichtbar gemacht, was in einer Graufärbung der aktiven ALP resultierte. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden ALP-Färbemusters. Rechts: Der ALP-positive Anteil der Gewebefläche wurde durch digitale Bildanalyse quantifiziert. (D) Die Phosphateinlagerung im Gewebe wurde mittels von Kossa-Färbung von Gefrierschnitten visualisiert, was zu einer dunkelbraunen bis schwarzen Färbung von extrazellulärem Phosphat führte. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden von Kossa-Färbemusters. Rechts: Quantifizierung des von Kossa-positiven Gewebereals anhand von digitaler Bildanalyse. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (B) in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

Einen weiteren osteoblastoiden Differenzierungsmarker stellt die ALP dar, die durch Hydrolyse von Pyrophosphat zu Phosphat erheblich zur Bildung und zum EZM-Einbau von Hydroxyapatit beiträgt [213]. Die NBT/BCIP-Färbung der Gefrierschnitte ergab, dass die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Hochregulation der ALP-Gewebeaktivität in den AOK-Taschen induzierte (Abbildung 21 C). Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium wurde die Hochregulation der valvulären ALP-Aktivität fast vollständig inhibiert. Um diese Ergebnisse hinsichtlich der Modulation der ALP-Aktivität zu bestätigen, wurde zusätzlich eine von Kossa-Färbung der Gefrierschnitte durchgeführt, um spezifisch die Gewebelevel von extrazellulärem Phosphat als Produkt der enzymatischen ALP-Aktivität nachzuweisen (Abbildung 21 D). Das resultierende von Kossa-Färbemuster korrelierte eindeutig mit dem Muster der NBT/BCIP-Färbung und bestätigt somit die Beobachtung, dass TGF- β 1 die Hochregulation der ALP-Gewebeaktivität unter prokalzifizierenden Kulturbedingungen blockiert.

3.1.7 TGF- β 1 blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition der SMAD1/5/8-Aktivierung und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

Prokalzifizierende Medienbedingungen induzieren nachweislich die Expression des proosteogenen BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*), welches anschließend die Transkriptionsfaktoren SMAD1/5/8 aktiviert, die die Differenzierung osteoblastoider Zellen und die damit verbundenen Kalzifizierungsprozesse vermitteln [117], [214]. Dementsprechend ergaben die Analysen mittels Immunoblot und qPCR, dass im Vergleich zu Kontrollbedingungen die Phosphorylierung, d.h. die Aktivierung von SMAD1/5/8 in den AOK-Taschen nach prokalzifizierender Kultivierung signifikant erhöht war (+ 66%) (Abbildung 22 A). Die Expression von SMAD1/5/8 hingegen blieb unverändert (Abbildung 22 B). Mit zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium wurde der Phosphorylierungsstatus von SMAD1/5/8 dagegen signifikant unter das Kontrollniveau herabreguliert (- 22%), während die SMAD1/5/8-Expression keine Veränderung zeigte.

In Bezug auf das inhibitorische SMAD6, dessen Expression als negativer

Rückkopplungsmechanismus hochreguliert wird, um eine übermäßige BMP-2-induzierte SMAD1/5/8-Aktivierung zu hemmen [215], zeigte die mRNA-Expressionsanalyse, dass die SMAD6-Expression im AOK-Gewebe nach prokalzifizierender Kultivierung signifikant hochreguliert war (+ 60%) (Abbildung 22 C), wohingegen das zusätzliche Vorhandensein von TGF- β 1 mit einer SMAD6-Expression auf Kontrollniveau verbunden war.

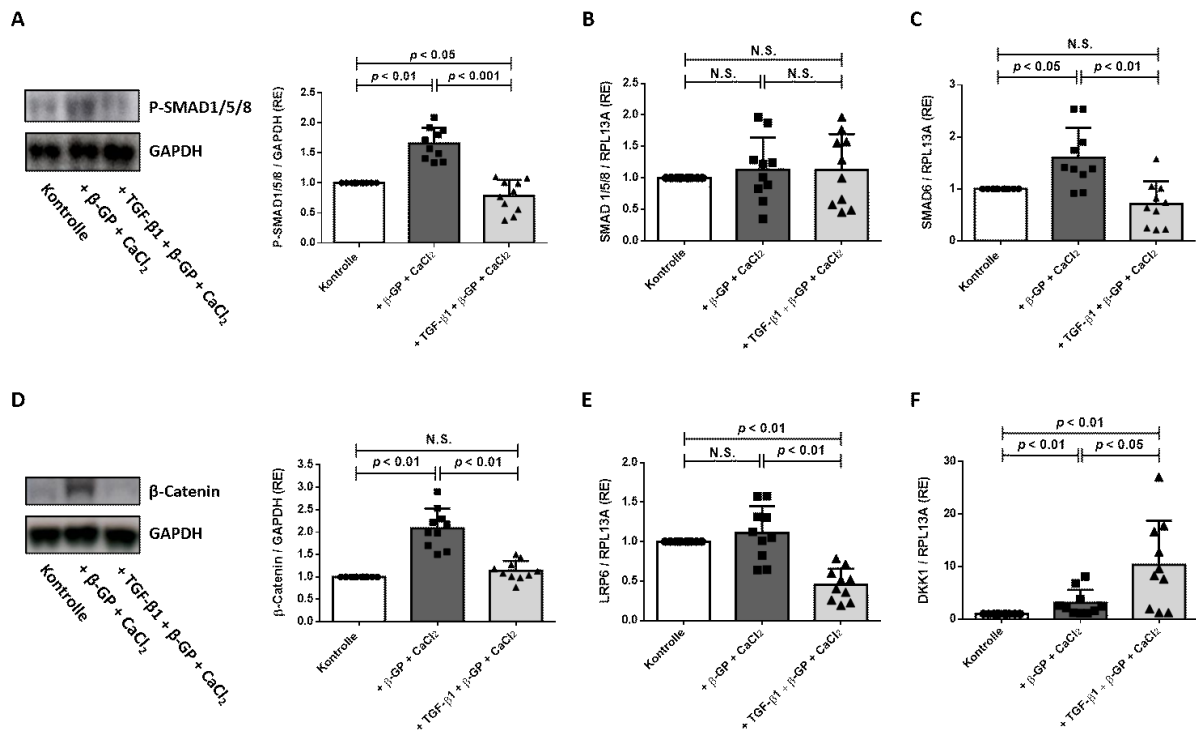


Abbildung 22: TGF- β 1 blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition der SMAD1/5/8-Aktivierung und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. (A) Die Phosphorylierung/Aktivierung von SMAD1/5/8 wurde mittels Immunoblot analysiert. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von P-SMAD1/5/8 (Molekulargewicht: 60 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). Rechts: Quantifizierung der Phosphorylierung von SMAD1/5/8 relativ zu GAPDH. (B) Quantifizierung der mRNA-Expression von SMAD1/5/8 relativ zu RPL13A mittels qPCR. (C) Quantifizierung der mRNA-Expression von SMAD6 relativ zu RPL13A mittels qPCR. (D) Die Expression von β -Catenin wurde mittels Immunoblot bestimmt. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von β -Catenin (Molekulargewicht: 92 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). Rechts: Quantifizierung der Expression von β -Catenin relativ zu GAPDH. (E) Quantifizierung der mRNA-Expression von LRP6 relativ zu RPL13A mittels qPCR. (F) Quantifizierung der mRNA-Expression von DKK1 relativ zu RPL13A mittels qPCR. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

Die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist ebenfalls wesentlich für die Osteogenese und wird nachweislich durch prokalzifizierende Kulturbedingungen induziert [117], [119], [214]. Dementsprechend zeigte die Immunoblotanalyse, dass die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen eine

signifikante, mehr als zweifache Hochregulation der β -Catenin-Expression im Vergleich zu Kontrollbedingungen induzierte (Abbildung 22 D). Mit zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium blieb die β -Catenin-Expression jedoch auf Kontrollniveau. Außerdem war die Expression von LRP6 (*lipoprotein receptor-related protein 6*), das die kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung als Co-Rezeptor der *Frizzled family receptors* unterstützt [216], in Anwesenheit von TGF- β 1 im Vergleich zu Kontroll- und prokalzifizierenden Bedingungen signifikant herabreguliert (Abbildung 22 E). Gleichzeitig zeigten die Analysen mittels qPCR, dass DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*), das als Antagonist fungiert und die kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalaktivität über die Inhibition von LRP6 verringert [216], unter prokalzifizierenden Medienbedingungen leicht erhöht war, wohingegen die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium eine starke, mehr als zehnfache Hochregulation von DKK1 induzierte (Abbildung 22 F).

3.1.8 Kollagen Typ I als extrazelluläres Matrixsubstrat moduliert die Wirkung von TGF- β 1 auf die Kalzifizierung isolierter VICs

Um die Auswirkungen von TGF- β 1 auf die Kalzifizierung von VICs in einer zweidimensionalen (2D) Kulturumgebung aufzuklären, wurden Monolayer von isolierten VICs zunächst auf unbeschichteten Zellkulturplatten in Ab- oder Anwesenheit von TGF- β 1 und unter ansonsten zum gewebebasierten 3D-CAVD-Modell äquivalenten prokalzifizierenden Bedingungen kultiviert. Die Alizarinrotfärbung der Zellen zeigte jedoch, dass TGF- β 1 im Gegensatz zu seiner inhibierenden Wirkung im 3D-CAVD-Modell, die Kalzifizierung von isolierten VICs, die auf unbeschichteten Oberflächen kultiviert wurden, signifikant verstärkte (Abbildung 23 A).

Um den Einfluss von Änderungen der Matrixelastizität und der Oberflächenspannung auf die Modulation der VIC-Kalzifizierung durch TGF- β 1 zu analysieren, wurden die oben beschriebenen Experimente mit beschichteten Zellkulturplatten wiederholt. Da im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell die Modulation der Kalzifizierung mit signifikanten Änderungen des Kollagengehalts der AOK-Taschen-EZM verbunden war, wurden die Platten mit Kollagen Typ I beschichtet. Auch bei den Kollagenbeschichteten Wells wurde unter prokalzifizierenden Medienbedingungen eine Kalzifizierung der VICs induziert, die im Durchschnitt stärker ausgeprägt war als bei

den unbeschichteten Wells. Die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium inhibierte jedoch die VIC-Kalzifizierung in Kombination mit Kollagen als Zellsubstrat (Abbildung 23 B).

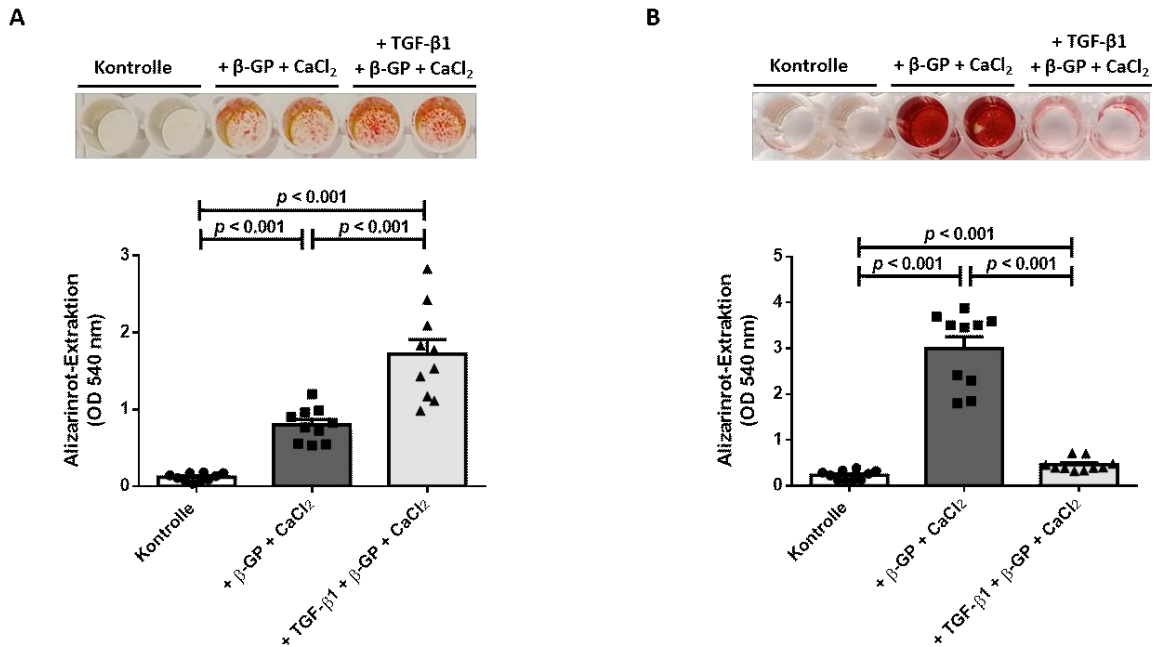


Abbildung 23: Kollagen Typ I als extrazelluläres Matrixsubstrat moduliert die Wirkung von TGF- β 1 auf die Kalzifizierung isolierter VICs. Ovine VICs wurden auf unbeschichteten (A) oder mit Kollagen Typ I-beschichteten (B) Zellschalen ausgesät und unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β 1 kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von acht Tagen wurde die Kalzifizierung mittels Alizarinrotfärbung der VICs visualisiert, was in einer rötlichen Färbung des kalziumhaltigen Hydroxyapatits resultierte. Oben: Repräsentative Bilder des resultierenden Alizarinrotfärbemusters. Unten: Nach Extraktion des gebundenen Alizarinrots erfolgte die quantitative Bestimmung mittels Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

3.2 Wirkung von Pirfenidon auf Fibrose und Kalzifizierung im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

3.2.1 Antifibrotische Wirkung von Pirfenidon im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

3.2.1.1 Zellbasiertes 2D-CAVD-Modell

3.2.1.1.1 Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung

Im Rahmen des Projekts wurde die Wirkung von Pirfenidon auf die Entstehung von valvulärer Fibrose und Kalzifizierung als Phänotypen der CAVD-Pathogenese untersucht. Zu Beginn der *in vitro*-Analysen wurde die optimale Wirkdosis von Pirfenidon ermittelt. Dazu wurde anhand einer Pirfenidon-Konzentrationsreihe (0,125 – 1 mg/ml) die inhibitorische Wirkung auf die Kalzifizierung isolierter VICs ermittelt (vgl. Kapitel 3.2.2.1.1). Dabei zeigte sich, dass bei einer Pirfenidon-Konzentration von 1 mg/ml die Kalzifizierung maximal effektiv inhibiert wird, ohne dass sich zytotoxische Effekte ergaben. Daher wurden die weiteren Analysen mit dieser Konzentration durchgeführt.

Zunächst wurde SMAD3 als zentraler Transkriptionsfaktor des TGF- β 1-Signalwegs untersucht, da es nach Aktivierung durch TGF- β 1 den fibrotischen Umbau der EZM induziert [84]. Daher wurde zu Beginn der *in vitro*-Experimente die Wirkung von Pirfenidon auf die Entstehung eines Fibrosephänotyps in VICs analysiert. Die Immunoblotanalyse der SMAD3-Regulation nach Kultur von VICs unter Kontrollbedingungen oder profibrotischen (+ TGF- β 1) Bedingungen in Ab- und Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon ergab, dass die profibrotische Kultivierung der VICs eine um etwa den Faktor acht erhöhte Phosphorylierung von SMAD3 induzierte, die durch Pirfenidon signifikant inhibiert wurde (Abbildung 24 A, B). Dagegen ergab sich für die SMAD3-Expression nach profibrotischer Behandlung eine Herabregulation im Vergleich zu den Kontrollbedingungen, die ebenfalls durch Pirfenidon tendenziell inhibiert wurde (Abbildung 24 C).

Beim Umbau der EZM im Kontext der CAVD-Pathogenese kommt es insbesondere in der fibrotischen Phase der CAVD zu einer vermehrten Expression der EZM-Komponente Kollagen Typ I [206]. Entsprechend ergab die Analyse der Kollagen Typ I-Sekretion in den konditionierten Zellkulturüberständen eine deutliche, fast 23-fache

Hochregulation durch TGF- β 1-Stimulation, die durch zusätzliche Pirfenidon-Behandlung der VICs signifikant inhibiert wurde (Abbildung 24 D).

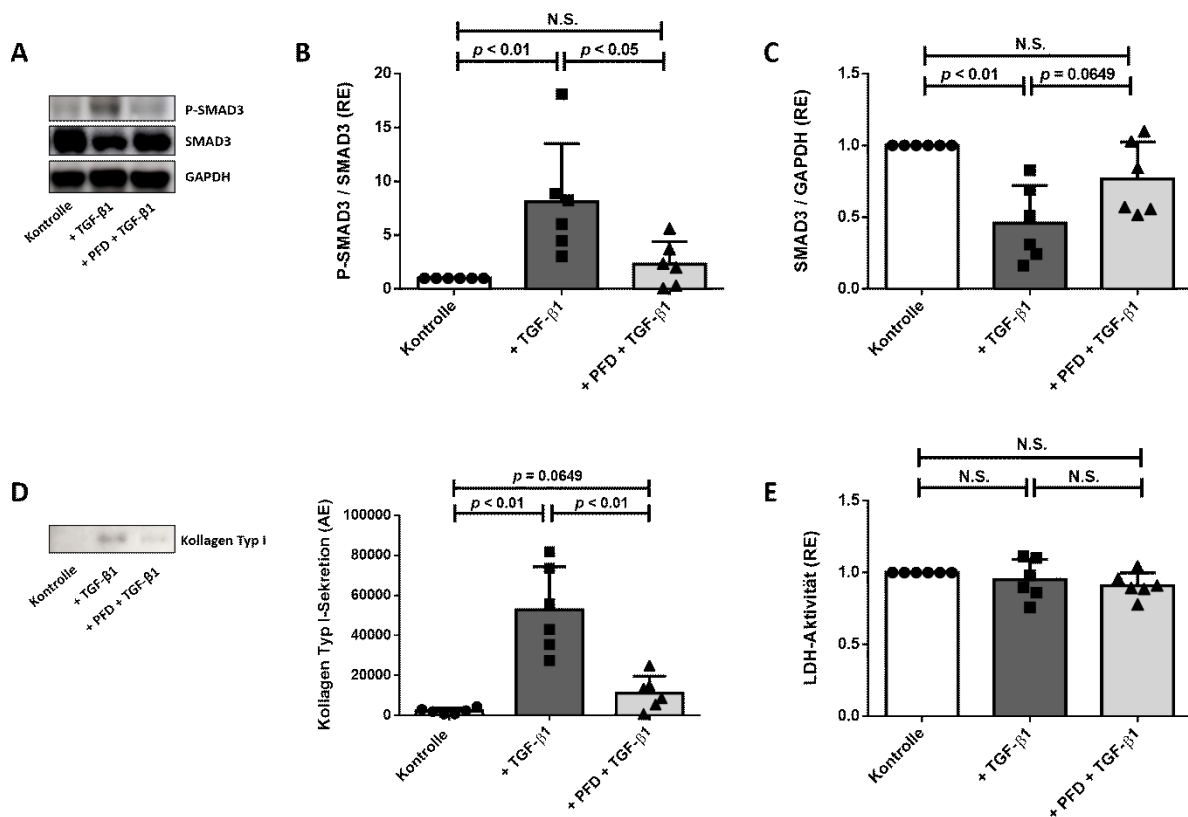


Abbildung 24: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung. Ovine VICs wurden unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF- β 1) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) für acht Tage kultiviert. Die Phosphorylierung und Expression von SMAD3 in Zelllysaten wurde mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von P-SMAD3, SMAD3 (Molekulargewicht: 52 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von phosphoryliertem SMAD3 relativ zu Gesamt-SMAD3. (C) Quantifizierung der Expression von SMAD3 relativ zu GAPDH. (D) Die Sekretion von Kollagen Typ I während der Kultivierung wurde mittels Immunoblot analysiert. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von Kollagen Typ I (Molekulargewicht: 120 kDa). Rechts: Quantifizierung der Kollagen Typ I-Sekretion. (E) Quantifizierung der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) und für (D) in arbiträren Einheiten (AE) ($n = 6$).

Die Quantifizierung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität ist ein etablierter Test für die Zellviabilität und dient als Nachweis einer potentiellen Toxizität von Wirkstoffkandidaten. Die Analyse der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen lieferte keinen Hinweis auf zellschädigende Effekte durch Pirfenidon und zeigte stattdessen in allen drei Testgruppen eine LDH-Aktivität auf ähnlichem Niveau (Abbildung 24 E).

3.2.1.1.2 Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung

Kennzeichnend für die fibrotische Phase der CAVD-Pathogenese ist, neben dem Gewebeumbau mit übermäßigem Einbau von Strukturproteinen, wie Kollagen Typ I, in die EZM, eine erhöhte expressionelle Aktivierung von VICs [207], was durch Analyse der RNA- und Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden kann. Im Vergleich zu Kontrollbedingungen führte die Kultivierung der VICs unter profibrotischen Bedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der RNA- (+ 174%) und Proteinkonzentrationen (+ 52%), die jeweils durch die zusätzliche Pirfenidon-Behandlung signifikant inhibiert wurden (Abbildung 25 A und B).

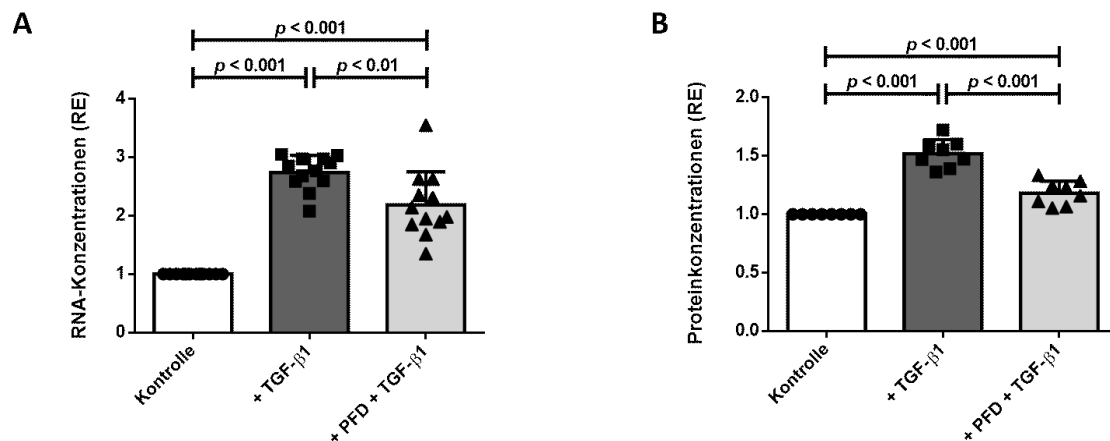


Abbildung 25: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung. Ovine VICs wurden unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF- β 1) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) für acht Tage kultiviert. Quantifizierung der RNA- (A) und Proteinkonzentrationen (B) in den Zellysaten. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 12 (A) bzw. n = 8 (B)).

3.2.1.1.3 Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung

Die fibrotische Phase der CAVD-Pathogenese ist unter anderem durch die Zelldifferenzierung von VICs in aktivierte Myofibroblasten charakterisiert, was durch die Hochregulation der α -SMA- sowie die gleichzeitige Herabregulation der Vimentinexpression gekennzeichnet ist [31]. Die Immunoblotanalyse dieser Zelldifferenzierungsmarker (Abbildung 26 A) ergab, dass die Kultivierung von VICs unter profibrotischen Bedingungen zu einer erhöhten α -SMA-Expression (+ 59%) führte, die jedoch in Anwesenheit von Pirfenidon auf dem Expressionsniveau der Kontrollgruppe verblieb (Abbildung 26 B). Gleichzeitig konnte eine deutliche

Herabregulation der Vimentinexpression (- 75%) im Vergleich zur Kontrollgruppe nach profibrotischer Kultivierung mit TGF- β 1 beobachtet werden, die durch Pirfenidon signifikant inhibiert wurde (Abbildung 26 C). Insgesamt ergab die profibrotische Kultivierung der AOK-Taschen eine signifikante Erhöhung des α -SMA/Vimentin-Expressionsverhältnisses, die durch Pirfenidon-Behandlung signifikant inhibiert wurde (Abbildung 26 D).

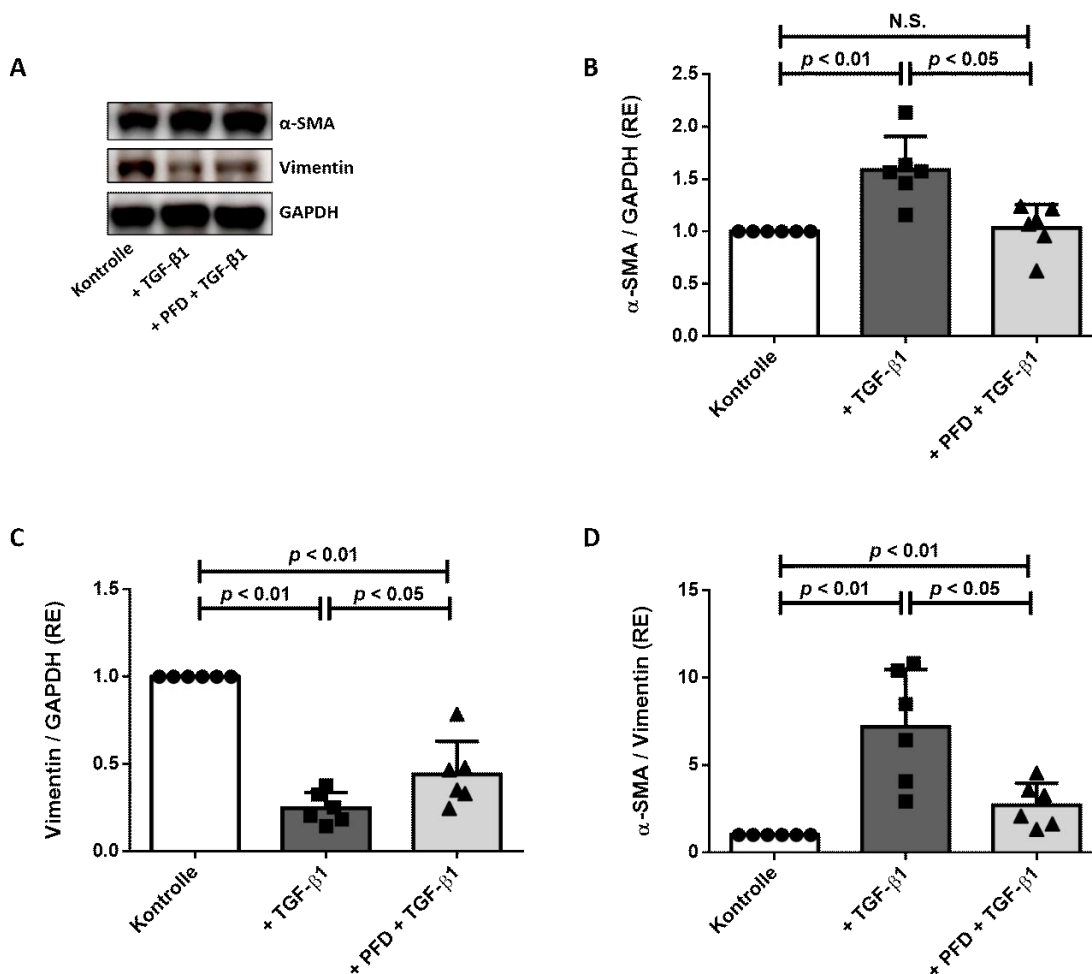


Abbildung 26: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung. Ovine VICs wurden unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF- β 1) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) für acht Tage kultiviert. Die Expression von α -SMA, Vimentin und GAPDH wurde mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von α -SMA (Molekulargewicht: 42 kDa), Vimentin (Molekulargewicht: 57 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von α -SMA relativ zu GAPDH. (C) Quantifizierung der Expression von Vimentin relativ zu GAPDH. (D) Quantifizierung der Expression von α -SMA relativ zu Vimentin. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 6).

3.2.1.2 Gewebebasiertes 3D-CAVD-Modell

3.2.1.2.1 Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie

Um die Wirkung von Pirfenidon auf die Entstehung eines Fibrosephänotyps in einer physiologischen EZM-Umgebung zu untersuchen, wurde in ovinen AOK-Taschen (3D-CAVD-Modell) eine Gewebefibrose durch TGF- β 1-Stimulation induziert und die Kultivierung in Ab- oder Anwesenheit von Pirfenidon durchgeführt.

