

Aus der Klinik für Herzchirurgie,
Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Die Rolle von Activin A und Decorin
in ovinen valvulären Interstitialzellen im Kontext der
degenerativen Aortenklappenerkrankung
im 2D- und 3D-*in vitro*-Modell

Dissertation

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

vorgelegt von
Elisabeth Pracht

2022

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. Nat. Christoph Suschek

Widmung

In Liebe gewidmet meinen Eltern und meinen beiden Geschwistern, ohne deren grenzenlose Unterstützung ich heute nicht wäre, wo ich bin.

„Es ist nicht genug zu wissen, man muß auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen, man muß auch tun.“

Johann Wolfgang von Goethe

Teile dieser Arbeit wurden in einer Posterpräsentation veröffentlicht:

Barth M, Pracht E, Bauer S, Selig JI, Lichtenberg A, Akhyari P (2019) Activin A in aortic heart valve degeneration. *Structural Heart*, 3 (sup1), 45-45. doi: 10.1080/24748706.2019.1590098

2019 *Heart Valve Society Annual Scientific Meeting* in Sitges, Spanien

Zusammenfassung

Eine der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen ist die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVD). Das Verständnis ihrer Pathogenese ist zur Identifikation prädiktiver Parameter und Behandlungsansätze klinisch höchst relevant, da der Ersatz der Klappe zurzeit die einzige kurative Therapieoption darstellt. Die DAVD ist ein aktiver Prozess, der maßgeblich durch valvuläre Interstitialzellen (VIC) vorangetrieben wird.

Activin A ist an der Bildung der atrialen Fibrose beteiligt. Im Blut von Patienten mit DAVD, in Kardiomyopathien sowie rheumatischen Herzklappenerkrankungen ist es überexprimiert. Der Effekt von Decorin auf VIC ist nicht hinreichend geklärt. Es führt in Glattmuskelzellen zur Einlagerung von Kalzium und das strukturverwandte Biglykan trägt zur osteogenen Differenzierung von VIC bei. Um ihre Rolle in der DAVD zu verstehen, wurden Activin A und Decorin daher in der vorliegenden Arbeit auf ihren Effekt in VIC untersucht.

VIC aus ovinen Aortenklappen wurden vier Tage lang mit Activin A bzw. Decorin im 2D-Modell *in vitro* stimuliert. Analog wurden ovine Aortenklappentaschen explantiert und in einem 3D-Modell kultiviert. Die Proben wurden über RT-PCR, kolorimetrische Kalzium-Assays, Western Blot-Analyse und histologische Färbungen hinsichtlich Kalzifizierung, Matrix-Mineralisierung, Extrazellulär-Umbau (EZM) sowie Degeneration und Inflammation untersucht.

Activin A scheint *in vitro* die Proliferation der VIC zu unterstützen. Kollagen Typ 1 (*Coll1A1*), Matrixmetalloproteinase-2 (*MMP2*), und *Tumor growth factor-β* (*TGF-β*) wurden durch Activin A im 2D-Modell hochreguliert. Im 3D-Modell zeigte *TGF-β* eine erhöhte Expression unter Einfluss von Activin A. Weder wurde ein Anstieg der Kalzium-Akkumulation in den VIC detektiert, noch zeigten sich deutliche Modifikationen der histologischen Klappenarchitektur. Auf Proteinebene wurde keine Veränderung von Osteopontin (OPN) nachgewiesen, im 2D-Modell war *OPN* unter Einfluss von Activin A jedoch hochreguliert. Im 3D-Modell war der Effekt gegensätzlich. Die Phosphorylierung von NF-κB war unter Einfluss von Activin A vermindert.

Decorin führte zur Herunterregulation von *MMP2* in VIC im 2D- und 3D-Modell. Die Expression von *TGF-β* war ebenso verringert in 2D, während hier *Coll1A1* hochreguliert wurde. Im 3D-Modell war *Coll1A1* hingegen vermindert. Unter der Behandlung mit Decorin kam es nicht zur gesteigerten Einlagerung von Kalzium. Die histologische Analyse zeigte keine eindeutigen Veränderungen des Gewebes. Während die Translation von OPN nicht verändert war, zeigte sich die Expression von *OPN* unter Decorin im 3D-Modell deutlich verringert. NF-κB zeigte unter Decorin-Stimulation einen Trend zur verminderten Phosphorylierung.

Die Hochregulation von *Coll1A1*, *MMP2* sowie *TGF-β* in den VIC deutet auf eine pro-degenerative Rolle von Activin A als Induktor von EZM-Umbau und Fibrose hin. Die erhöhte Expression von *OPN* suggeriert möglicherweise die Transformation der VIC in einen osteogenen Phänotyp, die der Regulation des Gewebes unterliegt. Unter den angewandten Bedingungen wurde jedoch keine relevante Biomineralisation beobachtet. NF-κB-vermittelte inflammatorische Prozesse scheinen durch Activin A vermindert zu werden. Daher liefert Activin A einen wichtigen Ansatzpunkt für das Verständnis pro-degenerativer Prozesse in der DAVD. Decorins Einfluss auf die Expression von *Coll1A1*, *MMP2* und *TGF-β* könnte eine anti-degenerative Funktion implizieren. Interessanterweise konnte im beschriebenen Versuchsmodell keine prägnante Veränderung der Kalzium-Akkumulation beobachtet werden, jedoch sorgt Decorin eventuell über verminderte Expression von *OPN* für reduzierte Kalzifizierung. Auch eine etwaige anti-inflammatorische Rolle sollte für Decorin in VIC weiter untersucht werden, da dies möglicherweise für die Prävention, Monitoring und Behandlung der DAVD relevant sein könnte.

Englische Zusammenfassung

The calcific aortic valve disease (CAVD) is one of the most common cardiovascular pathologies. In order to identify predictive parameters and treatment strategies, the comprehension of its cellular pathogenesis is mandatory. Since the interventional replacement of the valve is the only effective cure at this point, this issue is clinically highly relevant. The CAVD is described as an active process in which the valvular interstitial cells (VICs) play a crucial role as a progressor of the disease.

Activin A is involved in numerous cardiovascular diseases. It participates in the manifestation of atrial fibrosis and plays part in atherosclerotic alterations. Serum-levels of activin A are increased in patients with CAVD as well as its expression in cardiomyopathies and rheumatic valves. The effect of decorin in VICs is not yet fully understood. In smooth-muscle cells, decorin leads to higher accumulation of calcium, while the structural-related biglycan initiates osteogenic differentiation in VICs. Interestingly, in calcific stages of CAVD, decorin is significantly less expressed than in fibrotic stages. In order to comprehend their role in CAVD, activin A and decorin have been investigated regarding their effect on VICs.

In an *in vitro* 2D-setting, isolated VICs from ovine aortic valves have been stimulated with activin A and decorin for four days. As an equivalent, aortic cusps were cultivated in a 3D-setting. The samples were then evaluated by RT-PCR, colorimetric Calcium-Assay, Western Blot-analysis and histological staining in reference to calcification, matrix-mineralization and extracellular matrix remodelling (ECM) as well as degeneration and inflammation.

Activin A seems to support proliferation of VICs *in vitro*. Collagen type 1 (*Col1A1*), matrixmetalloproteinase-2 (*MMP2*) and Tumor growth factor- β (*TGF- β*) were upregulated through application of activin A in the 2D-setting. In the 3D-setting *TGF- β* showed an increased expression under influence of activin A. Neither an enlarged accumulation of calcium, nor significant modifications of histological architecture were detected in the VICs. On protein level, no significant alterations of Osteopontin (OPN) were observed, whereas *OPN*-expression was increased in the 2D-setting under the impact of activin A. The 3D-setting showed contradictory results. The phosphorylation of NF- κ B decreased significantly under activin A.

Decorin leads to downregulation of *MMP2* in VICs in both the 2D- and 3D-setting. The expression of *TGF- β* was also reduced in 2D, while *Col1A1* was upregulated here. Meanwhile, *Col1A1* was downregulated in 3D. Under treatment with decorin, there was no significant accumulation of calcium. Histological analysis showed no alterations on valve tissue. Translation of OPN was not altered, though the expression of *OPN* under decorin was decreased significantly in the 3D-setting. NF- κ B tends to be less phosphorylated under decorin.

Upregulation of *Col1A1*, *MMP2* as well as *TGF- β* in VICs hints to a pro-degenerative role of activin A as an inductor of ECM-remodeling and fibrosis. The elevated expression of *OPN* might suggest the transformation of VICs into an osteogenic phenotype. Under the used conditions, relevant biomineralization could not be observed. NF- κ B-transmitted inflammatory processes seemed to be reduced through activin A. Hence, activin A promises to be an important candidate as for the comprehension of pro-degenerative processes in the CAVD. The effect of decorin on the expression of *Col1A1*, *MMP2* and *TGF- β* could identify an anti-degenerative function in CAVD. Noteworthy, calcium-depletion was not altered in the used setting, while decorin might be able to rescue VICs from calcification through decreased expression of *OPN*.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	mm²	Quadratmeter
Abb.	Abbildung	Mol	Stoffmenge
Act1	Activin A, 50 ng/ml	MP	Movat-Pentachrom
Act2	Activin A, 100 ng/ml	NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
AG	Arbeitsgruppe		
AK	Antikörper		
Bzw.	Beziehungsweise	ng	Nanogramm
β-GPH	Beta-Glycerolphosphat	nm	Nanometer
CaCl₂	Kalziumchlorid	NH₃	Ammoniak
Calci	Pro-kalzifizierendes Medium/ β-GPH+CaCl ₂	Nr.	Nummer
Ca.	Circa	ns.	nicht signifikant
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	OPN	Osteopontin
cm	Zentimeter	OT	Objektträger
cm²	Quadratmeter	pH	<i>lat. potentia hydrogenii</i>
Col1A1	Kollagen Typ 1A1	pNF-κB	phospho- <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid		
CT	<i>Cycle Threshold</i>	P	Passage
DAVD	Degenerative Aortenklappenerkrankung	Pro-	fördernd
Dec1	Decorin, 10 ng/ml	PVDF	Polyvinylidenfluorid
Dec2	Decorin, 200 ng/ml	RIN	<i>RNA integrity number</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RPL29	RPL29
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rpm	<i>rounds per minute</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>	RT	Raumtemperatur
Engl.	Englisch	RT-PCR	Echtzeit-Polymerase
EtOH	Ethanol		Kettenreaktion
EZM	Extrazellulärmatix	Sec.	Sekunde
FCS	Fetales Kälberserum	SLRP	<i>Small leucin-rich proteoglycan</i>
g	Gramm	Sog.	sogenannte
GAG	Glykosaminoglykane	t	Zeitpunkt
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	TBST	TBST
h	Stunde	TGF-β	<i>Tumor growth factor β</i>
HCl	Salzsäure	TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin	Tris-	Tromethamin
HK	<i>Housekeeper</i>	Trizol	Guanidiniumthiocyanat
		μg	Mikrogramm
		μm	Mikrometer
		u.a.	unter anderem

Hz	Herz	V	Volt
H₂O	Wasser	VIC	Valvuläre Interstitialzellen
IL-6	Interleukin 6	Vs.	Versus
kDa	Kilodalton	v.a.	vor allem
kW	Kilowatt	W	Watt
konz.	konzentriert	z.B.	zum Beispiel
l	Liter	2D	zweidimensional
m	Meter	3D	dreidimensional
mg	Milligramm	%	Prozent
min.	Minute	°C	Grad Celsius
ml	Mililiter	+c	mit Calci
mM	Milimol	+T	mit TNF- α
MMP	Matrixmetalloproteinase		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Englische Zusammenfassung.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Die degenerative Aortenklappenerkrankung.....	- 1 -
1.2 Valvuläre Interstitialzellen.....	- 2 -
1.3 Zellulärer Pathomechanismus der DAVD.....	- 3 -
1.4 NF- κ B und Inflammation in der DAVD.....	- 4 -
1.5 Chondro-osteogene Marker.....	- 5 -
1.6 Adipokine und Activin A im kardiovaskulären Kontext.....	- 5 -
1.7 Myokine und Decorin im kardiovaskulären Kontext.....	- 6 -
1.8 Ziele der Arbeit.....	- 7 -
2 Methoden.....	- 9 -
2.1 Kultivierung der VIC.....	- 9 -
2.1.1 Kultivierungsbedingungen im 2D-Modell.....	- 9 -
2.1.2 Kultivierungsbedingungen im 3D-Modell.....	- 14 -
2.2 Semiquantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	- 15 -
2.2.1 RNA-Isolation aus VIC im 2D-Modell.....	- 15 -
2.2.2 mRNA-Isolation aus Aortenklappen im 3D-Modell.....	- 15 -
2.2.3 Quantifizierung der mRNA.....	- 17 -
2.2.4 Synthese von cDNA mittels Reverse Transkription.....	- 17 -
2.2.5 Verwendete Primer und RT-PCR.....	- 17 -
2.2.6 Normierung der RT-PCR Ergebnisse.....	- 18 -
2.3 Bestimmung der Kalzium-Akkumulation.....	- 18 -
2.3.1 Aufarbeitung der VIC im 2D-Modell.....	- 18 -
2.3.2 Aufarbeitung der Aortenklappen im 3D-Modell.....	- 19 -
2.3.3 Messung des Kalziumgehalts.....	- 19 -
2.4 Western Blot-Analysen.....	- 19 -
2.4.1 Ernte der VIC und Proteinbestimmung.....	- 19 -

2.4.2	Gelelektrophorese	- 20 -
2.4.3	Blotten.....	- 20 -
2.4.4	Antikörper-Bindung	- 20 -
2.4.5	Auswertung und Normierung des Western-Blot	- 21 -
2.5	Histologische Färbungen.....	- 22 -
2.5.1	Anfertigung von Präparat-Schnitten	- 22 -
2.5.2	Färbeverfahren	- 22 -
2.5.3	Mikroskopische Fotodokumentation der Färbungen.....	- 23 -
2.6	Statistische Verfahren	- 23 -
3	Material	- 24 -
3.1	Geräte	- 24 -
3.2	Hilfsmaterialien.....	- 25 -
3.3	Kits	- 28 -
3.4	Chemikalien	- 29 -
3.5	Selbthergestellte Lösungen.....	- 32 -
3.6	Rekombinante Proteine	- 35 -
4	Ergebnisse	- 36 -
4.1	Vorversuche zur Protokolletablierung	- 36 -
4.1.1	Bestimmung der geeigneten Zellzahl.....	- 36 -
4.1.2	Bestimmung der geeigneten Konzentrationen für Activin A und Decorin	- 37 -
4.2	Die Wirkung von Activin A im 2D-Modell.....	- 40 -
4.2.1	Morphologie der VIC.....	- 40 -
4.2.2	Analyse chondro-osteogener Marker im 2D-Modell	- 41 -
4.2.3	Analyse inflammatorischer Marker.....	- 47 -
4.2.4	Analyse der Kalzium-Akkumulation im 2D-Modell.....	- 48 -
4.3	Die Wirkung von Activin A im 3D-Modell.....	- 50 -
4.3.1	Histologische Färbungen.....	- 50 -
4.3.2	Analyse chondro-osteogener Marker im 3D-Modell	- 52 -
4.3.3	Analyse der Kalzium-Akkumulation im 3D-Modell.....	- 57 -
4.4	Die Wirkung von Decorin im 2D-Modell.....	- 59 -
4.4.1	Morphologie der VIC.....	- 59 -
4.4.2	Analyse chondro-osteogener Marker im 2D-Modell	- 60 -

4.4.3	Analyse inflammatorischer Marker.....	- 66 -
4.4.4	Analyse der Kalzium-Akkumulation im 2D-Modell.....	- 67 -
4.5	Die Wirkung von Decorin auf VIC im 3D-Modell.....	- 69 -
4.5.1	Histologische Färbungen.....	- 69 -
4.5.2	Analyse chondro-osteogener Marker im 3D-Modell.....	- 70 -
4.5.3	Analyse der Kalzium-Akkumulation im 3D-Modell.....	- 75 -
5	Diskussion.....	- 77 -
5.1	Mikroskopische Indizien für Fibrose und Kalzifizierung.....	- 77 -
5.2	Kalzium-Akkumulation als Zeichen der Degeneration: 2D vs. 3D.....	- 77 -
5.3	Extrazellulärmatrix-Umbau im 2D- vs. 3D-Modell.....	- 78 -
5.3.1	<i>Col1A1</i>	- 78 -
5.3.2	<i>MMP2</i>	- 79 -
5.3.3	<i>TGF-β</i>	- 80 -
5.4	Osteogene Differenzierung: Expression von Osteopontin.....	- 81 -
5.5	Inflammation in VIC.....	- 82 -
5.6	Fazit für Activin A und Decorin:.....	- 84 -
5.7	Mögliche Interaktion von Activin A vs. Decorin.....	- 85 -
5.8	Limitationen der Arbeit.....	- 85 -
5.9	Ausblick für weitere Forschung.....	- 86 -
6	Quellen- und Literaturverzeichnis.....	87
7	Danksagung.....	97

1 Einleitung

1.1 Die degenerative Aortenklappenerkrankung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (engl.: *degenerative aortic valve disease*; DAVD) ist die häufigste behandlungsbedürftige Klappenerkrankung des Herzens und eine der meistverbreiteten kardiovaskulären Pathologien (1-3). Die Prävalenz der DAVD nimmt mit steigendem Alter zu und hat in den letzten 20 Jahren durch demographische Entwicklungen immens an Bedeutung gewonnen (2, 3). Demnach leiden ungefähr 25% der über 65-Jährigen an Stufen der DAVD, wie bspw. der Aortenklappensklerose, die als frühe Manifestation der DAVD verstanden werden kann (4, 5). Im Vergleich zu den übrigen Herzklappen ist die Aortenklappe durch ihre Position im Hochdrucksystem des Kreislaufs hinter dem linken Ventrikel enormen transvalvulären Gradienten sowie Scherstress ausgesetzt und öffnet sich etliche Male im Laufe des Lebens (6, 7). Die Öffnungsfläche der Aortenklappen ist in der DAVD durch Verdickung und Versteifung vermindert und wird klassischerweise echokardiographisch in späten Stadien diagnostiziert, da valide Biomarker zur Früherkennung der DAVD bisher noch nicht identifiziert werden konnten (8).

Die Entstehung der DAVD wird als aktiver, chronischer Prozess verstanden, in dem es zu extrazellulärem Umbau im Rahmen von Inflammation, Fibrosierung und Kalzifizierung kommt (Abb. 1) (9). Die Akkumulation von Kalzium und die chondro-osteogene Modifikation der Klappen führen schließlich zur Bildung von mineralisierten Knötchen durch aktivierte osteoblasten-ähnliche Zellen (10-12). Dadurch entsteht eine zunehmende Rigidität der Klappen, welche die Mobilität und damit die Klappenöffnung erschwert und zur Verringerung des Lumens der Auswurfbahn des Herzens führt. Bei der schwergradigen Stenose der Klappe ist die Öffnungsfläche so massiv eingeschränkt, dass es folglich zur Minderversorgung mit oxygeniertem Blut kommt. Deutliche Symptome wie Dyspnoe, Angina Pectoris-Beschwerden oder Synkopen sind charakteristisch für die klinische Präsentation der DAVD (13).