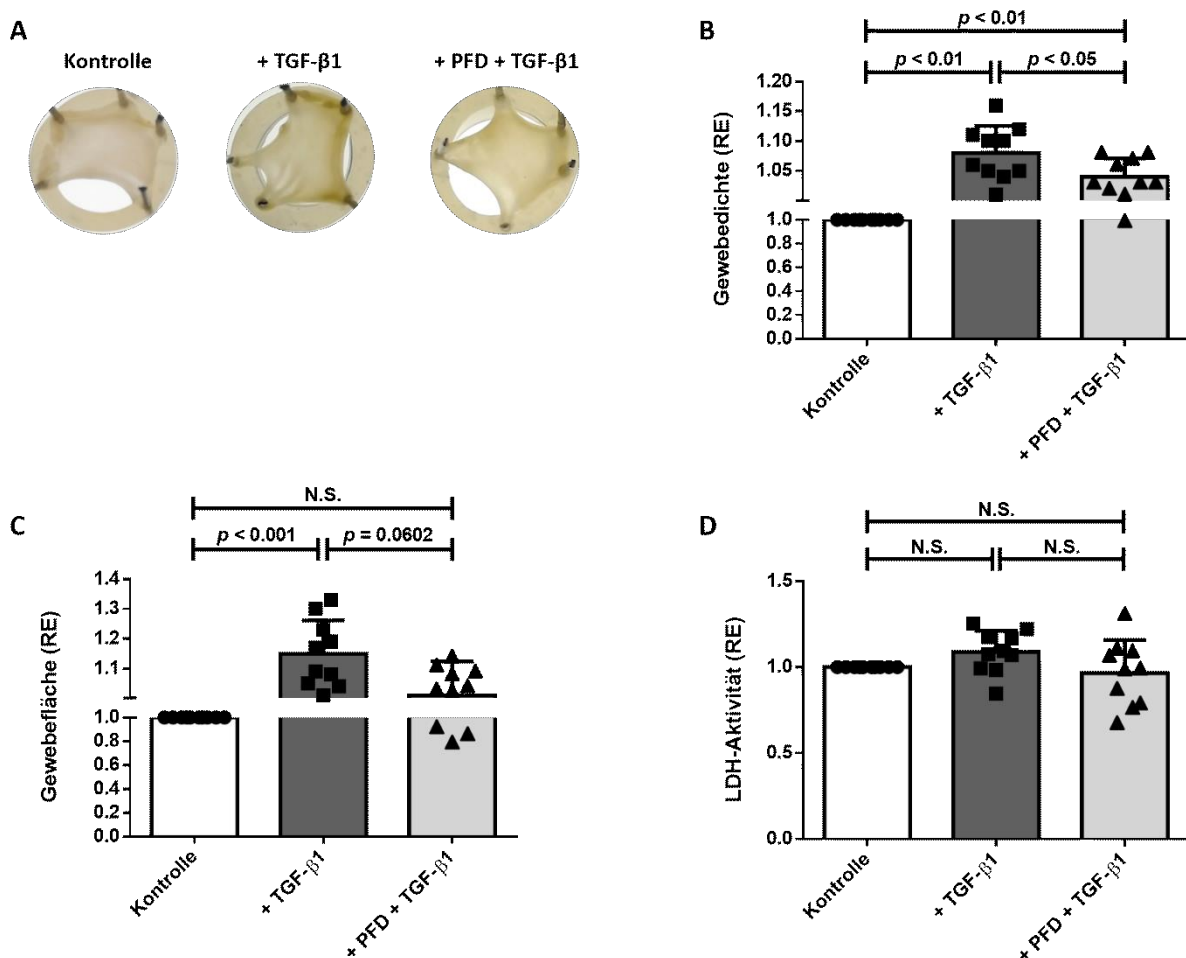


Abbildung 27: Pirfenidon inhibiert die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF- β 1) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. Die quantitative morphologische Analyse der AOK-Taschen erfolgte mittels digitaler Bildanalyse. (A) Repräsentatives Bild der AOK-Gewebemorphologie unmittelbar nach Ende der Kultivierung. (B) Die Gewebedichten wurden durch digitale Bildanalyse von Farbänderungen quantifiziert, die aus einer modifizierten Lichtdurchlässigkeit resultierten. (C) Die Gewebeflächen wurden durch digitale Bildanalyse der AOK-Taschen quantifiziert. (D) Quantifizierung der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

Bei der morphologischen Analyse (Abbildung 27 A) zeigte sich, dass die profibrotische Kultivierung der AOK-Taschen eine signifikante Erhöhung der Gewebedichte (Abbildung 27 B) und -fläche (Abbildung 27 C) zur Folge hatte. Durch Pirfenidon wurde die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie inhibiert.

Die Analyse der LDH-Aktivität in konditionierten Zellkulturüberständen ergab keinen Hinweis auf zytotoxische Effekte infolge der Pirfenidon-Behandlung (Abbildung 27 D).

3.2.1.2.2 Pirfenidon blockiert die TGF- β 1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung

Zur Analyse der Aktivierung des TGF- β 1-Signalwegs als zentraler Vermittler der CAVD-Pathogenese wurde die Expression und Phosphorylierung/Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD3 untersucht [217]. Die Immunoblotanalyse (Abbildung 28 A) ergab, dass die profibrotische Kultivierung der AOK-Taschen zu einer verstärkten SMAD3-Phosphorylierung (+ 474%) und einer signifikanten Herabregulation der SMAD3-Expression (- 43%) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen führte (Abbildung 28 B und C). Diese Effekte wurden durch Pirfenidon jeweils inhibiert bzw. für die SMAD3-Aktivierung tendenziell inhibiert.

Wie bereits im 2D-CAVD-Modell beobachtet (vgl. Kapitel 3.2.1.1.1), inhibierte Pirfenidon zudem auch im 3D-CAVD-Modell die TGF- β 1-induzierte Erhöhung der Kollagen Typ I-Sekretion signifikant (Abbildung 28 D).

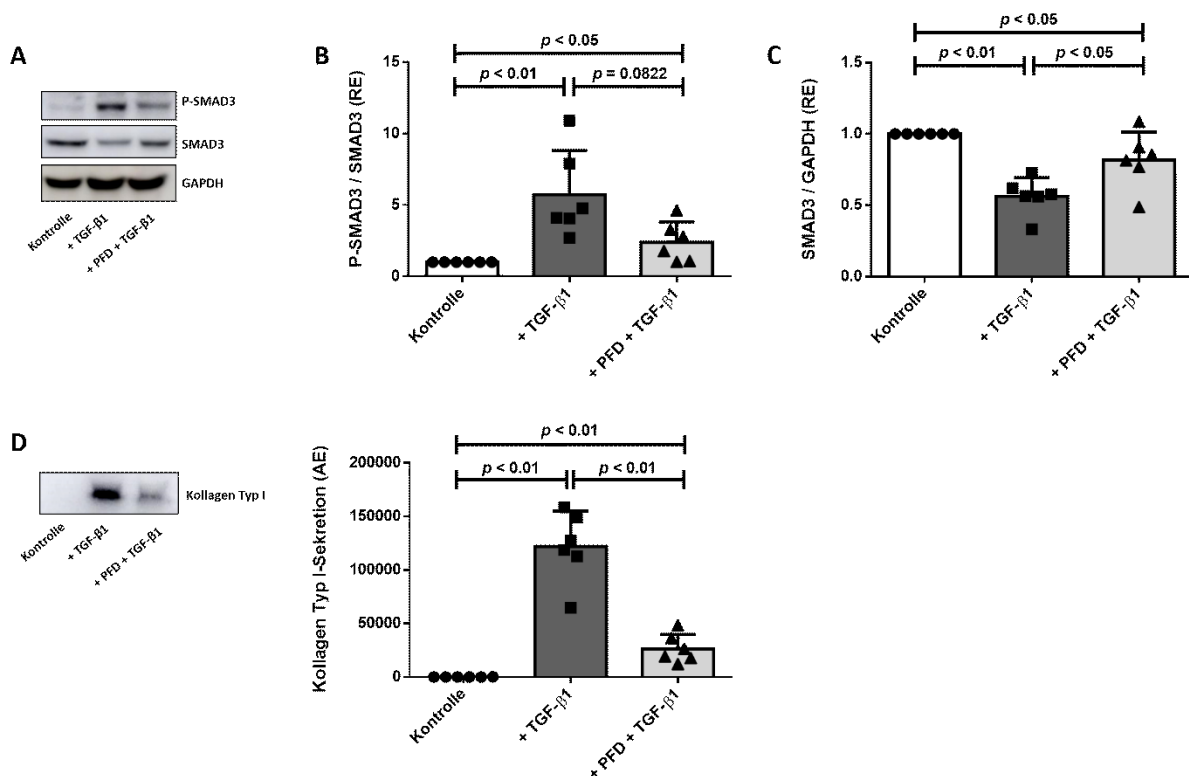


Abbildung 28: Pirfenidon blockiert die TGF-β1-induzierte Kollagen Typ I-Expression durch Inhibition der SMAD3-Aktivierung. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF-β1) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. Die Phosphorylierung/Aktivierung und Expression von SMAD3 wurde mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von P-SMAD3, SMAD3 (Molekulargewicht: 52 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von phosphoryliertem SMAD3 relativ zu Gesamt-SMAD3. (C) Quantifizierung der Expression von SMAD3 relativ zu GAPDH. (D) Die Sekretion von Kollagen Typ I während der Kultivierung wurde mittels Immunoblot analysiert. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von Kollagen Typ I (Molekulargewicht: 120 kDa). Rechts: Quantifizierung der Kollagen Typ I-Sekretion. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (B) und (C) in relativen Einheiten (RE) und (D) in arbiträren Einheiten (AE) (n = 6).

3.2.1.2.3 Pirfenidon inhibiert die TGF-β1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung in AOK-Gewebe

Für die Untersuchung der expressionellen VIC-Aktivierung als Merkmal der fibrotischen Phase der CAVD-Pathogenese wurden auch im 3D-CAVD-Modell die Proteinkonzentrationen der AOK-Gewebelysate untersucht. So führte die profibrotische Kultivierung der AOK-Taschen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen zu einer signifikant erhöhten Proteinkonzentration (+ 73%). Dieser Effekt wurde in Anwesenheit von Pirfenidon im Kulturmedium fast vollständig inhibiert (Abbildung 29).

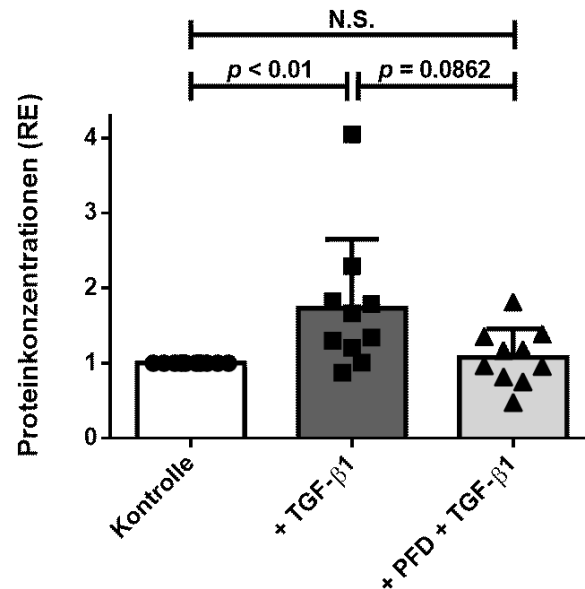


Abbildung 29: Pirfenidon inhibiert die TGF-β1-induzierte expressionelle VIC-Aktivierung in AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF-β1) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen in den AOK-Gewebelysaten. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertung als Streudiagramm sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

3.2.1.2.4 Pirfenidon inhibiert die TGF-β1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe

Zur Analyse der profibrotischen Differenzierung von VICs in aktivierte Myofibroblasten während der CAVD-Pathogenese wurde die Expression der Zelldifferenzierungsmarker α-SMA und Vimentin durch Immunoblotanalyse untersucht (Abbildung 30 A). Ähnlich wie bereits im 2D-CAVD-Modell mit isolierten VICs (vgl. 3.2.1.1.3) beobachtet, inhibierte Pirfenidon signifikant die TGF-β1-induzierte Herabregulation der Vimentin-Expression (Abbildung 30 C) auch im 3D-CAVD-Modell. Die TGF-β1-induzierte Erhöhung der α-SMA-Expression wurde nicht signifikant durch Pirfenidon inhibiert (Abbildung 30 B). Dennoch ergab sich daraus für das α-SMA/Vimentin-Expressionsverhältnis eine etwa 2,5-fache Erhöhung nach profibrotischer Kultivierung, die durch Pirfenidon signifikant inhibiert wurde (Abbildung 30 D).

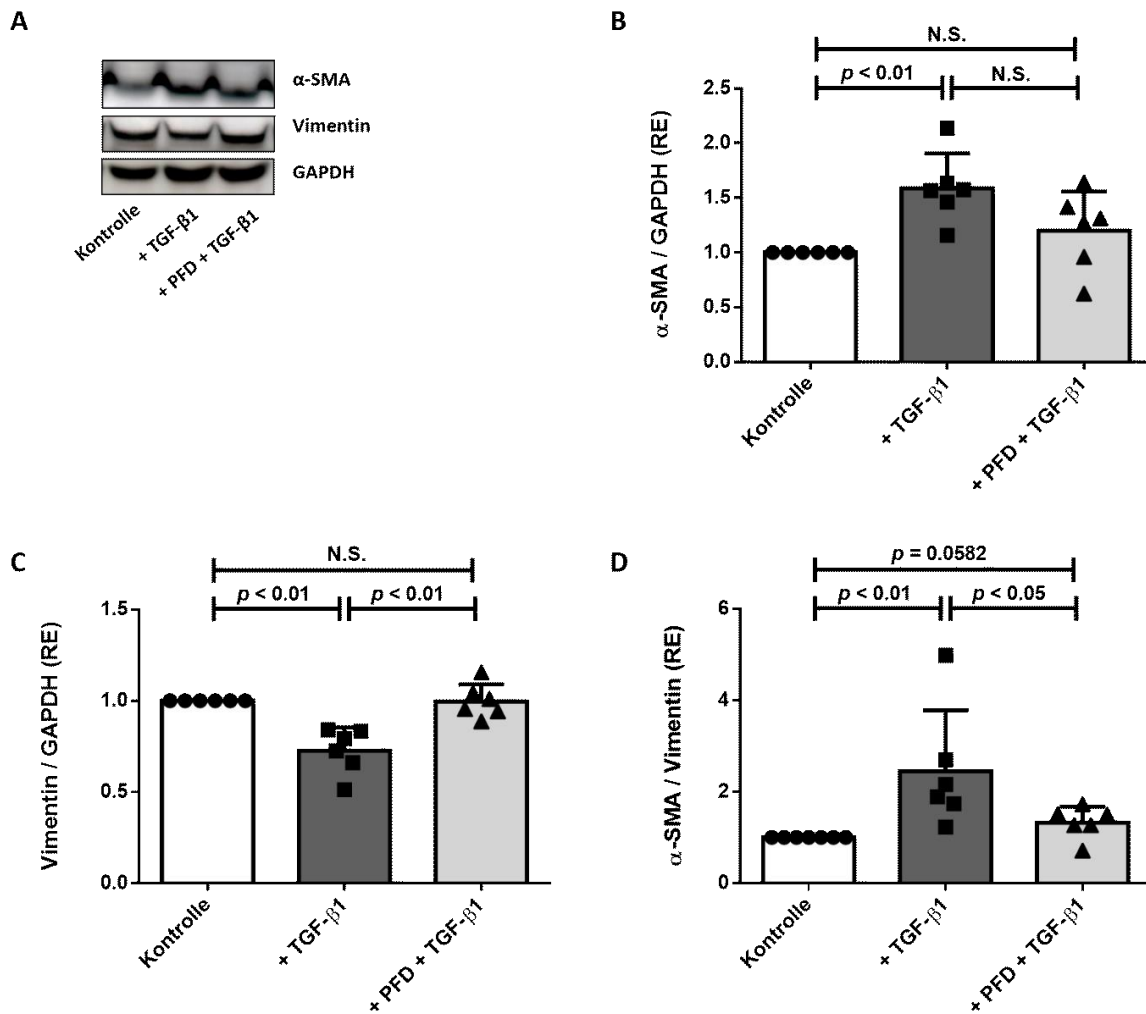


Abbildung 30: Pirfenidon inhibiert die TGF-β1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung in AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF-β1) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. Die Expression von α-SMA, Vimentin und GAPDH wurde mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von α-SMA (Molekulargewicht: 42 kDa), Vimentin (Molekulargewicht: 57 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von α-SMA relativ zu GAPDH. (C) Quantifizierung der Expression von Vimentin relativ zu GAPDH. (D) Quantifizierung der Expression von α-SMA relativ zu Vimentin. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 6).

3.2.2 Antikalzifizierende Wirkung von Pirfenidon im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

3.2.2.1 Zellbasiertes 2D-CAVD-Modell

3.2.2.1.1 Pirfenidon inhibiert dosisabhängig die VIC-Kalzifizierung

Um die Wirkung von Pirfenidon auch in der kalzifizierenden Phase der CAVD-Pathogenese zu analysieren, wurden zunächst isolierte VICs im 2D-CAVD-Modell in Ab- und Anwesenheit von Pirfenidon untersucht. Die Kultivierung der Zellen unter

prokalzifizierenden Medienbedingungen (+ β -GP + CaCl_2) führte zu einer starken Kalzifizierung der Zellen, die durch eine intensive Alizarinrotfärbung identifiziert wurde. Die Anwesenheit von Pirfenidon im Kulturmedium ergab eine konzentrationsabhängige (0,25 – 1 mg/ml) signifikante Inhibition der VIC-Kalzifizierung (Abbildung 31 A). Die stärksten inhibierenden Effekte (- 64%) waren bei einer Pirfenidon-Konzentration von 1 mg/ml zu beobachten, weshalb im Folgenden auch bei der Kultivierung der ovinen AOK-Taschen im 3D-CAVD-Modell mit dieser Konzentration weitergearbeitet wurde. Bezüglich Zytotoxizität konnten keine Effekte im untersuchten Pirfenidon-Konzentrationsbereich im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 31 B).

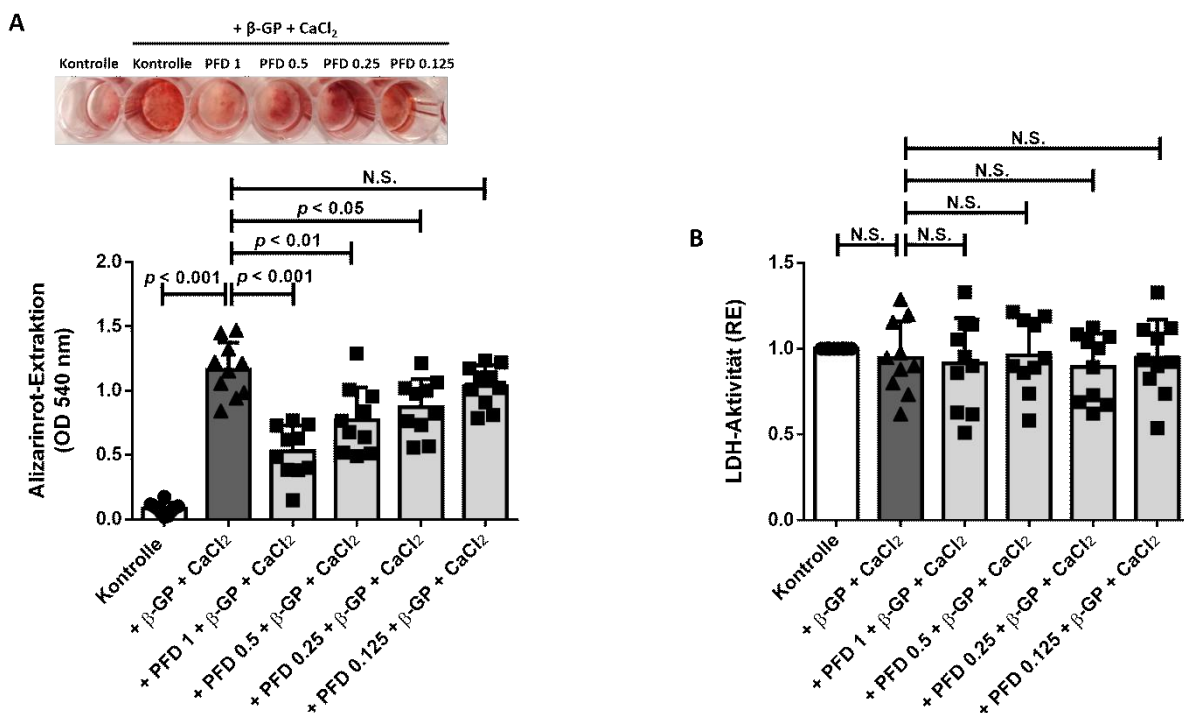


Abbildung 31: Pirfenidon inhibiert dosisabhängig die VIC-Kalzifizierung. Ovine VICs wurden unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von Pirfenidon (PFD) (0,125 – 1 mg/ml) kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von acht Tagen wurde die Kalzifizierung mittels Alizarinrotfärbung der VICs visualisiert, was in einer rötlichen Färbung des kalziumhaltigen Hydroxyapatits resultierte. (A) Oben: Repräsentative Bilder des resultierenden Alizarinrotfärbemusters. Unten: Nach Extraktion des gebundenen Alizarinrots erfolgte die quantitative Bestimmung mittels Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm. (B) Quantifizierung der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (B) in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

3.2.2.2 Gewebebasiertes 3D-CAVD-Modell

3.2.2.2.1 Pirfenidon inhibiert die Kalzifizierung des AOK-Gewebes

Wie schon in Teilprojekt 1 der vorliegenden Arbeit gezeigt (vgl. 3.1.2), konnte unter etablierten prokalzifizierenden Bedingungen im 3D-CAVD-Modell über eine Kulturperiode von vier Wochen eine auch makroskopisch erkennbare Gewebekalzifizierung induziert werden (Abbildung 32 A). Die makroskopische Analyse der AOK-Morphologie ergab eine signifikante Induktion grauer Gewebeverfärbungen in den prokalzifizierend-kultivierten AOK-Taschen, die - wie durch ergänzende Untersuchungen aufgezeigt (siehe Abbildung 33) - aus der Biomineralisierung des Gewebes resultieren und deren Entstehung durch 1 mg/ml Pirfenidon signifikant inhibiert wurde (- 40%) (Abbildung 32 B).

Das Eintreten von Gewebekalzifizierung im 3D-CAVD-Modell konnte zusätzlich durch die Bestimmung von Veränderungen der Gewebedichten nachgewiesen werden. Hier zeigte sich über die modifizierte Lichtdurchlässigkeit der AOK-Taschen eine signifikante Zunahme der Gewebedichte der prokalzifizierend-kultivierten AOK-Taschen (+ 65%) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kultivierung mit Pirfenidon führte zu einer nahezu vollständigen Blockade der kalzifizierungsassoziierten Erhöhung der Gewebedichte (Abbildung 32 C).

Darüber hinaus führte die prokalzifizierende Kultivierung der AOK-Taschen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Vergrößerung der Gewebefläche (+ 29%). Diese Vergrößerung der Gewebefläche wurde bei prokalzifizierender Kultivierung in Anwesenheit von Pirfenidon jedoch nicht beobachtet (Abbildung 32 D). Die Analyse der LDH-Aktivität aus den konditionierten Kulturüberständen ergab keine Anhaltspunkte für Pirfenidon-induzierte Zytotoxizität (Abbildung 32 E).

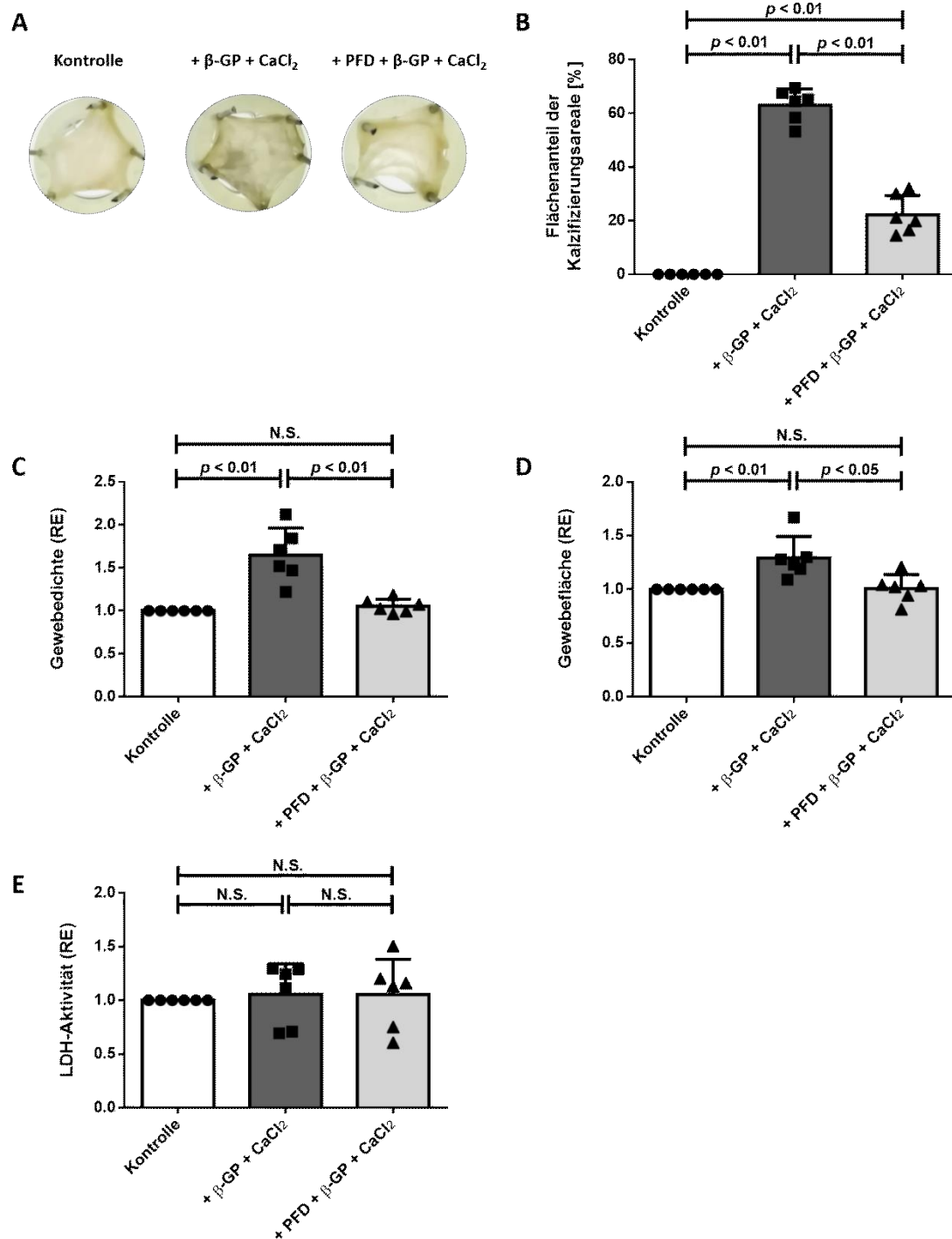


Abbildung 32: Pirfenidon inhibiert die Kalzifizierung des AOK-Gewebes. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. Die quantitative morphologische Analyse der AOK-Taschen erfolgte mittels digitaler Bildanalyse. (A) Repräsentatives Bild der AOK-Gewebemorphologie unmittelbar nach Ende der Kultivierung. (B) Der kalzifizierte Flächenanteil des AOK-Gewebes wurde durch digitale Bildanalyse von makroskopisch sichtbaren grauen Verfärbungen, die biomineralisierte Einlagerungen darstellen, quantifiziert. (C) Die Gewebedichten wurden durch digitale Bildanalyse von Farbänderungen, die aus einer modifizierten Lichtdurchlässigkeit resultierten, quantifiziert. (D) Die Gewebeflächen wurden durch digitale Bildanalyse der AOK-Taschen quantifiziert. (E) Quantifizierung der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (C) bis (E) in relativen Einheiten (RE) (n = 6).

Um die makroskopisch gewonnenen Eindrücke auch histologisch bzw. biochemisch zu belegen, wurden die AOK-Taschen mittels Alizarinrot- und NBT/BCIP-Färbung bzw. Kalziumassay analysiert. Die Alizarinrotfärbung des kultivierten Gewebes visualisierte eine signifikante Kalzifizierung der AOK-Taschen unter prokalzifizierenden Medienbedingungen. In Anwesenheit von Pirfenidon wurde diese Kalzifizierung signifikant inhibiert (Abbildung 33 A). Zur weiteren Analyse der Gewebekalzifizierung wurde die Kalziumkonzentration in den kultivierten AOK-Taschen über einen Kalziumassay bestimmt [218]. Es zeigte sich, dass die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen zu einer signifikanten Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Abbildung 33 B). Bei zusätzlicher Anwesenheit von Pirfenidon im Kulturmedium zeigte sich eine signifikante Inhibition der Kalziumkonzentration um mehr als 50%.

Als Schlüsselenzym der Kalzifizierung ist die alkaline Phosphatase (ALP) ein Marker für die osteoblastoide VIC-Differenzierung, da es die Hydrolyse zu Phosphat begünstigt und somit den Einbau von Hydroxyapatit in die EZM fördert [213]. Daher wurde eine NBT/BCIP-Färbung zum Nachweis der ALP-Gewebeaktivität durchgeführt (Abbildung 33 C). Hierbei zeigte sich, dass die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Hochregulation der ALP-Gewebeaktivität induzierte. Bei zusätzlicher Anwesenheit von Pirfenidon im Kulturmedium wurde die beobachtete Hochregulation der ALP-Gewebeaktivität signifikant um mehr als 66% inhibiert.

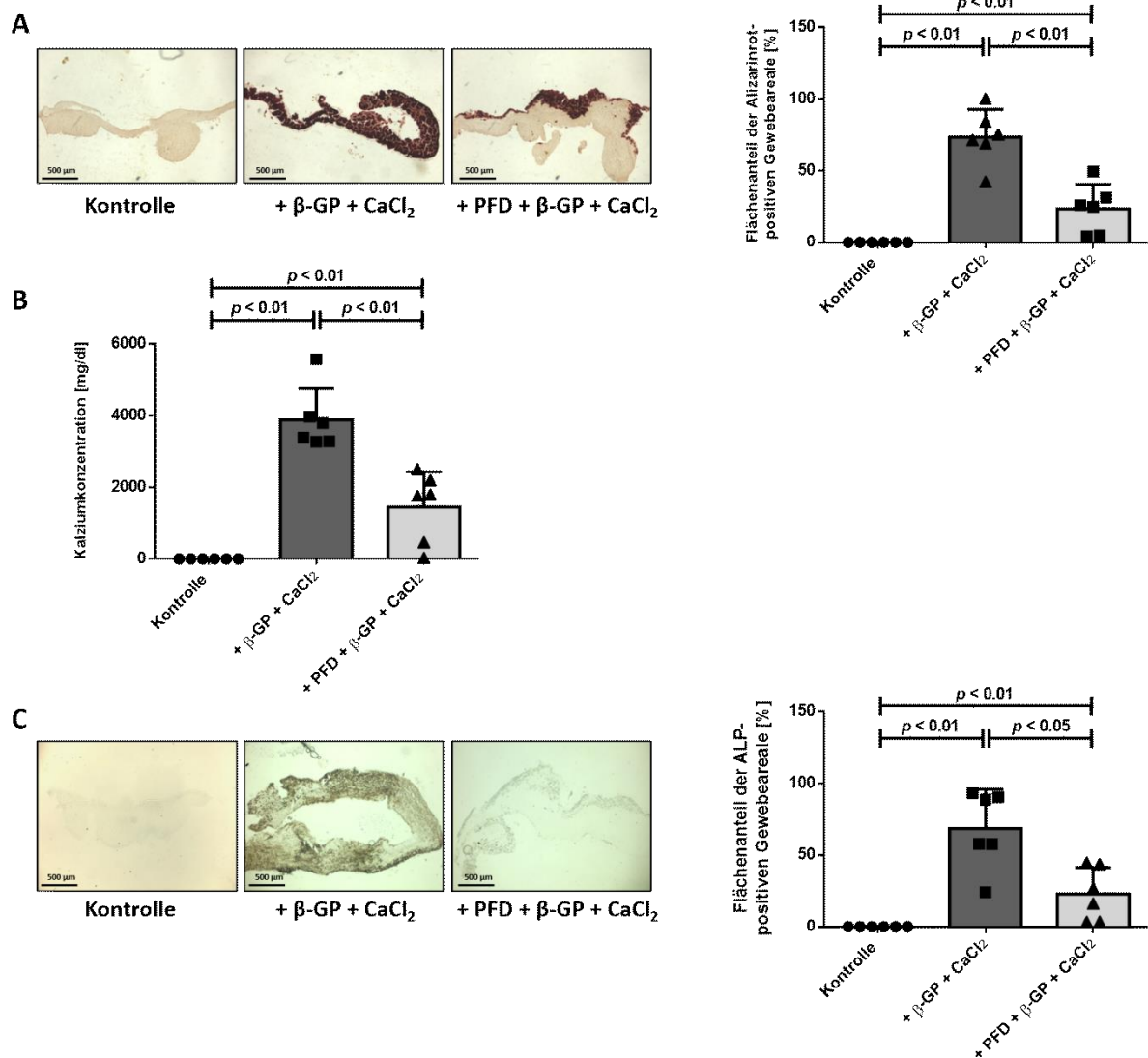


Abbildung 33: Pirfenidon inhibiert die Kalzifizierung des AOK-Gewebes. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. (A) Die Kalzifizierung des Gewebes wurde mittels Alizarinrotfärbung von Gewebeschnitten visualisiert und führte zu einer rötlichen Färbung des kalziumhaltigen Hydroxyapatits. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Alizarinrotfärbemusters. Rechts: Quantifizierung des Alizarinrot-positiven Flächenanteils mittels digitaler Bildanalyse. (B) Die Kalzium-Gewebekonzentration der AOK-Taschen wurde mittels Kalziumassay analysiert. (C) Die ALP-Gewebeaktivität wurde mittels NBT/BCIP-Färbung sichtbar gemacht, was in einer Graufärbung von Gewebebereichen mit ALP-Aktivität resultierte. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden ALP-Färbemusters. Rechts: Der ALP-positive Flächenanteil des AOK-Gewebes wurde mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 6).

3.2.2.2 Pirfenidon inhibiert die myofibroblastoide VIC-Differenzierung im Kontext der Kalzifizierung des AOK-Gewebes

Auch die kalzifizierende Phase der CAVD-Pathogenese ist mit der Zelldifferenzierung von VICs verbunden und wurde über die Expressionsanalyse der

Zelldifferenzierungsmarker α -SMA und Vimentin untersucht. Die Immunoblotanalysen (Abbildung 34 A) der AOK-Taschen ergaben eine signifikante Hochregulation der α -SMA- (+ 100%) sowie eine signifikante Herabregulation der Vimentinexpression (- 43%) nach prokalzifizierender Kultivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 34 B und C). Pirfenidon inhibierte signifikant sowohl die prokalzifizierend-induzierte α -SMA-Erhöhung als auch die Vimentin-Herabregulation. Entsprechend ergab sich für das α -SMA/Vimentin-Expressionsverhältnis eine deutliche Erhöhung unter prokalzifizierenden Medienbedingungen (+ 248%), die in Anwesenheit von Pirfenidon im Kulturmedium vollständig blockiert wurde (Abbildung 34 D).

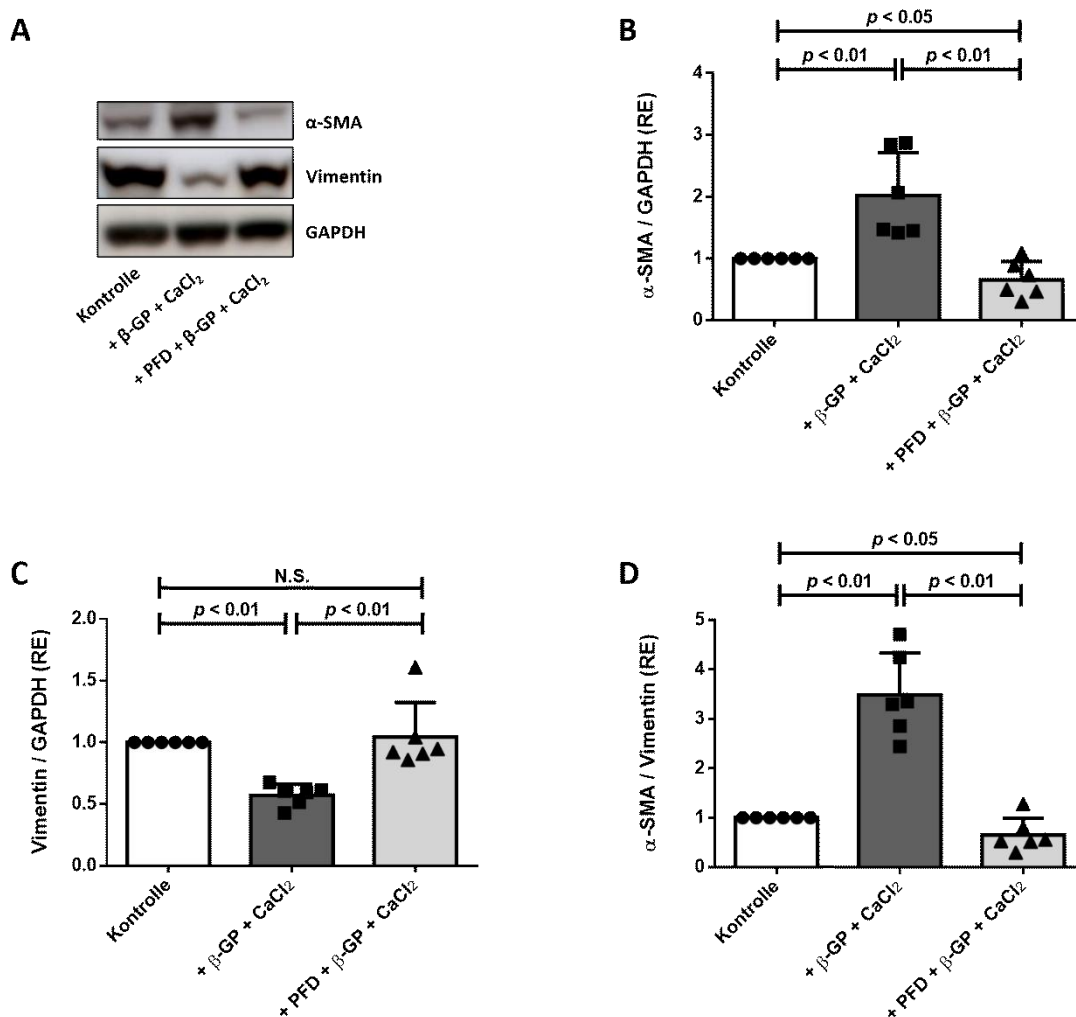


Abbildung 34: Pirfenidon inhibiert die myofibroblastoide VIC-Differenzierung im Kontext der Kalzifizierung des AOK-Gewebes. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl_2) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. Die Expression von α -SMA, Vimentin und GAPDH wurden mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von α -SMA (Molekulargewicht: 42 kDa), Vimentin (Molekulargewicht: 57 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von α -SMA relativ zu GAPDH. (C) Quantifizierung der Expression von Vimentin relativ zu GAPDH. (D) Quantifizierung der Expression von α -SMA relativ zu Vimentin. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) ($n = 6$).

3.2.2.3 Pirfenidon blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition des BMP-2-SMAD1/5/8- und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

Zur mechanistischen Untersuchung der antikalzifizierenden Wirkung von Pirfenidon wurden der Aktivierungsstatus des prokalzifizierenden BMP-2-Signalwegs sowie des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs analysiert [117] [214]. Durch BMP-2 kommt es zur Phosphorylierung/Aktivierung der zentralen Transkriptionsfaktoren SMAD1/5/8, welche wiederum durch Translokation in den Zellkern u.a. die osteoblastoide Zelldifferenzierung induzieren [214]. Daher wurden die Effekte prokalzifizierender Stimulation sowie der Einfluss von Pirfenidon auf die SMAD1/5/8-Phosphorylierung analysiert (Abbildung 35 A). Die Immunoblotanalysen ergaben eine signifikante Aktivierung von SMAD1/5/8 unter prokalzifizierenden Medienbedingungen, die durch Pirfenidon signifikant inhibiert wurde (- 34%) (Abbildung 35 B).

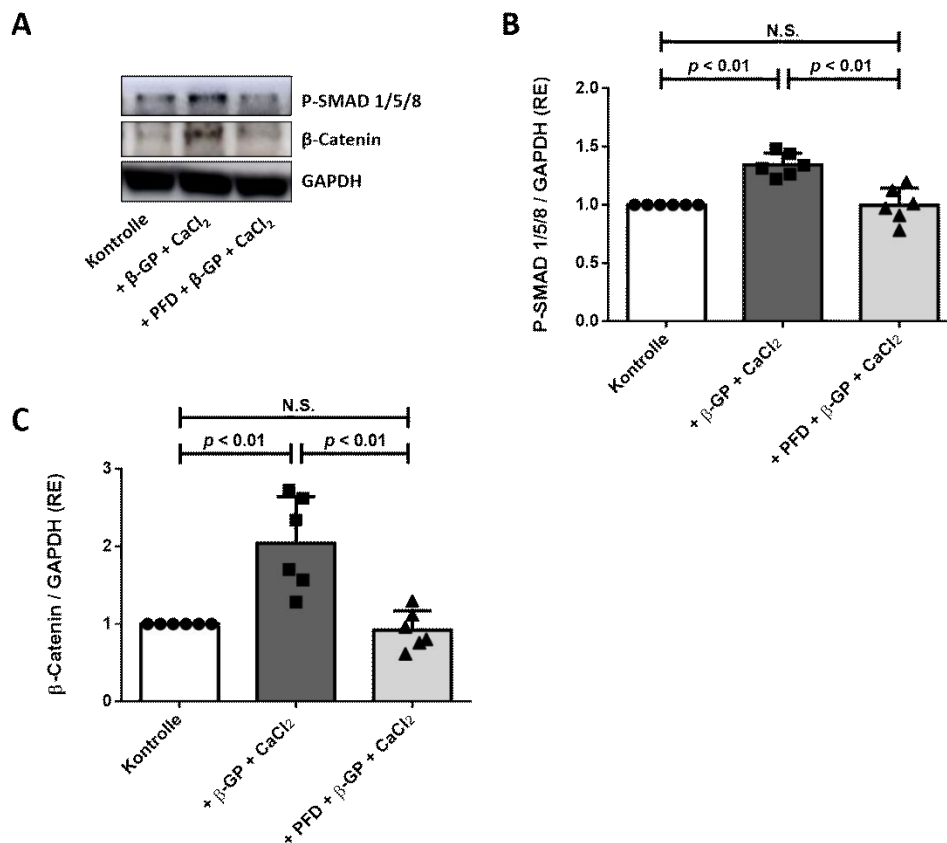


Abbildung 35: Pirfenidon blockiert die AOK-Gewebekalzifizierung durch Inhibition des BMP-2-SMAD1/5/8- und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von 1 mg/ml Pirfenidon (PFD) kultiviert. Die Phosphorylierung/Aktivierung von SMAD1/5/8 und die β -Catenin-Expression wurden mittels Immunoblot analysiert. (A) Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von P-SMAD1/5/8 (Molekulargewicht: 60 kDa), β -Catenin (Molekulargewicht: 92 kDa) und GAPDH (Molekulargewicht: 37 kDa). (B) Quantifizierung der Expression von P-SMAD1/5/8 relativ zu GAPDH. (C) Quantifizierung der Expression von β -Catenin relativ zu GAPDH. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 6).

Auch die Beteiligung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges an der Osteogenese wurde bereits nachgewiesen [117], [119], weshalb der zusätzliche Einfluss von Pirfenidon auf diesen Signalweg im Zuge der AOK-Gewebekalzifizierung analysiert wurde. Zunächst konnte mittels Immunoblotanalyse eine signifikante Hochregulation der β -Catenin-Expression (+ 100%) nach prokalzifizierender Kultivierung der AOK-Taschen im Vergleich zu Kontrollbedingungen nachgewiesen werden, was auf eine verstärkte Aktivierung dieses Signalwegs hindeutet (Abbildung 35 C). Die zusätzliche Kultivierung mit Pirfenidon führte zu einer mehr als 50%-igen Reduktion der β -Catenin-Expression und lag somit auf einem ähnlichen Niveau wie die Kontrollgruppe.

3.3 Das Adiponektin-Rezeptorsystem als neues Target für die Prävention und Therapie der CAVD

3.3.1 Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems im Verlauf der CAVD-Pathogenese

3.3.1.1 Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin in humanen AOK-Biopsien

3.3.1.1.1 Quantifizierung der mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin

Zur Untersuchung der Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems wurde die mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin in humanen AOK-Biopsien, die unveränderte (n = 13), fibrotische (n = 40) und kalzifizierte (n = 40) morphologische Phänotypen als konsekutive Stadien der CAVD-Pathogenese repräsentieren, gemessen (Abbildung 36 A). Für jede der drei analysierten phänotypischen Gruppen stammte die Hälfte der AOK-Biopsien von Patienten mit Diabetes Typ 2 als metabolische Komorbidität, deren Diagnose durch den Arztbrief oder einen HbA1c-Wert $\geq 6,5\%$ manifestiert wurde.

Zunächst wurde die Regulation der Biomarker für Fibrose (Kollagen Typ I) und Kalzifizierung (Osteopontin) in den drei morphologischen Gruppen analysiert (Abbildung 36 B). Fibroseprozesse innerhalb der AOK sind durch eine Hochregulation der EZM-Komponente Kollagen Typ I gekennzeichnet [212] und im weiteren Verlauf der CAVD kommt es typischerweise auch zu einer erhöhten Expression des Glykophosphoproteins Osteopontin, das an der Regulation von Kalzifizierungsprozessen der AOK beteiligt ist [219]. Bei der mRNA-Analyse zeigten sich in humanen AOK-Taschen mit fibrotischem und kalzifiziertem Phänotyp im Vergleich zu phänotypisch unveränderten AOK-Taschen entsprechend signifikant erhöhte Kollagen Typ I- bzw. Osteopontin-Expressionsniveaus. Wobei sich jeweils eine Zunahme der Expression von Kollagen Typ I und Osteopontin mit fortschreitender CAVD-Pathogenese beobachten ließ.

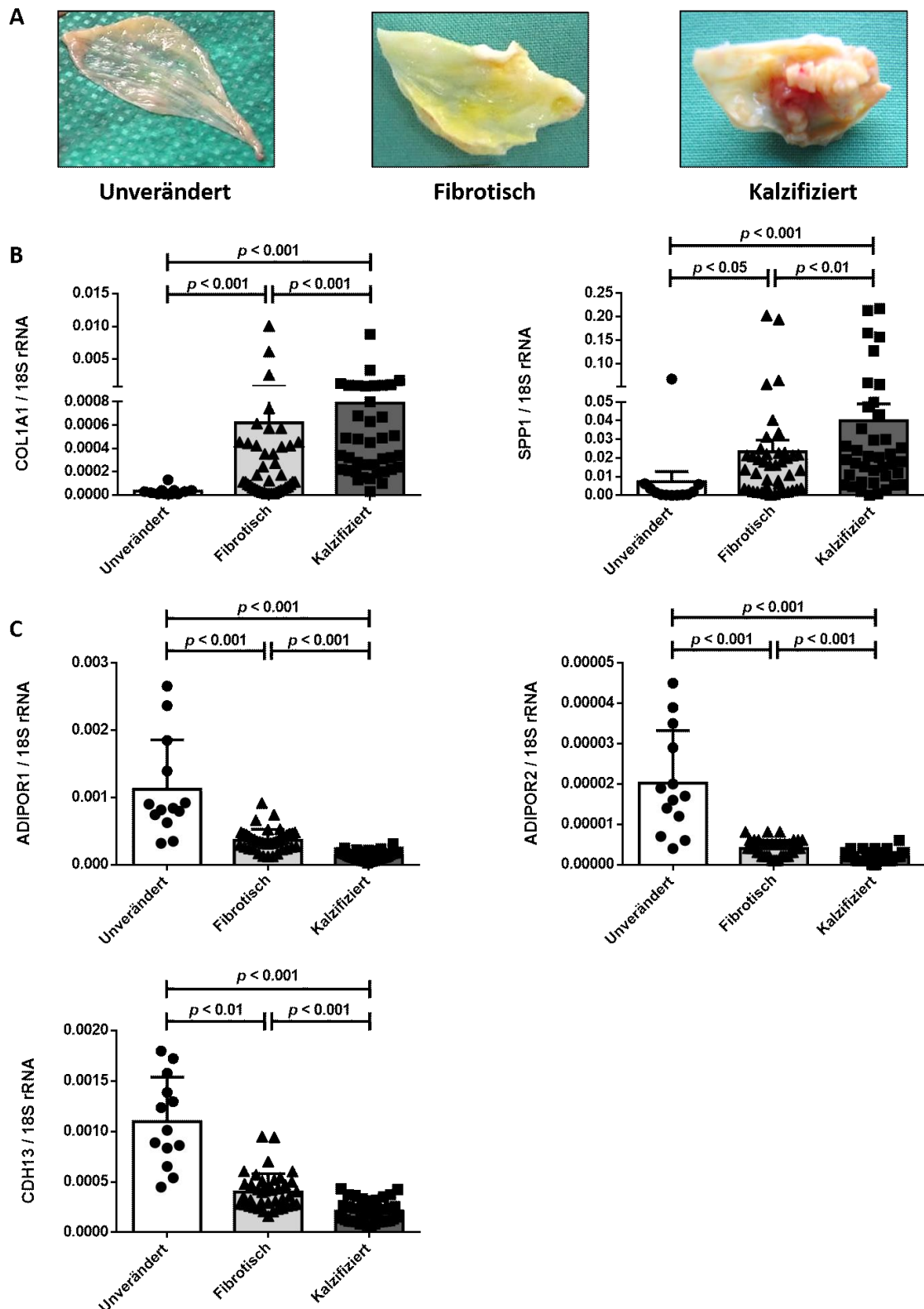


Abbildung 36: Quantifizierung der mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin in humanen AOK-Biopsien. (A) Biopsien von humanen AOK mit unveränderten ($n = 13$), fibrotischen ($n = 40$) und kalzifizierten ($n = 40$) morphologischen Phänotypen wurden für die mRNA-Expressionsanalytik verwendet. (B) Quantifizierung der mRNA-Expression der Fibrose- und Kalzifizierungsmarker Kollagen Typ I (Genname: COL1A1) und Osteopontin (Genname: SPP1) relativ zum Housekeepinggen 18S rRNA mittels qPCR. (C) Quantifizierung der mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin (Genname: CDH13) relativ zu 18S rRNA mittels qPCR. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SEM.

Im Gegensatz dazu waren die Expressionsniveaus von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin in fibrotischen und kalzifizierten AOK-Taschen im Vergleich zu den phänotypisch unveränderten AOK-Taschen signifikant verringert (Abbildung 36 C). Zudem zeigten die Expressionen von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin jeweils eine signifikante Herabregulation mit fortschreitender CAVD-Pathogenese. Diese Ergebnisse liefern einen eindeutigen deskriptiven Zusammenhang zwischen der Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems und der Entwicklung von Fibrose und Kalzifizierung in humanen AOK-Taschen.

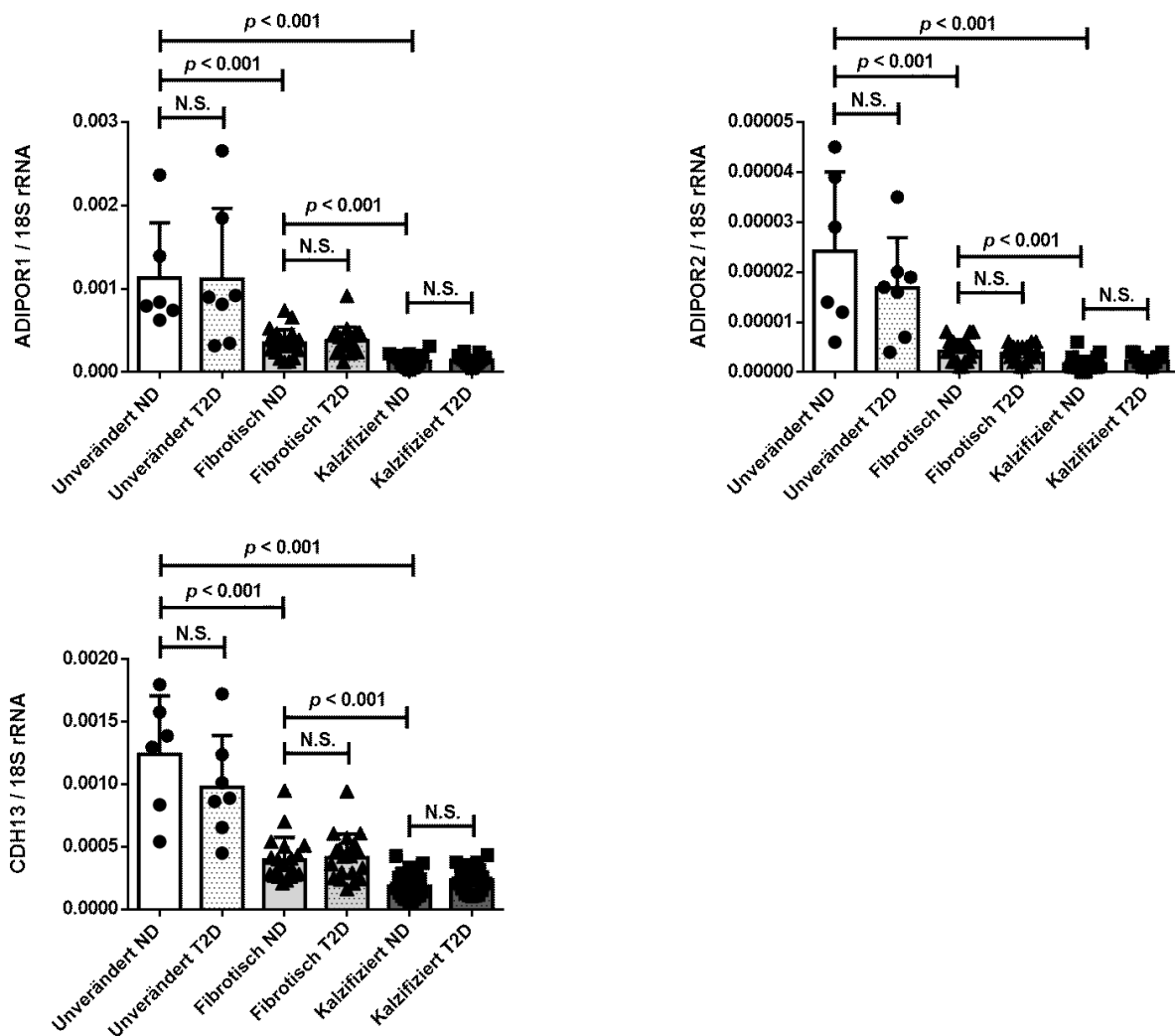


Abbildung 37: Die Regulation der Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems während der CAVD-Pathogenese verläuft diabetesunabhängig. Biopsien von humanen AOK mit unveränderten (n = 13; Nicht-Diabetiker (ND): n = 6, Typ 2 Diabetiker (T2D): n = 7), fibrotischen (n = 40; ND: n = 20, T2D: n = 20) und kalzifizierten (n = 40; ND: n = 20; T2D: n = 20) morphologischen Phänotypen wurden für die mRNA-Expressionsanalytik verwendet. Quantifizierung der mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin (CDH13) relativ zu 18S rRNA mittels qPCR. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SEM.

Dem Adiponektin-Rezeptorsystem werden ebenfalls insulinsensitivierende Eigenschaften und eine blutzuckersenkende Wirkung zugeordnet, sodass bei Patienten mit Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes Typ 2 ein erniedrigtes Adiponektin-Plasmalevel nachgewiesen werden konnte [132], [177],[176]. Gleichzeitig wurde eine reduzierte Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in Skelettmuskel, Herz und Fettgewebe bei diesen Patienten festgestellt [220],[221]. Daher wurde in den humanen AOK-Taschen auch der Einfluss von Diabetes Typ 2 auf die Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems untersucht. Dazu wurde die bestehende Kohorte zu gleichen Zahlen in Nicht-Diabetiker und Typ 2 Diabetiker unterteilt. Es zeigte sich, dass die CAVD-assoziierte Herabregulation der valvulären AdipoR1-, AdipoR2- und T-Cadherin-Expression unabhängig von Diabetes Typ 2 als metabolische Komorbidität ist und dieser Zusammenhang damit sowohl für Diabetiker als auch für Nicht-Diabetiker besteht (Abbildung 37).