Als Risikofaktoren wurden, ähnlich wie bei der Atherosklerose, neben dem Alter Körpergewicht, geringe Körpergröße, Diabetes mellitus Typ 2, männliches Geschlecht sowie Tabakkonsum beschrieben (14, 15). Zwischen den beiden Erkrankungen finden sich darüber hinaus Parallelen im Pathomechanismus wie z.B. Lipid-Einlagerung, Kalzifizierung oder Entzündungsreaktionen (14). Dennoch wird die Übertragbarkeit der beiden Pathologien kontrovers diskutiert (16, 17).

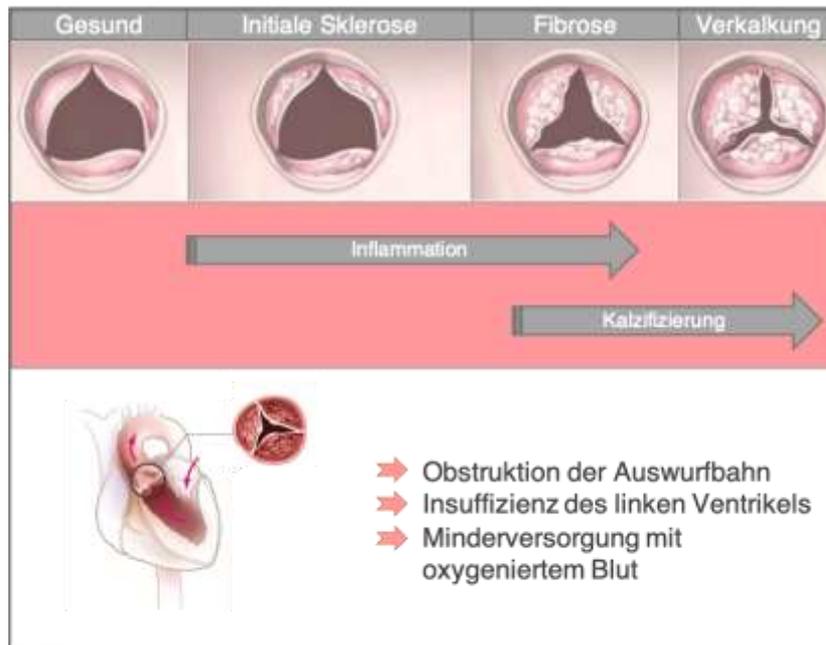


Abb. 1 Die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVD). Schematische Darstellung von Entstehung und Verlauf der DAVD. Die Kalzifizierung der Klappe führt schließlich zur Obstruktion der linken Auswurfbahn und resultiert in der klinischen Symptomatik. (Verändert nach (18), yourheartvalve.com).

Denn das Verständnis der Pathogenese in der DAVD ist zurzeit noch unvollständig: trotz zahlreicher Studien konnte bisher kein medikamentöser Ansatz zur Vorbeugung oder Behandlung der DAVD identifiziert werden (5, 19-22). Die therapeutischen Maßnahmen bestehen daher aktuell lediglich aus interventionellen Verfahren und dem operativen Klappenersatz (5, 23, 24). Angesichts der hohen Prävalenz und Mortalitätsrate in Industrienationen ist das Verständnis der Pathogenese der DAVD daher von dringlicher Relevanz und grundlegend für die Identifikation zukünftiger therapeutischer Ansatzpunkte (3).

1.2 Valvuläre Interstitialzellen

Eine besondere Rolle bezüglich Matrixumbau und Degeneration der Klappen nehmen die valvulären Interstitialzellen (VIC) ein (6, 25). Sie sind – neben der Extrazellulärmatix (EZM) und den valvulären Endothelzellen, die die Klappe umhüllen - für die Struktur der Klappe verantwortlich. Die EZM umgibt die VIC und erlaubt durch ortsspezifische Zusammensetzung die Unterteilung in drei Schichten: die Fibrosa, die Spongiosa und die Ventricularis. In allen Schichten sind VIC enthalten, die sowohl die Bestandteile der EZM produzieren als auch für Reparaturmechanismen verantwortlich sind und damit einen enormen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Mikroarchitektur der Klappe beitragen (25). In diesem Rahmen bilden VIC

unter anderem (u.a.) Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die Umbauprozesse in der Klappenstruktur erzeugen (25).

In gesundem Klappengewebe haben die VIC einen ruhenden Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp und sorgen für die konstante Synthese von wichtigen Klappen-Bestandteilen. Die Plastizität dieser hochspezialisierten Zellen ist jedoch sehr ausgeprägt und darüber hinaus empfänglich für exogene Stimulation, sodass die VIC diverse Rollen in Modifikationsprozessen der Klappenarchitektur einnehmen können - so auch in der DAVD (25).

Es werden generell fünf verschiedene Phänotypen der VIC unterschieden (25): Neben den ruhenden VIC, die unter Normalbedingungen in der Klappe vorliegen, können die VIC u.a. durch äußere Stimulation in einen aktivierten Zustand übertreten und so durch Umbau der EZM zur Fibrosierung beitragen. Wird der Zellzyklus durch die Verletzung der Klappenintegrität gestört, wird die Apoptose in den VIC gehemmt und es kommt funktionell zur Proliferation. Im Verlauf resultiert diese Akkumulation von VIC und EZM-Bestandteilen in der Entzündung und Fibrose der Klappe (26, 27). Osteoblastische VIC exprimieren vermehrt Gene wie Osteopontin (*OPN*) und spielen dadurch vermutlich eine aktive Rolle in der Kalzifizierung der Klappe (27, 28). Durch Prozesse, die von der alkalischen Phosphatase abhängig sind, tragen VIC dann zur Bildung von Kalzium-Knoten im Klappengewebe bei (25, 28). Im Kontext der Transformationsfähigkeit werden VIC somit als aktiver Part in der Entstehung der DAVD betrachtet, indem sie neben Kalzifizierung und Fibrosierung, vorausgehende Prozesse wie Inflammation und EZM-Umbau in der Aortenklappe modulieren (29-31).

1.3 Zellulärer Pathomechanismus der DAVD

Der Pathomechanismus, der zur Entstehung der DAVD führt, wird entgegen früheren Annahmen heutzutage als aktiver Prozess verstanden (Abb. 2.). Hierbei kommt es u.a. durch mechanischen Stress der Aortenklappe zur Dysfunktion des Endothels (6). Die valvulären Endothelzellen reagieren mit der Expression von Adhäsions-Molekülen (bspw. ICAM, VCAM), wodurch die Einlagerung und Oxidation von Lipiden möglich wird (32, 33). Folglich kommt es im Rahmen von Entzündungsprozessen zur Einwanderung von Immunzellen wie bspw. Makrophagen und T-Lymphozyten (34). Zum Progress der Erkrankung führt, neben der Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen, die parakrine Kommunikation der VIC mit valvulären Endothelzellen. Die Transformation in einen aktivierten, myofibroblastischen oder osteoblasten-ähnlichen Phänotyp ist verantwortlich für die Synthese und Ausschüttung von proteolytischen Enzymen durch die VIC (25, 28). Der Umbau der EZM im Zuge der Entzündungsreaktion resultiert schließlich in der Anreicherung von Hydroxyapatit und im Abbau von Elastin.

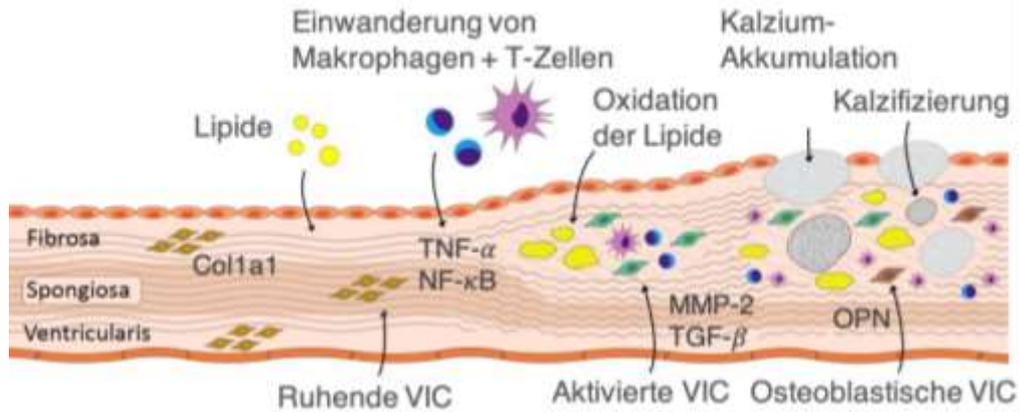


Abb. 2 Pathomechanismus der degenerativen Aortenklappenerkrankung (DAVD). Die vereinfachte Darstellung der Pathogenese der DAVD auf zellulärer Ebene beinhaltet Prozesse wie Inflammation, Fibrosierung und Kalzifizierung sowie die Transformation der valvulären Interstitialzellen (VIC) in unterschiedliche Phänotypen (Angelehnt an (8)). Abkürzungen: *Col1a1*: Kollagen Typ 1, *MMP-2*: Matrix-Metalloproteinase 2, *NF- κ B*: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, *OPN*: Osteopontin, *TGF- β* : Transforming growth factor beta, *VIC*: Valvuläre Interstitialzellen.

Die Akkumulation fehlgefalteter Kollagenfasern kennzeichnet dabei den fibrotischen Fortschritt der DAVD und führt zur Rigidität (8). Als Konsequenz der osteoblastischen Differenzierung der VIC kommt es zu vermehrter *OPN*-Expression. Schließlich entstehen durch die Biomineralisation der Klappe Kalzium-reiche Knötchen. Die fibrosierte und nahezu verknöcherte Klappe verliert durch Versteifung ihre Flexibilität und führt so zur klinischen Symptomatik (5).

1.4 NF- κ B und Inflammation in der DAVD

In frühen Stadien nehmen Entzündungsreaktionen am Progress der DAVD teil (35-38). Hier werden neben oxidierten Lipiden entzündungsfördernde Zytokine beobachtet. NF- κ B (*engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) nimmt eine Schlüsselfunktion in der Regulation dieser Entzündungsreaktionen ein. Es kommt in fast allen menschlichen Zellen vor und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Als Transkriptionsfaktor wirkt es auch in der DAVD auf Zellproliferation, Apoptose und die Immunantwort (39). Im Rahmen der Inflammation verstärkt NF- κ B u.a. nach TNF- α -Stimulation die Transkription von Cyklookxygenase-2 und Interleukin-6 (IL-6) (40). Die Phosphorylierungsrate von NF- κ B zu pNF- κ B liefert daher Hinweise auf die Entzündungsaktivität des Gewebes und bildet so einen zentralen Aspekt der DAVD ab.

1.5 Chondro-osteogene Marker

In der Pathogenese der DAVD ist die Synthese diverser sog. chondro-osteogener Marker durch die VIC von Bedeutung. So lassen sich durch die Expression dieser Marker Rückschlüsse auf den vorliegenden Phänotyp im Sinne der exogenen Aktivierung der VIC ziehen. Kollagen Typ 1 (CollA1) ist ein natürlicher Bestandteil der Mikroarchitektur der Herzklappen und kommt vorrangig in der Fibrosa vor. Hier spielt es eine entscheidende Rolle in mikrobiologischen Heilungsprozessen und der Modifikation der Zusammensetzung sowie Biomineralisation von Gewebe. Durch die geringe Dehnbarkeit der dicht gepackten Fasern kommt es in verschiedenen Pathologien bei Ansammlungen und Veränderungen der Kollagen-Faserbündel zu Fibrosierung, so auch in der DAVD (41).

Transforming growth factor beta (TGF- β) beeinflusst neben dem Zellzyklus die Differenzierung der VIC in spezifische Phänotypen (25, 42, 43). Dadurch reguliert TGF- β im Klappengewebe die Proliferation der VIC, die Synthese von EZM-Bestandteilen sowie den Umbau der Klappenarchitektur (25). Als Zytokin ist es somit beteiligt an Signalwegen im Kontext der Heilungsreaktion und der Fibrosierung der Klappe und besitzt anti-inflammatorische Fähigkeiten (44, 45). In weiteren kardiovaskulären Erkrankungen leistet es einen relevanten Beitrag zur Umstrukturierung von kardialen Gewebe, bspw. bei Herzversagen nach Myokardinfarkt (46).

Die Familie der MMPs wird im Hinblick auf EZM-Homöostase betrachtet (47). MMP2 gilt als Marker für Mineralisierungsvorgänge und EZM-Umstrukturierung (48). Aber auch Entzündungsreaktionen werden von MMPs moduliert. Die Regulation von MMP2 steht somit im Zusammenhang mit pro-degenerativen Prozessen der VIC im Rahmen der DAVD (48). Als Konsequenz der osteoblastischen Differenzierung der VIC kommt es zu vermehrter *OPN*-Expression (27). *OPN* gilt als regulatorischer Marker der DAVD und ist in kalzifizierten Klappen vermehrt exprimiert (11).

1.6 Adipokine und Activin A im kardiovaskulären Kontext

Adipokine sind an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt. Sie werden aus dem Fettgewebe sezerniert und wirken nicht nur auf das hormonelle System, sondern nehmen auch an der Modulation der EZM, dem allgemeinen Metabolismus sowie Entzündungsreaktionen teil. Dabei können Adipokine sowohl pro-inflammatorische als auch mildernde Effekte haben. Im kardiovaskulären Kontext ist ihr Einfluss auf den Blutdruck und die Angiogenese ebenfalls beschrieben (49). U.a. sollen Adipokine auch mit der Kalzifizierung der Koronararterien assoziiert sein (50). Inwieweit unterschiedliche Adipokine auf die Pathogenese in der DAVD wirken könnten, gilt es zu untersuchen.



Abb. 3 Activin A. Dargestellt ist das Adipokin Activin A. Das Glykoprotein besteht aus zwei β -A-Untereinheiten und liegt meist als Homodimer vor (51).

Das Adipokin Activin A ist ein Glykoprotein der TGF- β -Superfamilie und besteht aus zwei β -A-Einheiten (52) (Abb. 3). Es ist involviert in verschiedene Phasen des Zellzyklus sowie in Proliferation, Differenzierung und Apoptose und soll Auswirkung auf den Umbau der EZM haben (53, 54). Darüber hinaus steht Activin A im Zusammenhang mit etlichen kardiovaskulären Erkrankungen, so spielt es eine bedeutende Rolle in atherosklerotischen Veränderungen (55). Es ist an der Fibrosierung der Herzvorhöfe und der Entwicklung der Herzklappen beteiligt. Activin A wird ferner in Kardiomyopathien überexprimiert (56). Außerdem ist es in rheumatischen Herzklappen und im Blut von Patienten mit DAVD erhöht (57, 58). Als Regulator von Matrix-Umbau und osteogener Differenzierung ist Activin A damit ein interessanter Kandidat bezüglich seines Einflusses in der Entstehung der DAVD.

1.7 Myokine und Decorin im kardiovaskulären Kontext

Myokine spielen eine Rolle in zahlreichen Signalwegen des Körpers. Dabei fungiert der Muskel als endokrines Organ und sezerniert kontraktions-abhängig Moleküle, die zu den Zytokinen und Peptiden gezählt werden. Myokine beeinflussen dadurch diverse Organsysteme und sind in kardiovaskuläre Erkrankungen involviert (55, 59, 60). Zudem modifizieren sie u.a. Entzündungsreaktionen (61, 62). Myokine könnten daher in Zukunft als nützliche Biomarker auch in kardiovaskulären Erkrankungen verwendet werden (62). Eine wichtige Gruppe der Myokine sind die kleinen leucin-reichen Proteoglykane (*engl. small leucin-rich proteoglycans = SLRPs*), zu denen auch Decorin gehört (Abb. 4).

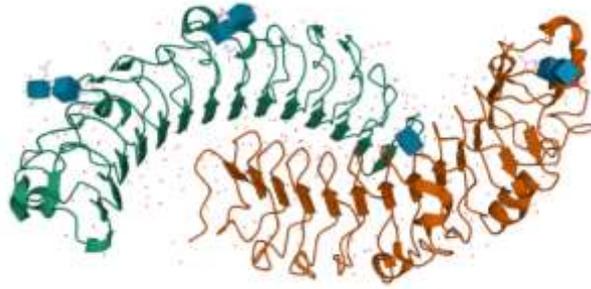


Abb. 4 Decorin. Schematische Darstellung der 3D-Struktur des kleinen Leucin-reichen Proteoglykans Decorin als Homodimer, bestehend aus einer spezifischen Glycosaminoglykan-Kette und einem Kernprotein (51).

Decorin zählt zu den am besten charakterisierten Myokinen mit Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Es besteht aus einer spezifischen Glykosaminoglykan-(GAG)-Kette und einem Kernprotein und liegt meist als Dimer vor (63). Durch seine Fähigkeit mit Kollagen zu interagieren und diese mit Lipiden zu „dekorieren“ hat Decorin nicht nur seinen Namen, es spielt außerdem oftmals eine anti-fibrotische Rolle im Umbau der EZM (63, 64). Auch an onkologischen Prozesse nimmt es teil und beeinflusst dort die Patho- und Morphogenese der Zellen und nimmt Einfluss auf das Mikromilieu (65). Decorin ist bereits an der Bildung der Herzklappen beteiligt und erzeugt durch exogene Stimulation *in vitro* in Glattmuskel-Zellen der Aorta eine vermehrte Kalzium-Akkumulation (66, 67). In der DAVD liegt Decorin zudem in fibrotischen Stadien erhöht vor (68). Außerdem führt es zur subendothelialen LDL-Retention in Aortenklappen (69). Das Struktur-verwandte Biglykan trägt zur osteogenen Differenzierung von VIC bei (70). Die genaue Funktion von Decorin in der DAVD ist jedoch noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.8 Ziele der Arbeit

Activin A und Decorin sind nachweislich mit verschiedenen kardiovaskulären Pathologien assoziiert. In dieser Arbeit soll in zwei separaten Versuchsansätzen der Einfluss des Adipokins Activin A und des Myokins Decorin auf den noch nicht ausreichend verstandenen Pathomechanismus der DAVD untersucht werden. Dies soll zunächst in einem zweidimensionalen Ansatz (2D) anhand von kultivierten ovinen primären VIC ausgeführt und in einem weiteren Schritt in einen drei-dimensionalen Ansatz (3D) übertragen werden. Dadurch sollen die VIC in einem nahezu natürlichen Mikro-Milieu in ovinen Aortenklappen-Taschen sowie unter pro-kalzifizierenden bzw. pro-inflammatorischen Bedingungen untersucht werden.

Die Zielsetzung umfasst dabei die Identifikation des degenerativen Effektes von Activin A und Decorin auf VIC hinsichtlich des pro-fibrotischen Umbaus der EZM, die Transformation von VIC in einen osteoblastischen Phänotyp sowie der Mineralisierung des Klappen-Gewebes. Zusätzlich gilt es zu evaluieren inwiefern Activin A und Decorin in die Modifikationen der Klappenarchitektur und inflammatorische Prozesse involviert sind.

Dabei kommen Methoden wie RT-PCR (Echtzeit Polymerasekettenreaktion) zur Analyse der Genexpression, Western Blot zur Analyse der Proteinexpression, kolorimetrische Assays zur Analyse der Kalzium-Akkumulation sowie histologische Färbungen zur Anwendung.