3.3.1.2 Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

Nach der klinischen Analyse der Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems in humanen Biopsien phänotypisch unveränderter, fibrotischer und kalzifizierter AOK, wurde eine Expressionsanalyse in kultivierten ovinen AOK-Taschen (3D-CAVD-Modell) durchgeführt. Dazu wurden durch profibrotische (+ TGF- β 1) sowie prokalzifizierende (+ β -GP + CaCl₂) Medienbedingungen Gewebephänotypen induziert, die aufeinanderfolgende Stadien der CAVD repräsentieren (Abbildung 38 A). Es zeigte sich, dass es anders als in den Patientenproben, nur zu einer Herabregulation der AdipoR2-Expression in den profibrotisch und prokalzifizierend kultivierten AOK-Taschen im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt (Abbildung 38 C). Für AdipoR1 und T-Cadherin zeigte sich stattdessen in allen Gruppen eine unveränderte Expression (Abbildung 38 B und D).

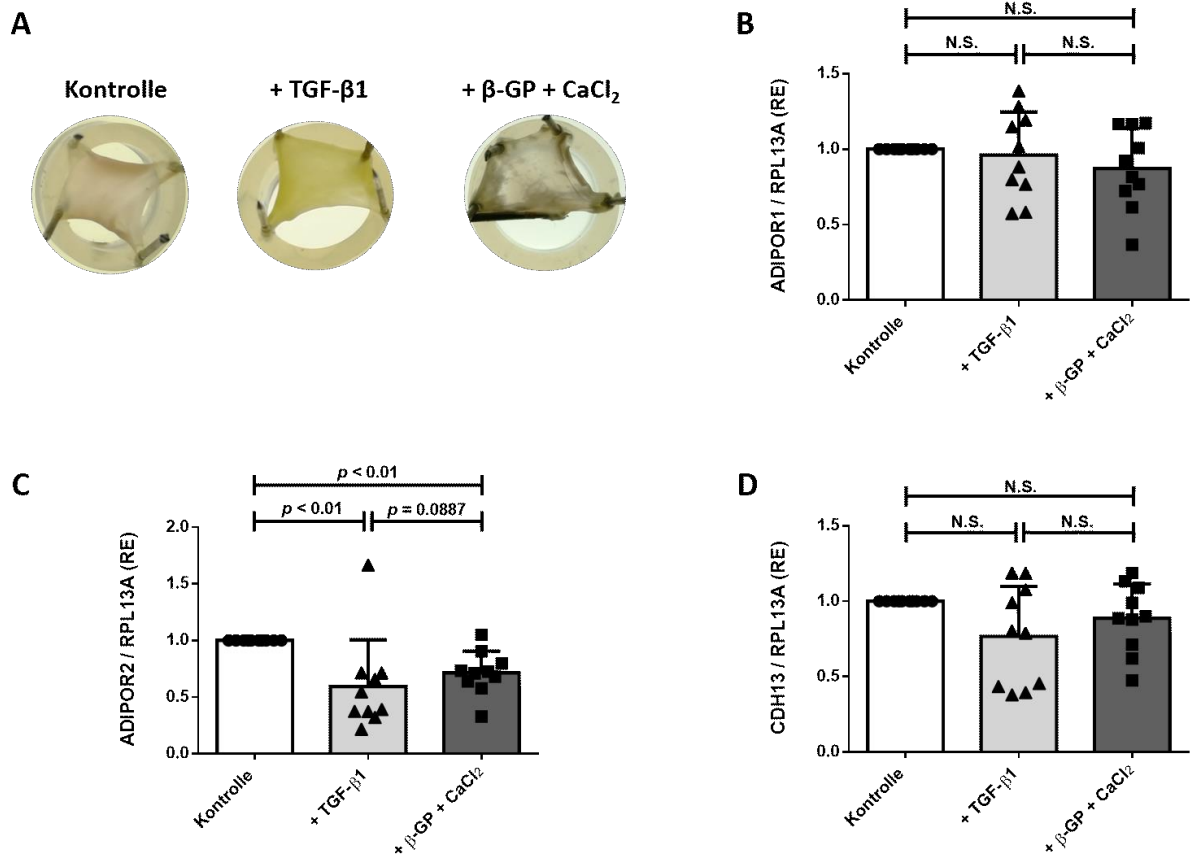


Abbildung 38: Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll-, profibrotischen (+ TGF-β1) oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β-GP + CaCl₂) kultiviert. (A) Repräsentatives Bild der AOK-Gewebemorphologie unmittelbar nach Ende der Kultivierung. Quantifizierung der mRNA-Expression von AdipoR1 (B), AdipoR2 (C) und T-Cadherin (CDH13) (D) relativ zum Housekeepinggen RPL13A mittels qPCR. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 10).

3.3.2 Wirkung von AdipoRon auf Fibrose und Kalzifizierung im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

3.3.2.1 Initiale Wirksamkeitsprüfung von AdipoRon in ovinen VICs durch Messung der AMPK-Aktivierung

Zur initialen Analyse, ob auch in Zellen oviner Herkunft AdipoRon die Aktivierung der AMPK als zentralen Vermittler AdipoR1/AdipoR2-abhängiger Effekte induziert [222], wurden ovine VICs für eine Stunde mit verschiedenen AdipoRon-Konzentrationen (20 – 100 μm) stimuliert und die Aktivierung der AMPK quantifiziert (Abbildung 39 A). Hierbei zeigte sich, dass eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung/Aktivierung der AMPK durch AdipoRon-Stimulation erfolgte und die AMPK-Aktivierung somit mit

steigender AdipoRon-Konzentration zunahm. Der Adiponektin-Rezeptoragonist AdipoRon induziert also auch in ovinen VICs eine deutliche AMPK-Aktivierung.

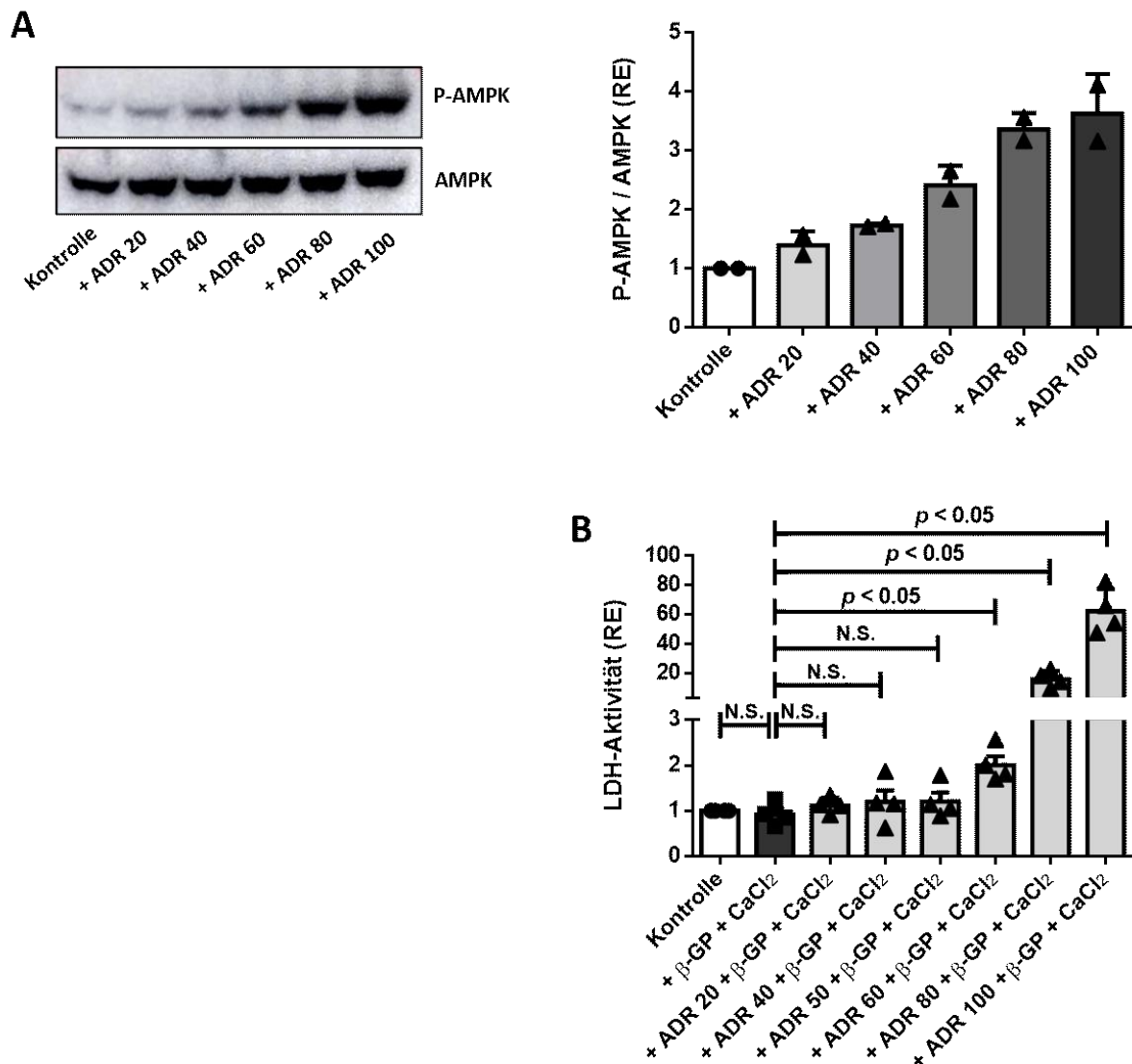


Abbildung 39: Initiale Wirksamkeitsprüfung von AdipoRon in ovinen VICs durch Messung der AMPK-Aktivierung. (A) Ovine VICs wurden mit verschiedenen AdipoRon (ADR)-Konzentrationen (20 – 100 µM) für eine Stunde stimuliert. In den Zellysaten wurde die Phosphorylierung/Aktivierung und Expression der AMPK über Immunoblot analysiert und in Relation zur Kontrolle quantifiziert. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von P-AMPK und AMPK (Molekulargewicht: 62 kDa). Rechts: Quantifizierung der Expression von P-AMPK relativ zu Gesamt-AMPK. (B) Quantifizierung der LDH-Aktivität in konditionierten Kulturüberständen. Ovine VICs wurden unter Kontrollbedingungen oder prokalfizierenden Bedingungen (+ β-GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von AdipoRon in einem Konzentrationsbereich von 20 – 100 µM für acht Tage kultiviert. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 2 (A) bzw. n = 4 (B)).

Die zugehörige Analyse der LDH-Aktivität in konditionierten Kulturüberständen ergab jedoch, dass AdipoRon-Konzentrationen über 50 µM toxisch auf die VICs wirkten (Abbildung 39 B).

Für die weiteren Analysen im 3D-CAVD-Modell wurde daher mit einer AdipoRon-Konzentration von 50 μ M weitergearbeitet, da mit dieser Konzentration eine effektive AMPK-Aktivierung ohne toxische Nebenwirkungen erfolgt.

3.3.2.2 Einfluss von AdipoRon auf Fibrose im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

3.3.2.2.1 AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF- β 1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie

Um die Effekte von AdipoRon auf fibrotische Veränderungen des AOK-Gewebes zu analysieren, wurden ovinen AOK-Taschen unter profibrotischen Medienbedingungen (+ TGF- β 1) in Ab- oder Anwesenheit von AdipoRon stimuliert. Die morphologische Analyse des kultivierten AOK-Gewebes (Abbildung 40 A) ergab, dass es durch die TGF- β 1-Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der Gewebedichte (+ 15%) (Abbildung 40 B) und der Gewebefläche (+ 11%) (Abbildung 40 C) in den AOK-Taschen im Vergleich zur Kontrollgruppe kam, die durch die AdipoRon-Behandlung nicht inhibiert wurde.

Bei der Analyse der LDH-Aktivität in konditionierten Kulturüberständen zeigte sich, dass sowohl die Stimulation mit TGF- β 1, als auch die zusätzliche Behandlung mit AdipoRon zu keiner Veränderung der LDH-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führte und somit keine zytotoxischen Effekte auftraten (Abbildung 40 D).

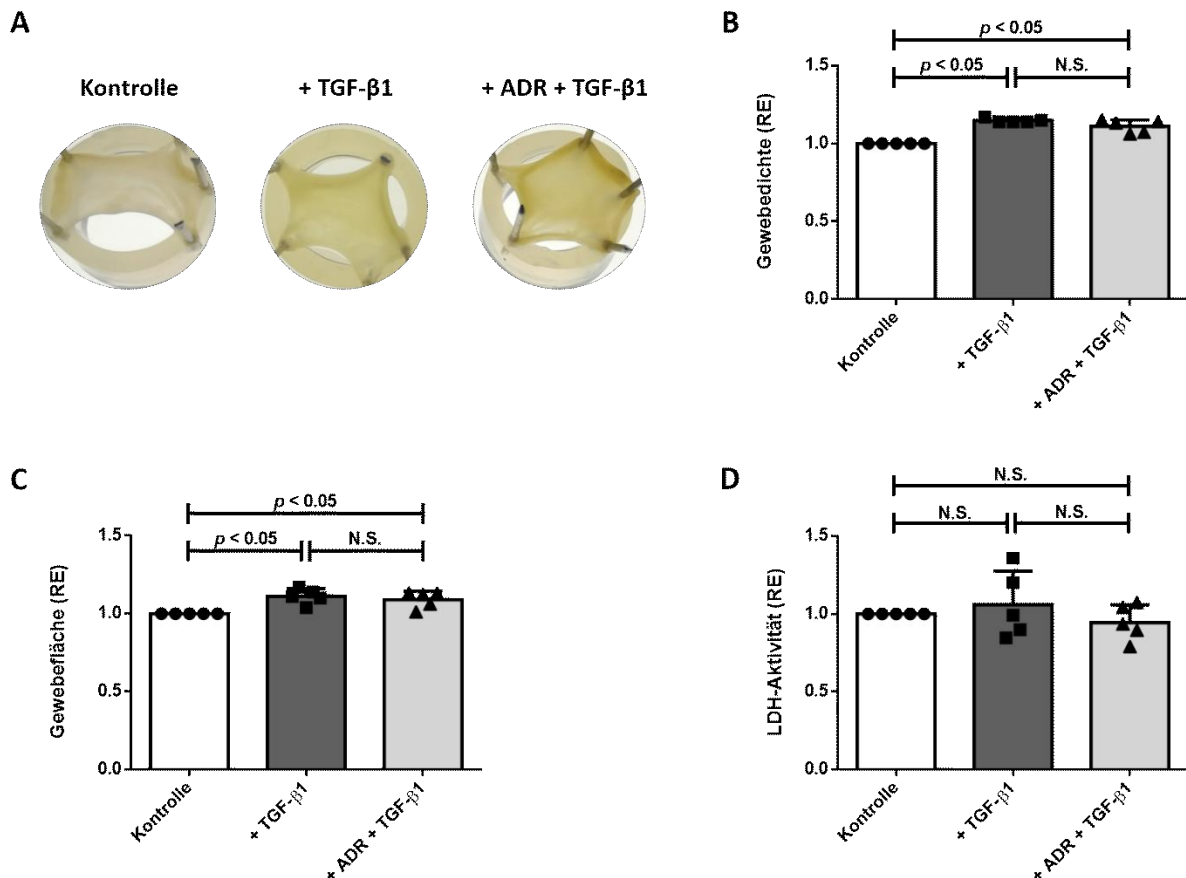


Abbildung 40: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF-β1-induzierte Entstehung einer fibrotischen AOK-Gewebemorphologie. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF-β1) in Ab- oder Anwesenheit von 50 μM AdipoRon (ADR) kultiviert. Die quantitative morphologische Analyse der AOK-Taschen erfolgte mittels digitaler Bildanalyse. (A) Repräsentatives Bild der AOK-Gewebemorphologie unmittelbar nach Ende der Kultivierung. (B) Die Gewebedichten wurden durch digitale Bildanalyse von Farbänderungen, die aus einer modifizierten Lichtdurchlässigkeit resultierten, quantifiziert. (C) Die Gewebeflächen wurden durch digitale Bildanalyse der AOK-Taschen quantifiziert. (D) Quantifizierung der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD in relativen Einheiten (RE) (n = 5).

3.3.2.2 AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF-β1-induzierte Kollagen Typ I-Sekretion

Im Anschluss an die makroskopische Gewebeanalyse wurde in den konditionierten Kulturüberständen die Kollagen Typ I-Sekretion nach TGF-β1-Stimulation in Ab- oder Anwesenheit von AdipoRon untersucht. TGF-β1 induziert nachweislich eine verstärkte Kollagenproduktion [223], weshalb auch die Kultivierung der AOK-Taschen unter profibrotischen Bedingungen zu einer stark erhöhten Kollagen Typ I-Sekretion führte (Abbildung 41). Bei zusätzlicher Anwesenheit von AdipoRon im Kulturmedium ergab sich keine Änderung der Kollagen Typ I-Sekretion im Vergleich zur rein profibrotischen

Kultivierung, d.h. es gibt keine Anzeichen für eine antifibrotische Wirkung von AdipoRon.

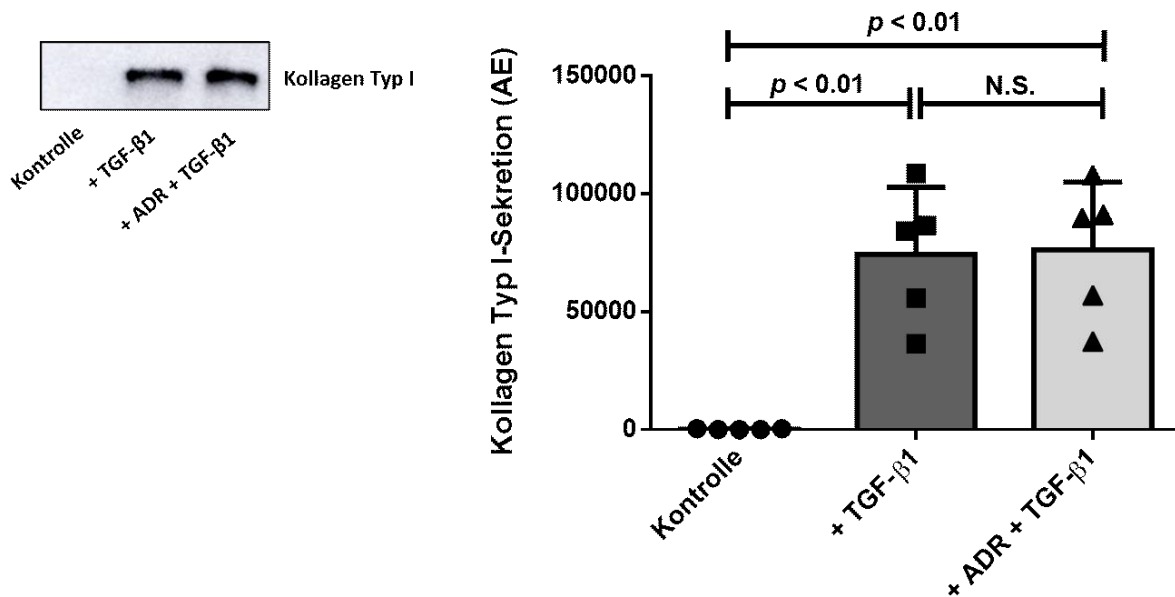


Abbildung 41: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die TGF-β1-induzierte Kollagen Typ I-Sekretion. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder profibrotischen Bedingungen (+ TGF-β1) in Ab- oder Anwesenheit von 50 μM AdipoRon (ADR) kultiviert. Die Sekretion von Kollagen Typ I während der Kultivierung wurde mittels Immunoblot analysiert. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Bandenmusters von Kollagen Typ I (Molekulargewicht: 120 kDa). Rechts: Quantitative Auswertung der Kollagen Typ I-Sekretion. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertung als Streudiagramm sowie Mittelwerte + SD in arbiträren Einheiten (AE) (n = 5).

3.3.2.3 Einfluss von AdipoRon auf Kalzifizierung im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

3.3.2.3.1 AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im zellbasierten 2D-CAVD-Modell

Für Adiponektin sowie weitere AMPK-Aktivatoren, wie Metformin und Resveratol, ist bekannt, dass sie die vaskuläre Kalzifizierung über eine AMPK-vermittelte Inhibition der osteoblastoiden Zelldifferenzierung blockieren [198], [224]. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, welchen Effekt der Adiponektin-Rezeptoragonist AdipoRon auf die Kalzifizierung von VICs bzw. AOK-Taschen im 2D- und 3D-CAVD-Modell hat. Dazu wurden zunächst ovine VICs für acht Tage unter prokalzifizierenden Medienbedingungen (+ β-GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von AdipoRon im Konzentrationsbereich von 6,25 - 50 μM kultiviert. Durch Alizarinrotfärbung zeigte sich, dass AdipoRon im getesteten Konzentrationsbereich keinen inhibierenden Effekt auf

die Kalzifizierung von VICs hat (Abbildung 42 A). Die Analyse der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen ergab keine zytotoxische Wirkung von AdipoRon auf die VICs im getesteten Konzentrationsbereich (Abbildung 42 B).

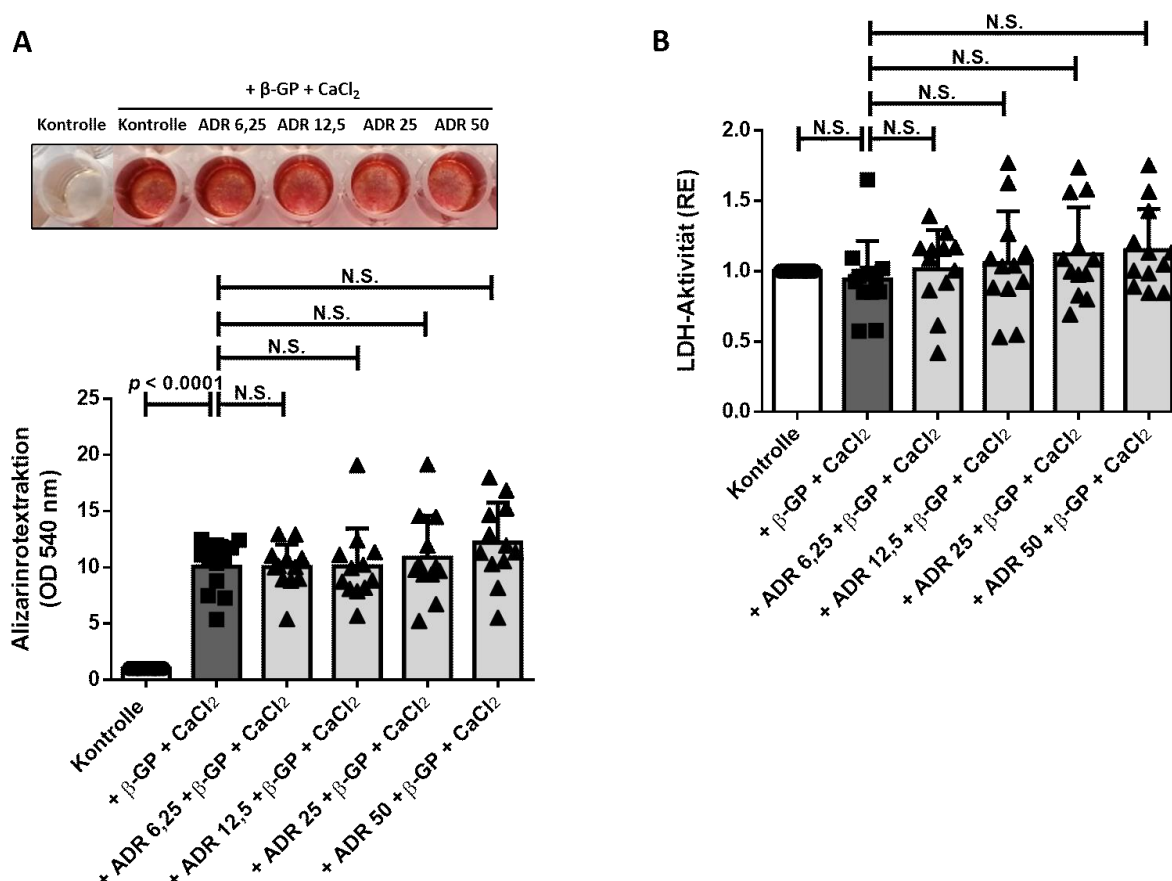


Abbildung 42: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im zellbasierten 2D-CAVD-Modell. Ovine VICs wurden unter Kontrollbedingungen oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β-GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von AdipoRon (ADR) (6,25 – 50 μM) kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von acht Tagen wurde die Kalzifizierung mittels Alizarinrotfärbung der VICs visualisiert, was in einer rötlichen Färbung des kalziumhaltigen Hydroxyapatits resultierte. (A) Oben: Repräsentative Bilder des resultierenden Alizarinrotfärbemusters. Unten: Nach Extraktion des gebundenen Alizarinrots erfolgte die quantitative Bestimmung mittels Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm (B) Quantifizierung der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (B) in relativen Einheiten (RE) (n = 12).

3.3.2.3.2 AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

Um die Wirkung von AdipoRon auf die Entstehung von Gewebekalzifizierung in einer physiologischen EZM-Umgebung zu untersuchen, wurden ovine AOK-Taschen im 3D-CAVD-Modell unter äquivalenten Bedingungen zum 2D-CAVD-Modell kultiviert. Über die makroskopische Analyse des kultivierten AOK-Gewebes konnte festgestellt

werden, dass die prokalzifizierenden Medienbedingungen zu großflächigen grauen Verfärbungen des Gewebes führten (Abbildung 43 A und B), die auf eine Biomineralisierung zurückzuführen sind [205]. Durch das zusätzliche Vorhandensein von AdipoRon im Kulturmedium ergab sich jedoch keine Veränderung der so entstandenen Gewebekalzifizierung.

Diese visuellen Wahrnehmungen stimmten mit den Ergebnissen der auf Lichttransmission-basierenden digitalen Analyse der Gewebedichte als Indikator für Veränderungen der Gewebezusammensetzung oder -dicke überein (Abbildung 43 C). Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen führte die Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen in Ab- und Anwesenheit von AdipoRon jeweils zu einer signifikanten Erhöhung der Gewebedichte (+ 15%). Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der Analyse der Gewebefläche beobachtet werden. So führte die Kultivierung der AOK-Taschen unter prokalzifizierenden Medienbedingungen in Ab- und Anwesenheit von AdipoRon im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Vergrößerung der durchschnittlichen Gewebefläche (+ 40%) (Abbildung 43 D). Bei der Analyse der LDH-Aktivität aus konditionierten Kulturüberständen zeigte sich, dass sowohl die Stimulation unter prokalzifizierenden Bedingungen, als auch die zusätzliche Behandlung mit AdipoRon zu keiner signifikant vermehrten LDH-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führte und somit keine zytotoxischen Effekte zu beobachten waren (Abbildung 43 E).

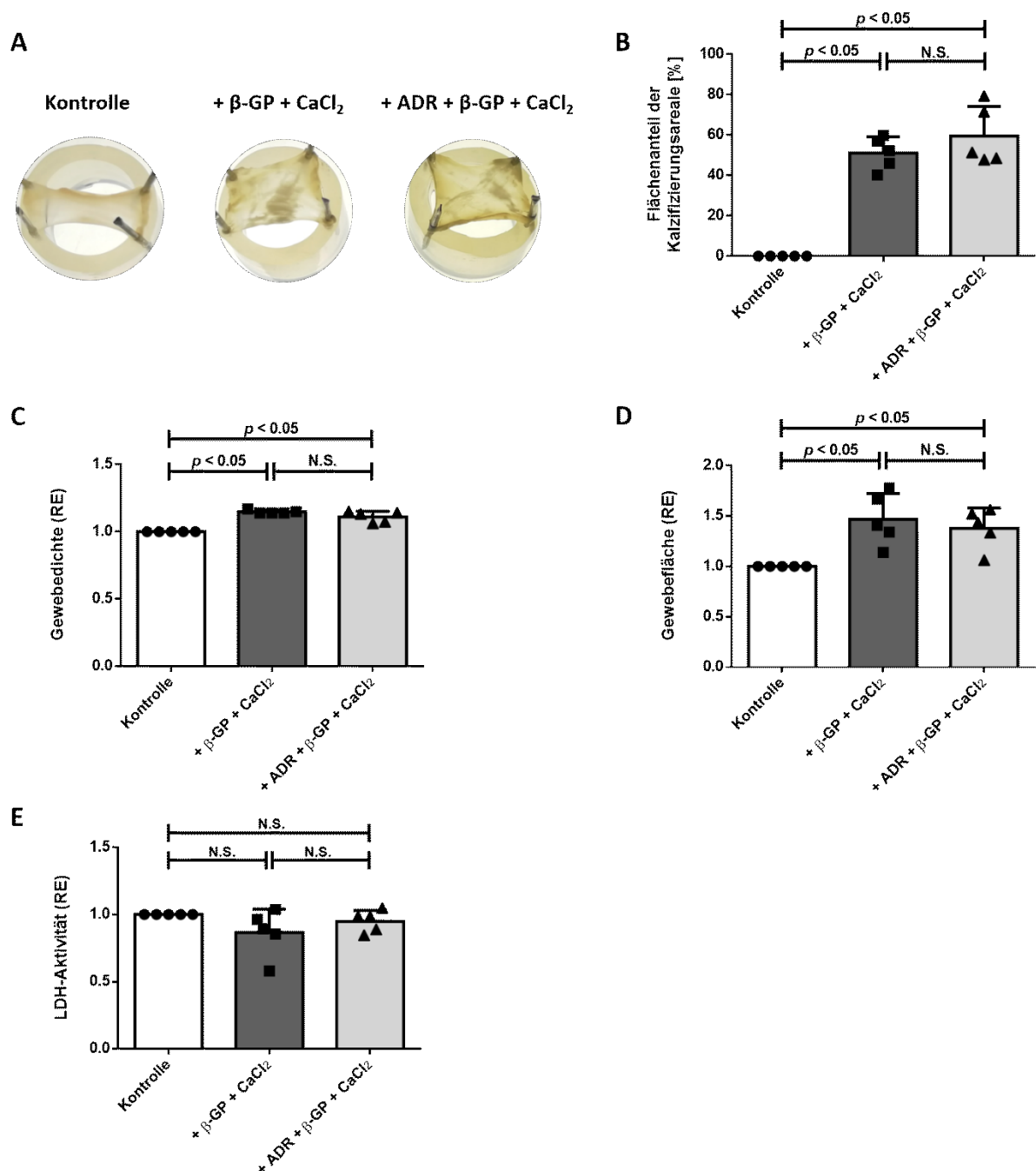


Abbildung 43: AdipoRon hat keinen Einfluss auf die Kalzifizierung im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β -GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von 50 μ M AdipoRon (ADR) kultiviert. Die quantitative morphologische Analyse der AOK-Taschen erfolgte mittels digitaler Bildanalyse. (A) Repräsentatives Bild der AOK-Gewebemorphologie unmittelbar nach Ende der Kultivierung. (B) Der kalzifizierte Flächenanteil des AOK-Gewebes wurde durch digitale Bildanalyse von makroskopisch sichtbaren grauen Verfärbungen, die Biominalisierungen darstellen, quantifiziert. (C) Die Gewebedichten wurden durch digitale Bildanalyse von Farbänderungen, die aus einer modifizierten Lichtdurchlässigkeit resultierten, quantifiziert. (D) Die Gewebeflächen wurden durch digitale Bildanalyse der AOK-Taschen quantifiziert. (E) Quantifizierung der LDH-Aktivität in den konditionierten Kulturüberständen. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertungen als Streudiagramme sowie Mittelwerte + SD, für (C) bis (E) in relativen Einheiten (RE) (n = 5).

Die CAVD-Pathogenese ist u.a. durch den Einbau von kalziumhaltigen Hydroxyapatit in die Kollagenfibrillen der EZM charakterisiert [213]. Durch Alizarinrotfärbung von Gewebeschnitten zeigte sich, dass es durch prokalzifizierende Stimulation im 3D-CAVD-Modell entsprechend zu einer ausgeprägten Gewebekalzifizierung kommt (Abbildung 44). Bei zusätzlicher Behandlung des AOK-Gewebes mit AdipoRon ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie unter prokalzifizierenden Bedingungen, d.h. AdipoRon hat keine inhibierende Wirkung auf die AOK-Gewebekalzifizierung.

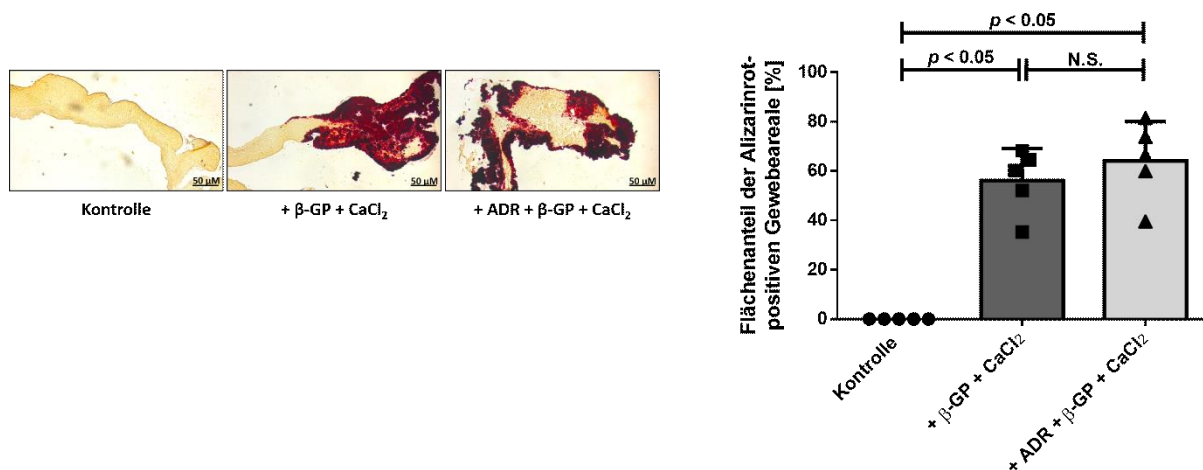


Abbildung 44: AdipoRon inhibiert nicht den Einbau von kalziumhaltigen Hydroxyapatit in die EZM von ovinem AOK-Gewebe. Ovine AOK-Taschen wurden für vier Wochen unter Kontroll- oder prokalzifizierenden Bedingungen (+ β-GP + CaCl₂) in Ab- oder Anwesenheit von 50 μM AdipoRon (ADR) kultiviert. Die Kalzifizierung des Gewebes wurde mittels Alizarinrotfärbung von Gefrierschnitten visualisiert und führte zu einer rötlichen Färbung des kalziumhaltigen Hydroxyapatits. Links: Repräsentative Bilder des resultierenden Alizarinrotfärbemusters. Rechts: Quantifizierung des Alizarinrot-positiven Flächenanteils mittels digitaler Bildanalyse. Graphische Darstellung der Ergebnisauswertung als Streudiagramm sowie Mittelwerte + SD (n = 5).

4 Diskussion

4.1 TGF- β 1 fördert die Fibrose und inhibiert gleichzeitig die Kalzifizierung von als 3D-CAVD-Modell kultiviertem AOK-Gewebe

Trotz wichtiger Erkenntnisse aus früheren Studien wurden die Pathomechanismen der CAVD bisher noch nicht vollständig aufgedeckt. Dies gilt insbesondere für die Rolle von TGF- β 1 bei der CAVD-Pathogenese, da *in vitro*-Studien mit Monolayern isolierter VICs zur Untersuchung seiner pathogenen Funktion widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Da die valvuläre EZM eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der mechanischen und biologischen Funktion der AOK spielt [225] und auch die degenerative VIC-Kalzifizierung kontrolliert [113], [207], sind realitätsnähere CAVD-Modelle, in denen VICs dreidimensional wachsen und mit einer physiologischen EZM-Umgebung interagieren können, für aussagekräftige *in vitro*-Studien erforderlich. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Rolle von TGF- β 1 bei der Entstehung von Fibrose und Kalzifizierung während der CAVD-Pathogenese native AOK-Taschen in einem gewebebasierten 3D-CAVD-Modell kultiviert.

Durch den Nachweis einer erhöhten Phosphorylierung/Aktivierung des Schlüsseltranskriptionsfaktors SMAD3, das die Transkription von TGF- β 1-Zielgenen reguliert sowie einer gleichzeitigen Herabregulation der SMAD3-Expression und einer Hochregulation des inhibitorischen SMAD7 als weiteren negativen Rückkopplungsmechanismus [84] sowie der Autoinduktion der TGF- β 1-Expression [226], konnte in dieser Arbeit umfassend gezeigt werden, dass die Applikation von rekombinantem TGF- β 1 im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell effektiv die zugehörigen Signalwege aktiviert. Dementsprechend förderte TGF- β 1 die Entstehung eines ausgeprägten Fibrosephänotyps während gleichzeitig die Kalzifizierung der AOK-Taschen im 3D-CAVD-Modell blockiert wurde (Abbildung 45). Interessanterweise konnte hier die teilweise gegensätzliche Wirkung unter 2D-Bedingungen beobachtet werden, was frühere Beobachtungen bestätigt und ferner die Bedeutung spezifischer Versuchsbedingungen unterstreicht.

Die Entstehung der CAVD resultiert aus einem aktiven fibrotisch-kalzifizierenden Prozess, der durch die Differenzierung von quieszenten VICs in aktivierte bzw. Osteoblasten-ähnliche VICs angetrieben wird. Aktivierte VICs, die aus der

myofibroblastoiden Differenzierung resultieren, erhalten die Integrität des AOK-Gewebes unter Stressbedingungen durch Verstärkung des EZM-Umbaus [212] und sind durch eine erhöhte Proliferation [227], die Hochregulation der α -SMA- und Kollagen Typ I-Expression sowie der Herabregulation der Vimentin-Expression gekennzeichnet [211]. Langfristig fördert die myofibroblastoide VIC-Differenzierung allerdings die Entstehung von Gewebefibrose.

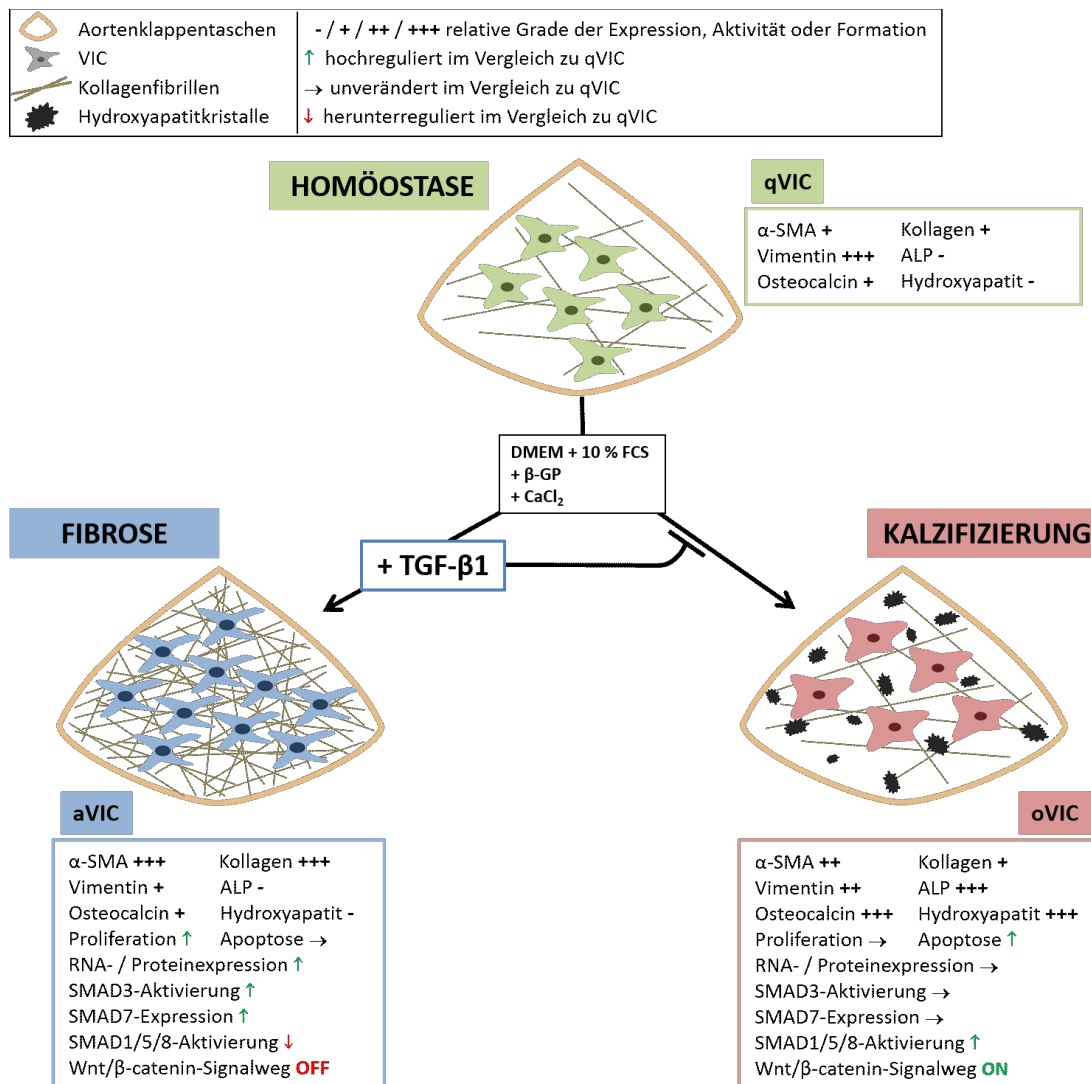


Abbildung 45: Schematische Übersicht über die Effekte von TGF- β 1 im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell. In AOK-Taschen, die als 3D-CAVD-Modell kultiviert wurden, induziert das zusätzliche Vorhandensein von TGF- β 1 unter ansonsten prokalzifizierenden Bedingungen die SMAD3-vermittelte myofibroblastoide Differenzierung von quieszenten VICs (qVICs) in aktivierte VICs (aVICs), was mit expressioneller und proliferativer Aktivierung und Entstehung einer dominanten Gewebefibrose verbunden ist. Gleichzeitig blockiert TGF- β 1 durch Inhibition der Aktivierung von SMAD1/5/8 und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Differenzierung von qVICs in Osteoblasten-ähnliche VICs (oVICs) und das assoziierte Auftreten von Apoptose und AOK-Gewebekalzifizierung.

Die Analyse der α -SMA-, Vimentin- und Kollagen Typ I-Expression in Verbindung mit der Messung von Cyclin D1 als Marker für proliferative Aktivität zeigte, dass TGF- β 1 die myofibroblastoide VIC-Differenzierung im 3D-CAVD-Modell induziert [210], [212]. Dementsprechend ergaben frühere Studien in Bezug auf die Regulation der Proliferationsmarker Cyclin D1 und Ki-67, der Zellproliferation sowie der α -SMA- und Kollagen Typ I-Expression in VICs [228], pulmonalen [229] und kardialen Fibroblasten [78], dass die TGF- β 1-induzierte SMAD3-Aktivierung eine myofibroblastoide Differenzierung und die damit verbundene Entstehung von Gewebefibrose vermittelt. Die mechanistische Basis der erhöhten VIC-Proliferation als Reaktion auf die TGF- β 1-Stimulation beinhaltet allerdings zusätzlich auch die nicht-kanonische TGF- β 1-Signalübertragung über die SMAD2/3-unabhängige Aktivierung von zellwachstumskontrollierenden Kinasen, wie ERK1/2 und Akt [210], [230], [231].

Die zuvor erwähnten Anhaltspunkte für eine TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung und die damit assoziierte Entstehung einer AOK-Gewebefibrose wurde durch die elektronenmikroskopische Analyse weiter fundiert. Die TGF- β 1-Behandlung löste umfassende phänotypische VIC-Veränderungen, wie ein Wachstum der Zellgröße, des zytoplasmatischen Volumens und der Zelloberfläche sowie vermehrtes Vorhandensein von Mitochondrien, rauem ER, Golgi-Apparaten und sekretorischen Vesikeln aus, was insgesamt für eine intensive expressionelle und sekretorische Aktivität spricht. In diesem Zusammenhang wurde auch eine TGF- β 1-induzierte starke Hochregulation der Freisetzung von Kollagen-Polypeptidketten aus VICs und deren anschließender extrazellulärer Zusammenbau zu Kollagen Typ I-Strängen deutlich. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren elektronenmikroskopischen Charakterisierungen von Myofibroblasten überein und stellen erstmals eine direkte Verbindung zwischen der myofibroblastoiden VIC-Differenzierung und der Entstehung von AOK-Gewebefibrose im 3D-CAVD-Modell her. Äquivalent zu früheren Studien [232] ergab die ultrastrukturelle Analyse des AOK-Gewebes, welches durch TGF- β 1-induzierte fortgeschrittene Fibrose charakterisiert ist, dass das Kollagenfasernetzwerk extrem verdichtet ist, die VICs eng in die EZM eingebettet sind und eine kompaktierte Größe, eine reduzierte Oberfläche sowie vermindertes zytoplasmatisches Volumen aufweisen.

Osteoblasten-ähnliche VICs sind für den Einbau von kalziumhaltigen Hydroxyapatit in die Kollagenfibrillen der EZM als Ursprung der Gewebekalzifizierung verantwortlich

[213]. Sie tragen zur Kalzifizierung der AOK-Taschen bei, indem sie große Mengen ALP freisetzen und durch eine erhöhte Expression von Osteocalcin gekennzeichnet sind [9]. Darüber hinaus stellen *in vitro*- [208] und *in vivo*-Studien [233] eine Verbindung zwischen der AOK-Kalzifizierung und einem verstärkten Auftreten von VIC-Apoptose her. In dieser Hinsicht zeigte die Quantifizierung des Hydroxyapatit-Einbaus in die EZM, der ALP-Aktivität, der Osteocalcin-Expression und der TUNEL-positiven VICs umfassend, dass das zusätzliche Vorhandensein von TGF- β 1 die osteoblastoide Differenzierung und Apoptose von VICs sowie die durch prokalzifizierende Kulturbedingungen-induzierte Gewebekalzifizierung im 3D-CAVD-Modell inhibiert. Diese Ergebnisse wurden durch die elektronenmikroskopische Beobachtung bestätigt, dass die Bildung von kalzifizierten Arealen und die damit verbundene Akkumulation von Zelltrümmern und toter VICs durch die TGF- β 1-Behandlung vollständig inhibiert wurde.

Mechanistisch wurde eine pro-osteogene Rolle der BMP-2-SMAD1/5/8-Signalachse bereits in humanen VICs nachgewiesen, die aus stenosierten AOK isoliert wurden [234]. Dementsprechend war die Induktion von osteoblastoide VIC-Differenzierung und AOK-Gewebekalzifizierung im 3D-CAVD-Modell dieser Arbeit mit einer erhöhten Phosphorylierung/Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SMAD1/5/8 verbunden. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien an mesenchymalen Stammzellen [117] und VICs [214] überein, die zeigten, dass prokalzifizierende Kulturbedingungen die Expression von proosteogenem BMP-2 hochregulieren. Dies führt anschließend über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SMAD1/5/8 zur osteoblastoiden Zelldifferenzierung und der damit verbundenen Gewebekalzifizierung. Zusammen mit der erhöhten Aktivierung von SMAD1/5/8 wurde die SMAD6-Expression durch prokalzifizierende Kulturbedingungen im 3D-CAVD-Modell hochreguliert. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Indikator für die effektive Aktivierung der BMP-2-SMAD1/5/8-Signalachse, da SMAD6 als negativer Rückkopplungsregulator fungiert und die übermäßige BMP-2-induzierte Aktivierung von SMAD1/5/8 spezifisch abschwächt [215]. Bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium verblieb die SMAD6-Expression im 3D-CAVD-Modell jedoch auf Kontrollniveau, während die SMAD1/5/8-Aktivierung sogar unterhalb des Kontrollniveaus herabreguliert wurde. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse eine TGF- β 1-vermittelte Inhibition der proosteogenen BMP-2-SMAD1/5/8-Signalübertragung im

3D-CAVD-Modell, wie sie bereits entsprechend von Guerrero et al. bezüglich der osteogenen Differenzierung und Kalzifizierung von mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen wurde [117]. In diesem Zusammenhang könnte die TGF- β 1-induzierte Hochregulation der SMAD7-Expression die mechanistische Verbindung zwischen der Aktivierung der TGF- β 1-SMAD3- und der Inhibition der BMP-2-SMAD1/5/8-Signalachse im 3D-CAVD-Modell darstellen (Abbildung 46). Im Gegensatz zu SMAD6 wirkt SMAD7 als allgemeiner Inhibitor von Zytokinen der TGF- β -Familie, der sowohl die Aktivierung der TGF- β 1-SMAD3- als auch der BMP-2-SMAD1/5/8-Signalachse blockiert [215]. Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten Ehnert et al., dass die BMP-2-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung von SMAD1/5/8 in Osteoblasten durch die TGF- β 1-induzierte Hochregulation von SMAD7 blockiert wird [235].

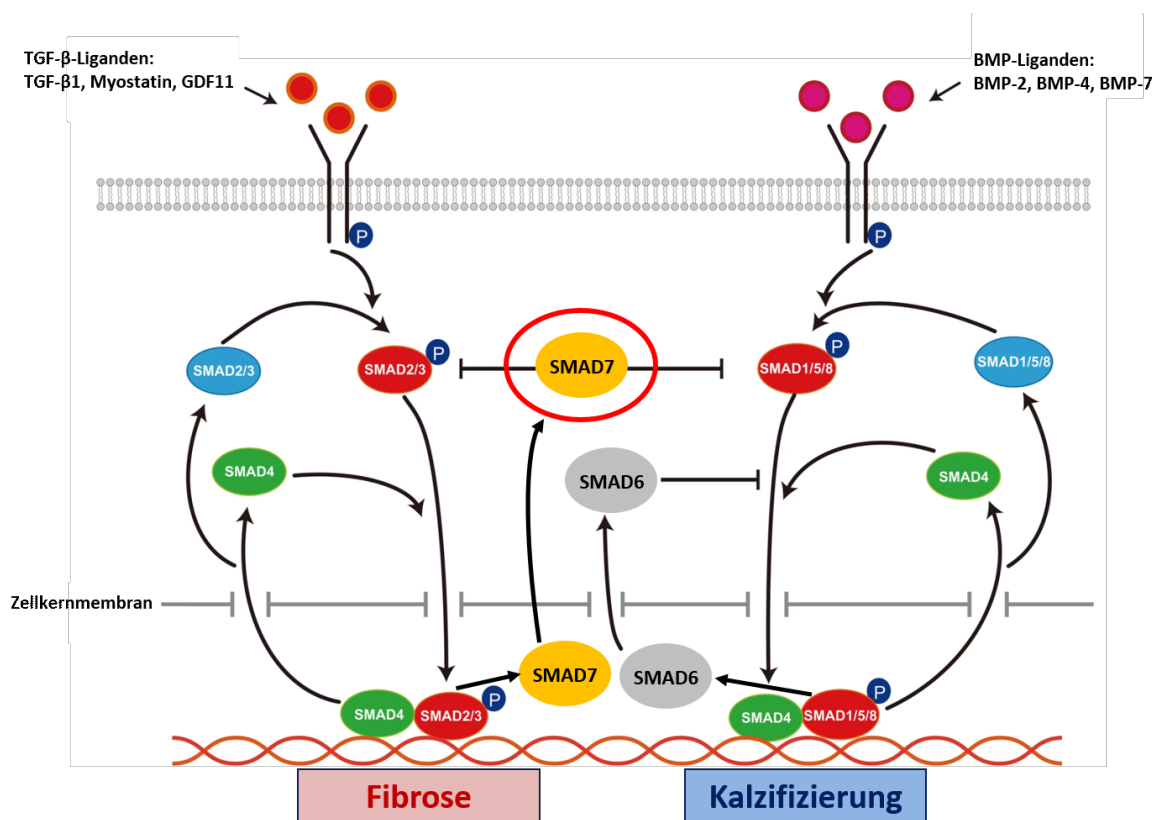


Abbildung 46: Schematische Übersicht über den Mechanismus der SMAD7-vermittelten Interaktion von TGF- β 1- und BMP-2-Signalweg im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell. Die Hochregulation der Expression des Transkriptionsfaktors SMAD7 repräsentiert eine mögliche mechanistische Verbindung für die, gleichzeitig zur Aktivierung der TGF- β 1-SMAD3-Signalachse, zu beobachtende Inhibition der BMP-2-SMAD1/5/8-Signalachse im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell. Modifiziert nach [236].

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist ein weiterer kritischer Vermittler der osteogenen Zelldifferenzierung und wurde bereits zuvor mit der CAVD-Entstehung in Verbindung gebracht [237]. Äquivalent zu Ergebnissen früherer Zellkulturstudien [117], [119], [214] konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass prokalzifizierende Kultivierungsbedingungen die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im 3D-CAVD-Modell induzieren, was sich an einer erhöhten valvulären β -Catenin-Expression erkennen ließ. Im Gegensatz dazu wurde bei zusätzlicher Anwesenheit von TGF- β 1 im Kulturmedium die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs blockiert. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die TGF- β 1-induzierte Inhibition des proosteogenen kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch eine Herabregulation des *Frizzled family* Co-Rezeptors LRP6 und der Hochregulation des LRP6-Antagonisten DKK1 vermittelt wird [216]. Passend dazu wurde bereits zuvor gezeigt, dass eine Blockade des TGF- β 1-Signalwegs in Brusttumoren die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, die intrazelluläre Akkumulation von β -Catenin und eine erhöhte Expression von β -Catenin-Zielgenen auslöst [235]. Ähnlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten Guerrero et al., dass TGF- β 1 die osteogene Differenzierung und Kalzifizierung von mesenchymalen Stammzellen über die Inhibition des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs verhindert, die mechanistisch mit einer Herabregulation des LRP6-Homologs LRP5 sowie der Hochregulation von DKK1 verbunden ist [117].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit damit, dass TGF- β 1 die Aktivierung sowohl der BMP-2-SMAD1/5/8- als auch der kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalachse abschwächt, die zusammen die osteoblastoide VIC-Differenzierung sowie die Kalzifizierung im 3D-CAVD-Modell induzieren. Obwohl die funktionelle und molekulare Interaktion zwischen dem BMP-2-SMAD1/5/8- und dem kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg noch nicht genau charakterisiert wurde, legen mehrere Studien nahe, dass im Hinblick auf die Induktion der CAVD-Pathogenese der BMP-2-Signalweg via SMAD1/5/8 als Upstream-Aktivator des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs agiert [238].

Darüber hinaus könnten TGF- β 1-induzierte fibrotische Veränderungen der EZM, wie z.B. die Hochregulation der Kollagenexpression, -sekretion und -gewebeeinlagerung, zu einer Blockade der osteoblastoiden VIC-Differenzierung und der damit

verbundenen Kalzifizierung im 3D-CAVD-Modell beitragen. In dieser Hinsicht veranschaulichten Studien von Rodriguez et al. die regulative Bedeutung von Kollagen Typ I. Äquivalent zu den Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten sie, dass eine enzymvermittelte Reduktion des Kollagengehalts in statisch-kultivierten AOK-Taschen mit einer verstärkten osteoblastoiden VIC-Differenzierung, erhöhter ALP-Expression und intensivierter Gewebekalzifizierung verbunden ist [239]. Dementsprechend ist in humanen AOK die altersbedingte Abnahme des Kollagengehalts mit einer erhöhten Prävalenz von Kalzifizierung verbunden [240] und die niedrigsten Kollagen Typ I-Gehalte sind um kalzifizierte Areale lokalisiert [241]. Die ultrastrukturelle Analyse der vorherrschenden Assoziationen zwischen Kollagen und den kalzifizierten Gewebearealen im 3D-CAVD-Modell bestätigt die Ergebnisse von Rodriguez et al. [239] und Eriksen et al. [241], da eine Abnahme der Dichte und ein Zerfall der geordneten Kollagenstruktur mit fortschreitender Kalzifizierung der AOK-Taschen zu beobachten war. In Gebieten fortgeschrittener Gewebekalzifizierung führte dies sogar zu einer vollständigen lokalen Elimination nativen Kollagens in der Umgebung der Kalzifizierungsareale und zu einem ansonsten stark degenerierten Erscheinungsbild der verbliebenen Kollagenfasern. Im Gegensatz dazu war die TGF- β 1-induzierte Blockade der AOK-Gewebekalzifizierung mit einer Hochregulation der Kollagenexpression und -sekretion durch die VICs, einem verstärkten extrazellulären Kollagen Typ I-Zusammenbau sowie dem Auftreten einer intensiven Gewebefibrose verbunden. Diese Daten legen nahe, dass die Hochregulation der Kollagenexpression, -sekretion und -gewebeeinlagerung im 3D-CAVD-Modell direkt zur TGF- β 1-induzierten Blockade der osteoblastoiden VIC-Differenzierung und Gewebekalzifizierung beitragen. In diesem Zusammenhang werden die Störung von VIC-Hyaluronsäure-Wechselwirkungen infolge einer Kollagen Typ I-Defizienz [239] und die Hochregulation von Tenascin-C durch denaturiertes Kollagen Typ I [209] als mögliche Mechanismen diskutiert, welche Änderungen des Kollagen Typ I-Gehalts oder -Struktur, osteoblastoide VIC-Differenzierung und AOK-Gewebekalzifizierung verbinden. Der Zerfall des Kollagenfasernetzwerks und die Destabilisierung der EZM im Zusammenhang mit fortgeschrittener Kalzifizierung könnten auch eine Erklärung für die vergrößerte Gewebefläche der AOK-Taschen nach Kultivierung unter prokalzifizierenden Bedingungen als Folge einer Gewebeschwäche als Reaktion auf passive Spannung im 3D-CAVD-Modell sein. Im Gegensatz dazu ist der Trend zu verringerter AOK-Taschengröße nach Kultivierung in Anwesenheit von TGF- β 1

vermutlich auf verstärkte α -SMA-Expression, Stressfaserbildung und EZM-Kontraktion zurückzuführen, die mit der TGF- β 1-induzierten myofibroblastoiden VIC-Differenzierung verbunden sind [242].