Ziel der Arbeit ist es daher, potenziell anti- bzw. pro-degenerative Effekte von Activin A und Decorin für die Entstehung der DAVD zu identifizieren. Diese Erkenntnisse könnten die Definition von prognostischen Markern, *Screening*-Parametern oder sogar medikamentöser Ansatzpunkte möglich machen und das Verständnis der DAVD ergänzen.

2 Methoden

2.1 Kultivierung der VIC

2.1.1 Kultivierungsbedingungen im 2D-Modell

Die Kultivierung der VIC erfolgte grundsätzlich unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank, um die Gefahr von Kontaminationen zu minimieren. Dazu wurden stets Handschuhe getragen. Das *Dulbeccos' s Modified Eagle' s Medium* (DMEM) zur Kultivierung der VIC enthielt 4,5 g/l Glukose und wurde mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren ergänzt. Bei der Zugabe von Stoffen, dem Waschen des Zellrasens oder dem Wechsel von Medien wurde darauf geachtet, dass die Applikation den Zellrasen nicht beschädigt und die Temperatur der Lösungen bei ca. 37 °C liegt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zellisolation

Die Isolation der VIC erfolgte aus ovinen (ov.) Aortenklappen. Dazu wurden die Klappen aus Schafsherzen explantiert (Abb. 9), die von einem lokalen Schlachthof bezogen wurden (Schlachthof Laame GmbH, Wuppertal). Für die Verwendung des ov. Gewebes wurde keine Tierversuchsgenehmigung benötigt, da es sich hierbei um „für den Verzehr freigegebenes Material“ handelte. Die Aortenklappen eines Herzens wurden in 3 ml *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) gespült und anschließend in vorgewärmtem DMEM mit einer Schere in etwa 1 mm² große Fragmente zerteilt. Das Medium mit den Gewebe-Fragmenten wurde nun mithilfe einer Pipette in eine mit Gelatine beschichtete T25-Kulturflasche überführt. Dabei wurde durch vorsichtiges Schwenken darauf geachtet, dass sich die Gewebe-Fragmente gleichmäßig verteilen. Nach einer Woche wurden die Aortenklappen-Fragmente mit einer Pipette entnommen und verworfen, sodass die aus den Fragmenten herausgewachsenen VIC passagiert werden konnten. Die Passagen-Anzahl betrug zu diesem Zeitpunkt null (P = 0).

Passagieren der VIC

Vor den Passagieren der VIC wurde das Medium abgesaugt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Zellrasen nicht beschädigt wurde. In Vorbereitung wurden alle verwendeten Medien in einem Wasserbad auf ca. 37 °C erwärmt. Der Zellrasen wurde nun zwei Mal mit DPBS gespült, um beschädigte und avitale Zellreste abzuwaschen. Nun wurde Trypsin direkt auf den Zellrasen appliziert, um die Adhäsion auf der Gelatine am Boden der Kulturflasche zu lösen. Die

enzymatische Reaktion mit Trypsin betrug ca. 5 min. im Inkubator bei 37 °C und wurde durch die Applikation von Serum-haltigem Medium im Verhältnis 3:1 inhibiert. Die gleichmäßige Ablösung des Zellrasens wurde mikroskopisch überprüft. Nach mehrfachem Re-Suspendieren der Zellen wurden diese in ein 15 ml-*Falcon*-Gefäß überführt. Durch fünf-minütige Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen pro min. (*engl. rounds per minute* = rpm) entstand eine Zellansammlung am Boden des Gefäßes. Überstehendes Medium wurde entsorgt und das Pellet in frischem Medium re-suspendiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen vor Re-Suspension mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt, um ein vordefiniertes Zell-Medium-Verhältnis zu gewährleisten. Die Passagenzahl der Zellen erhöhte sich bei jeder Passagierung um eins.

Kryo-Konservierung

Zur Konservierung wurden die VIC in Medium suspendiert und ggf. die Zellzahl bestimmt. Dafür wurde die Suspension bei 1500 rpm für 5 min. zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde in gekühltem 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS gelöst und die Suspension zu je 1 ml in Kryo-Konservierungsröhrchen bei -80 °C eingefroren und langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die zytotoxische Wirkung von DMSO auf Zellen bei Raumtemperatur (RT) zu vermeiden, wurde zügig gearbeitet.

Auftauen der VIC

Zum Auftauen der Zellen aus DMSO wurden die in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagerten Kryo-Röhrchen rasch mit 37 °C-warmem Medium versetzt und die Zellsuspension verdünnt, um die zytotoxische Wirkung von DMSO bei RT zu minimieren. Die Zellsuspension wurde nun zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Zellpellet wurde in frischem Medium gelöst und die VIC in eine mit Gelatine beschichtete Inkubationsflasche überführt. Im Verlauf der Kultivierung wurde die Zellvitalität und Quantität mikroskopisch an einem inversen Mikroskop (DMIL, Leica) beurteilt.

Kultivierung unter pro-kalzifizierenden Bedingungen

Das Protokoll zur Kultivierung der ov. VIC - unter Normalbedingungen auf der einen und unter pro-kalzifizierenden Bedingungen auf der anderen Seite - erfolgte über vier Tage (Abb. 5) für sechs biologische Individuen (n = 6). Die Stimulation durch Activin A und Decorin wurde in je zwei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, die zuvor durch die Vorversuche bestimmt wurden (4.1.2). Die Aussaat der Zellen erfolgte an Tag null, die erste Stimulation nach 24 Stunden (*engl. hour* = h; t = 1) und eine zweite Stimulation im Rahmen des Medium-Wechsels nach 72 h (t = 3). Nach 96 h (t = 4) erfolgte die Ernte.

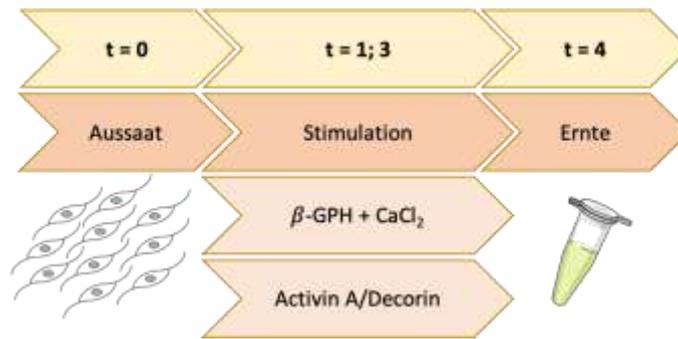


Abb. 5 Protokoll zur Kultivierung von ovinen VIC unter pro-kalzifizierenden Bedingungen. Die Kultivierung der VIC erfolgte nach Explantation der Aortenklappen aus Schafsherzen. Im 2D-Modell wurden die Zellen zuvor aus den Klappen isoliert und in Passage 4 (P4) in Kultur genommen. Die VIC wurden an Tag (t) 1 und 3 stimuliert, nach 4 Tagen in Kultur wurden sie geerntet, (Verändert nach <https://smart.servier.com>), Abkürzungen: β -GPH = beta-Glycerolphosphat, CaCl_2 = Kalziumchlorid.

In DMEM gelöste VIC (P = 4) wurden auf mit Gelatine beschichteten 6-Well-Platten kultiviert (t = 0). In jedem Well befanden sich bei Aussaat 125.000 Zellen, die in 1 ml Medium kultiviert wurden. Nach 24 h wurde der Erfolg der Aussaat mikroskopisch überprüft und die Zellen mit DPBS von avitalen und inadhärenten Zellen befreit. Die erste Stimulation der Zellen (t = 1) erfolgte mit Activin A bzw. Decorin unter Normal- sowie unter pro-kalzifizierenden Bedingungen mit je einer zusätzlichen Kontrollgruppe. Der pro-kalzifizierende Versuchsansatz (im Folgenden als „calci“ oder „+c“ bezeichnet) wurde durch supplementiertes Medium mit 10 % β -Glycerolphosphat und 0,1 % Kalzium-Chlorid (β -GPH + CaCl_2) stimuliert. Eine Übersicht über die Versuchsbedingungen zeigt Abb. 6.

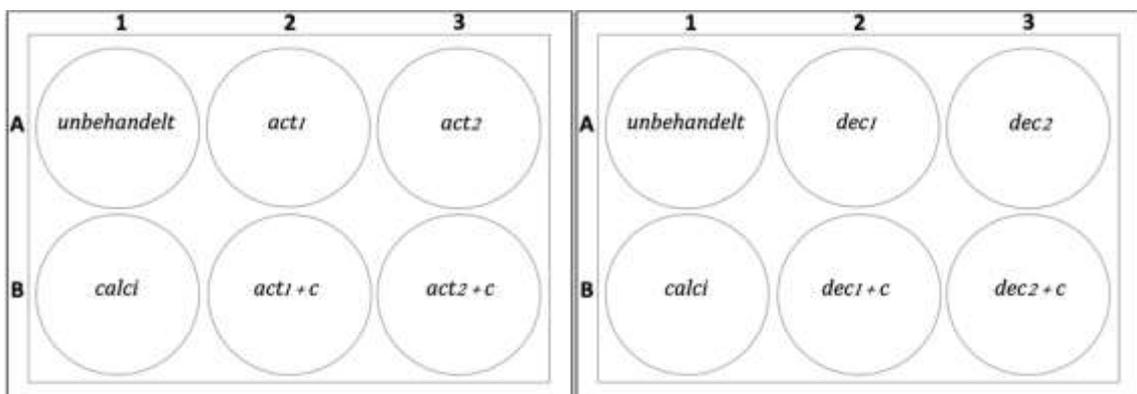


Abb. 6 Stimulation von valvulären Interstitialzellen (VIC) unter pro-kalzifizierenden Bedingungen für Activin A bzw. Decorin. Schematisch dargestellt sind zwei 6-Well-Platten mit den Behandlungsgruppen. Sie bestehen aus einer unbehandelten Kontrolle (1A), einer Kontrolle mit pro-kalzifizierendem Stimulus (1B; calci: β -Glycerolphosphat- und Kalziumchlorid-supplementiertes

Medium), sowie *Stimulationen mit je zwei verschiedenen Konzentrationen Activin A bzw. Decorin in DMEM-Medium (2A und 3A) sowie pro-kalzifizierendem Stimulus (2B und 3B)*.

Zur Stimulation mit Activin A wurden sowohl unter Normalbedingungen als auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zwei Konzentrationen verwendet (act1; act2 bzw. act1+c; act2+c), die zuvor in Vorversuchen ausgewählt worden (4.1.2). In einem separaten Versuchsaufbau wurde ebenso mit der Stimulation mit Decorin verfahren (dec1; dec2 bzw. dec1+c; dec2+c). Tabelle 1 zeigt die verwendeten Konzentrationen für Activin A und Decorin.

Bezeichnung	Konzentration Activin A [ng/ml]
<i>act1</i>	50
<i>act2</i>	100
<i>act1+c</i>	50 + calci
<i>act2+c</i>	100 + calci

A

Bezeichnung	Konzentration Decorin [ng/ml]
<i>dec1</i>	50
<i>dec2</i>	200
<i>dec1+c</i>	50 + calci
<i>dec2+c</i>	200 + calci

B

Tabelle 1 *Verwendete Konzentrationen Activin A und Decorin zur Stimulation von VIC. Die verwendeten Konzentrationen Activin A (A) und Decorin (B) sind tabellarisch mit Bezeichnung aufgeführt. Abkürzung: calci = 10 % β -Glycerolphosphat und 0,1 % Kalziumchlorid.*

Nach der ersten Stimulation wurden die VIC für 48 h bei 37 °C inkubiert und die Stimulation mit Activin A bzw. Decorin unter den genannten Bedingungen wiederholt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen nach mikroskopischer Beurteilung bezüglich Vitalität, Adhäsion und Morphologie für die Versuche weiterverarbeitet.

Kultivierung unter pro-inflammatorischen Bedingungen

In einem Kurzzeit-Protokoll unter pro-inflammatorischen Bedingungen wurden die VIC 24 h mit Activin A und Decorin behandelt (Abb. 7). Dabei wurden die VIC von je fünf Individuen (n = 5) an Tag null ausgesät, um nach 24 h Inkubation (t = 1) mit den rekombinanten Proteinen behandelt zu werden. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet (t = 2).

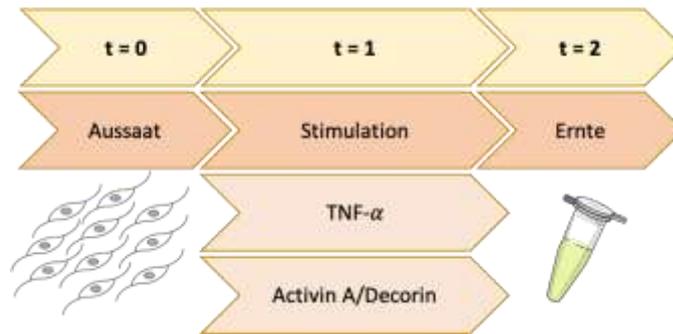


Abb. 7 Protokoll zur Kultivierung von ovinen VIC unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Die Kultivierung der VIC erfolgte nach Explantation der Aortenklappen aus Schafsherzen. Im 2D-Modell wurden die Zellen zuvor aus den Klappen isoliert und in Passage 5 (P5) in Kultur genommen. Die VIC wurden an Tag (t) 1 stimuliert, und bei t = 2 geerntet. Quelle: <https://smart.servier.com>. Abkürzungen: TNF- α = Tumor necrosis factor- α .

Je 125.000 VIC (P = 5) wurden in ein mit 1 ml-Gelatine beschichtetes Well einer 6-Well-Platte appliziert und über 24 h in 1 ml DMEM-Medium bei 37 °C kultiviert. Nun wurde mikroskopisch der Erfolg der Aussaat bewertet, avitale und beschädigte Zellen wurden mit DPBS abgewaschen. Die Stimulation der VIC erfolgte mit Activin A bzw. Decorin in den bekannten Konzentrationen in Kombination mit TNF- α als inflammatorischer Stimulus (act1+T; act2+T bzw. dec1+T; dec2+T). Einen Überblick über die Behandlungsgruppen bietet Abb. 8.

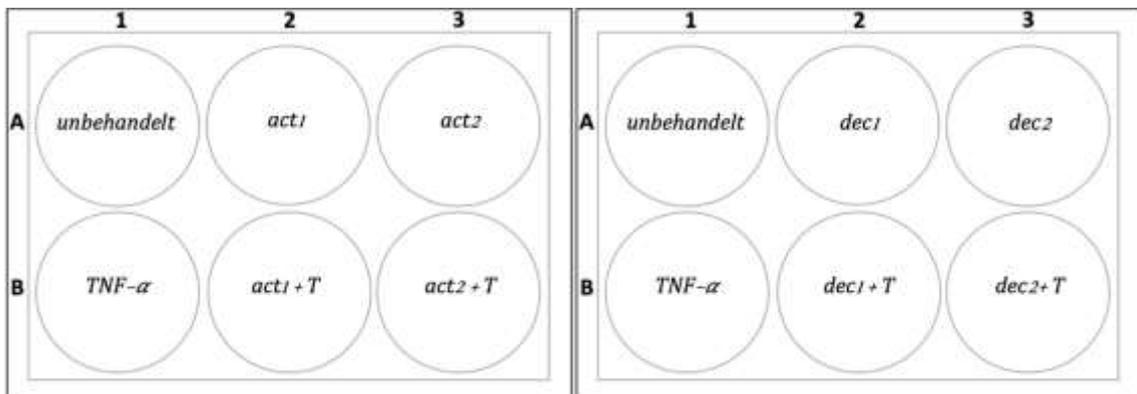


Abb. 8 Stimulation von valvulären Interstitialzellen (VIC) unter pro-inflammatorischen Bedingungen mit Activin A bzw. Decorin. Schematisch dargestellt sind zwei 6-Well-Platten mit den Behandlungsgruppen, bestehend aus einer unbehandelten Kontrolle (1A), einer Kontrolle mit pro-inflammatorischem Stimulus (1B; TNF- α), sowie Stimulationen mit je zwei verschiedenen Konzentrationen Activin A bzw. Decorin in DMEM-Medium (2A und 3A) und in pro-inflammatorischem Medium (2B und 3B).

Die Morphologie der *in vitro*-kultivierten VIC im 2D-Modell wurde vor jeder Behandlung und vor der Ernte per Mikroskop bei 10-fach Vergrößerung dokumentiert. Dazu wurden die Gefäße der 6-Well-Platten einzeln mikroskopisch beurteilt und eine repräsentative Stelle bezüglich Morphologie und Zelldichte dokumentiert. Bestimmte Parameter wie Belichtung wurden konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu gewährleisten.

2.1.2 Kultivierungsbedingungen im 3D-Modell

Präparation der Aortenklappen im 3D-Modell

In diesem Versuchsteil wurden die einzelnen Taschen der Aortenklappen steril aus ovinen Herzen präpariert (Abb. 9). Dazu wurde die Aorta bis ca. 1 cm vor der Klappenebene mit einer Schere gekürzt. Die Herzspitze wurde auf Höhe des Mittelquerschnitts des Herzens mit einem Skalpell entfernt. Der linke Ventrikel wurde mithilfe von anatomischen Merkmalen wie Myokardkaliber identifiziert und in Folge die Aorta vorsichtig entlang der *Commissura posteriora* mit einer Schere längs aufgetrennt, ohne die Aortenklappen-Taschen zu beschädigen. Das übrige Myokard wurde zur Darstellung der aufgeklappten Aorta entfernt, aus der nun die Taschen explantiert wurden. Die exzidierten Klappen-Taschen wurden nun mit einem Skalpell halbiert und schwimmend in Kultur genommen.



Abb. 9 Präparation von ovinen Herzen zur Explantation der Aortenklappen-Taschen. Für das 3D-Modell wurden die Aortenklappen-Taschen unter möglichst sauberen Bedingungen aus den Schafsherzen entnommen. (1). Das Lumen des linken Ventrikels (2: Pinzettenspitze) stellt sich nach Abtrennung der Herzspitze dar und ermöglicht die Freilegung der Herzklappen-Ebene entlang der aufgetrennten Aorta (3). Zwei Klemmen spannen das Myokard unter der Klappenebene und ermöglichen den Blick auf die drei Taschen der Aortenklappe.

Kultivierung unter pro-kalzifizierenden Bedingungen

Die Kultivierung der ov. Aortenklappen erfolgte analog dem Protokoll für VIC unter pro-kalzifizierenden Bedingungen über vier Tage (Abb. 5). Nach der Präparation wurden die Taschen

in je 2 ml DMEM-Medium in 6-Well-Platten für 24 h bei 37 °C in Kultur genommen. Die Taschen wurden mit Activin A und Decorin in den bekannten Konzentrationen (Tabelle 1) sowohl unter Normal- als auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen stimuliert (Abb. 6).

2.2 Semiquantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

2.2.1 RNA-Isolation aus VIC im 2D-Modell

Für die Ernte der VIC aus der Kultur und die Aufarbeitung der Lysate für die RNA-Isolation wurde ein Isolations-Kit (*Qiagen*) verwendet und hierbei stets nach Herstellerangaben verfahren. Die in Wasser gelöste RNA wurde nach Bestimmung der RNA-Konzentration bei -80°C gelagert.