Mechanistisch ist der Zerfall des Kollagenfasernetzwerks in Bereichen fortgeschrittener Kalzifizierung vermutlich auf eine ausgeprägte lokale Freisetzung von Kollagen-spaltenden Matrixmetalloproteinasen und dem gleichzeitigen Verlust der Kollagensynthese zurückzuführen, da die elektronenmikroskopische Analyse in diesen Bereichen signifikant häufiger Hinweise auf einen Untergang von VICs zeigte. Diese Erklärung würde VIC-Apoptose und -nekrose, den reduzierten Kollagengehalt der valvulären EZM, osteoblastoide VIC-Differenzierung und AOK-Gewebekalzifizierung plausibel in Zusammenhang bringen.

Die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung und die Entstehung einer dominanten Gewebefibrose im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell stimmten mit früheren Studienergebnissen in 2D-VIC-Kulturen überein, in denen eine Hochregulation der Zellproliferation, eine erhöhte α -SMA-Expression und die Bildung einer Kollagen Typ I-reichen EZM mit der gleichzeitigen Inhibition der VIC-Kalzifizierung als Reaktion auf die TGF- β 1-Stimulation beobachtet wurden [24], [115], [227]. Im Gegensatz dazu widersprechen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit im 3D-CAVD-Modell den Ergebnissen mehrerer anderer Studien, die unter Verwendung von VIC-Monolayerkulturen als 2D-CAVD-Modell gezeigt haben, dass TGF- β 1 die VIC-Kalzifizierung durch Hochregulation der ALP-Expression und -Aktivität verstärkt [108], [111], [206]. Ein zentraler Faktor, der zu den inhibitorischen Effekten von TGF- β 1 auf die osteoblastoide Differenzierung und Kalzifizierung von VICs im 3D-CAVD-Modell führt und gleichzeitig im Gegensatz zu den Effekten von TGF- β 1 in den meisten konventionellen Zellkulturstudien steht, könnte auf Unterschiede in der EZM-Zusammensetzung und Elastizität zurückzuführen sein [243], z.B. in Form einer unterschiedlichen rezeptorvermittelten Aktivierung bestimmter Signalwege, etwa über Integrine, aber auch allein durch rein biomechanische Eigenschaften und deren Ähnlichkeit mit Eigenschaften der physiologischen EZM. Letztgenannte Eigenschaften könnten je nach Ausprägung eine TGF- β 1-vermittelte Inhibition der Gewebekalzifizierung begünstigen oder inhibieren [113].

In dieser Hinsicht zeigen die Zellkulturergebnisse der vorliegenden Arbeit und Daten anderer Arbeitsgruppen [207], [244], dass die dünne künstliche EZM von VIC-

Monolayern, die auf unnatürlich steifen Oberflächen von unbeschichteten Kulturplatten kultiviert wurden, eine Umgebung schafft, die die TGF- β 1-induzierte VIC-Kalzifizierung begünstigt, während eine Beschichtung aus bestimmten EZM-Komponenten die Reaktion der VICs auf mineralisierungsinduzierende Kultivierungsbedingungen erheblich moduliert. Da im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell die Modulation der Kalzifizierung mit signifikanten Änderungen des Kollagengehalts der valvulären EZM verbunden war, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen einer Beschichtung auf Kollagen Typ I-Basis analysiert. Nach Verringerung der Oberflächenspannung durch Kollagen Typ I-Beschichtung der Zellkulturplatten konnte eine VIC-Kalzifizierung weiterhin unter prokalzifizierenden Bedingungen induziert werden, während jedoch die zusätzliche Anwesenheit von TGF- β 1 die VIC-Kalzifizierung blockierte. Im Gegensatz zum Zustand auf unbeschichteten Zellkulturplatten konnte damit gezeigt werden, dass mit Kollagen Typ I als Zellsupstrat die Auswirkungen von TGF- β 1 auf die Kalzifizierung isolierter VICs mit den Beobachtungen im 3D-CAVD-Modell übereinstimmen. Entsprechend wurde in einer Studie von Yip et al. gezeigt, dass eine kontrollierte Verringerung der Oberflächensteifigkeit durch Erhöhung der Dicke von Kollagenbasierten Matrixkonstrukten die TGF- β 1-induzierte Kalzifizierung von isolierten VICs durch Herabregulation des TGF- β 1-Rezeptors I abschwächt [245]. Darüber hinaus zeigten Rodriguez et al., dass das Beschichten der Zellkulturplatten mit Kollagen Typ I die Kalzifizierung von 2D-VIC-Kulturen auf unbeschichteten Zellkulturplatten vollständig blockiert und dieser Effekt sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von TGF- β 1 auftrat [207]. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien beobachteten Clark-Greuel et al. [111] sowie Jian et al. [108] jedoch, dass TGF- β 1 die Kalzifizierung von VICs auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten verstärkt. Dieser offensichtliche Widerspruch dokumentiert ein grundlegendes Problem von *in vitro*-Studien mit isolierten VICs als 2D-CAVD-Modell, nämlich dass relativ kleine Abweichungen hinsichtlich Zellursprung, Medienzusammensetzung und Substrateigenschaften zu recht unterschiedlichen Effekten hinsichtlich der VIC-Differenzierung und -Kalzifizierung führen können. Obwohl 2D-Kulturen von isolierten VICs häufig als einfach zu generierende und handhabende CAVD-Modelle eingesetzt werden, sind sie insgesamt wenig repräsentativ für *in vivo*-Prozesse in der AOK. Daher ermöglicht die native EZM im gewebebasierten 3D-CAVD-Modell eine realistischere mechanistische Untersuchung der CAVD-Pathogenese, da sie den physiologischen Zustand der AOK

in Bezug auf Zusammensetzung, Dicke, Nachgiebigkeit und Dimensionalität des Zellwachstums widerspiegelt.

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des gewebebasierten 3D-CAVD-Modells die Hypothese einer generell CAVD-fördernden Rolle von TGF- β 1, die in der Literatur weit verbreitet ist, in Frage. Stattdessen weisen sie auf eine notwendige phasenabhängige Differenzierung seiner Funktion hin, d.h. während TGF- β 1 die CAVD-Progression in der frühen fibrotischen Phase signifikant antreibt, scheint es in der nachfolgenden kalzifizierenden Phase inhibitorisch auf die Pathogenese zu wirken. Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit verringert die therapeutische Senkung der Plasmalipide bei hypercholesterinämischen Mäusen mit fortgeschrittener CAVD die valvuläre Kalzifizierung und hemmt die Aktivierung von SMAD1/5/8 und Induktion der β -Catenin-Expression als Vermittler der osteoblastoiden VIC-Differenzierung [246]. Gleichzeitig beobachteten Miller et al., dass die valvuläre Phosphorylierung von SMAD2/3 und das Expressionsniveau von α -SMA, die auf Aktivierung des profibrotischen TGF- β 1-Signalwegs und Induktion der myofibroblastoiden VIC-Differenzierung hindeuten, nicht durch therapeutische Reduktionen der Plasmalipide beeinflusst werden. Weitere Hinweise, dass eine Aktivierung des TGF- β 1-Signalwegs, wie auch bei anderen fibrotischen Erkrankungen, mit der myofibroblastoiden und nicht mit der osteoblastoiden VIC-Differenzierung in der AOK assoziiert ist, stammen aus histologischen Daten, die zeigen, dass in den AOK von hypercholesterinämischen Schweinen und Mäusen TGF- β 1-Signalwegskomponenten verstärkt mit Myofibroblasten [247] und weniger mit Osteoblasten-ähnlichen Zellen assoziiert sind [246]. Stattdessen gibt es weitere deutliche Hinweise darauf, dass TGF- β 1 tatsächlich die osteogene Kalzifizierung der AOK inhibieren kann, da *in vivo* die Hemmung des TGF- β -Rezeptors I eine osteogene Differenzierung von mesenchymalen Knochenmarksstammzellen der Maus [248] fördert und *in vitro* die TGF- β 1-Behandlung die osteogene Differenzierung und Kalzifizierung von Osteoblasten [119] sowie vaskulären Glattmuskelzellen [117] unterdrückt.

Eine Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Arbeit stellt die statische Natur des gewebebasierten 3D-CAVD-Modells dar, da der mit dem Blutfluss verbundene Scherstress und die hämodynamischen Kräfte wichtige Faktoren für die Entwicklung, den Umbau und die Erkrankung der AOK darstellen. Darüber hinaus wird der Einfluss

anderer CAVD-assoziiierter Faktoren, wie proinflammatorische Zytokine und aktivierte Immunzellen, nicht berücksichtigt [31]. Zukünftige entsprechende Weiterentwicklungen des Modells sollten es ermöglichen, diese Limitierungen zu überwinden.

Zusammenfassend untersuchte die vorliegende Arbeit unter Verwendung von AOK-Taschen als gewebebasiertes 3D-CAVD-Modell die Rolle von TGF- β 1 bei der CAVD-Pathogenese. Dabei zeigte sich, dass durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors SMAD3 TGF- β 1 die expressionelle und proliferative Aktivierung einhergehend mit der myofibroblastoiden VIC-Differenzierung intensiviert und so eine dominante Gewebefibrose auslöst. Gleichzeitig reduziert TGF- β 1 durch Inhibition der Aktivierung von SMAD1/5/8 und des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs Apoptose und osteoblastoide Differenzierung der VICs und blockiert so die AOK-Gewebekalzifizierung. Diese Ergebnisse stellen die Existenz einer generellen phasenunabhängigen CAVD-fördernden Rolle von TGF- β 1 in Frage.

4.2 Pirfenidon inhibiert umfassend die CAVD-Progression im zellbasierten 2D- und gewebebasierten 3D-CAVD-Modell

Für den bereits zur Behandlung von idiopathischer pulmonaler Fibrose zugelassenen Wirkstoff Pirfenidon sind bislang umfassend dokumentierte antifibrotische Effekte in einer Vielzahl von *in vivo*- und *in vitro*-Modellen beschrieben worden, darunter der Nachweis einer effektiven antifibrotischen Wirkung auf pulmonale Fibroblasten [92], [249] [250]. So wurde in mehreren Studien zur Lungenfibrose gezeigt, dass Pirfenidon signifikant die TGF- β 1-induzierte Fibronektinsynthese, als Charakteristikum für fibrotische Gewebeprozesse, inhibiert [251], [252]. Zudem konnte eine Herabregulation der profibrotischen Genexpression und Kollagen-Sekretion nach Pirfenidon-Behandlung auch in diversen Tiermodellen beobachtet werden [253]–[255]. Neben der Inhibition von Lungenfibrose wurden auch antifibrotische Effekte von Pirfenidon für Organe wie Herz, Haut, Leber und Niere nachgewiesen [88], [89]. So konnte für diverse Spezies und Krankheitsmodelle, wie der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Hamstern [256], der sklerosierenden Peritonitis [257], der renalen Fibrose [258], der Dimethylnitrosamin-induzierten Leberfibrose in Ratten [259], in humanen myometrialen Zellkulturen sowie in Streptozotozin-diabetischen Ratten [96] eine antifibrotische Wirkung von Pirfenidon beobachtet werden. Mirkovic et al. zeigten zudem im Rattenmodell, dass Pirfenidon die durch Bluthochdruck-induzierte Ausbildung kardialer Fibrose und Hypertrophie reduzierte [260].

Äquivalent zu dem bereits beschriebenen Wirkungsspektrum von Pirfenidon konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine antifibrotische Wirkung im Kontext der CAVD-Pathogenese demonstriert werden. Durch den Nachweis der Inhibition der TGF- β 1-induzierten Phosphorylierung/Aktivierung des Schlüsseltranskriptionsfaktors SMAD3 zur Steuerung der TGF- β 1-Zielgentranskription sowie der Kollagen Typ I-Expression durch Pirfenidon-Behandlung, konnte diese Arbeit zudem zeigen, dass Pirfenidon im Kontext der Fibrose von AOK-Gewebe seine antifibrotische Wirkung wesentlich über eine Inhibition des TGF- β 1-Signalwegs vermittelt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch verschiedene andere Arbeitsgruppen, die die Pirfenidon-induzierte Inhibition der TGF- β 1/SMAD-Signalachse beobachteten [255], [261]–[263].

Die Entstehung und Progression der CAVD ist als aktiver Prozess charakterisiert und resultiert aus der myofibroblastoiden bzw. osteoblastoiden Differenzierung der VICs [8]. Die fibrotische Phase der CAVD geht mit einer Aktivierung der quieszenten VICs

einher, die durch eine erhöhte Proliferation, die Hochregulation der α -SMA- und Kollagen Typ I-Expression sowie die gleichzeitige Herabregulation der Vimentin-Expression gekennzeichnet ist [211], [227]. So konnte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* nach profibrotischer Stimulation eine verstärkte expressionelle VIC-Aktivierung beobachtet werden, die durch Pirfenidon in den eingesetzten 2D- und 3D-CAVD-Modellen jeweils inhibiert wurde. Die Analyse der α -SMA-, Vimentin- und Kollagentyp I-Expressionen ergab zudem, dass Pirfenidon die TGF- β 1-induzierte myofibroblastoide VIC-Differenzierung sowohl im 2D- als auch im 3D-CAVD-Modell inhibiert. Passend hierzu ergaben frühere *in vitro*-Studien mit intestinalen Fibroblasten in Bezug auf die Regulation der Zelldifferenzierungsmarker α -SMA und Vimentin, dass Pirfenidon die TGF- β 1-induzierte SMAD3-Aktivierung und die damit verbundene myofibroblastoide Zelldifferenzierung sowie die Entstehung von Gewebefibrose inhibiert [255], [262], [264]. Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass Pirfenidon die myofibroblastoide Zelldifferenzierung sowie den übermäßigen EZM-Aufbau von Fibroblasten der Lunge und des Auges über eine Inhibition der TGF- β 1-Signaltransduktion abschwächt [265], [266].

Die beschriebenen Nachweise für eine Inhibition der TGF- β 1-induzierten myofibroblastoiden VIC-Differenzierung und die assoziierte Entstehung einer AOK-Gewebefibrose durch Pirfenidon-Behandlung wurde in der vorliegenden Arbeit durch die makroskopische Gewebeanalyse bestätigt. Die profibrotische Stimulation mit TGF- β 1 induzierte einen auch makroskopisch sichtbaren Fibrosephänotyp der kultivierten AOK-Taschen, während Pirfenidon die Entstehung dieses Phänotyps vollständig inhibierte. Äquivalent dazu wurde in mehreren Studien im Tiermodell gezeigt, dass Pirfenidon fibrotische Prozesse in Lunge, Leber, Herz und Niere blockiert [88], [267].

Während der kalzifizierenden Phase der CAVD induzieren Osteoblasten-ähnliche VICs die Einlagerung von kalziumhaltigen Hydroxyapatit in die Kollagenfibrillen der EZM, was schließlich zur Ausbildung von Gewebekalzifizierung führt [213]. In dieser Hinsicht zeigte sich in der vorliegenden Arbeit durch Quantifizierung der Hydroxyapatit-Einlagerung, dass Pirfenidon die prokalzifizierend-induzierte osteoblastoide VIC-Differenzierung und die Gewebekalzifizierung sowohl im 2D- als auch im 3D-CAVD-Modell inhibiert. Wesentlich zur Kalzifizierung trägt die vermehrte ALP-Synthese und -Sekretion der VICs bei [9], was auch im 3D-CAVD-Modell nach Stimulation von AOK-Gewebe unter prokalzifizierenden Medienbedingungen zu beobachten war. Pirfenidon

blockierte den entsprechenden Anstieg der ALP-Aktivität vollständig und dadurch die assoziierte AOK-Gewebekalzifizierung. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch die makroskopische Gewebeanalyse bestätigt, da die Ausbildung von grauen Kalzifizierungsarealen im AOK-Gewebe durch Pirfenidon-Behandlung vollständig inhibiert wurde. Da die CAVD als aktiver mehrstufiger Prozess charakterisiert ist, bei dem die myofibroblastoide Zelldifferenzierung der Kalzifizierung des AOK-Gewebes vorausgeht, wurde in der vorliegenden Arbeit auch im Kontext der Kalzifizierung die myofibroblastoide Zelldifferenzierung analysiert. Dabei zeigte sich eine Inhibition der kalzifizierungsassoziierten Erhöhung der α -SMA- sowie der gleichzeitigen Herabregulation der Vimentinexpression durch Pirfenidon-Behandlung [268], [269]. Passend dazu ergab eine *in vitro*-Studie von Stougaard et al. zur Wirkung von Pirfenidon bei Spondyloarthritis, einer Erkrankung, die neben inflammatorischen und fibrotischen Prozessen auch durch Osteogenese gekennzeichnet ist, ebenfalls eine Suppression der myofibroblastoiden Zelldifferenzierung, insbesondere der α -SMA-Expression, nach Pirfenidon-Behandlung von synovialen Fibroblasten [270].

Mechanistisch wurde u.a. von Zhang et al. eine proosteogene Rolle des BMP-2-Signalwegs über eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SMAD1/5/8 in humanen VICs aus stenosierten AOK nachgewiesen [234]. In früheren, bereits publizierten Studien mit isolierten VICs wurde zudem gezeigt, dass prokalzifizierende Medienbedingungen die proosteogene BMP-2-Expression hochregulieren und dies zur Aktivierung von SMAD1/5/8 führt, was letztlich in einer Gewebekalzifizierung resultiert [214]. Entsprechend war der Prozess der osteoplastoiden VIC-Differenzierung sowie die assoziierte AOK-Gewebekalzifizierung in der vorliegenden Arbeit im 3D-CAVD-Modell mit einer erhöhten Aktivierung von SMAD1/5/8 verbunden, die aber durch Pirfenidon vollständig inhibiert wurde. Neben dem BMP-2-Signalweg trägt auch der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg zur Induktion der osteogenen Zelldifferenzierung bei und ist entsprechend als Treiber der CAVD-Pathogenese identifiziert [237]. In früheren Zellkulturstudien wurde gezeigt, dass eine prokalzifizierende Kultivierung die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs induziert, was mit einer erhöhten β -Catenin-Expression verbunden ist [117], [118], [214]. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen bestätigt werden, und die prokalzifizierende Kultivierung der AOK-Taschen im 3D-CAVD-Modell führte zu einer erhöhten β -Catenin-Expression und somit zur Aktivierung des Wnt/ β -

Catenin-Signalwegs. Diese Effekte wurden jedoch durch Pirfenidon vollständig inhibiert, d.h. es ließ sich keine Erhöhung der β -Catenin-Expression nach Pirfenidon-Behandlung mehr beobachten.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Pirfenidon die Aktivierung sowohl der BMP-2-SMAD1/5/8- als auch der kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalachse inhibiert, von denen beide jeweils zur osteoblastoiden Zelldifferenzierung und schließlich zur Ausbildung von Gewebekalzifizierung im 3D-CAVD-Modell beitragen. Die Interaktion der beiden Signalachsen ist dabei noch nicht vollständig aufgeklärt worden, allerdings deuten mehrere Studien zur Osteogenese darauf hin, dass der BMP-2-Signalweg über die Transkriptionsfaktoren SMAD1/5/8 die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auslöst [238].

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmalig eine inhibierende Wirkung von Pirfenidon auf Kalzifizierungsprozesse in Gewebekulturexperimenten. Bislang wurde nur eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass Pirfenidon die Mineralisierung von Osteoblasten und damit die Knochenneubildung im Kontext der Spondyloarthritis der Wirbelsäule inhibierte [270]. Somit bestätigt diese Arbeit erste bisherige Erkenntnisse zu einer antikalzifizierenden Wirkung von Pirfenidon. Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum einen der Mechanismus der antifibrotischen Wirkung von Pirfenidon im Kontext der CAVD-Pathogenese äquivalent zu früheren Studien auf die Inhibition der TGF- β 1-induzierten SMAD3-Aktivierung zurückgeführt werden. Darüber hinaus konnte die antikalzifizierende Wirkung von Pirfenidon mechanistisch über die Inhibition der Aktivierung von SMAD1/5/8 im BMP-2-Signalweg sowie des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erklärt werden. So lassen die Ergebnisse dieser Arbeit insgesamt auf eine umfassende Inhibition der CAVD-Pathogenese durch Pirfenidon schließen, d.h. sowohl im fibrotischen als auch im kalzifizierenden Stadium der Erkrankung.

Perspektivisch wäre es auf Basis des in dieser Arbeit beobachteten Wirkungsspektrums interessant, die Wirkung von Pirfenidon auch *in vivo* zu untersuchen. Denkbar wäre dazu der Einsatz verschiedener CAVD-Tiermodelle, mit denen eine AOK-Stenose entweder genetisch oder diätetisch induziert wird [271] oder über eine AOK-Verletzung mit einem heißen Draht („*hot wire injury*“) [272]. Ziel wäre dabei, die *in vitro* beobachteten antifibrotischen und antikalzifizierenden Effekte von Pirfenidon im Tiermodell zu bestätigen, um langfristig eine erste medikamentöse

Therapieoption zur Behandlung der CAVD entwickeln zu können, da aktuell nur ein operativer AOK-Ersatz oder die Transkatheter-AOK-Implantation für die betroffenen Patienten infrage kommt [42]. In den letzten Jahren wurden in vier großen klinischen Studien verschiedene Statine erfolglos als mögliche Kandidaten für die medikamentösen Therapie der CAVD evaluiert [43]–[45], [273]. Vor diesem Hintergrund repräsentiert Pirfenidon, für das sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vitro* in Zell- und Gewebekulturmodellen der CAVD ein umfassendes antifibrotisches und antikalzifizierendes Wirkungsspektrum nachweisen ließ, einen äußerst vielversprechenden Entwicklungskandidaten für eine medikamentöse CAVD-Therapie.

Ein zusätzlicher signifikanter Vorteil der weiteren Entwicklung von Pirfenidon zum CAVD-Therapeutikum ist die bereits bestehende Zulassung des Medikaments zur Behandlung von Lungenfibrose, d.h. der Wirkstoff hat schon einmal sämtliche klinische Zulassungsphasen erfolgreich durchlaufen, sein Nebenwirkungsprofil ist als unbedenklich bewertet worden und es liegen umfassende Erkenntnisse zu seinen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften im menschlichen Organismus vor [274]–[276]. Perspektivisch würden die späteren klinischen Phasen einer Wirkstoffzulassung von Pirfenidon als CAVD-Therapeutikum durch dieses Vorwissen wesentlich beschleunigt.

4.3 Trotz Suppression des Adiponektin-Rezeptorsystems im Verlauf der CAVD-Pathogenese bleibt seine *in vitro*-Adressierung in CAVD-Modellen ohne therapeutischen Effekt

Für das Adipozytokin Adiponektin und sein Rezeptorsystem ist neben positiven metabolischen Effekten auch ein breites Spektrum an immunmodulatorischen, vaskulo- und kardioprotektiven Effekten bekannt [147], [159], [176], [178], [182]. So korrelieren erniedrigte Adiponektin-Plasmalevel mit einem erhöhten Infarktisiko und dem verstärkten Auftreten von koronarer Herzkrankheit und linksventrikulärer Hypertrophie [187], [193], [194]. Außerdem wurde bereits nachgewiesen, dass Adiponektin zur Reduktion von kardialer Fibrose, Atherosklerose, oxidativem Stress, Entzündung und Bluthochdruck beiträgt [134], [188], [189], [191]. Obwohl dieses Wirkungsspektrum von Relevanz für die CAVD-Pathogenese ist, wurde die Rolle von Adiponektin bzw. seines Rezeptorsystems bei der CAVD-Pathogenese bislang nicht detailliert untersucht. So wurde bisher nur eine negative Korrelation zwischen dem Adiponektin-Plasmalevel und dem CAVD-Schweregrad nachgewiesen [277], [278]. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen die Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems im Verlauf der CAVD-Pathogenese und zum anderen die Wirkung des Adiponektin-Rezeptoragonisten AdipoRon auf die Entstehung von Fibrose und Kalzifizierung als konsekutive Stadien der CAVD anhand von *in vitro*-Krankheitsmodellen untersucht.

Bei der Analyse der Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems in den humanen AOK-Taschen, deren Phänotypen die verschiedenen Stadien der CAVD repräsentieren, zeigte sich eine Herabregulation von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin im Verlauf der CAVD-Pathogenese. Dabei war für alle drei Adiponektin-Rezeptoren die jeweils stärkste Suppression in der kalzifizierenden Phase der CAVD zu beobachten. Da für metabolische Erkrankungen, wie Diabetes Typ 2 oder das metabolische Syndrom, eine Herabregulation der Expression von Adiponektin und seiner Rezeptoren bekannt ist, wurde zur Untersuchung von Diabetes Typ 2 als metabolische Komorbidität der CAVD die bestehende Patientenkohorte entsprechend in T2D und Nicht-Diabetiker unterteilt [137]. Da die Herabregulation des Adiponektin-Rezeptorsystems sowohl für Diabetiker als auch für Nicht-Diabetiker zu beobachten war, deuten die Daten dieser Arbeit auf ein generelles Regulationsmuster im Verlauf der CAVD-Pathogenese hin. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu den Studien,

die gezeigt haben, dass bei Adipositas, Diabetes Typ 2 und dem metabolischen Syndrom die Expression der Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in Skelettmuskel, Herz und Fettgewebe reduziert ist [178], [179]. Gleichwohl stellen die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse die ersten ihrer Art an humanem AOK-Gewebe dar.

Zur Untersuchung, ob eine ähnliche Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystem auch *in vitro* in einem 3D-CAVD-Modell zu beobachten ist, wurden ovine AOK-Taschen unter profibrotischen oder prokalzifizierenden Medienbedingungen kultiviert und die Expression der Adiponektin-Rezeptoren analysiert. Hierbei ergab sich lediglich eine signifikante Herabregulation der AdipoR2-Expression in den profibrotisch und prokalzifizierend kultivierten AOK-Taschen im Vergleich zur Kontrollgruppe, weshalb diese Ergebnisse nur teilweise mit den Daten aus klinischen Proben von AOK-Taschen von Patienten mit einer CAVD übereinstimmen. Die beobachteten Unterschiede der Rezeptorregulation lassen sich vermutlich darauf zurückführen, dass das 3D-CAVD-Modell zwar die Kultivierung von AOK-Taschen unter physiologischen Bedingungen erlaubt, es aber dabei nicht alle Faktoren und Langzeitprozesse, die auf eine AOK innerhalb des Herzens einwirken, berücksichtigt. So sind die AOK-Taschen im 3D-CAVD-Modell *in vitro* passiv aufgespannt, so dass mechanische Einflüsse durch den pulsatilem Blutfluss, aber auch die Wirkung zirkulierender Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie Komorbiditäten, Medikationen und des Alters vernachlässigt werden. Außerdem werden ovine AOK-Taschen verwendet. Daher hat das 3D-CAVD-Modell Limitierungen, die die abweichenden Ergebnisse erklären können. Andererseits stellen klinische Proben aus Patienten mit CAVD das Endstadium der Progression im AOK-Gewebe dar, sodass auch bezüglich des Krankheitsstadiums Unterschiede zwischen den beiden Modellen vorliegen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass das antifibrotisch und antikalzifizierend wirkende Adiponektin-Rezeptorsystem in AOK exprimiert und mit fortschreitender CAVD-Pathogenese immer weiter supprimiert wird. Unklar ist aber weiterhin, ob die Suppression des Adiponektin-Rezeptorsystems mit ursächlich für die CAVD-Pathogenese ist und welche an der CAVD-Pathogenese beteiligten ätiologischen Faktoren für die Suppression des Adiponektin-Rezeptorsystems verantwortlich sein könnten. Ihre Identifikation wäre von enormer Wichtigkeit, da diese Faktoren potentielle Targets für Therapeutika zur Behandlung oder Prävention der CAVD darstellen könnten. Es könnte sich dabei um microRNAs handeln, d.h. um

endogene nicht-kodierende RNAs, die komplementäre mRNAs vorwiegend durch Induktion ihres Abbaus deaktivieren und sich als zentrale Regulatoren herausgestellt haben, die die Expression von Protein-kodierenden Genen steuern [279]. In früheren microRNA-Expressionsanalysen mit stenotischen und gesunden AOK-Taschen wurden einige microRNAs identifiziert, die im AOK-Gewebe während der CAVD hochreguliert werden und gleichzeitig den Abbau der mRNA des Adiponektin-Rezeptorsystems induzieren. So wurde in einer Studie, die stenotische mit gesunden humanen AOK verglichen hat, eine CAVD-assoziierte Hochregulation der microRNA-221 aufgedeckt, von der auch bekannt ist, dass sie den Abbau von AdipoR1-mRNA induziert [280]–[282]. Zudem ist bekannt, dass microRNA-214, welche die AdipoR2-mRNA bindet, während der Verdickung und Kalzifizierung der AOK aufgrund von oszillatorischem Scherstress *in vitro* hochreguliert war [283]. Auf Basis der vorgestellten Daten zur Expression des Adiponektin-Rezeptorsystems in humanen AOK im Verlauf der CAVD-Pathogenese wurde daher ein mittlerweile bereits genehmigter DFG-Projektantrag zur Identifizierung entsprechender regulatorischer microRNAs über ein Expressionsprofiling in humanen AOK der verschiedenen CAVD-Stadien gestellt, die gleichzeitig die CAVD-Pathogenese antreiben und das Adiponektin-Rezeptorsystem supprimieren.