2.2.2 mRNA-Isolation aus Aortenklappen im 3D-Modell

Die Taschen wurden aus der Kultur mit einer autoklavierten Pinzette in Kryo-Konservierungs-Röhrchen gebracht und in flüssigem Stickstoff bei ca. -196 °C schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Etablierung eines Protokolls zur mRNA-Isolation aus Aortenklappen (3D)

Zur Etablierung eines geeigneten Protokolls wurde die Prozessierung der Aortenklappen in unterschiedlichen Vorgängen getestet. Neben der Bearbeitung durch Beklopfen des Gewebes mit einem Mörser („Klopfen“) wurden die Homogenisierung mit einem elektischen Hexler („Homogenisator“) und einem *Pellet-Pestel* getestet. Die Bearbeitung mittels Homogenisator ist im nachfolgenden Kapitel beschrieben. Die Verfahren wurden bezüglich mRNA-Ausbeute und Integrität verglichen (Abb. 10).

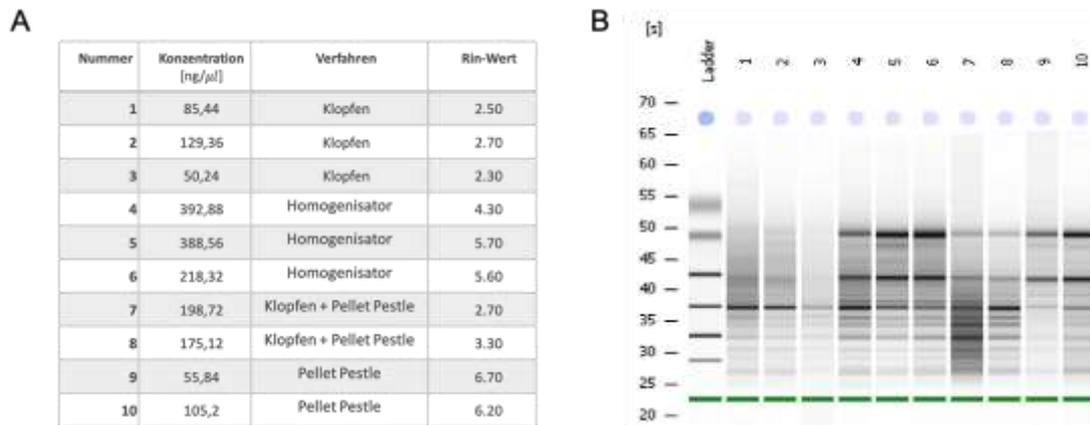


Abb. 10 Integritätsmessung und Ausbeute verschiedener RNA-Isolationsverfahren. Tabellarisch dargestellt sind zehn mRNA-Messungen aus ovinen Aortenklappen (A). Gegenübergestellt sind verschiedene Isolationsverfahren bezüglich mRNA-Ausbeute als Konzentration. Mit dem RIN-Wert ist der gemessenen RNA das Maß an Integrität zugeordnet. Die Integritätsmessungen für diese Proben sind in Bezug zu einer Referenz (Ladder) abgebildet (B). Die Bandbreite des RIN-Wertes umfasst dabei Werte von 0-10, wobei die Integrität mit dem RIN-Wert steigt. Die Messung erfolgte gemäß Eukaryote Total RNA Nano-Assay. Abkürzung: RIN = RNA integrity number.

Beim Vergleich ergab die Quantifizierung der mRNA deutlich höhere Konzentrationen bei der Isolation mit dem Homogenisator. Auch die Isolation durch Kombination von Klopfen und *Pellet-Pestel* zeigte eine hohe mRNA-Ausbeute, während die Konzentrationen bei den Übrigen Methoden nicht zufriedenstellend war. Die Integritätsmessung ergab die höchsten Werte bei der Isolation mittels *Pellet-Pestel*. Auch der Homogenisator ergab RIN-Werte über fünf, während die übrigen Verfahren sehr geringe RIN-Werte ergaben. In Zusammenschau der hohen Ausbeute und zufriedenstellenden Integrität der mRNA mit dem Homogenisator, wurde dieses Verfahren für die RNA-Isolation aus ov. Aortenklappen für den Hauptversuch ausgewählt.

Homogenisierung und mRNA-Isolation aus Aortenklappen im 3D-Modell

Zur Homogenisierung der Aortenklappen im 3D-Modell wurden die Klappen-Taschen einzeln mit je 1 ml Trizol (Guanidiniumthiocyanat) versetzt und mit einem Homogenisator ca. 20 sec. zerkleinert, bis die Emulsion homogen erschien. Nach jeder Probe wurde der Homogenisator mit 70%igem Ethanol (EtOH), RNase Away und anschließend zweimal mit RNase-freiem Wasser gereinigt.

Die Emulsion wurde 5 min. bei RT ruhen gelassen. Schließlich wurde das Homogenisat in Eppendorf-Gefäße überführt und 0,2 ml Chloroform dazu gegeben. Das Gemisch wurde kräftig

geschüttelt und mit einem *Vortexer* vermischt. Nun wurde bei 4 °C für 15 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die Trennung der wässrigen von der organischen Phase zu bewirken. Die mRNA befand sich nun in der wässrigen Phase und wurde vorsichtig abpipettiert und mit 70%igem EtOH im 1:1 Verhältnis gemischt. Im Folgenden wurde die mRNA-Isolation auf den RNA-Isolationssäulen analog der Isolation des 2D-Modells fortgesetzt (2.2.1).

2.2.3 Quantifizierung der mRNA

Die Konzentrationen der auf Eis gekühlten mRNA-Proben wurde mit einem Plattenlesegerät (*Tecan Reader*) gemessen. Hierbei wurde die Absorption der RNA bei 260 nm gemessen und die Konzentrationen in ng/µl bestimmt. Außerdem wurde auch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm/280 nm bestimmt, um eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenole auszuschließen. Bei einer Ratio über zwei wurde die Messung als verwertbar betrachtet.

2.2.4 Synthese von cDNA mittels Reverse Transkription

Die isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben, um sie in der RT-PCR verwenden zu können. Dazu wurde das Volumen der Probe berechnet, in der 1000 ng RNA enthalten sind (1000 ng/RNA-Gehalt [ng/µl]). Die folgenden Vorgänge zur cDNA-Synthese fanden unter Kühlung der Proben auf Eis statt. Dazu wurden die Lösungen und Materialien aus dem *QuantiTect^R-Kit* von *Qiagen* nach Herstellerangaben verwendet. In ein 200 µl-Eppendorf-Gefäß wurde die berechnete Menge Probe mit 1000 ng-RNA-Gehalt gegeben und die Differenz zu 12 µl mit RNase-freiem Wasser auf pipettiert. Es wurden je 2 µl *gDNA Wipeout*-Puffer zur umzuschreibenden RNA gegeben und die Probe im *Thermocycler* für 2 min. auf 42 °C erhitzt. Zur Probe wurden nun 4 µl *RT-Buffer*, 1 µl *RT-Primer Mix* sowie 1 µl Reverse Transkriptase appliziert und im *Thermocycler* für 30 min. bei 42 °C erhitzt. Darauf folgte eine 3-minütige Phase bei 95 °C. In jedem Gefäß befanden sich nun 20 µl mit 1000 ng umgeschriebener RNA, welche mit 180 µl RNase-freiem auf 5 ng/µl verdünnt wurden.

2.2.5 Verwendete Primer und RT-PCR

Als Marker für EZM-Umbau und osteogene Differenzierung wurden *Primer* für *Coll1A1*, *MMP2*, *TGF-β* und *OPN* getestet. Als Referenz-Gen wurde Ribosomales Protein L29 (*RPL29*) mittels RT-PCR verwendet (Tabelle 2) (68, 71).

Primer	Sequenz (forward 5'-3')	Sequenz (reverse 3'-5')
MMP2 2.0 ov (<i>matrix metalloproteinase 2</i>)	TGACAAGGACGGCAAGTATG	GTAAGATGTGCCCTGGAAGC
OPN ov (<i>osteopontin</i>)	GATGGCCGAGGTGATAGTGT	TCGTCTTCTTAGGGTGCGTCA
RPL29 ov (<i>ribosomal protein L29</i>)	CCAAGTCCAAGAACCACACC	TATCGTTGTGATCGGGGTTT
TGF- β ov (<i>transforming growth factor-beta</i>)	CTGAACCCGTGTTGCTCTC	GAGGTATCGCCAGGAATTGT
Col1A1 ov (<i>collagen type 1</i>)	AAGACATCCCACCAGTCACC	TAAGTTCGTCAGATCACG

Tabelle 2 Verwendete Primer in der RT-PCR.

Die RT-PCR wurde mittels des *GoTaq^R qPCR Master Mix-Kit* von *Promega* an einem PCR-Gerät nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte in Duplikaten unter Berücksichtigung einer Wasserprobe und einer sog. *Intercalibration-Sample*.

2.2.6 Normierung der RT-PCR Ergebnisse

Zur Auswertung der PCR-Daten wurden nur CT-Messwerte als valide berücksichtigt, deren Duplikate weniger als einen CT-Wert voneinander abwichen. Zudem wurden CT-Messwerte über 33 als nicht messbar gewertet und aus der Analyse ausgeschlossen. Die CT-Messwerte für ein biologisches Individuum wurden auf die zugehörige unbehandelte Kontroll-Probe (unbehandelt) desselben Individuums normiert und mittels der $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet.

2.3 Bestimmung der Kalzium-Akkumulation

2.3.1 Aufarbeitung der VIC im 2D-Modell

Zur Ernte der kultivierten VIC für die Bestimmung der Kalzium-Akkumulation wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen und dann mit 80 μ l Tris-HCl mit 0,1 % Triton X Puffer (pH 7) versetzt. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Aufarbeitung der Aortenklappen im 3D-Modell

Am Tag der Ernte wurden die Aortenklappen mit einer autoklavierten Pinzette aus der Kultur in ein Kryo-Konservierungsröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Kalzium-Akkumulation wurden die Proben jeweils in ein Arbeitsgefäß überführt. Es wurde 80 µl des Tris-HCL-Puffers hinzugefügt und mit einem Homogenisator 15 sec. lang zerkleinert. Das Homogenisat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend 10 min. in einem Ultraschall-Bad behandelt. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min. bei 4 °C wurde der Überstand vom Zell-Pellet abpipettiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Messung des Kalziumgehalts

Die Bestimmung des Kalziumgehalts in den Lysaten aus dem 2D- und dem 3D-Modell erfolgte durch die Verwendung eines kolorimetrischen Assays (*Calcium Assay Kit, Abnova*) nach Herstellerangaben. Die Proben wurden im 96-Well-Format in einem Plattenlesegerät (*Tecan-Reader*) bei 612 nm in Duplikaten gemessen. Dabei ist die Intensität der Farbe laut Hersteller proportional zur Kalzium-Konzentration. Die Konzentrationen der Proben wurden mithilfe der Kalibrierungsreihe berechnet. Dazu wurde der Mittelwert der Kalibrierungsduplikate zur Erstellung einer Eichgerade verwendet. Mithilfe der Geradengleichung der Eichgerade und der Kalibrierungsreihe konnte nun jedem Messwert ein Kalziumgehalt zugeordnet werden. Dazu wurden die Messwerte der Probenduplikate gemittelt. Diese wurden auf den mittleren Proteingehalt einer jeden Probe bezogen.

2.4 Western Blot-Analysen

2.4.1 Ernte der VIC und Proteinbestimmung

Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Zellen zweimal mit kaltem DPBS gewaschen, um abgestorbene Zellreste zu entfernen. Auf die VIC wurde nun 120 µl Lyse-Puffer gegeben, der mit 50 mM *Hepes* und 1% Triton X100 erstellt wurde. Der Puffer wurde zuvor auf einen pH von 7,4 eingestellt und mit Protease-Inhibitoren versetzt und die in Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die Lysate wurden für 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert, um die Zell-Lyse zu intensivieren bzw. zu vervollständigen. Die Proben wurden nun bei 4 °C für 15 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Überstände zur weiteren Verwendung abgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und gemischt, sodass eine gleichmäßige Verteilung der Proteine

ermöglicht wurde. Der Proteingehalt wurde mittels eines kolorimetrischen Assays (DC™ Protein Assay, Biorad) nach Herstellerangaben im 96-Well-Format in einem Plattenlesegerät (Tecan-Reader) bei 750 nm in Duplikaten gemessen.

2.4.2 Gelelektrophorese

Die vorbereiteten Proben wurden mit 6-fach-Laemmli-Puffer im Verhältnis 5:1 versetzt und 5 min. bei 95 °C in einem Thermomixer erhitzt, um die Proteine zu entfalten und denaturieren. In eine Gelkammer wurden je 2 Gele in Gelkassetten eingespannt und vollständig mit Laufpuffer befüllt, sodass die Elektroden der Gelkammern bedeckt waren. Die Taschen der Gele wurden nun mit der identischen Menge Protein befüllt. Dazu wurden durch Verdünnung gleichgroße Volumina Probe verwendet. Zusätzlich wurde ein sog. *Page Ruler* zu 5 µl an der Seite des Gels beladen, um Referenzbanden zur Erfassung des Molekulargewichtes der Proteine zu projizieren. Zum Einlaufen der Probe in das obere Sammelgel wurde eine Spannung von 50 Volt (V) verwendet. Sobald die Proben das Trenn-Gel erreichten, wurde auf 150 V erhöht.

2.4.3 Blotten

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Membran wurden die Gele aus den Gelkassetten gelöst und 10 sec. in destilliertem Wasser von Puffer-Rückständen befreit. Für die Detektion von OPN wurde eine Nitrocellulose-Membran, für NF-κB eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran verwendet. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blotten in Methanol für 10 sec. aktiviert. Die Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran wurden mit destilliertem Wasser befeuchtet. In der Blot-Kassette wurde nun zwischen zwei Filterpapieren das Gel und die Membran so aufeinander gebracht, dass bei Stromfluss (100 V) die Proteine auf die Membran übertragen wurden. Nach vollständiger Übertragung wurde die Membran mit einer 5%-igen Magermilch-Lösung mit *Tris-buffered saline with Tween20* (TBST) für 60 min. unter Rotation blockiert.

2.4.4 Antikörper-Bindung

Die verwendeten Antikörper (AK) sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zur AK-Bindung wurde die Membran mit dem Primär-AK über 12 h bei 4 °C inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit dem Sekundär-AK wurde die Membran dreimal für 5 min. mit TBST gewaschen. Der Zweit-AK wurde bei RT für 60 min. inkubiert. Die Verdünnung der AK erfolgte nach Herstellerangaben.

Nach der AK-Inkubation wurde die Membran mit 500 μ l Chemolumineszenz Substrat (Verhältnis 1:1) benetzt und mittels eines *Imager* (GE Healthcare) die Proteinbanden detektiert.

<u>Protein</u>	<u>Primär-AK</u> <u>Wirtsorganismus</u>	<u>Hersteller/</u> <u>Katalognummer</u>	<u>Sekundär-AK</u> <u>Wirtsorganismus</u>	<u>Hersteller/</u> <u>Katalognummer</u>
NF-κb	Kaninchen	Cell Signaling/ 8242	Ziege	Jackson ImmunoResearch/ 111-035-003
pNF-κb	Kaninchen	Cell Signaling/ 3033	Ziege	Jackson ImmunoResearch/ 111-035-003
β-Aktin	Kaninchen	Cell Signaling/ 4967	Ziege	Jackson ImmunoResearch/ 111-035-003
OPN	Maus	Novus Biologicals/ NB110-89062	Ziege	Jackson ImmunoResearch/ 115-035-044
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling/ CS2118	Ziege	Jackson ImmunoResearch/ 111-035-003

Table 3 Antikörper zur Detektion von Proteinen im Western-Blot.

2.4.5 Auswertung und Normierung des Western-Blot

Die Bilder der detektierten Proteinmengen wurden mittels *ImageJ* geöffnet, zurechtgeschnitten und die Banden gleichmäßig vermessen und markiert. Jede detektierte Bande wurde so in einen Messwert konvertiert, der mit der enthaltenen Proteinmenge korreliert. Dieser wurde in eine Excel-Tabelle exportiert. Die Werte für OPN, NF- κ B und pNF- κ B einer jeden Probe wurden mit dem zugehörigen Wert des *Housekeeper*-(HK)-Gens dividiert. Die daraus ermittelten Proteinmengen für NF- κ B wurden zusätzlich mit der phosphorylierten Form von NF- κ B in Relation gesetzt.

2.5 Histologische Färbungen

2.5.1 Anfertigung von Präparat-Schnitten

Nach Kultivierung im 3D-Modell wurde das Klappenmaterial in Kryo-Kompound eingebettet. Die Gewebeproben wurden mit einer Pinzette mittig im Schälchen platziert und Luftblasen entfernt. Die Schälchen wurden in Isopentan eingefroren, welches zuvor in flüssigem Stickstoff herunter gekühlt wurde. Die eingebetteten Proben wurden bei -80 °C gelagert. An einem Kryostaten wurden 5 µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, auf Objektträger (OT) aufgenommen und diese bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Färbeverfahren

Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Um die verschiedenen Gewebeschichten der Aortenklappen darzustellen, wurden Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbungen angefertigt. Die zu färbenden Präparate wurden dazu 1 min. in Hämatoxylin gefärbt und 1 min. mit destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die OT für 1 min. in 5%ige Essigsäure inkubiert und erneut für 1 min. mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden die OT 2 min. mit frischem Leitungswasser gespült und daraufhin je 1 min. mit 70%igem EtOH und zweimal mit 96%igem EtOH sowie zweimal mit 100%igem EtOH versetzt. Zuletzt wurden die OT zweimal je 1 min. in Xylol gestellt. Alle Schritte erfolgten unter einem Luftabzug. Eosin färbt basische Stoffe wie Zellplasmaproteine und Kollagen rot, während saure Strukturen wie DNA (Desoxyribonukleinsäure) durch Hämalaun blau gefärbt werden.

Movat-Pentachrom-(MP)-Färbung

Vor der Verwendung der OT wurden diese über Nacht bei 37 °C erwärmt. Alle folgenden Schritte fanden unter einem Abzug statt. Die OT wurden vor und nach der 10-minütigen Fixierung in 4%iger Formalin-Lösung für 5 min. mit destilliertem Wasser gespült. Am Tag der Färbung wurde die *Bouin's*-Lösung langsam und vorsichtig auf einer Kochplatte auf 50 °C erhitzt und die OT für 10 min. darin inkubiert. Danach wurden die OT für 10 min. mit Leitungswasser gespült, anschließend mit 5%igem Natriumthiosulfat für 5 min. fixiert und danach zweimal je 2 min. und einmal 1 min. in destilliertem Wasser gespült. Die Färbung mit 1%igem Alacianblau erfolgte 20 min. lang. Nun wurde erneut vor und nach der Stabilisierung in 60 °C warmen alkalischen Alkohol für 3 min. mit Leitungswasser gespült. 9 min. wurde in *Weigert's working solution* gefärbt und 1 min. mit kaltem Leitungswasser gespült. Im Folgenden wurde wiederholt vor und nach der 1-minütigen Färbung mit *Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-working solution* dreimal mit destilliertem Wasser gespült. In 5%iger Phosphowolframsäure wurde nun für 5 min. differenziert

und schließlich mit 1%iger Essigsäure für 2 min. gespült. Nach einer weiteren Spülung mit Wasser wurden die OT 1 min. mit 96%igem Ethanol und zweimal 1 min. mit 100%igem Ethanol dehydratisiert. Die Färbung in alkoholischem Safran erfolgte in 8 min. Nachdem die Präparate erneut zweimal für 1 min. mit 100%igem Ethanol gespült wurden, wurden sie dreimal für 5 min. in Xylol entfettet.

Von Kossa-(VK)-Färbung

Vor der Färbung nach Von Kossa (VK) wurden die OT in Aceton für 8 min. bei -20 °C gekühlt und danach 5 min. unter einem Abzug getrocknet. Nachdem die OT kurz in destilliertes Wasser getaucht wurden, wurden sie für 15 min. in einer 5%igen Silbernitratlösung unter einer Neonröhre behandelt. Daraufhin wurde dreimal für je 3 min. mit destilliertem Wasser gespült. Nun wurden die OT für 2 min. mit Natriumkarbonat-Formaldehydlösung zur Reduktion gebracht, wobei sich ein schwarzer Niederschlag bildet. Nach der Reduktion wurde mit Leitungswasser für 10 min. gespült. Es folgte die Fixierung mit 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung für 5 min., um überschüssiges Silber zu entfernen. Danach erfolgte eine 15-minütige Spülung mit Leitungswasser. Vor und nach der 10-minütigen Färbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat wurde 3 min. in destilliertem Wasser gespült. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %, EtOH) wurden die OT für je 2 min. entwässert. Daraufhin wurde zweimal für 5 min. Xylol verwendet.

2.5.3 Mikroskopische Fotodokumentation der Färbungen

Das Eindecken der gefärbten Präparate erfolgte nicht unter dem Abzug, um Verschmutzung der OT durch aufgewirbelte Partikel zu vermeiden. Die OT wurden nach der Färbung unmittelbar für 10 min. bei RT getrocknet. Auf jeden OT wurden nun drei Tropfen Eindeckmedium gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Die photographische Dokumentation erfolgte an einem Mikroskop des Typ Leica DM2000. Die Fotos eines Präparates wurden mithilfe der Software *ImageJ* unter Verwendung der Erweiterung *Fuji* oder manuell zu einer Aufnahme zusammengefügt.

2.6 Statistische Verfahren

Die angewandten statistischen Analysen beziehen sich auf eine nicht-normalverteilte Probengröße von bis zu sieben Individuen ($n \leq 7$). Die verwendete Analyse-Software *GraphPad Prism 6.0* wurde ebenso zur Erstellung von Graphen verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standard-Fehler dargestellt. Signifikante Ergebnisse ergeben sich bei einem p-Wert $< 0,05$. Es wurde der *Kruskal-Wallis-Test* angewandt und mit dem *Dunn's multiple comparison*

*t*est ergänzt. Im Folgenden wurden daraus resultierende Signifikanzen bei $p < 0,05$ mit * und bei $p < 0,01$ mit ** gekennzeichnet. Zusätzlich wurde der *Mann-Whitney U* zu Zweigruppen-Vergleichen durchgeführt und daraus ermittelte signifikante Unterschiede mit Rauten (#) versehen. Im Folgenden wurden daraus resultierende Signifikanzen bei $p < 0,05$ mit #, bei $p < 0,01$ mit ## und bei $p < 0,001$ mit ### gekennzeichnet.

3 Material

3.1 Geräte

Gerätename	Herstellerangaben
HERAcell 240i CO2 Incubator	<p>ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) Seriennr.: 41379403 (55 °C und 90 °C, 50/60 Hz, IP20, 1 NIPE, 230 V, 2,8 A, 0,64 kW)</p>
Heraeus™ Labofuge™ 300	<p>ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) Fabr.-Nr.: 40248728, Bestell-Nr.: 75003230 (kin. Energie: 427 Nm, max. Drehzahl: 4.000 U/min, Spannung: 230 V, Frequenz: 50/60 Hz, Strom: 1,25 A, Leistung: 180 W)</p>
HERASAFE KS, Type: KS 18	<p>ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) Order Code: 51022712, Serial No.: 41172502 (1/PE AC, 8,7 A, 230 V, 50/60 Hz, 2,0 kW, IP 20, EN 12469: 2000, Class II, Safety Cabinet, Working Volume: 1800x780x627 mm)</p>
System VX-95	<p>System GmbH, the autoclave company (Nürnberg, Deutschland) Seriennr.: 4713</p>
Tecan Reader, infinite M1000 PRO	Tecan Deutschland GmbH
T3000 Thermocycler	<p>Biometra^R (Göttingen, Deutschland) Seriennr.: 2710292</p>
Zählkammer Neubauer, Tiefe, 0,0025 mm ²	<p>Assistent^R (Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) Bestell-Nr.: 40441001</p>

Ultra-Turrax Typ TP18-10	Janke und Kunke KG Gerätenr.: 10758
Electrophoresis Power Supply EV245	Consort
Accu-jet ^R pro	Brand Produktnr.: 16B34312
StepOne Plus Real time PCR-System	Applied Biosystems
Ultraschall	Bandelin electronics
IKA ^R RH basic 2	06.071622
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell	Quelle: Instruction Manual der Mini: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf)
RS-TR05	Phoenix Instrument
Amersham Imager 600	GE Healthcare
Leica CM1950	Leica
LEICA DMIL LED LEICA DFC425 C	Leica
Centrifuge 5804R	Eppendorf AG (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) Seriennr. 30405693

3.2 Hilfsmaterialien

Produktname	Hersteller	Produktnummer
Cell Scraper 16 cm, sterile	Sarstedt, Inc. (Newton, USA)	83.1832
Cellstar ^R Cell Culture Flasks, 550 ml, 175 cm ² , PS, red standard screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	660 160
Cellstar ^R Tubes, 15 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	188 271

Cellstar [®] Tubes, 50 ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	277 261
Cellstar [®] Tubes, 50 ml, PP, graduated, conical bottom with support skirt, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	210 261
Cellstar [®] 6 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	657 160
ClearLine PP microtube 2 ml, round bottom, snap cap, non-sterile	ClearLine [®] Biosigma (Venedig, Italien)	390691
Low Temperature Freezer Vials (Self-Standing, 2 ml, Silicone O-Ring Seal)	VWR [®] (Radnor, PA, USA)	497-1262 (European Article No.)
MicroAmp [®] , Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml), PCR Compatible DNA/RNA/RNase Free	Applied Biosystems Inc (Foster City, CA, USA)	4346906
MicroAmp [™] Optical Adhesive Film, PCR/Real-time PCR Compatible	Applied Biosystems, by ThermoFisher Scientific (Carlsbad, CA, USA)	4311971
Microplatte, 96 Well, PP, F-Boden (Kaminform), Natur, 10 St./Btl.	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)	655201
Micro tube/Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)	72.690.001
Pasteurpipetten aus Glas, für den Einmalgebrauch, ca. 150 mm	BRAND GMBH & CO KG (Wertheim, Deutschland)	7477 15
Pasteurpipetten aus Glas, für den Einmalgebrauch, ca. 230 mm	BRAND GMBH & CO KG (Wertheim, Deutschland)	7477 20
QIAshredder (250)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	79656

Stericup ^R 500 ml, Millipore Express ^R PLUS, 0,22 µm PES	EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Deutschland)	SCGPU05RE
Tip OneR 10 µl Graduated, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1121-3810
Tip OneR 10/20 µl XL Graduated, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1120-3810
Tip OneR 20 µl Bevelled, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1120-1810
Tip OneR 200 µl Graduated, Filter Tip, 10x96 Tips, Racked (Sterile), Free of detectable RNase, DNase, DNA & pyrogens	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)	S1120-8810
Tissue Culture Flask, 25 cm ² , treated, vented cap, sterile	VWRR International (Löwen, Belgien)	734-2311
Tissue Culture Flask, 75 cm ² , treated, vented cap, sterile	VWRR International (Löwen, Belgien)	734-2313
Tissue Culture Flasks, Vented Cap, 225 cm ² , sterile	FALCONR, Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	353138
µltraAmp PCR Products, Certified RNase/DNase Free, 0,2 ml, Natural	SorensonTM (West Salt Lake City, USA)	16950A
5 mL StripetteR, Disposable Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile	costarR, Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	4487
10 mL StripetteR, Disposable Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile	costarR, Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	4488

25 mL StripetteR, Disposable Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile	costarR, Corning Incorporated (Corning, NY, USA)	4489
Petrischale 15 cm	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Germany)	83.3903
TC-Dish 150, Standard		
Petrischale 10cm	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Germany)	83.3902
TC-Dish 100, Standard		
Scalpell	pfm medical AG (Köln, Germany)	02.001.40.010
Safeshield Scalpel, No 10 pfm, Feather disposable Scalpel		
Abdecktuch	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG (Rengsdorf, Germany)	33010
Raucodrape ^R Pro, Klebetuch, 2-lagig		
Spezialfusselfreituch	Kimberly-Clark ^R Professional, (Canada)	00551
KIMTECH Science, Präzisionswischtücher		
Kassette WB 1,5 mm	Novex by life technologies	
Nitrocellulose membranes 0.45 µm	Bio Rad	A29480718
Amersham Hybond P0.45 PVDF	Amersham	10600029
Einbetttschälchen Kunststoff 17x17x5 mm	Medite	48-6303-00
Objektträger 76x26x1 mm	Marienfeld	0810000
Objektträger 75x25x1 mm	R. Langenbrinck	03-0060
Objektplatte Rund 30 m	Technomed	14037008587
Deckgläser	Engelbrecht	K12450

3.3 Kits

Produktname	Hersteller	Nummer
Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	BCA-1

Calcium Assay Kit	Abnova ^R Corporation (Taipei City, Taiwan)	KA1644
GoTaq ^R qPCR Master Mix	Promega (Madison, WI, USA)	A6002
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	23225
QuantiTect ^R Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)	205313
RNeasy ^R Mini Kit (250)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	74106
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Biozym	
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	

3.4 Chemikalien

Produktname	Hersteller	Produktnummer	Lagerung
Ampuwa ^R Spüllösung 1.000 ml Plastipur ^R , steril und endotoxinfrei	Fresenius Deutschland GmbH	Kabi 13LAP061	RT
β-Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate, ≥ 98,0 % (NT)	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	50020-100G	2-8 °C
Bicinchoninic Acid solution	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	B9643-1L	RT
Bovine Serum Albumin (lyophilized powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥ 96 % (agarose gel electrophoresis))	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	A9418-10G	2-8 °C
Kalziumchlorid ≥ 98 %, getrocknet, Pulver (CaCl ₂ - M 110,99 g/mol)	Carl Roth GmbH + Co. KG	CN93.1	RT

	(Karlsruhe, Deutschland)			
complete Tablets, Mini, EDTA-free, (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)	04 693 159 001, LOT 17756800 Nr. 11697498001	2-8 °C	
Copper (II) sulfate solution, 4 % (w/v)	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	C2284-25ML	RT	
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	D8418-100ML	RT	
DL-Dithiothreitol, ≥99,0 % (RT)	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	43819-25G	2-8 °C	
DMEM (1X) + Gibco ^R GlutaMAX TM - i, [+] 4,5 g/L D-Glucose, [+] Pyruvate	(Grand Island, NY, USA)	31966-021	4 °C	
DPBS w/o Calcium and Magnesium	BioFroxx GmbH (Pfungstadt, Deutschland)	1445ML500	RT	
Ethanol, CHROMASOLV ^R , for HPLC, absolute, ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	34852-1L	RT	
Fetal Bovine Serum, Sterile Filtered, Cell Culture Tested	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	F7524, LOT 025M3302	-20 °C	
Gelatin from bovine skin	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	G9391-500G	RT	
HEPES, Sodium Salt, ULTROL ^R Grade, MW: 260,3 g/mol	CALBIOCHEM ^R , Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)	391333, LOT B52066	20°C	
HiPerFect Transfection Reagent (1 ml)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	301704	4 °C	
Lipofectamine ^R 2000 Transfection Reagent	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)	11668019	4 °C	
MEM Non-Essential Amino Acid Solution 100x	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	M7145	4 °C	

Nuclease-Free Water	Promega Corporation (Madison, WI, USA)	P119E	30 °C
Pen Strep	gibco ^R (Grand Island, NY, USA)	15140-122	-20 °C
PhosSTOP (Phosphatase Cocktail Tablets)	EASYpack Inhibitor Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)	04 906 837 001, LOT 18738300	2-8 °C
RNase-Free DNase Set (50), for use with RNeasyR/QIAampR Columns	Qiagen (Hilden, Deutschland)	79254	-20 °C
TRIS-hydrochlorid, PUFFERANR ≥ 99 %, p.a., C4H11NO3-HCL-M g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9090.3	RT
TritonTM, X-100	Sigma-Aldrich ^R (St. Louis, MO, USA)	T9284-500ML, LOT SLBM1897V	20-25 °C
Trypan Blue Solution, 0,4 %	AMRESCOR (Solon, OH, USA)	K940-100ML	2-8 °C
0,25 % Trypsin-EDTA (1X)	gibco ^R (Grand Island, NY, USA)	25200-056	-20 °C
PageRulerTM plus prestained protein ladder	Thermo Scientific	26619	-20 °C
BSA	Roth,	8076	4 °C
KP-CryoCompound	Klinipath	1620-C	RT
2-Methylbutan/ Isopentan	Roth	3927,2	4°C
Ammoniumhydroxid 30 %	Roth	CP17.1	RT
Pikrinsäure	VWR Chemicals	84512.260	RT
Formaldehydlösung 37 %	Roth	4979.1	RT
Essigsäure 100 %	Roth	6755.2	RT
Natriumthiosulfat	Sigma	72049-250G	RT
Safran du Gatinais	Waldeck	5A-394	RT
Eisen-Chlorid- Hexahydrat	Sigma-Aldrich	236489-100G	RT
Jod	Roth	7935.1	RT

HCl 32-37 %	Roth	2601.1	RT
Kaliumjodid	Roth	8491.1	RT
Brilliant Crocein R	Waldeck	1B-109	RT
Säurefuchsin	Roth	T128.1	RT
Phosphotungstic Acid	Sigma-Aldrich	P4006-250G	RT
Alcianblau	Sigma-Aldrich	A5268-25G	RT
Hämatoxylin	Thermo	6765009	RT
Ethanol 70 %, 96 %, 99,8 %	Zentralapotheke UKD		RT
Eosin	Sigma-Aldrich	861006	RT
Xylol	VWR	28975.325	RT
Essigsäure	Roth	6755.2	RT
Eindeckmedium Histokitt 2	Roth	T160.1	RT
Silbernitrat	Roth	9370.2	RT
Natriumthiosulfat	Sigma	72049-1KG	RT
Natriumcarbonat	Merck	1.06392.1000	RT
Formaldehydlösung 4 %	Roth	P087.5	RT

3.5 Selbsthergestellte Lösungen

Produktname	Bestandteile
Tris/HCl 1,5M pH 8,8	45,4275 g TrizmaBase (MW= 121,14 g/mol) 450ml AquaDest 37% HCl auf pH = 8,8
Tris/HCl 0,1M pH 6,8	9,0855 g TrizmaBase (MW = 121, 14 g) 250 ml Aqua dest. 37 % HCl auf pH = 6,8
10 % SDS	10 g SDS-Pellet 100 ml Aqua dest.
10 % APS	1 g Ammonium Persulfate 10 ml Aqua dest.
Laemmli-Puffer	3,75 ml 375 mM Tris/HCl 1M pH 6,8 6 ml (60 %) Glycerin 1,26 g SDS-Pellet 0,09258 g 600mM DTT 0,009 g Bromphenolblau 10 ml Aqua dest.

10x SDS Running Buffer pH 8,3	250 mM Tris Base (= 30,285 g (MW=121,14 g/mol)) 1,9 M Glycin (= 142,633 g (MW= 75,07)) 1l Aquadest 100 ml 10 % SDS
1x Transfer Buffer	200 ml Methanol 100 ml 10x Running Buffer (ohne SDS) 700 ml Aquadest
Buffer RDD, DNA Digest Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland), Katalog-Nr. 1010397, Lagerung bei 4 °C
TRIS-HCl-Puffer (100 mM) (Lagerung bei 4 °C)	0,7875 g TRIS-Hydrochlorid 50 ml ddH ₂ O pH = 7,0 500 µl Triton X-100
Medium zur Kultivierung der VIC (4,5 g/l Glukose)	500 ml DMEM 50 ml FBS (10 %) 5 ml Pen/Strep (1 %) 5 ml NEAA (1 %)
Degenerierendes Zellkulturmedium	49 ml Zellkulturmedium (s.o.) 100 µl Kalziumchlorid (1,5 M; 1,665 g in 10 ml ddH ₂ O) 1.000 µl β-Glycerol phosphate (1 M; 3,061 g in 10 ml ddH ₂ O)
Einfriermedium	10 % DMSO in FBS
Trenngel	Wasser 40 % Acrylamid/Bisacrylamid Trenngelpuffer 1,5 M Tris pH 8,8 SDS 10 % TEMED 10 % APS
Sammelgel	Wasser Acrylamid/Bisacrylamid Sammelgelpuffer 0,5 M Tris pH 6,8 SDS 10 % TEMED 10 % APS

5% BSA in TBST	5 gelöst in TBST	%	Milchpulver
Eosin-Lösung	1 g Eosin in 100 ml Aqua dest 100 ml 100 % Ethanol 200 µl Eisessig lösen Über einen Faltenfilter filtriert		
4-5 % Essigsäure	10 ml Eisessig (konz. Essigsäure) mit 190 ml Wasser verdünnt		
Alkalischer Alkohol, 400 ml	360 ml Ethanol (96 %) 40 ml 30% Ammoniumhydroxid (NH ₃ +H ₂ O)		
Bouin's Lösung, 420 ml	300 ml Pikrinsäure (wässrig gesättigt), 100 ml Formaldehyd 37-40 % 20 ml 100%ige Essigsäure (Eisessig)		
5 % Natriumthiosulfat, 200 ml	10 g Natriumthiosulfat (Sodium Thiosulfate) 200 ml Aquadest		
1 % Alcianblau, 200 ml	2 g Alcianblau 200 ml Aquadest		
2 % Alkoholisches Hämatoxylin, 500 ml	10 g Hämatoxylin 500 ml 96%iger Ethanol		
Eisenchlorid, 500 ml	12,4 g Eisen-Chlorid-Hexahydrat (FeCl ₃ -6H ₂ O) 500 ml Aquadest 5 ml 32-37%ige Salzsäure (HCl)		
Jodlösung, 500 ml	10 g Jod 20 g Kaliumjodid (Potassium Iodide) 500 ml Aquadest		
Weigert's Eisenhämatoxylin, 120 ml	60 ml 2 % Hämatoxylin 40 ml Eisenchlorid 20 ml Jodlösung		
Brilliant Crocein R Stock, 400 ml	4 g Brilliant Crocein R (Crocein Scarlet 3B) 398 ml Aquadest		
Säurefuchsin Stock, 500 ml	0,5 g Säurefuchsin 497,5 ml Aquadest 2,5 ml 100%ige Essigsäure		
Crocein-Säurefuchsin, 100 ml	80 ml Brilliant Crocein R Stock (langsam schütten, schäumt sonst)		

	20 ml Säurefuchsin Stock
5% Phosphorwolframsäure, 500 ml	25 g Phosphorwolframsäure (Phosphotungstic Acid) 500 ml Aquadest
1% Eisessig, 500 ml	5 ml 100%ige Essigsäure 495 ml Aquadest
Alkoholischer Safran, 200 ml	12 g Safran du Gatinais (Spanish Saffron) 200 ml 100%iger Ethanol In luftdichter Flasche 48 h bei 60 °C erhitzen grob filtrieren
5% Silbernitratlösung	200 ml Aquadest 10 g Silbernitrat
5% Natriumthiosulfatlösung	200 ml Aquadest 10 g Natriumthiosulfat
Natriumkarbonat- Formaldehydlösung	150 ml Aquadest 50 ml Formaldehyd 10 g Natriumcarbonat

3.6 Rekombinante Proteine

Protein	Katalognummer	Hersteller
Humanes Decorin	143-DE	R&D Systems
Human Activin A	338-AC	R&D Systems
Human TNF- α	H8916	Sigma Aldrich

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche zur Protokolletablierung

4.1.1 Bestimmung der geeigneten Zellzahl

Zur Protokolletablierung wurden Vorversuche zur Ermittlung einer geeigneten Zellzahl bei der Aussaat durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Zellzahlen getestet: 100.000 und 150.000 VIC. Die Kultur erfolgte über vier Tage je in Normalmedium sowie unter pro-kalzifizierenden Bedingungen. In den Vorversuchen zur Protokolletablierung wurden morphologische Aspekte der VIC sowie die Konfluenz evaluiert. Abb. 11 zeigt exemplarisch Fotografien der VIC unter dem Mikroskop am dritten und vierten Tag (Tag der Ernte).