Zusätzlich zur Regulation des Adiponektin-Rezeptorsystems wurde im Rahmen dieser Arbeit in weiteren *in vitro*-Experimenten die Wirkung des Adiponektin-Rezeptoragonisten AdipoRon auf die Entstehung und Progression der CAVD analysiert. AdipoRon bindet und aktiviert nachweislich das Adiponektin-Rezeptorsystem und aktiviert die AMPK- und PPAR α -Signalwege [167], [168]. Im Gegensatz zu Adiponektin lässt es sich jedoch einfach und kostengünstig synthetisch produzieren, was es zusätzlich zu seiner simplen oralen Verabreichung zu einem vielversprechenden Kandidaten für die therapeutische Anwendung Adiponektin-Rezeptor-abhängiger protektiver Effekte macht. Im Hinblick auf die fibrotische Phase der CAVD ergaben die *in vitro*-Analysen im 2D- und 3D-CAVD-Modell, dass AdipoRon weder Einfluss auf den makroskopisch sichtbaren Fibrose-Phänotyp der AOK-Taschen noch auf die Expression des Fibrosemarkers Kollagen Typ I nimmt. Stattdessen kam es unter profibrotischen Medienbedingungen auch in Anwesenheit von AdipoRon zur profibrotischen Differenzierung der VICs in Myofibroblasten, die

durch eine starke Hochregulation ihrer Expression der EZM-Komponente Kollagen Typ I gekennzeichnet sind [211].

Darüber hinaus konnte auch hinsichtlich der kalzifizierenden Phase der CAVD keine inhibierende Wirkung durch AdipoRon im 2D- und 3D-CAVD-Modell nachgewiesen werden. So fand unter prokalzifizierenden Medienbedingungen auch in Anwesenheit von AdipoRon die VIC-Differenzierung in Osteoblasten-ähnliche VICs statt, die für den Einbau von kalziumhaltigen Hydroxyapatit in die EZM-Kollagenfibrillen verantwortlich sind und somit die Kalzifizierung von AOK-Gewebe induzieren [213].

Liganden des Adiponektin-Rezeptorsystems aktivieren u.a. den metabolischen Masterregulator AMPK, für den auch ein breites protektives Wirkungsspektrum im Kontext der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen wurde [141], [284]. So wurde gezeigt, dass die AMPK die atherosklerotische Kalzifizierung inhibiert sowie *in vitro* die chondrogene Entwicklung und osteoblastoide Zelldifferenzierung hemmt [198], [285]–[287]. Für Adiponektin sowie weitere AMPK-Aktivatoren, wie u.a. Metformin und Resveratrol, wurde bereits eine AMPK-vermittelte Inhibition der osteoblastoiden Zelldifferenzierung und die daraus resultierende Inhibition der vaskulären Kalzifizierung nachgewiesen [198], [224]. Daher wäre es zu erwarten gewesen, dass auch der Adiponektin-Rezeptoragonist AdipoRon eine inhibierende Wirkung auf die Kalzifizierung im 2D- bzw. 3D-CAVD-Modell hat. Die Wirksamkeit von AdipoRon in den verwendeten Modellsystemen auf oviner Gewebe- bzw. Zellbasis wurde zudem initial im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass AdipoRon eine Aktivierung der AMPK als zentralen Vermittler AdipoR1/AdipoR2-abhängiger Effekte auch in Kulturen oviner VICs induziert [222]. Zudem wurde ein bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes und standardisiertes 2D- bzw. 3D-CAVD-Modell für die Analyse der Wirkung von AdipoRon auf Fibrose und Kalzifizierung verwendet, in dem sich nachweislich makroskopisch sichtbare fibrotische und kalzifizierte Zell- bzw. Gewebephänotypen induzieren lassen [288].

Damit könnte vor dem Hintergrund der ausbleibenden inhibitorischen Wirkung von AdipoRon auf die Entstehung von Fibrose und Kalzifizierung im 3D-CAVD-Modell die beobachtete Herabregulation des Adiponektin-Rezeptorsystems in den humanen AOK im Verlauf der CAVD-Pathogenese letztlich ein Epiphänomen repräsentieren, das in keinem ursächlichen Zusammenhang zur CAVD-Progression steht.

5 Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Schleich, T. Abdulla, R. Summers, and L. Houyel, "An overview of cardiac morphogenesis," *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2013.
- [2] R. B. Hinton *et al.*, "Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves," *Circ. Res.*, 2006.
- [3] M. D. Combs and K. E. Yutzey, "Heart valve development: Regulatory networks in development and disease," *Circulation Research*. 2009.
- [4] P. Kozlovsky, R. J. Bryson-Richardson, A. J. Jaffa, M. Rosenfeld, and D. Elad, "The Driving Mechanism for Unidirectional Blood Flow in the Tubular Embryonic Heart," *Ann. Biomed. Eng.*, 2016.
- [5] A. H. Chester, I. El-Hamamsy, J. T. Butcher, N. Latif, S. Bertazzo, and M. H. Yacoub, "The living aortic valve: From molecules to function," *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, 2014.
- [6] D. E. Spicer, J. M. Bridgeman, N. A. Brown, T. J. Mohun, and R. H. Anderson, "The anatomy and development of the cardiac valves," *Cardiol. Young*, 2014.
- [7] M. Misfeld and H. H. Sievers, "Heart valve macro- and microstructure," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2007.
- [8] N. M. Rajamannan *et al.*, "Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process," *Circulation*, 2011.
- [9] A. C. Liu, V. R. Joag, and A. I. Gotlieb, "The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology," *American Journal of Pathology*, vol. 171, no. 5. pp. 1407–1418, 2007.
- [10] M. W. Weston, D. V. LaBorde, and A. P. Yoganathan, "Estimation of the Shear Stress on the Surface of an Aortic Valve Leaflet," *Ann. Biomed. Eng.*, 1999.
- [11] C. M. G. Duran and A. J. Gunning, "The vascularization of the heart valves: A comparative study," *Cardiovascular Research*. 1968.
- [12] P. Poggio *et al.*, "Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis," *Cardiovasc. Res.*, vol. 98, no. 3, pp.

- 402–410, 2013.
- [13] V. Kamperidis, V. Delgado, N. M. Van Mieghem, A. P. Kappetein, M. B. Leon, and J. J. Bax, “Diagnosis and management of aortic valve stenosis in patients with heart failure,” *European Journal of Heart Failure*. 2016.
- [14] B. R. Lindman *et al.*, “Calcific aortic stenosis,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, p. 16006, 2016.
- [15] F. J. Schoen, “Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease,” *Cardiovasc. Eng. Technol.*, 2018.
- [16] J. D. Hutcheson, E. Aikawa, and W. D. Merryman, “Potential drug targets for calcific aortic valve disease,” *Nature Reviews Cardiology*. 2014.
- [17] P. Faggiano, F. Antonini-Canterin, F. Baldessin, R. Lorusso, A. D’Aloia, and L. Dei Cas, “Epidemiology and cardiovascular risk factors of aortic stenosis,” *Cardiovasc. Ultrasound*, 2006.
- [18] A. Beckmann, R. Meyer, J. Lewandowski, A. Markewitz, and W. Harringer, “German heart surgery report 2018: The annual updated registry of the german society for thoracic and cardiovascular surgery,” *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2019.
- [19] D. A. Lerman, S. Prasad, and N. Alotti, “Calcific aortic valve disease: Molecular mechanisms and therapeutic approaches,” *Eur. Cardiol. Rev.* , vol. 10, no. 2, pp. 108–112, 2015.
- [20] I. Sathyamurthy and S. Alex, “Calcific aortic valve disease: Is it another face of atherosclerosis?,” *Indian Heart Journal*. 2015.
- [21] B. R. Hughes, G. Chahoud, and J. L. Mehta, “Aortic stenosis: Is it simply a degenerative process or an active atherosclerotic process?,” *Clinical Cardiology*. 2005.
- [22] L. Sun, N. M. Rajamannan, and P. Sucusky, “Defining the role of fluid shear stress in the expression of early signaling markers for calcific aortic valve disease,” *PLoS One*, 2013.
- [23] B. R. Lindman *et al.*, “Calcific aortic stenosis,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 2016.

- [24] G. A. Walker, K. S. Masters, D. N. Shah, K. S. Anseth, and L. A. Leinwand, "Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor- β : Implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 3, pp. 253–260, 2004.
- [25] A. M. Porras *et al.*, "Robust generation of quiescent porcine valvular interstitial cell cultures," *J. Am. Heart Assoc.*, 2017.
- [26] R. V. Freeman and C. M. Otto, "Spectrum of calcific aortic valve disease: Pathogenesis, disease progression, and treatment strategies," *Circulation*, vol. 111, no. 24, pp. 3316–3326, 2005.
- [27] P. Mathieu and M. C. Boulanger, "Basic mechanisms of calcific aortic valve disease," *Canadian Journal of Cardiology*. 2014.
- [28] C. M. Otto, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown, and K. D. O'Brien, "Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies," *Circulation*, vol. 90, no. 2, pp. 844–853, 1994.
- [29] A. Small *et al.*, "Biomarkers of calcific aortic valve disease," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 37, no. 4, pp. 623–632, 2017.
- [30] D. A. Towler, "Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease," *Circ. Res.*, vol. 113, no. 2, pp. 198–208, 2013.
- [31] M. R. Dweck, N. A. Boon, and D. E. Newby, "Calcific aortic stenosis: A disease of the valve and the myocardium," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 60, no. 19, pp. 1854–1863, 2012.
- [32] T. A. Pawade, D. E. Newby, and M. R. Dweck, "Calcification in aortic stenosis: The skeleton key," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 66, no. 5, pp. 561–577, 2015.
- [33] R. A. Nishimura, S. R. Ommen, and A. J. Tajik, "Cardiology patient page. Hypertrophic cardiomyopathy: a patient perspective.," *Circulation*, vol. 108, no. 19, 2003.
- [34] C. T. Hoffmann, J. A. Heiner, and T. C. Nguyen, "Review of minimal access

- versus transcatheter aortic valve replacement for patients with severe aortic stenosis," *Ann. Cardiothorac. Surg.*, 2017.
- [35] J. Butany *et al.*, "Mechanical heart valve prostheses - Identification and evaluation," *Cardiovasc. Pathol.*, 2003.
- [36] C. M. Giachelli, "Ectopic calcification: Gathering hard facts about soft tissue mineralization," *American Journal of Pathology*. 1999.
- [37] S. J. Phillips, "Selecting the best heart valve for your patient: mechanical or tissue.," *The American heart hospital journal*. 2004.
- [38] M. Ruel *et al.*, "Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves," in *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2004.
- [39] A. Vahanian *et al.*, "Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012)," *Eur. Heart J.*, 2012.
- [40] K. H. Kuck *et al.*, "Qualitätskriterien zur Durchführung der transkathetären Aortenklappenimplantation (TAVI): Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie," *Kardiologe*, 2015.
- [41] H. Hermans *et al.*, "Statins for calcific aortic valve stenosis: Into oblivion after SALTIRE and SEAS? An extensive review from bench to bedside," *Curr. Probl. Cardiol.*, 2010.
- [42] L. Thiago *et al.*, "Statins for aortic valve stenosis," *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016.
- [43] S. J. Cowell *et al.*, "A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis," *N. Engl. J. Med.*, 2005.
- [44] A. B. Rossebø *et al.*, "Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis," *N. Engl. J. Med.*, 2008.
- [45] K. L. Chan, K. Teo, J. G. Dumesnil, A. Ni, and J. Tam, "Effect of lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: Results of the aortic stenosis progression observation: Measuring effects of rosuvastatin (Astronomer) trial," *Circulation*, 2010.

- [46] M. Schenone, V. Dančák, B. K. Wagner, and P. A. Clemons, "Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery," *Nature Chemical Biology*. 2013.
- [47] R. A. Blake, "Target validation in drug discovery.," *Methods Mol. Biol.*, 2007.
- [48] M. Sioud, "Main approaches to target discovery and validation.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2007.
- [49] K. K. Kopec, D. Bozyczko-Coyne, and M. Williams, "Target identification and validation in drug discovery: The role of proteomics," *Biochemical Pharmacology*. 2005.
- [50] P. G. Wyatt, I. H. Gilbert, K. D. Read, and A. H. Fairlamb, "Target Validation: Linking Target and Chemical Properties to Desired Product Profile," *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011.
- [51] J. Nickel, P. Ten Dijke, and T. D. Mueller, "TGF- β family co-receptor function and signaling," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2018.
- [52] F. Verrecchia and F. R dini, "Transforming growth factor- β signaling plays a pivotal role in the interplay between osteosarcoma cells and their microenvironment," *Frontiers in Oncology*. 2018.
- [53] J. Massagué, "TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION," *Annu. Rev. Biochem.*, 1998.
- [54] M. Huse, Y. G. Chen, J. Massagué, and J. Kuriyan, "Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF β receptor in complex with FKBP12," *Cell*, 1999.
- [55] J. Massagué and Y. G. Chen, "Controlling TGF-beta signaling.," *Genes Dev.*, 2000.
- [56] Y. Shi, Y. F. Wang, L. Jayaraman, H. Yang, J. Massagué, and N. P. Pavletich, "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: Insights on DNA binding in TGF- β signaling," *Cell*, 1998.
- [57] J. Massagué and D. Wotton, "Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system," *EMBO J.*, 2000.

- [58] A. Nakao *et al.*, "Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling," *Nature*, 1997.
- [59] C. H. Heldin, K. Miyazono, and P. Ten Dijke, "TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins," *Nature*. 1997.
- [60] C. M. Mallawaarachchi, P. L. Weissberg, and R. C. M. Siow, "Smad7 gene transfer attenuates adventitial cell migration and vascular remodeling after balloon injury," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005.
- [61] S. Itoh *et al.*, "Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7," *J. Biol. Chem.*, 1998.
- [62] A. Ishisaki *et al.*, "Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells," *J. Biol. Chem.*, 1999.
- [63] A. Hata, G. Lagna, J. Massagué, and A. Hemmati-Brivanlou, "Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor," *Genes Dev.*, 1998.
- [64] X. Xu *et al.*, "Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis," *Bone Research*. 2018.
- [65] J. E. De Larco and G. J. Todaro, "Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells (epidermal growth factor/polypeptide hormones/cell transformation/radioreceptor assays)," *Microbiology*, vol. 75, no. 8, pp. 4001–4005, 1978.
- [66] M. B. Sporn and A. B. Roberts, "TGF- β : Problems and prospects," *Mol. Biol. Cell*, 1990.
- [67] M. Shi *et al.*, "Latent TGF- β structure and activation," *Nature*, 2011.
- [68] M. Horiguchi, M. Ota, and D. B. Rifkin, "Matrix control of transforming growth factor- β function," *J. Biochem.*, 2012.
- [69] N. Schuster and K. Kriegelstein, "Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis," *Cell and Tissue Research*. 2002.

- [70] A. Sánchez-Capelo, "Dual role for TGF- β 1 in apoptosis," *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2005.
- [71] M. O. Li, Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A.-K. L. Robertson, and R. A. Flavell, "TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES," *Annu. Rev. Immunol.*, 2006.
- [72] B. J. Faler, R. A. Macsata, D. Plummer, L. Mishra, and A. N. Sidawy, "Transforming Growth Factor- β and Wound Healing," *Perspect. Vasc. Surg. Endovasc. Ther.*, 2006.
- [73] R. A. Rahimi and E. B. Leof, "TGF- β signaling: A tale of two responses," *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007.
- [74] S. S. Huang and J. S. Huang, "TGF- β control of cell proliferation," *Journal of Cellular Biochemistry*. 2005.
- [75] H. L. Moses and R. Serra, "Regulation of differentiation by TGF- β ," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1996.
- [76] A. Moustakas, K. Pardali, A. Gaal, and C. H. Heldin, "Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation," in *Immunology Letters*, 2002.
- [77] Z. G. Ma, Y. P. Yuan, H. M. Wu, X. Zhang, and Q. Z. Tang, "Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis," *International Journal of Biological Sciences*. 2018.
- [78] H. Khalil *et al.*, "Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis," in *Journal of Clinical Investigation*, 2017.
- [79] M. C. D'Arpino, A. G. Fuchs, S. S. Sánchez, and S. M. Honoré, "Extracellular matrix remodeling and TGF- β 1/Smad signaling in diabetic colon mucosa," *Cell Biol. Int.*, 2018.
- [80] T. N. Wight and S. Potter-Perigo, "The extracellular matrix: An active or passive player in fibrosis?," *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, 2011.
- [81] L. Chen *et al.*, "Central role of dysregulation of TGF- β /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment," *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018.

- [82] M. J. Macias, P. Martin-Malpartida, and J. Massagué, "Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling," *Trends in Biochemical Sciences*. 2015.
- [83] X. M. Meng, D. J. Nikolic-Paterson, and H. Y. Lan, "TGF- β : The master regulator of fibrosis," *Nature Reviews Nephrology*. 2016.
- [84] H. H. Hu *et al.*, "New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis," *Chemico-Biological Interactions*. 2018.
- [85] S. N. Iyer, D. M. Hyde, and S. N. Giri, "Anti-inflammatory effect of pirfenidone in the bleomycin- hamster model of lung inflammation," *Inflammation*, 2000.
- [86] K. Ishii *et al.*, "Pirfenidone, an Anti-Fibrotic Drug, Suppresses the Growth of Human Prostate Cancer Cells by Inducing G1 Cell Cycle Arrest," *J. Clin. Med.*, 2019.
- [87] A. Azuma, "Pirfenidone: Antifibrotic agent for idiopathic pulmonary fibrosis," *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2010.
- [88] C. J. Schaefer, D. W. Ruhmund, L. Pan, S. D. Seiwert, and K. Kossen, "Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models," *European Respiratory Review*. 2011.
- [89] D. A. Lopez-de la Mora *et al.*, "Role and New Insights of Pirfenidone in Fibrotic Diseases," *International journal of medical sciences*. 2015.
- [90] M. Barbero, M. Mossotti, A. Sironi, G. B. Giovenzana, and V. Colombo, "Crystal structure of pirfenidone (5-methyl-1-phenyl-1H-pyridin-2-one): An active pharmaceutical ingredient (API)," *Acta Crystallogr. Sect. E Crystallogr. Commun.*, 2019.
- [91] S. Davis, R. Rafia, C. Carroll, J. Hamilton, and M. Essat, "Pirfenidone for Treating Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal," *PharmacoEconomics*. 2019.
- [92] N. J. Carter, "Pirfenidone: In idiopathic pulmonary fibrosis," *Drugs*, 2011.
- [93] A. Di Sario *et al.*, "Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production," *J. Hepatol.*, 2002.

- [94] X. Lin, M. Yu, K. Wu, H. Yuan, and H. Zhong, "Effects of pirfenidone on proliferation, migration, and collagen contraction of human tenon's fibroblasts in vitro," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009.
- [95] T. D. Hewitson *et al.*, "Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis," *J. Nephrol.*, 2001.
- [96] B. S. Lee, S. B. Margolin, and R. A. Nowak, "Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998.
- [97] H. Nakazato, H. Oku, S. Yamane, Y. Tsuruta, and R. Suzuki, "A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α at the translational level," *Eur. J. Pharmacol.*, 2002.
- [98] M. Böttner, K. Krieglstein, and K. Unsicker, "The transforming growth factor- β s: Structure, signaling, and roles in nervous system development and functions," *Journal of Neurochemistry*. 2000.
- [99] D. Horbelt, A. Denkis, and P. Knaus, "A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2012.
- [100] K. A. Harradine and R. J. Akhurst, "Mutations of TGF β signaling molecules in human disease," *Annals of Medicine*. 2006.
- [101] J. Massagué, "TGF β in Cancer," *Cell*. 2008.
- [102] E. J. Battegay, E. W. Raines, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope, and R. Ross, "TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop," *Cell*, 1990.
- [103] Y. X. Qi *et al.*, "PDGF-BB and TGF- β 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011.
- [104] A. B. ROBERTS, U. I. HEINE, K. C. FLANDERS, and M. B. SPORN, "Transforming Growth Factor- β : Major Role in Regulation of Extracellular Matrix," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1990.

- [105] A. B. Roberts, B. K. McCune, and M. B. Sporn, "TGF- β : Regulation of extracellular matrix," in *Kidney International*, 1992.
- [106] N. Khalil, O. Berezney, M. Sporn, and A. H. Greenberg, "Macrophage production of transforming growth factor β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation," *J. Exp. Med.*, 1989.
- [107] W. A. Border, S. Okuda, L. R. Languino, M. B. Sporn, and E. Ruoslahti, "Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1," *Nature*, 1990.
- [108] B. Jian, N. Narula, Q. Y. Li, E. R. Mohler, and R. J. Levy, "Progression of aortic valve stenosis: TGF- β 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis," *Ann. Thorac. Surg.*, 2003.
- [109] K. E. Watson, K. Boström, R. Ravindranath, T. Lam, B. Norton, and L. L. Demer, "TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify," *J. Clin. Invest.*, 1994.
- [110] E. Yetkin and J. Waltenberger, "Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis," *International Journal of Cardiology*. 2009.
- [111] J. N. Clark-Greuel *et al.*, "Transforming Growth Factor- β 1 Mechanisms in Aortic Valve Calcification: Increased Alkaline Phosphatase and Related Events," *Ann. Thorac. Surg.*, 2007.
- [112] F. Liu, C. Chu, Q. Wei, J. Shi, H. Li, and N. Dong, "Metformin ameliorates TGF- β 1-induced osteoblastic differentiation of human aortic valve interstitial cells by inhibiting β -catenin signaling," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018.
- [113] P. Gwanmesia *et al.*, "Opposite effects of transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor on the degeneration of aortic valvular interstitial cell are modified by the extracellular matrix protein fibronectin: Implications for heart valve engineering," *Tissue Eng. - Part A*, 2010.
- [114] R. Song, D. A. Fullerton, L. Ao, D. Zheng, K. seng Zhao, and X. Meng, "BMP-2 and TGF- β 1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells," *J. Mol. Med.*, 2015.

- [115] K. L. Cloyd *et al.*, "Characterization of Porcine Aortic Valvular Interstitial Cell 'Calcified' Nodules," *PLoS One*, 2012.
- [116] F. Grinnell and C. H. Ho, "Transforming growth factor β stimulates fibroblast-collagen matrix contraction by different mechanisms in mechanically loaded and unloaded matrices," *Exp. Cell Res.*, 2002.
- [117] F. Guerrero *et al.*, "TGF- β prevents phosphate-induced osteogenesis through inhibition of BMP and Wnt/ β -catenin pathways," *PLoS One*, 2014.
- [118] N. Lian *et al.*, "Transforming growth factor β suppresses osteoblast differentiation via the vimentin activating transcription factor 4 (ATF4) axis," *J. Biol. Chem.*, 2012.
- [119] T. Alliston, L. Choy, P. Ducy, G. Karsenty, and R. Derynck, "TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation," *EMBO J.*, 2001.
- [120] K. Naka and A. Hirao, "Regulation of hematopoiesis and hematological disease by TGF- β family signaling molecules," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2017.
- [121] B. Alberts, A. Johnson, and J. Lewis, "Helper T cells and Lymphocyte Activation," in *Molecular Biology of the Cell*, 2002.
- [122] N. S. Dole *et al.*, "Osteocyte-Intrinsic TGF- β Signaling Regulates Bone Quality through Perilacunar/Canalicular Remodeling," *Cell Rep.*, 2017.
- [123] F. Xie, L. Ling, H. Van Dam, F. Zhou, and L. Zhang, "TGF- β signaling in cancer metastasis," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2018.
- [124] J. J. Letterio and A. B. Roberts, "REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- β ," *Annu. Rev. Immunol.*, 1998.
- [125] S. Jasinski-Bergner, M. Büttner, D. Quandt, B. Seliger, and H. Kielstein, "Adiponectin and Its Receptors Are Differentially Expressed in Human Tissues and Cell Lines of Distinct Origin," *Obes. Facts*, 2018.
- [126] P. E. Scherer, S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H. F. Lodish, "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes," *J. Biol. Chem.*, 1995.

- [127] R. Piñeiro *et al.*, "Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes," *FEBS Lett.*, 2005.
- [128] S. Wilk *et al.*, "Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells," *Eur. J. Immunol.*, 2011.
- [129] T. Yamauchi *et al.*, "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects," *Nature*, 2003.
- [130] I. Kharroubi, J. Rasschaert, D. L. Eizirik, and M. Cnop, "Expression of adiponectin receptors in pancreatic β cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003.
- [131] G. Chinetti, C. Zawadzki, J. C. Fruchart, and B. Staels, "Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPAR α , PPAR γ , and LXR," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004.
- [132] T. Kadowaki and T. Yamauchi, "Adiponectin and adiponectin receptors," *Endocrine Reviews*. 2005.
- [133] C. Skurk *et al.*, "Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy," *Eur. Heart J.*, 2008.
- [134] M. S. Denzel, M. C. Scimia, P. M. Zumstein, K. Walsh, P. Ruiz-Lozano, and B. Ranscht, "T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice," *J. Clin. Invest.*, 2010.
- [135] D. D. Doyle, G. E. Goings, J. Upshaw-Earley, E. Page, B. Ranscht, and H. C. Palfrey, "T-cadherin is a major glycoposphoinositol-anchored protein associated with noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma," *J. Biol. Chem.*, 1998.
- [136] G. Li *et al.*, "Loss of Cardio-Protective Effects at the CDH13 Locus Due to Gene-Sleep Interaction: The BCAMS Study," *EBioMedicine*, 2018.
- [137] T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe, "Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome," *Journal of Clinical Investigation*. 2006.

- [138] T. Kadowaki and T. Yamauchi, "Adiponectin receptor signaling: A new layer to the current model," *Cell Metabolism*. 2011.
- [139] H. Ruan and L. Q. Dong, "Adiponectin signaling and function in insulin target tissues," *Journal of Molecular Cell Biology*. 2016.
- [140] X. Mao *et al.*, "APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function," *Nat. Cell Biol.*, 2006.
- [141] L. Zhou *et al.*, "Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca²⁺/Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways," *J. Biol. Chem.*, 2009.
- [142] Y. Zhang *et al.*, "AdipoRon, the First Orally Active Adiponectin Receptor Activator, Attenuates Post-Ischemic Myocardial Apoptosis.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 309, no. 3, p. ajpendo.00577.2014, 2015.
- [143] R. A. Miller *et al.*, "Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling," *J. Clin. Invest.*, 2011.
- [144] T. Yamauchi *et al.*, "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase," *Nat. Med.*, 2002.
- [145] M. Iwabu *et al.*, "Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1," *Nature*, 2010.
- [146] T. Yamauchi *et al.*, "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity," *Nat. Med.*, 2001.
- [147] Y. Kim and C. W. Park, "Mechanisms of adiponectin action: Implication of adiponectin receptor agonism in diabetic kidney disease," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 7. 2019.
- [148] P. Delerive, J. C. Fruchart, and B. Staels, "Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control," *J. Endocrinol.*, 2001.
- [149] T. Yamauchi and T. Kadowaki, "Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases," *Cell Metabolism*. 2013.

- [150] S. S. Deepa *et al.*, "APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKC ζ signaling pathway," *Mol. Endocrinol.*, 2011.
- [151] W. L. Holland *et al.*, "Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin," *Nat. Med.*, 2011.
- [152] X. Xin, L. Zhou, C. M. Reyes, F. Liu, and L. Q. Dong, "APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, 2011.
- [153] E. Hu, P. Liang, and B. M. Spiegelman, "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity," *J. Biol. Chem.*, 1996.
- [154] K. Maeda, K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara, "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996.
- [155] Y. Nakano, T. Tobe, N. H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita, "Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma," *J. Biochem.*, 1996.
- [156] Z. V. Wang and P. E. Scherer, "Adiponectin, the past two decades," *Journal of Molecular Cell Biology*. 2016.
- [157] R. Natarajan, F. N. Salloum, B. J. Fisher, R. C. Kukreja, and A. A. Fowler, "Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury," *Circ. Res.*, 2006.
- [158] A. M. Delaigle, J. C. Jonas, I. B. Bauche, O. Cornu, and S. M. Brichard, "Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: In vivo and in vitro studies," *Endocrinology*, 2004.
- [159] F. Ziemke and C. S. Mantzoros, "Adiponectin in insulin resistance: Lessons from translational research," in *American Journal of Clinical Nutrition*, 2010.
- [160] M. Takahashi *et al.*, "Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin," *Int. J. Obes.*, 2000.
- [161] A. E. Achari and S. K. Jain, "Adiponectin, a therapeutic target for obesity,"

- diabetes, and endothelial dysfunction,” *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
- [162] B. J. Goldstein, R. G. Scalia, and X. L. Ma, “Protective vascular and myocardial effects of adiponectin,” *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2009.
- [163] M. Liu *et al.*, “A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008.
- [164] M. van Andel, A. C. Heijboer, and M. L. Drent, “Adiponectin and Its Isoforms in Pathophysiology,” in *Advances in Clinical Chemistry*, 2018.
- [165] M. Okada-Iwabu *et al.*, “A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity,” *Nature*, 2013.
- [166] A. K. Singh *et al.*, “Orally active osteoanabolic agent GTDF binds to adiponectin receptors, with a preference for adipoR1, induces adiponectin-associated signaling, and improves metabolic health in a rodent model of diabetes,” *Diabetes*, 2014.
- [167] M. Esfahani, N. Shabab, and M. Saidijam, “AdipoRon may be benefit for atherosclerosis prevention,” *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2017.
- [168] Y. Kim *et al.*, “The adiponectin receptor agonist AdipoRon ameliorates diabetic nephropathy in a model of type 2 diabetes,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2018.
- [169] C. H. Lee and Y. J. Hung, “Possible new therapeutic approach for obesity-related diseases: Role of adiponectin receptor agonists,” *Journal of Diabetes Investigation*. 2015.
- [170] M. Akimoto, R. Maruyama, Y. Kawabata, Y. Tajima, and K. Takenaga, “Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis,” *Cell Death Dis.*, 2018.
- [171] Y. Zhang *et al.*, “AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings,” *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, 2015.
- [172] X. Hu, Q. Ou-Yang, L. Wang, T. Li, X. Xie, and J. Liu, “AdipoRon prevents I -

- thyroxine or isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through regulating the AMPK-related pathway," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2018.
- [173] W. L. Holland and P. E. Scherer, "Ronning after the adiponectin receptors," *Science*. 2013.
- [174] L. Otvos, "Potential Adiponectin Receptor Response Modifier Therapeutics," *Frontiers in Endocrinology*. 2019.
- [175] N. Zhang *et al.*, "AdipoRon, an adiponectin receptor agonist, attenuates cardiac remodeling induced by pressure overload," *J. Mol. Med.*, 2018.
- [176] T. Yamauchi *et al.*, "Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions," *Nat. Med.*, 2007.
- [177] G. I. Shulman, "Cellular mechanisms of insulin resistance," *Journal of Clinical Investigation*. 2000.
- [178] S. Yaturu, J. Bridges, and D. R. R. S. Reddy, "Decreased levels of plasma adiponectin in prediabetes, Type 2 Diabetes and coronary artery disease," *Med. Sci. Monit.*, 2006.
- [179] J. Spranger *et al.*, "Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus," *Lancet*, 2003.
- [180] R. Ouedraogo *et al.*, "Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: Evidence for involvement of a cAMP signaling pathway," *Diabetes*, 2006.
- [181] H. Motoshima, X. Wu, K. Mahadev, and B. J. Goldstein, "Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004.
- [182] R. Shibata *et al.*, "Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function," *FEBS Lett.*, 2008.
- [183] H. Chen, M. Montagnani, T. Funahashi, I. Shimomura, and M. J. Quon, "Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells," *J. Biol. Chem.*, 2003.

- [184] A. M. Wolf, D. Wolf, H. Rumpold, B. Enrich, and H. Tilg, "Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004.
- [185] M. C. Wulster-Radcliffe, K. M. Ajuwon, J. Wang, J. A. Christian, and M. E. Spurlock, "Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004.
- [186] Y. Okamoto *et al.*, "Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis," *Circ. Res.*, 2008.
- [187] T. Pischon, C. J. Girman, G. S. Hotamisligil, N. Rifai, F. B. Hu, and E. B. Rimm, "Plasma Adiponectin Levels and Risk of Myocardial Infarction in Men," *J. Am. Med. Assoc.*, 2004.
- [188] L. Tao *et al.*, "Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress," *Circulation*, 2007.
- [189] R. Shibata *et al.*, "Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms," *Nat. Med.*, 2005.
- [190] Y. Ishikawa *et al.*, "Changes in the distribution pattern of gelatin-binding protein of 28 kDa (adiponectin) in myocardial remodelling after ischaemic injury," *Histopathology*, 2003.
- [191] S. J. Hong, C. G. Park, H. S. Seo, D. J. Oh, and Y. M. Ro, "Associations among plasma adiponectin, hypertension, left ventricular diastolic function and left ventricular mass index," *Blood Press.*, 2004.
- [192] H. Ebinç *et al.*, "Impact of adiponectin on left ventricular mass index in non-complicated obese subjects," *Endocr. J.*, 2008.
- [193] M. Kozakova *et al.*, "Adiponectin and left ventricular structure and function in healthy adults," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008.
- [194] R. Shibata *et al.*, "Adiponectin accumulates in myocardial tissue that has been damaged by ischemia-reperfusion injury via leakage from the vascular compartment," *Cardiovasc. Res.*, 2007.

- [195] K. Fujita *et al.*, "Adiponectin protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis through activation of PPAR- α ," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2008.
- [196] A. Jenke *et al.*, "Adiponectin attenuates profibrotic extracellular matrix remodeling following cardiac injury by up-regulating matrix metalloproteinase 9 expression in mice," *Physiol. Rep.*, 2017.
- [197] Y. Kamada *et al.*, "Enhanced Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Mice Lacking Adiponectin," *Gastroenterology*, 2003.
- [198] J. K. Zhan *et al.*, "Adiponectin attenuates the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells through the AMPK/mTOR pathway," *Exp. Cell Res.*, 2014.
- [199] "World Medical Association declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects," *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2013.
- [200] S. K. Atkins, K. Cao, N. M. Rajamannan, and P. Sucosky, "Bicuspid aortic valve hemodynamics induces abnormal medial remodeling in the convexity of porcine ascending aortas," *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 2014.
- [201] M. Nauck *et al.*, "Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus," *Diabetol. und Stoffwechsel*, 2017.
- [202] T. Danne *et al.*, "Typ-1-Diabetes," in *Diabetologie kompakt*, 2014.
- [203] A. Weber, M. Pfaff, F. Schöttler, V. Schmidt, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, "Reproducible in vitro tissue culture model to study basic mechanisms of calcific aortic valve disease: Comparative analysis to valvular interstitials cells," *Biomedicines*, 2021.
- [204] J. McGadey, "A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase," *Histochemie*, 1970.
- [205] V. Cottignoli, E. Cavarretta, L. Salvador, C. Valfré, and A. Maras, "Morphological and chemical study of pathological deposits in human aortic and mitral valve stenosis: A biomineralogical contribution," *Patholog. Res. Int.*, 2015.
- [206] T. A. Wynn, "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis," *Journal of*

Pathology. 2008.

- [207] K. J. Rodriguez and K. S. Masters, "Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2009.
- [208] B. Yu *et al.*, "Lipoprotein(a) Induces Human Aortic Valve Interstitial Cell Calcification," *JACC Basic to Transl. Sci.*, 2017.
- [209] J. Satta *et al.*, "Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression," *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002.
- [210] Q. Yao, R. Song, L. Ao, J. C. Cleveland, D. A. Fullerton, and X. Meng, "Neurotrophin 3 upregulates proliferation and collagen production in human aortic valve interstitial cells: A potential role in aortic valve sclerosis," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, 2017.
- [211] E. Rabkin-Aikawa, M. Farber, M. Aikawa, and F. J. Schoen, "Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves," in *Journal of Heart Valve Disease*, 2004.
- [212] F. Klingberg, B. Hinz, and E. S. White, "The myofibroblast matrix: Implications for tissue repair and fibrosis," *Journal of Pathology*. 2013.
- [213] H. Orimo, "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease," *Journal of Nippon Medical School*. 2010.
- [214] S. J. Li, Y. H. Kao, C. C. Chung, W. L. Cheng, and Y. J. Chen, "Hdac i inhibitor regulates runx2 transactivation through canonical and non-canonical wnt signaling in aortic valvular interstitial cells," *Am. J. Transl. Res.*, 2019.
- [215] P. Dutta and J. Lincoln, "Calcific Aortic Valve Disease: a Developmental Biology Perspective," *Current Cardiology Reports*. 2018.
- [216] C. Y. Logan and R. Nusse, "THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2004.
- [217] X. jian Hu *et al.*, "Role of TGF- β 1 Signaling in Heart Valve Calcification Induced by Abnormal Mechanical Stimulation in a Tissue Engineering Model," *Curr. Med. Sci.*, 2018.

- [218] K. D. O'Brien, "Pathogenesis of calcific aortic valve disease: A disease process comes of age (and a good deal more)," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 8. pp. 1721–1728, 2006.
- [219] P. J. Yu *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.*, vol. 138, no. 1, pp. 196–199, 2009.
- [220] T. Sente, A. M. Van Berendoncks, V. Y. Hoymans, and C. J. Vrints, "Adiponectin resistance in skeletal muscle: pathophysiological implications in chronic heart failure," *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2016.
- [221] A. E. Civitarese *et al.*, "Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes," *Diabetologia*, 2004.
- [222] P. G. Cammisotto and M. Bendayan, "Adiponectin stimulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase α in renal glomeruli," *J. Mol. Histol.*, 2008.
- [223] P. Lijnen and V. Petrov, "Transforming growth factor- β 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts," *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2002.
- [224] J. Lee *et al.*, "Metformin, resveratrol, and exendin-4 inhibit high phosphate-induced vascular calcification via AMPK-RANKL signaling," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2020.
- [225] H. Wang, L. A. Leinwand, and K. S. Anseth, "Cardiac valve cells and their microenvironment-insights from in vitro studies," *Nature Reviews Cardiology*. 2014.
- [226] E. Van Obberghen-Schilling, N. S. Roche, K. C. Flanders, M. B. Sporn, and A. B. Roberts, "Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells.," *J. Biol. Chem.*, 1988.
- [227] A. C. Liu and A. I. Gotlieb, "Transforming growth factor- β regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells," *Am. J. Pathol.*, 2008.
- [228] C. Munjal, A. M. Opoka, H. Osinska, J. F. James, G. M. Bressan, and R. B.

- Hinton, "TGF- β mediates early angiogenesis and latent fibrosis in an Emilin1-deficient mouse model of aortic valve disease," *DMM Dis. Model. Mech.*, 2014.
- [229] L. Gu, Y. J. Zhu, X. Yang, Z. J. Guo, W. B. Xu, and X. L. Tian, "Effect of TGF- β /Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation," *Acta Pharmacol. Sin.*, 2007.
- [230] Q. Yao *et al.*, "Over-expression of neurotrophin 3 in human aortic valves affected by calcific disease induces the osteogenic responses via the Trk-Akt pathway," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 2015.
- [231] X. Yi *et al.*, "Hepatocyte growth factor regulates the TGF- β 1-induced proliferation, differentiation and secretory function of cardiac fibroblasts," *Int. J. Mol. Med.*, 2014.
- [232] C. W. van Wyk, H. A. Seedat, and V. M. Phillips, "Collagen in submucous fibrosis: an electron-microscopic study," *J. Oral Pathol. Med.*, 1990.
- [233] N. M. Rajamannan *et al.*, "Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve," *J. Heart Valve Dis.*, 2001.
- [234] M. Zhang *et al.*, "MicroRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2014.
- [235] K. Roarty, S. E. Baxley, M. R. Crowley, A. R. Frost, and R. Serra, "Loss of TGF- β or Wnt5a results in an increase in Wnt/ β -catenin activity and redirects mammary tumour phenotype," *Breast Cancer Res.*, 2009.
- [236] S. N. Li and J. F. Wu, "TGF- β /SMAD signaling regulation of mesenchymal stem cells in adipocyte commitment," *Stem Cell Research and Therapy*. 2020.
- [237] C. M. Alfieri, J. Cheek, S. Chakraborty, and K. E. Yutzey, "Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction," *Dev. Biol.*, 2010.
- [238] G. Rawadi, B. Vayssière, F. Dunn, R. Baron, and S. Roman-Roman, "BMP-2 Controls Alkaline Phosphatase Expression and Osteoblast Mineralization by a Wnt Autocrine Loop," *J. Bone Miner. Res.*, 2003.
- [239] K. J. Rodriguez, L. M. Piechura, A. M. Porras, and K. S. Masters, "Manipulation of valve composition to elucidate the role of collagen in aortic valve calcification,"

BMC Cardiovasc. Disord., 2014.

- [240] N. M. Rajamannan, R. O. Bonow, and S. H. Rahimtoola, "Calcific aortic stenosis: An update," *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2007.
- [241] H. A. Eriksen, J. Satta, J. Risteli, M. Veijola, P. Väre, and Y. Soini, "Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis," *Atherosclerosis*, 2006.
- [242] A. Gonzalez Rodriguez, M. E. Schroeder, C. J. Walker, and K. S. Anseth, "FGF-2 inhibits contractile properties of valvular interstitial cell myofibroblasts encapsulated in 3D MMP-degradable hydrogels," *APL Bioeng.*, 2018.
- [243] J. H. Chen and C. A. Simmons, "Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: Critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues," *Circ. Res.*, vol. 108, no. 12, pp. 1510–1524, 2011.
- [244] X. Gu and K. S. Masters, "Role of the MAPK/ERK pathway in valvular interstitial cell calcification," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, 2009.
- [245] C. Y. Y. Yip, J. H. Chen, R. Zhao, and C. A. Simmons, "Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009.
- [246] J. D. Miller *et al.*, "Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010.
- [247] J. H. Chen, W. L. K. Chen, K. L. Sider, C. Y. Y. Yip, and C. A. Simmons, " β -catenin mediates mechanically regulated, transforming growth factor- β 1-induced myofibroblast differentiation of aortic valve interstitial cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011.
- [248] K. S. Mohammad *et al.*, "Pharmacologic inhibition of the TGF- β type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone," *PLoS One*, 2009.
- [249] P. W. Noble *et al.*, "Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): Two randomised trials," *Lancet*, 2011.
- [250] V. Cottin, "The role of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis," *Respir. Res.*, 2013.

- [251] J. W. Card, W. J. Racz, J. F. Brien, S. B. Margolin, and T. E. Massey, "Differential effects of pirfenidone on acute pulmonary injury and ensuing fibrosis in the hamster model of amiodarone-induced pulmonary toxicity," *Toxicol. Sci.*, 2003.
- [252] F. S. Shihab, W. M. Bennett, H. Yi, and T. F. Andoh, "Pirfenidone treatment decreases transforming growth factor- β 1 and matrix proteins and ameliorates fibrosis in chronic cyclosporine nephrotoxicity," *Am. J. Transplant.*, 2002.
- [253] E. Conte, E. Gili, E. Fagone, M. Fruciano, M. Iemmolo, and C. Vancheri, "Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2014.
- [254] Y. Yang, Y. Ye, X. Lin, K. Wu, and M. Yu, "Inhibition of Pirfenidone on TGF-beta2 Induced Proliferation, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Lens Epithelial Cells Line SRA01/04," *PLoS One*, 2013.
- [255] G. Li *et al.*, "Oral pirfenidone protects against fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and TGF- β signaling in a murine colitis model," *Biochem. Pharmacol.*, 2016.
- [256] S. N. Iyer, J. S. Wild, M. J. Schiedt, D. M. Hyde, S. B. Margolin, and S. N. Giri, "Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters.," *J. Lab. Clin. Med.*, 1995.
- [257] H. Suga *et al.*, "Preventive effect of pirfenidone against experimental sclerosing peritonitis in rats," *Exp. Toxicol. Pathol.*, 1995.
- [258] G. Miric, C. Dallemagne, Z. Endre, S. Margolin, S. M. Taylor, and L. Brown, "Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats," *Br. J. Pharmacol.*, 2001.
- [259] S. Tada *et al.*, "Pirfenidone inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2001.
- [260] S. Mirkovic *et al.*, "Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats," *Br. J. Pharmacol.*, 2002.
- [261] Y. W. Sun, Y. Y. Zhang, X. J. Ke, X. Jing Wu, Z. F. Chen, and P. Chi, "Pirfenidone prevents radiation-induced intestinal fibrosis in rats by inhibiting fibroblast

- proliferation and differentiation and suppressing the TGF- β 1/Smad/CTGF signaling pathway," *Eur. J. Pharmacol.*, 2018.
- [262] Y. Sun, Y. Zhang, and P. Chi, "Pirfenidone suppresses TGF- β 1-induced human intestinal fibroblasts activities by regulating proliferation and apoptosis via the inhibition of the Smad and PI3K/AKT signaling pathway," *Mol. Med. Rep.*, 2018.
- [263] K. Hostettler, J. Zhong, M. Tamm, D. Lardinois, and M. Roth, "Effect of pirfenidone on TGF- β -induced pro-fibrotic effects in primary human lung cells derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis," *Eur. Respir. J.*, 2014.
- [264] L. H. Kurahara *et al.*, "Activation of Myofibroblast TRPA1 by Steroids and Pirfenidone Ameliorates Fibrosis in Experimental Crohn's Disease," *CMGH*, 2018.
- [265] T. Stahnke *et al.*, "Suppression of TGF- β pathway by pirfenidone decreases extracellular matrix deposition in ocular fibroblasts in vitro," *PLoS One*, 2017.
- [266] Y. Kurita *et al.*, "Pirfenidone inhibits myofibroblast differentiation and lung fibrosis development during insufficient mitophagy," *Respir. Res.*, 2017.
- [267] J. Macías-Barragán, A. Sandoval-Rodríguez, J. Navarro-Partida, and J. Armendáriz-Borunda, "The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets," *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010.
- [268] N. M. Rajamannan, M. Cicek, J. R. Hawse, T. C. Spelsberg, and M. Subramaniam, "In vitro cell culture model of calcification: Molecular regulation of myofibroblast differentiation to an osteoblast phenotype," in *Molecular Biology of Valvular Heart Disease*, 2014.
- [269] C. Y. Y. Yip, M. C. Blaser, Z. Mirzaei, X. Zhong, and C. A. Simmons, "Inhibition of pathological differentiation of valvular interstitial cells by C-type natriuretic peptide," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011.
- [270] J. Stougaard, S. Lomholt, P. Ommen, J. Kelsen, and T. W. Kragstrup, "The antifibrotic drug pirfenidone inhibits spondyloarthritis fibroblast-like synoviocytes and osteoblasts in vitro," *BMC Rheumatol.*, 2018.
- [271] K. L. Sider, M. C. Blaser, and C. A. Simmons, "Animal Models of Calcific Aortic

- Valve Disease,” *Int. J. Inflamm.*, 2011.
- [272] S. Honda *et al.*, “A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014.
- [273] D. Van Der Linde *et al.*, “Effects of rosuvastatin on progression of stenosis in adult patients with congenital aortic stenosis (PROCAS Trial),” *Am. J. Cardiol.*, 2011.
- [274] T. Iwata *et al.*, “A phase II trial evaluating the efficacy and safety of perioperative pirfenidone for prevention of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in lung cancer patients undergoing pulmonary resection: West Japan Oncology Group 6711 L (PEOPLE Study),” *Respir. Res.*, 2016.
- [275] Y. Takeda, K. Tsujino, T. Kijima, and A. Kumanogoh, “Efficacy and safety of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis,” *Patient Preference and Adherence*. 2014.
- [276] R. Okuda, E. Hagiwara, T. Baba, H. Kitamura, T. Kato, and T. Ogura, “Safety and efficacy of pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis in clinical practice,” *Respir. Med.*, 2013.
- [277] R. Kolasa-Trela, T. Miszalski-Jamka, G. Grudzień, E. Wypasek, and M. Kostkiewicz, “Adiponectin, leptin, and resistin in patients with aortic stenosis without concomitant atherosclerotic vascular disease,” *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2011.
- [278] D. Mohty *et al.*, “Hypoadiponectinemia is associated with valvular inflammation and faster disease progression in patients with aortic stenosis,” *Cardiology*, 2011.
- [279] H. Guo, N. T. Ingolia, J. S. Weissman, and D. P. Bartel, “Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels,” *Nature*, 2010.
- [280] S. Coffey, M. J. A. Williams, L. V. Phillips, I. F. Galvin, R. W. Bunton, and G. T. Jones, “Integrated microRNA and messenger RNA analysis in aortic stenosis,” *Sci. Rep.*, 2016.
- [281] M. S. Hwang *et al.*, “miR-221/222 Targets Adiponectin Receptor 1 to Promote

- the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer,” *PLoS One*, 2013.
- [282] C. F. Chen *et al.*, “MicroRNA-221 regulates endothelial nitric oxide production and inflammatory response by targeting adiponectin receptor 1,” *Gene*, 2015.
- [283] S. Rathan *et al.*, “Identification of side- and shear-dependent microRNAs regulating porcine aortic valve pathogenesis,” *Sci. Rep.*, 2016.
- [284] D. G. Hardie, “AMP-activated protein kinase: A key regulator of energy balance with many roles in human disease,” *Journal of Internal Medicine*. 2014.
- [285] T. Ou *et al.*, “Targeting AMPK signalling pathway with natural medicines for atherosclerosis therapy: an integration of in silico screening and in vitro assay,” *Nat. Prod. Res.*, 2016.
- [286] Y. Dong *et al.*, “Reduction of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo,” *Circulation*, 2010.
- [287] K. Bandow, J. Kusuyama, K. Kakimoto, T. Ohnishi, and T. Matsuguchi, “AMP-activated protein kinase (AMPK) activity negatively regulates chondrogenic differentiation,” *Bone*, 2015.
- [288] A. Jenke *et al.*, “Transforming growth factor- $\beta 1$ promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as three-dimensional calcific aortic valve disease model,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, 2020.

6 Publikationen

Originalarbeiten

Kistner J, Jenke A, Saradar S, Chekhoeva A, Yazdanyar M, Bergmann AK, Röttepohl MV, Lichtenberg A, Akhyari P. Transforming growth factor- β 1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as three-dimensional calcific aortic valve disease model. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. 2020; 319(5): H1123-H1141

Kongressbeiträge

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie 2020

The Small Molecule Drug Pirfenidone Attenuates Fibrosis and Calcification in Cell and Tissue Culture Models of Calcific Aortic Valve Disease – J. Kistner, A. Jenke, M. Yazdanyar, A. Lichtenberg, P. Akhyari (Vortrag). *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* 68. 2020. doi: 10.1055/s-0040-1705465

Transforming Growth Factor- β 1 Promotes Fibrosis and Attenuates Calcification in a Tissue-Based Three-Dimensional CAVD Model - J. Kistner, A. Jenke, S. Saradar, M. Yazdanyar, A. Weber, P. Akhyari, A. Lichtenberg (Vortrag). *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* 68. 2020. doi: 10.1055/s-0040-1705334

85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2019

Transforming Growth Factor- β 1 Promotes Fibrosis but Attenuates Calcification of Aortic Valve Tissue in a Three-Dimensional CAVD model - J. Kistner, A. Jenke, S. Saradar, M. Yazdanyar, A. Lichtenberg, P. Akhyari (Postervortrag). *Clinical Research in Cardiology*. 2019. 108, Suppl 1

Jahrestagung The Heart Valve Society (HVS) 2019

Transforming Growth Factor Beta 1 Promotes Fibrosis but Attenuates Calcification of Aortic Valve Tissue in a Three-Dimensional CAVD Model - A. Jenke, J. Kistner, S. Saradar, M. Yazdanyar, A. Lichtenberg, P. Akhyari (Postervortrag). *Structural Heart*. 2019. 3(sup1), p. 185

46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie 2017

Osteopontin Does not Inhibit Aortic Valve Fibrosis and Calcification in Three-Dimensional Ovine Aortic Valve Model – S. Raschke, M. Lukic, L. Nehrenheim, J. Kistner, F. Schlag, A. Jenke, A. Lichtenberg, P. Akhyari (Postervortrag). *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*. 2017. 65(S 01): S1-S110. doi: 10.1055/s-0037-1598849

52. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes 2016

The novel adipokine chitinase-3-like-protein 1 (CHI3L1) is up-regulated in fibrotic and calcified aortic valves of type 2 diabetic patients – J. Kistner, S. Raschke, M. Barth, P. Akhyari, A. Lichtenberg (Vortrag). *Diabetologia*. 2016. 59 (Suppl 1): S1–S581

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation „Identifizierung und Adressierung von Targets zur Therapie der Calcific Aortic Valve Disease - Die Rolle des TGF- β 1-Signalwegs und des Adiponektin-Rezeptorsystems“ von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Fassung keiner anderen als der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift

8 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit, insbesondere die Dissertation, ist niemals nur ein Individualwerk, weshalb ich mich im Folgenden bei allen bedanken möchte, die mir die Anfertigung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Herrn Prof. Lichtenberg möchte ich für die Möglichkeit danken, die Dissertation an seiner Klinik anfertigen zu können. Danke für ein spannendes Thema, für Ihr Vertrauen in meine Arbeit und die Unterstützung in der Umsetzung neuer Projektideen.

Herrn Prof. Gödecke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Neben einer hohen wissenschaftlichen Expertise und vielen Anregungen konnte ich mich immer auf Deine Unterstützung verlassen.

Herrn Prof. Akhyari gilt mein großer Dank für die fachliche, aber auch menschliche Unterstützung. Ihre Förderung und Ihr Einsatz haben das Projekt maßgeblich vorangebracht.

Ein besonderer Dank gilt meinem AG-Leiter und Betreuer Alexander Jenke. Du hast mich motiviert, gefordert und gefördert und schließlich dazu beigetragen, dass das Promotionsprojekt erfolgreich umgesetzt wurde.

Ein weiterer Dank gilt meiner ehemaligen Betreuerin Silja Raschke, die mir den Weg in die Herzchirurgie eröffnet hat und das erste Jahr zu einer unvergesslichen Zeit gemacht hat. Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Co-Betreuerin Mareike Barth nicht nur für die fachliche Unterstützung. Dir und auch Mariam danke ich für Euer stets offenes Ohr, die ehrlichen Worte sowie Euren Rückhalt und Eure Motivation auch in Tiefpunkten der Dissertation.

Darüber hinaus danke ich den Mitgliedern der Forschungsgruppe der Experimentellen Chirurgie für Eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Gisela möchte ich für die unterhaltsamen Gespräche im Labor sowie Deine Projektunterstützung danken.

Ein großer Dank gilt auch meinen Eltern für Eure bedingungslose Liebe, Euren Rückhalt in allen Lebenslagen sowie die aufbauenden Worte und Taten.

Außerdem möchte ich meiner Familie sowie meinen Freunden für Euren Beistand, Euer Verständnis und Eure Unterstützung danken. Insbesondere Saskia, Lisa, Corinna, Inga, und Tanja. Ihr wart und seid mir eine ganz besondere Stütze im Leben.

Zuletzt gilt mein Dank all den lieben Menschen, die mich zum Lachen bringen. Meine Familie, Ihr Reiterhofmädels, Ihr Theaterleute und all Ihr guten Freunde!