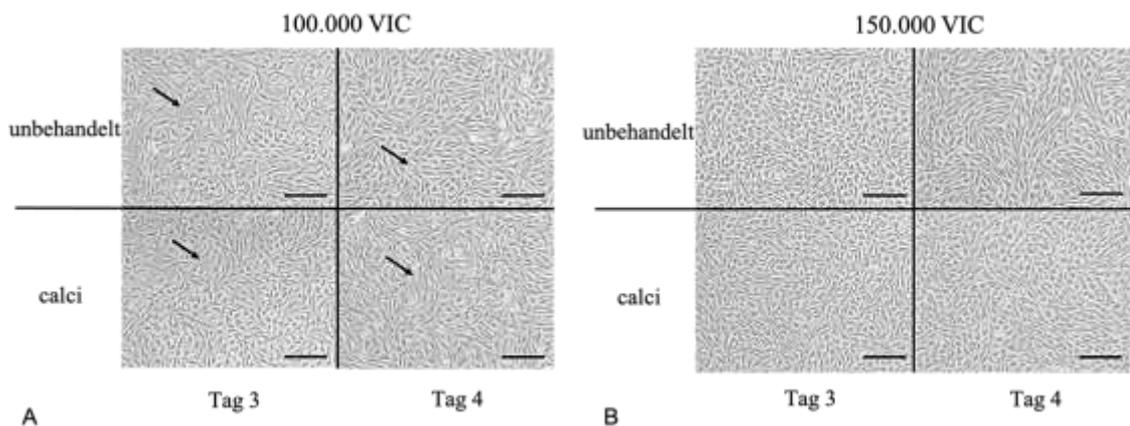


Abb. 11 Vorversuche zur Kultivierung von VIC in unterschiedlicher Anzahl. Dargestellt sind exemplarische Fotografien kultivierter VIC bei einer initialen Aussaat von 100.000 Zellen (**A**) bzw. 150.000 Zellen (**B**) zu zwei Zeitpunkten der Kultivierung unter Normal- (unbehandelt) sowie pro-kalzifizierenden (calci) Bedingungen. Bei 10-fach-Vergrößerung unter dem Auflichtmikroskop zeigt sich in **A** eine moderate Konfluenz am dritten sowie am vierten Tag mit Lücken im Zellrasen (Pfeile), während **B** jeweils super-konfluente Zellpopulationen zeigt. Erläuterungen: VIC: valvuläre Interstitialzellen, unbehandelt: DMEM-Medium, calci: DMEM + β -Glycerolphosphat + Kalziumchlorid.

Bei einer Anzahl von 100.000 VIC bei Aussaat zeigte sich eine moderate Konfluenz am dritten Tag sowie am Tag der Ernte, erkenntlich an Lücken im Zellrasen (Abb. 11, Pfeile). Morphologisch zeigen sich die VIC in der typischen spindelförmigen Anordnung (25). Insgesamt schien die Anzahl von 100.000 VIC zu gering um die gewünschte Konfluenz am Tag der Ernte zu erzielen. Die Zellzahlen am Tag der Ernte für die unbehandelte Kontrolle sind in Abb. 12 und Abb. 13 aufgeführt und unterstützen diese Beobachtungen. Demnach zeigten sich bei einer

initialen Zellzahl von 150.000 VIC bei Aussaat bereits am dritten Tag Superkonfluenz-Merkmale (25), sodass am vierten Tag kaum eine Steigerung der Konfluenz zu beobachten war. Da eine möglichst ungehemmte Proliferation der VIC vom dritten zum vierten Tag nach Stimulation gewährleistet werden sollte, wurde im Folgenden schließlich mit einer Zellzahl von 125.000 VIC in den Hauptversuch gestartet, da hier die Konfluenz-Entwicklung vom dritten zum vierten Tag zufriedenstellend war. Die fotografische Dokumentation der Kultivierung mit dieser Anzahl VIC ist im Hauptversuch dargestellt (Abb. 14).

4.1.2 Bestimmung der geeigneten Konzentrationen für Activin A und Decorin

Activin A

Zur Protokolltablierung wurden geeignete Stimulationsdosen mit Activin A in Vorversuchen ermittelt. Für die Auswahl der Konzentrationen im Hauptversuch wurden aus der Literatur verschiedene Activin A-Konzentrationen zur Stimulation von VIC herangezogen: 10, 50 und 100 ng/ml (72), (73). Die Kultivierung erfolgte über vier Tage in den in Abb. 11 getesteten Zellzahlen. Es wurden morphologische Aspekte der VIC sowie die Konfluenz evaluiert. Zudem wurden die Zellzahlen am Tag der Ernte ermittelt.

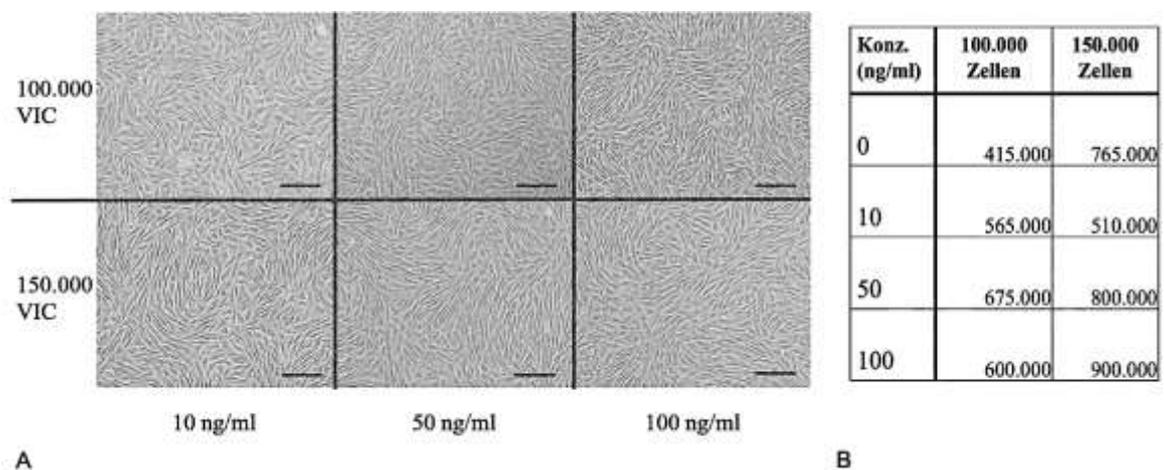


Abb. 12 Vorversuche zur Kultivierung von VIC unter Stimulation mit Activin A. Exemplarische fotografische Aufnahmen von VIC am vierten Tag Kultur unter Stimulation mit drei verschiedenen Konzentrationen von Activin A (A). Gegenübergestellt sind zwei initiale Zellzahlen bei Aussaat. Die Zellzahlen bei Ernte (B) sind für die Konzentrationen 50 und 100 ng/ml jeweils erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (0 ng/ml). Maßstab = 200µm.

Bei der Begutachtung der kultivierten VIC zeigen sich keine deutlichen morphologischen Unterschiede nach Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen von Activin A (Abb. 12).

Die Konfluenz in den getesteten Konzentrationen scheint in allen Bedingungen gegeben zu sein, allerdings zeigen die Zellzahlen am Tag der Ernte, dass bei Stimulationen mit Activin A in den Konzentrationen 50 ng/ml und 100 ng/ml höhere Zellzahlen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auftraten. Diese Beobachtung ließ sich bei initialen Zellzahlen von 100.000 sowie 150.000 VIC machen. Bei 10 ng/ml trat dieser Effekt lediglich für 100.000 VIC auf. Nach Evaluation der morphologischen Merkmale und um einen eventuellen proliferativen Prozess integrieren zu können, wurden die beiden höheren Konzentrationen für den Hauptversuch mit Activin A ausgewählt. Im Folgenden werden die beiden Konzentrationen als act1 (50 ng/ml) und als act2 (100 ng/ml) bezeichnet.

Decorin

Zur Protokolletablierung wurden analog zu Activin A geeignete Stimulationsdosen mit Decorin in Vorversuchen ermittelt. Die für Decorin verwendeten Konzentrationen zur Stimulation von VIC waren 50, 200 und 500 ng/ml (67). Die Kultivierung erfolgte mit den in Abb. 11 getesteten Zellzahlen. Bei der Evaluation der Vorversuche zur Protokolletablierung wurden morphologische Aspekte der VIC sowie Konfluenz qualitativ mittels Mikroskopie bewertet. Zudem wurden die Zellzahlen zum Tag der Ernte ermittelt, um einen Einfluss auf die Proliferation messen zu können.

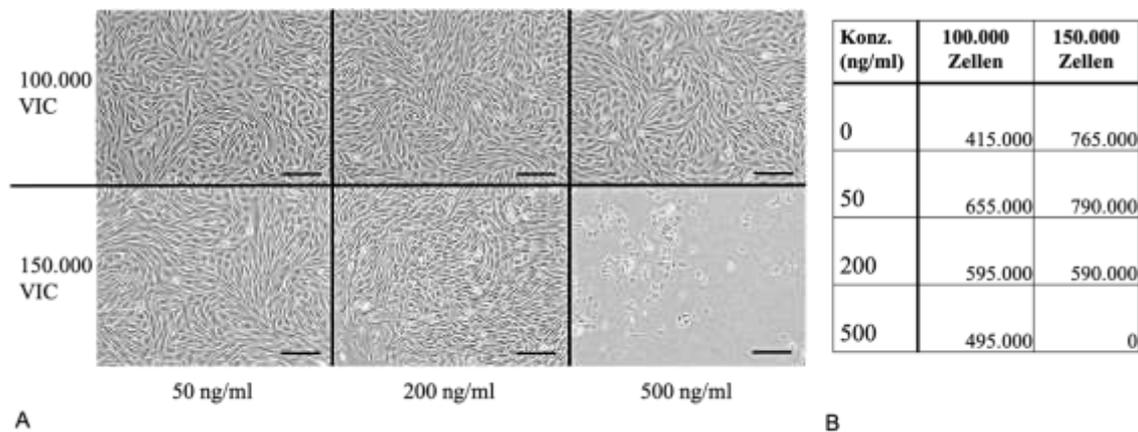


Abb. 13 Vorversuche zur Kultivierung von VIC unter Stimulation mit Decorin. In A sind exemplarische fotografische Aufnahmen von VIC am Tag der Ernte nach Stimulation mit drei verschiedenen Konzentrationen von Decorin dargestellt. Gegenübergestellt sind zwei Zellzahlen bei der Aussaat. Zum Zeitpunkt der Ernte zeigt sich nach Stimulation mit Decorin (B) eine Abnahme der Zellzahl mit steigender Decorin Konzentration. Maßstab = 200µm.

Bei der Begutachtung der kultivierten VIC nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Decorin fallen keine deutlichen morphologischen Unterschiede auf (Abb. 13). Die Zellzahlen

am Tag der Ernte zeigen, dass bei Stimulation mit Decorin in aufsteigender Reihenfolge der Konzentrationen zu geringeren Zellzahlen führte. Dies war sowohl bei initialen Zellzahlen von 100.000 sowie 150.000 VIC zu beobachten. Unter Stimulation mit 500 ng/ml Decorin kam es bei 150.000 VIC Aussaat zum ausgedehnten Vitalitäts- bzw. Adhäsionsverlust der VIC. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte die Konzentrationen mit 50 ng/ml Decorin bei beiden Zellzahlen zu einer gesteigerten Anzahl an VIC am Tag der Ernte. Dies trat bei 200 ng/ml lediglich bei der Aussaat von 100.000 VIC auf. Nach Evaluation der morphologischen Effekte und um einen potenziell toxischen Einfluss zu vermeiden und etwaige proliferative Aspekte zu integrieren, wurden die beiden niedrigeren Konzentrationen für den Hauptversuch mit Decorin ausgewählt und im Folgenden als dec1 (50 ng/ml) und dec2 (200 ng/ml) bezeichnet.

4.2 Die Wirkung von Activin A im 2D-Modell

In einem klassischen 2D-*in vitro*-Modell wurde der Effekt von Activin A auf VIC untersucht.

4.2.1 Morphologie der VIC

Im Hauptversuch wurden je 125.000 ov. VIC (n = 6) über vier Tage kultiviert. Die Stimulation mit Activin A in zwei Konzentrationen (act1: 50 ng/ml; act2: 100 ng/ml) wurde sowohl in Normalmedium als auch in pro-kalzifizierendem Medium durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthält eine Kontrolle ohne Stimulation mit Activin A. Die Kultur der VIC wurde fotografisch mittels Auflichtmikroskops dokumentiert. In Abb. 14 sind repräsentative Photographien der kultivierten VIC in allen Bedingungen exemplarisch für ein Individuum dargestellt.

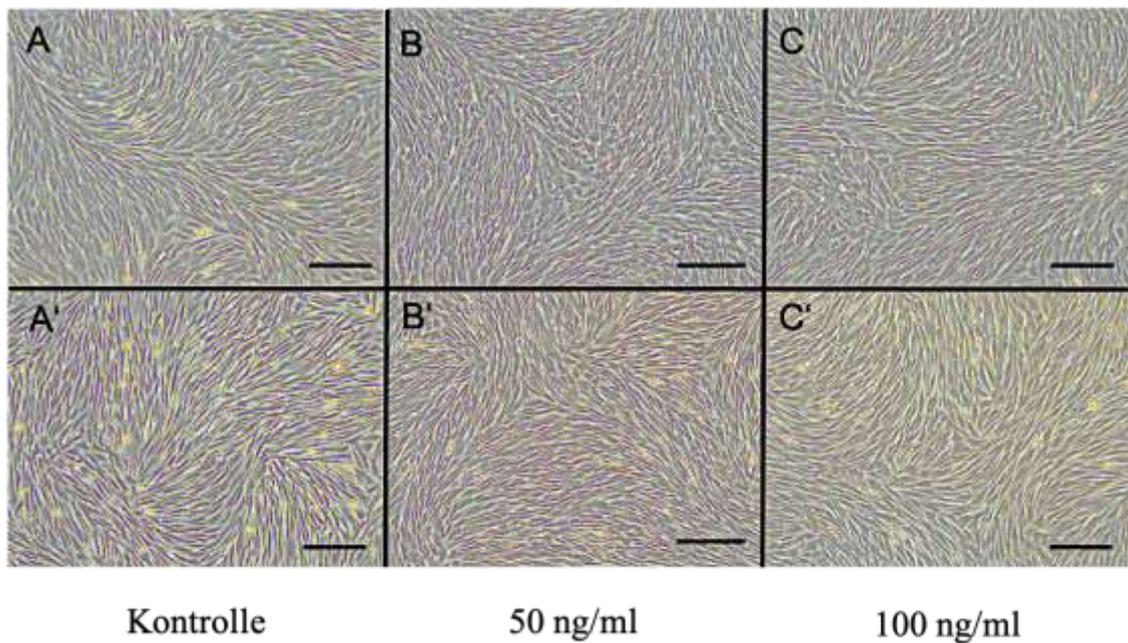


Abb. 14 Stimulation von VIC unter pro-kalzifizierenden Bedingungen mit Activin A. Fotografisch dargestellt sind VIC aller Behandlungsgruppen eines repräsentativen Individuums am Tag der Ernte. Die Kultivierung von VIC erfolgte über vier Tage unter Normal- bzw. pro-kalzifizierenden Bedingungen bei Stimulation mit Activin A in je zwei Konzentrationen plus Kontrollgruppe. Morphologisch sind keine prägnanten Unterschiede zu erkennen. Legende: A/A' = unbehandelt/ calci, B/B' = act1/ act1+c, C/C' = act2/ act2+c. Abkürzungen: VIC = valvuläre Interstitialzellen. Maßstab: 200 μ m.

4.2.2 Analyse chondro-osteogener Marker im 2D-Modell

Die RT-PCR-Analyse wurde bezüglich Regulation chondro-osteogener Marker in VIC nach Activin A-Stimulation durchgeführt. Alle Bedingungen eines biologischen Replikates wurden dabei auf die jeweilige eigene unbehandelte Kontrolle (n = 6) normiert. Es wurden die Gene *Coll1A1*, *MMP2*, *TGF-β* und *OPN* als Indikatoren für EZM-Umbau, Fibrosierung sowie osteogener Differenzierung ausgewertet.

Coll1A1

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 15A; Kruskal-Wallis Anova p = 0,0842). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 15B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 15C) konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden. Durch Activin A-Behandlung wurde *Coll1A1* bei beiden Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter Normalbedingungen signifikant hochreguliert (unbehandelt vs. act1: p = 0,0828 Dunn's post-hoc; p = 0,0476 Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: p = 0,0177 Dunn's post-hoc; p = 0,0022 Mann-Whitney U).

Beide Konzentrationen von Activin A führten zu einer signifikanten Hochregulation der Expression von *Coll1A1* im Vergleich zur Kontrolle unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (calci vs. act1+c: p = 0,3306 Dunn's post-hoc; p = 0,0476 Mann-Whitney U; calci vs. act2+c: p = 0,5056 Dunn's post-hoc; p = 0,0022 Mann-Whitney U). Für die Expression von *Coll1A1* nach Stimulation mit Activin A war sowohl unter Normal- als auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen keine signifikante Dosisabhängigkeit nachweisbar (act1 vs. act2: p > 0,999 Dunn's post-hoc; p > 0,999 Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: p > 0,999 Dunn's post-hoc; p > 0,999 Mann-Whitney U).

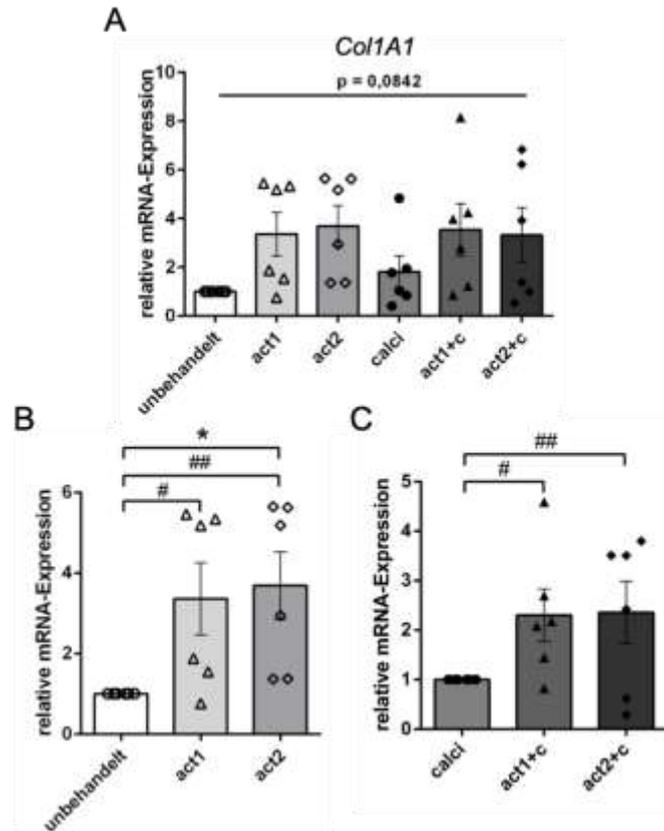


Abb. 15 Expression von Kollagen Typ 1 (Col1A1) nach Stimulation mit Activin A in VIC im 2D-Modell. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 6$). Die Expression von Col1A1 nach Stimulation mit Activin A ist in Bezug zur Kontrollgruppe sowohl unter Normalbedingungen (B) als auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) in beiden Konzentrationen signifikant erhöht. Abkürzungen: *: p -Wert < 0.05 Dunn's post-hoc. #: p -Wert < 0.05 , ##: p -Wert < 0.01 Mann-Whitney U. act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

MMP2

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich im Trend Unterschiede in der Expression (Abb. 16A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,060$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 16B) konnten ebenso Unterschiede beobachtet werden. Die Stimulation mit Activin A führte hier zu einer signifikanten Hochregulation von MMP2 bei act1 (unbehandelt vs. act1: $p = 0,3691$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U). Bei act2 kam es zu keinem signifikanten Unterschied (unbehandelt vs. act2: $p = 0,4564$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 16C) wurden keine signifikante Veränderung im Expressionsverhalten zwischen Kontrollgruppe und Activin A-Behandlung beobachtet (act1+c: $p > 0,999$, Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; act2+c: $p = 0,6769$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U). Zwischen den beiden applizierten Konzentrationen Activin A

konnte kein signifikanter Unterschied der Expression festgestellt werden (act1 vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; act1+c zu act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U).

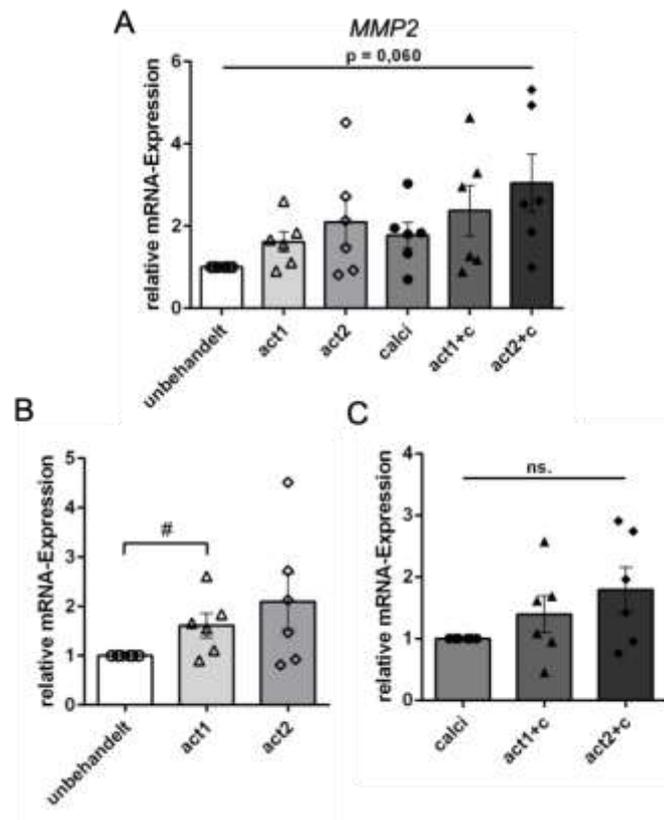


Abb. 16 Expression von Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2) nach Stimulation mit Activin A in VIC im 2D-Modell. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen für sechs Individuen ($n = 6$) zu RLP29. Die Expression von MMP2 ist für act1 (B) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) kann in beiden Konzentrationen keine signifikante Regulation der MMP2-Expression durch Stimulation mit Activin A beobachtet werden. #: p -Wert < 0.05 Mann-Whitney U. Abkürzungen: act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

TGF- β

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine Unterschiede in der Expression (Abb. 17A; Krsukal-Wallis Anova $p = 0,0976$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 17B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 17C) konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden. Hier stellt sich eine signifikante Regulation der Expression von TGF- β dar: Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist TGF- β unter Normalbedingungen in beiden Konzentrationen mit Activin A erhöht exprimiert (unbehandelt vs. act1: $p = 0,4110$ Dunn's post-

hoc Test, $p = 0,0476$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p = 0,0396$ Dunn's post-hoc Test, $p = 0,0476$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zeigt sich für act1+c keine signifikante Steigerung der Expression (calci vs. act1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U). Die Stimulation mit act2+c führt zu einer signifikant erhöhten Expression von *TGF- β* (calci vs. act2+c: $p = 0,0339$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0022$ Mann-Whitney U). Es wurde zudem eine signifikant höhere Expression von *TGF- β* bei act2 zu act1 bzw. act2+c im Vergleich zu act1+c detektiert (act1 vs. act2: $p = 0,9645$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0476$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p = 0,1091$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0022$ Mann-Whitney U).

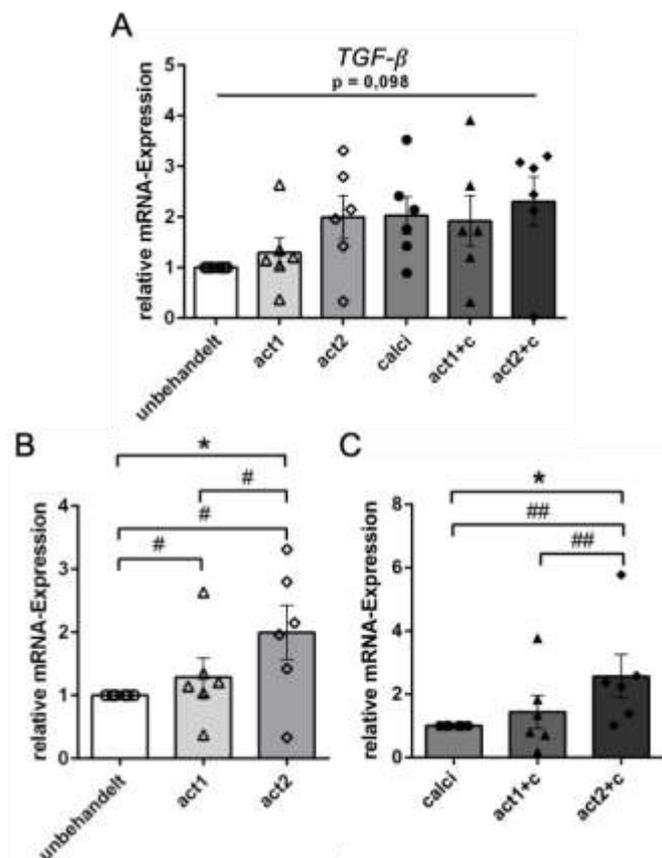


Abb. 17 Expression von Transforming growth factor beta (*TGF- β*) nach Stimulation mit Activin A in VIC im 2D-Modell. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen für sechs Individuen ($n = 6$) zu RLP29. Die Expression von *TGF- β* ist nach Stimulation mit Activin A unter Normalbedingungen (B) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in beiden Konzentrationen signifikant erhöht. Die *TGF- β* -Expression ist bei act2 signifikant höher als bei act1. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) zeigt act2+c eine signifikante Erhöhung der *TGF- β* -Expression. Eine dosisabhängige Expression zeigt sich zudem zwischen act1+c und act2+c (C). *: p -Wert $< 0,05$ Kruskal-Wallis. #: p -Wert $< 0,05$, ##: p -Wert $< 0,01$ Mann-Whitney U. Abkürzungen: act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

OPN

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine Unterschiede in der Expression (Abb. 18A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,1072$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 18B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 18C) konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden. Unter Normalbedingungen zeigte sich unter Stimulation mit Activin A eine signifikante Steigerung der Expression von *OPN* bei act1 (unbehandelt vs. act1: $p = 0,1422$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U). Auch act2 führte zur erhöhten Expression von *OPN* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. act2: $p = 0,0088$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0022$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zeigte sich keine signifikante Veränderung bei act1+c (calci vs. act1+c: $p = 0,8860$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U). Die Stimulation mit Activin A in höherer Konzentration führte zu einer höheren Expression als in der Kontrollgruppe (calci vs. act2+c: $p = 0,1617$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U). Eine Dosisabhängigkeit war nicht signifikant nachweisbar (act1 vs. act2: $p = 0,9645$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U).

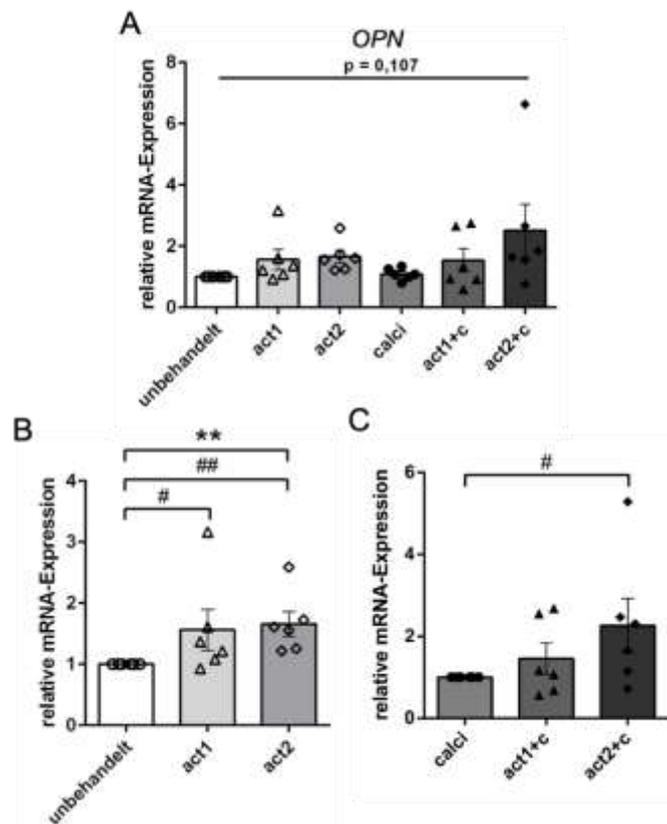


Abb. 18 Expression von Osteopontin (*OPN*) in VIC nach Stimulation mit Activin A im 2-Modell. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen für sechs Individuen ($n = 6$) zum Housekeeper.

Die Expression von OPN nach Stimulation mit Activin A ist in Bezug zur unbehandelten Kontrolle unter Normalbedingungen (B) in beiden Konzentrationen signifikant erhöht. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) zeigt sich eine erhöhte Expression von OPN bei act2+c im Vergleich zu calci. **: p-Wert < 0.01 Kruskal-Wallis. #: p-Wert < 0.05, ##: p-Wert < 0.01 Mann-Whitney U. Abkürzungen: act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

Westernblot-Analyse für Osteopontin

Im Westernblot wurde die Expression von OPN auf Proteinebene detektiert und auf das HK-Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bezogen. OPN wurde dabei als Marker für osteogene Differenzierung verwendet.

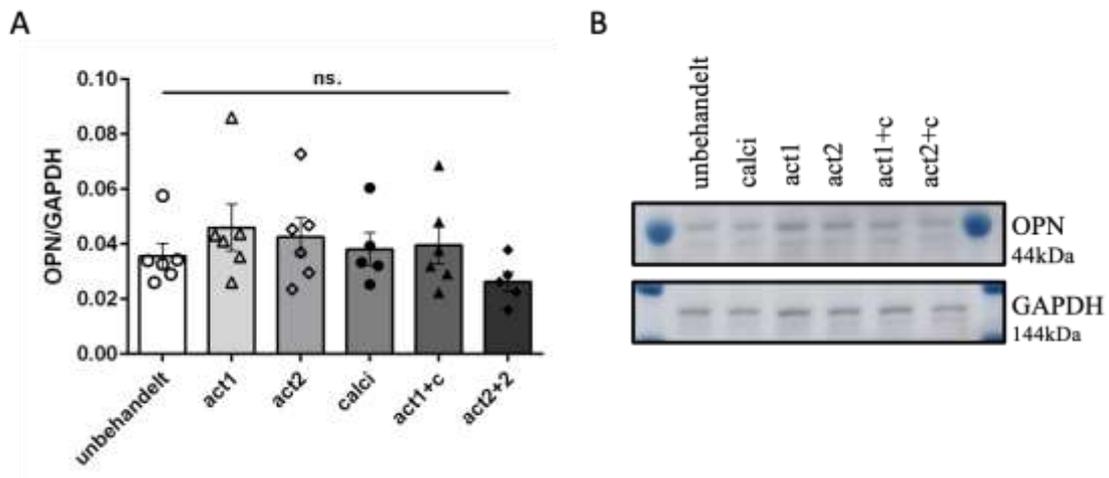


Abb. 19 Relative Proteinlevel von Osteopontin (OPN) nach Stimulation von VIC mit Activin A. Die Proteinlevel von Osteopontin wurden im Westernblot für sechs Individuen ($n = 6$) im Verhältnis zum Housekeeper GAPDH betrachtet. Die Behandlung mit Activin A führt weder unter Normalbedingungen noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zu signifikant veränderten Proteinleveln (A). Exemplarisch sind Proteinbanden mit Referenzen für die verschiedenen Behandlungen aufgeführt (B). ns.: nicht signifikant; U. Abkürzungen: act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine Unterschiede in der Expression (Abb. 19A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,2809$). Unter Normalbedingungen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expression von OPN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. act1: $p = 0,6408$ Dunn's post-hoc, $p = 0,1797$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p = 0,9127$ Dunn's post-hoc; $p = 0,4848$ Mann-Whitney U).

Auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen unter Activin A-Stimulation in VIC (calci vs. act1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,9307$ Mann-Whitney U; calci vs. act2+c: $p = 0,3327$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1508$ Mann-Whitney U). Weder unter Normal- noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurde eine signifikante Dosisabhängigkeit für Activin A beobachtet (act1 vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p = 0,4166$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1775$ Mann-Whitney U).

4.2.3 Analyse inflammatorischer Marker

NF- κ B-Phosphorylierungsraten wurden als Indikator für NF- κ B-vermittelte Inflammation betrachtet. Mittels Westernblot-Analyse wurden Proteinlevel von NF- κ B in ov. VIC nach Stimulation mit Activin A unter pro-inflammatorischen Stimuli mit TNF- α und unter Normalbedingungen durchgeführt. Es wurden fünf Individuen betrachtet ($n = 5$). Für beide Bedingungen gab es je eine Kontrollgruppe (unbehandelt/TNF- α). Activin A wurde je in zwei Konzentrationen über 24 h appliziert (act1: 50 ng/ml; act2: 100 ng/ml). Die Phosphorylierung als Aktivierungsmarker (pNF- κ B) wurde detektiert und auf die Proteinmenge von NF- κ B normiert. NF- κ B und pNF- κ B wurden dabei in Relation zum HK-Protein β -Aktin betrachtet. TNF- α stellt die Positivkontrolle für die Expression von NF- κ B dar.

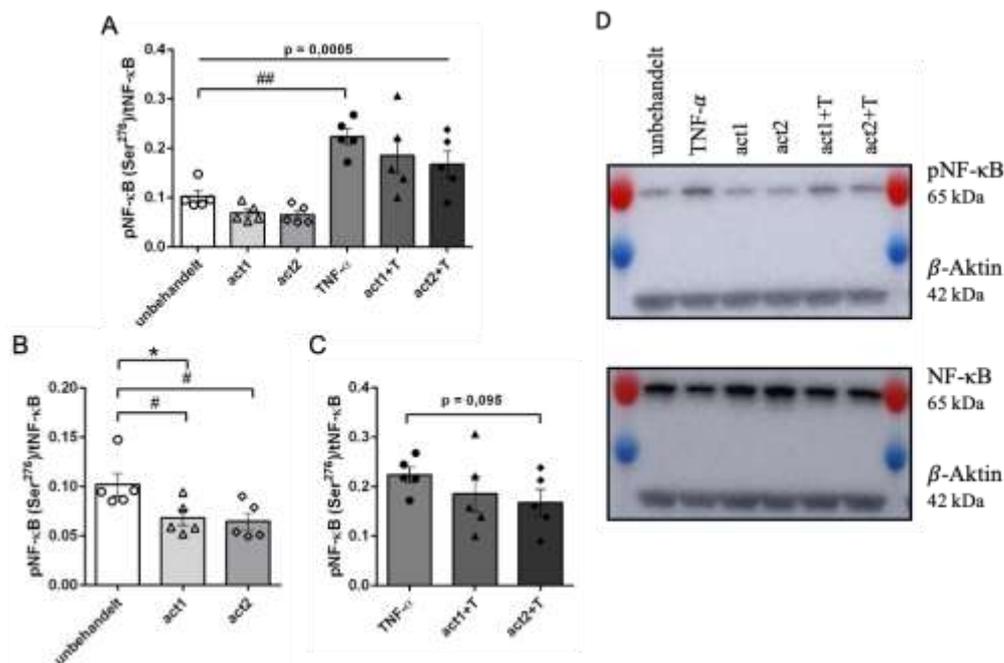


Abb. 20 Phosphorylierungsrate für NF- κ B in ovinen VIC nach Stimulation mit Activin A im 2D-Modell. Die Phosphorylierung von NF- κ B wurde im Westernblot für fünf Individuen ($n = 5$) detektiert und auf den Housekeeper β -Aktin bezogen (A). Die Applikation von Activin A führt unter Normalbedingungen (B) zur

verminderten Phosphorylierung von NF- κ B. Unter pro-inflammatorischen Bedingungen ist dieser Trend nicht signifikant (C). Exemplarisch sind Proteinbanden mit Referenzen für die verschiedenen Behandlungen aufgeführt (D). *: p-Wert < 0.05, #: p-Wert < 0.05, ##: p-Wert < 0.01 Mann-Whitney U. Abkürzungen: act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, T = TNF- α , HK = Housekeeper, kDa = KiloDalton, p = phospho-.

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich Unterschiede in der Expression (Abb. 20A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,0005$). Die Proteinmenge von pNF- κ B in Bezug auf NF- κ B zeigt unter Stimulation mit TNF- α eine signifikante Steigerung ($p = 0,0079$ Mann-Whitney U). Auch unter Stimulation mit Activin A kam es zu signifikanten Unterschieden (Abb. 20). Hier zeigt sich eine verminderte Expression von pNF- κ B bei act1 und act2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. act1: $p = 0,0400$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0317$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p = 0,1431$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0317$ Mann-Whitney U).

Unter pro-inflammatorischen Stimuli führt die Applikation von Activin A nicht zu einer signifikanten Veränderung, jedoch zeigt die Behandlung mit act2+T den Trend zu einer verminderten Phosphorylierung von NF- κ B (TNF- α vs. act1+T: $p = 0,7737$ Dunn's post-hoc; $p = 0,4206$ Mann-Whitney U; TNF- α vs. act2+T: $p = 0,3116$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0952$ Mann-Whitney U)

Weder unter Normal- noch unter pro-inflammatorischen Bedingungen wurde eine signifikante Dosisabhängigkeit für Activin A beobachtet (act1 vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1270$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6825$ Mann-Whitney U).

4.2.4 Analyse der Kalzium-Akkumulation im 2D-Modell

Die Akkumulation von Kalzium unter Activin A-Behandlung wurde als Hinweis auf pro-kalzifizierende Prozesse in $n = 6$ biologischen Replikaten gemessen. Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich zunächst Unterschiede im Kalziumgehalt (Abb. 21A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,0005$).

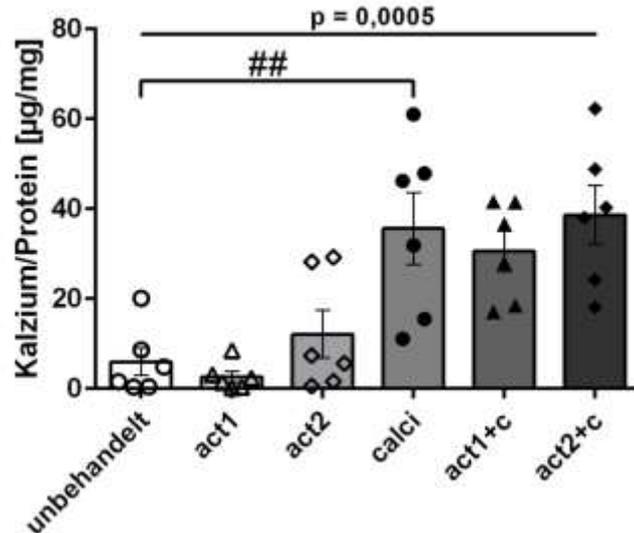


Abb. 21 Kalzium-Akkumulation in VIC nach Applikation von Activin A im 2D-Modell. Die Kultivierung in pro-kalzifizierendem Medium (calci; act1+c; act2+c) führt zu einer erhöhten Kalzium-Akkumulation im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelt). Die Stimulation mit Activin A führt unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Veränderung des Kalziumgehaltes in den VIC. Abkürzungen: ##: p -Wert < 0.01 Mann-Whitney U, act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

In den beschriebenen Bedingungen konnte zwar eine Zunahme der Kalzium-Akkumulation in pro-kalzifizierendem Medium im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektiert werden (unbehandelt vs. calci: $p = 0,1001$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0087$ Mann-Whitney U), jedoch zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Kalzium-Akkumulation nach Stimulation mit Activin A (unbehandelt vs. act1: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,4848$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p = 0,9912$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3095$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zeigte sich im Zweigruppenvergleich ein signifikant erhöhter Kalziumgehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. calci: $p = 0,1001$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0087$ Mann-Whitney U). Für die Stimulation mit Activin A wurden keine signifikanten Unterschiede im Kalziumgehalt detektiert (calci vs. act1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6991$ Mann-Whitney U; calci vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6991$ Mann-Whitney U). Auch eine Dosisabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden (act1 vs. act2: $p = 0,3143$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1797$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,4848$ Mann-Whitney U).

4.3 Die Wirkung von Activin A im 3D-Modell

Um potenzielle Aktivierungs- oder Transformationsmechanismen der VIC in ihrem physiologischen Milieu im Gewebe nachvollziehen zu können und den Daten aus dem *in vitro*-2D-Modell gegenüber stellen zu können, wurden experimentelle Verfahren in einem 3D-Modell mit ov. Klappen-Explantaten angewendet. In diesem Versuchsaufbau wurden die VIC analog zum Modell mit Activin A unter pro-kalzifizierenden Bedingungen stimuliert.

4.3.1 Histologische Färbungen

Die Färbung ov. Aortenklappen (n = 3) erfolgte zur Analyse potenzieller struktureller Modulation der Klappenarchitektur nach Stimulation mit Activin A. Die Auswertung der Präparate mittels mikroskopischer Begutachtung wurde deskriptiv anhand gängiger Merkmale durchgeführt. Es wurden die Färbungen Hämatoxylin-Eosin-Fuchsin (HE), Movat-Pentachrom (MP) sowie Von Kossa (VK) durchgeführt.

Übersichtsdarstellungen mit HE und Movat-Pentachrom

Durch die Übersichtsfärbungen werden die drei Schichten der Aortenklappe histologisch nachvollziehbar. In Tabelle sind exemplarisch Übersichtsaufnahmen aufgeführt. In der MP-Färbung stellen sich Kollagene und retikuläres Bindegewebe gelb dar, wodurch die kollagenreiche Fibrosa deutlich abgrenzbar wird. In dieser Schicht beginnt meist die Mineralisierung in der DAVD und breitet sich über das restliche Gewebe aus (32), (33). Elastische Fasern und Kerne sind schwarz angefärbt und finden sich vorrangig in der Ventrikularis. GAG sind blau-grünlich und Fibrin rot angefärbt.

In der Färbung mit HE sind alle basischen Bestandteile durch Eosin rot zu sehen, v.a. dicht gepackte Kollagene in der Fibrosa. Hämalaun färbt saure Strukturen blau, darunter Zellkerne mit DNA.

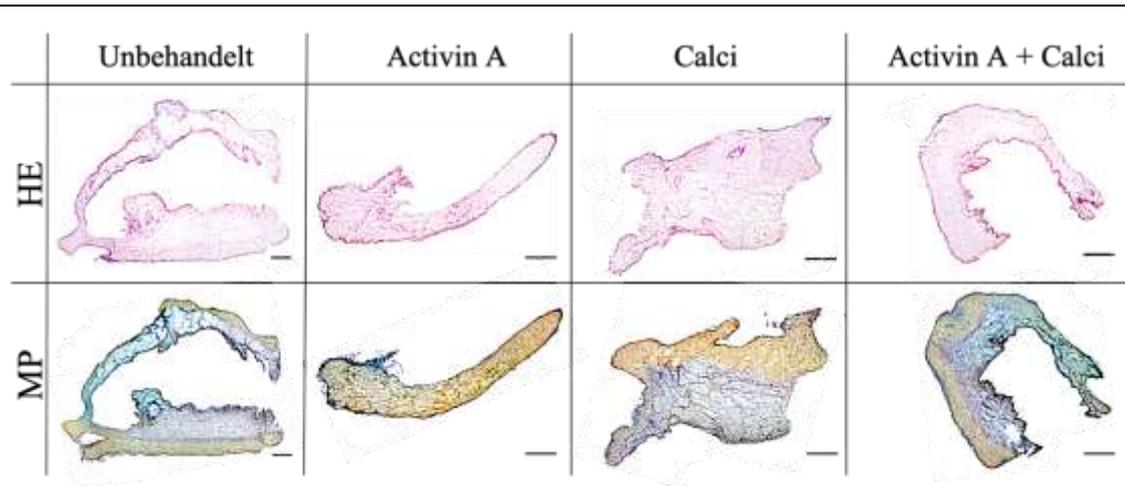


Tabelle 3 Histologie oviner Aortenklappen unter Einfluss von Activin A. Repräsentativ dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen oviner Aortenklappen. Die Präparate unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (calci) und unter Stimulation mit Activin A wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Fuchsin (HE) und Movat-Pentachrom (MP) gefärbt. Maßstab: 400 μ m. Vergrößerung: 5-fach.

Durch die Stimulation mit Activin A waren weder in den HE-Färbungen noch in den MP-Präparaten deutliche Unterschiede im histologischen Aufbau der Klappenarchitektur erkennbar. Etwaige Kalzifizierungsprozesse waren in den Übersichtsaufnahmen auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen nicht deutlich erkennbar.

Kalzifizierung

Die Färbung mit Von Kossa wurde zum Nachweis von Kalzium-Ablagerungen im Gewebe durchgeführt. Durch Reduktion in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung werden schwarzbraune Ablagerungen sichtbar, die einen Hinweis auf Kalzifizierungsprozesse liefern.

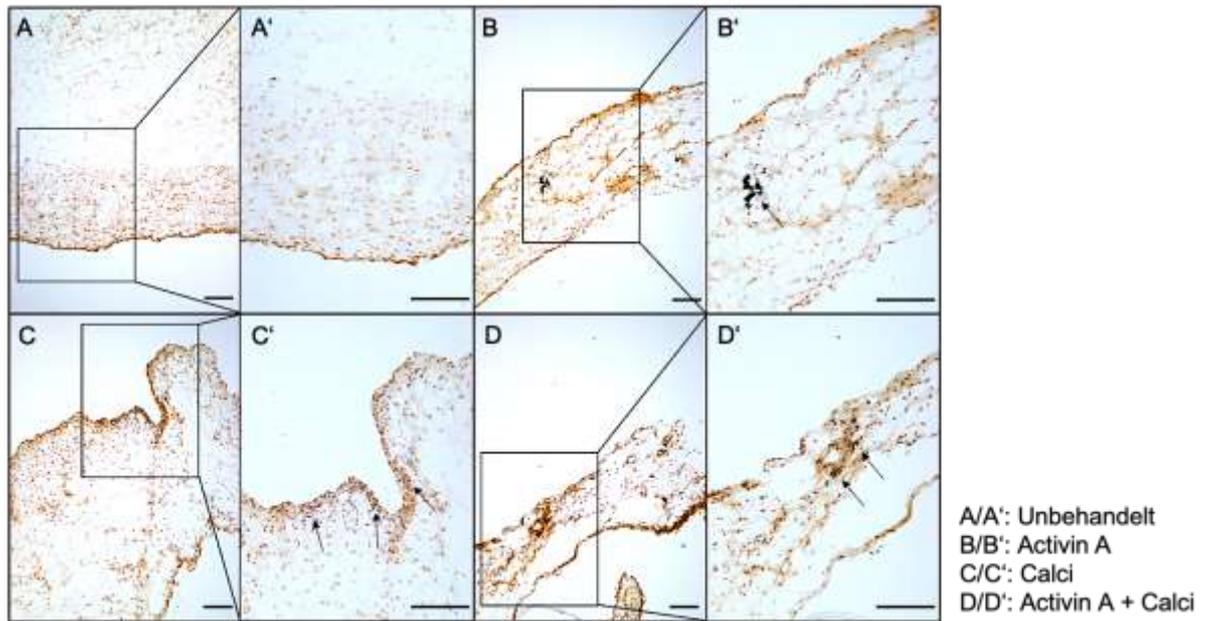


Tabelle 4 Histologischer Nachweis von Kalzium-Ablagerungen unter Einfluss von Activin A. Die Tabelle zeigt exemplarisch nach Von Kossa-gefärbte ovine Aortenklappen. Die Präparate wurden zuvor unter pro-kalzifizierenden Bedingungen und mit Activin A stimuliert. Gegenübergestellt sind mikroskopische Durchlicht-Aufnahmen in 5-fach- (A, B, C, D) und in 10-fach-Vergrößerung (A', B', C', D'). Maßstab: 200 μm .

Die exemplarischen Aufnahmen in Tabelle zeigen, dass durch die Kultur in pro-kalzifizierendem Medium deutliche Kalziumablagerungen sichtbar waren, augenscheinlich vermehrt als in der unbehandelten Kontrolle (A vs. C; A vs. D). Durch die Applikation mit Activin A war in dem hier gezeigten Exemplar ebenfalls eine vermehrte Kalziumablagerung sichtbar (B u. D). Dieser Effekt ließ sich nicht in den restlichen Individuen beobachten und zeigt unter Normalbedingungen eine außergewöhnliche Akkumulation, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass es sich hier um ein Artefakt halten könnte. V. a. die Stimulation mit Activin A unter pro-kalzifizierenden Bedingungen führte jedoch augenscheinlich zu einer stärker ausgeprägten flächendeckenden Kalzium-Ablagerung als unter Normalbedingungen. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zeigen sich Kalzium-Ablagerungen hier v.a. in Endothel-nahen Bereichen der Fibrosa.

4.3.2 Analyse chondro-osteogener Marker im 3D-Modell

Die Regulation chondro-osteogener Marker nach Activin A-Stimulation in VIC im 3D-Modell wurde analog zum 2D-Modell analysiert (siehe 4.2.2). Die Anzahl der untersuchten Individuen betrug sieben ($n = 7$). Es wurden die Gene *Coll1A1*, *MMP2*, *TGF- β* und *OPN* getestet.

Coll1A1

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 22A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,5615$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 22B) konnten ebenfalls keine Unterschiede durch Activin A im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (unbehandelt vs. act1: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,690$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,690$ Mann-Whitney U)

Auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 22C) wurden keine Unterschiede beobachtet (calci vs. act1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,690$ Mann-Whitney U; calci vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,690$ Mann-Whitney U). Eine Dosisabhängigkeit konnte zwar nicht unter Normalbedingungen, allerdings unter pro-kalzifizierenden Bedingungen festgestellt werden (act1 vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1801$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0169$ Mann-Whitney U).

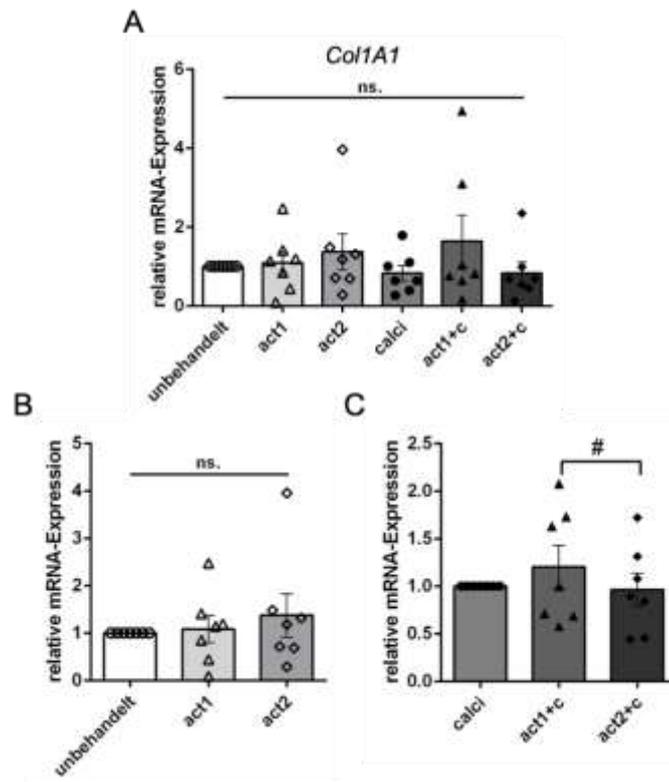


Abb. 22 Expression von Kollagen Typ 1 (Col1A1) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Activin A. Dargestellt (A) wird die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 7$). Die Expression von Col1A1 ist nach Stimulation mit Activin A weder unter Normalbedingungen (B) noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) im 3D-Modell für VIC signifikant verändert. Abkürzungen: ns. = nicht signifikant, act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

MMP2

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 23A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,6920$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 23B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 23C) konnten ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden.

Es stellte sich im 3D-Modell unter Stimulation mit Activin A keine signifikante Veränderung der Expression von *MMP2* in VIC unter Normalbedingungen dar (unbehandelt vs. act1: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U).

Die Expression von *MMP2* unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurde durch die Applikation von Activin A nicht signifikant verändert (calci vs. act1+c: $p = 0,6157$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1801$ Mann-Whitney U; calci vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U). Dosisabhängige Veränderungen waren unter Normalbedingungen signifikant nachweisbar, unter pro-kalzifizierenden jedoch nicht (act1 vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0169$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U).

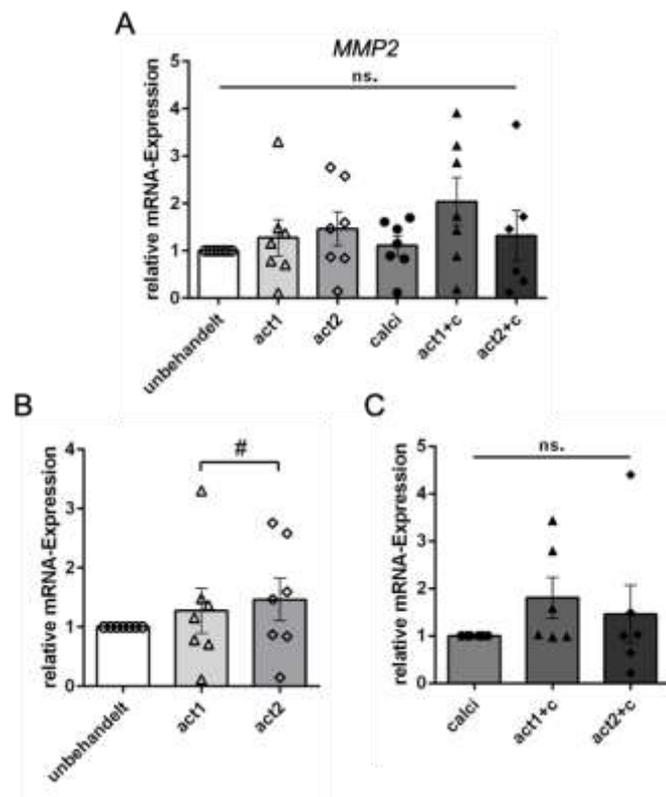


Abb. 23 Expression von Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Activin A. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen für sieben Individuen ($n = 7$) zu RLP29 (A). *MMP2* ist nach Stimulation mit Activin A weder unter Normalbedingungen (B) noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) im 3D-Modell signifikant

reguliert. Abkürzungen: ns. = nicht signifikant. act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

TGF- β

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Abb. 24A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,0236$). Auch bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 24B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 24C) konnten Unterschiede beobachtet werden. Dabei zeigten sowohl act1 als auch act2 eine signifikante Hochregulation der Expression von *TGF- β* unter Normalbedingungen (unbehandelt vs. act1: $p = 0,0847$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0169$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p = 0,0474$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0169$ Mann Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen konnte ebenfalls sowohl bei act1+c (calci vs. act1+c: $p = 0,0371$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0169$ Mann-Whitney U) als auch bei act2+c (calci vs. act2+c: $p = 0,1056$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0169$ Mann-Whitney U) eine signifikante Hochregulation der Expression von *TGF- β* beobachtet werden. Unter Normalbedingungen wurde keine Dosisabhängigkeit für Activin A detektiert, während sich unter pro-kalzifizierenden Bedingungen Unterschiede zeigen (act1 vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0169$ Mann-Whitney U).

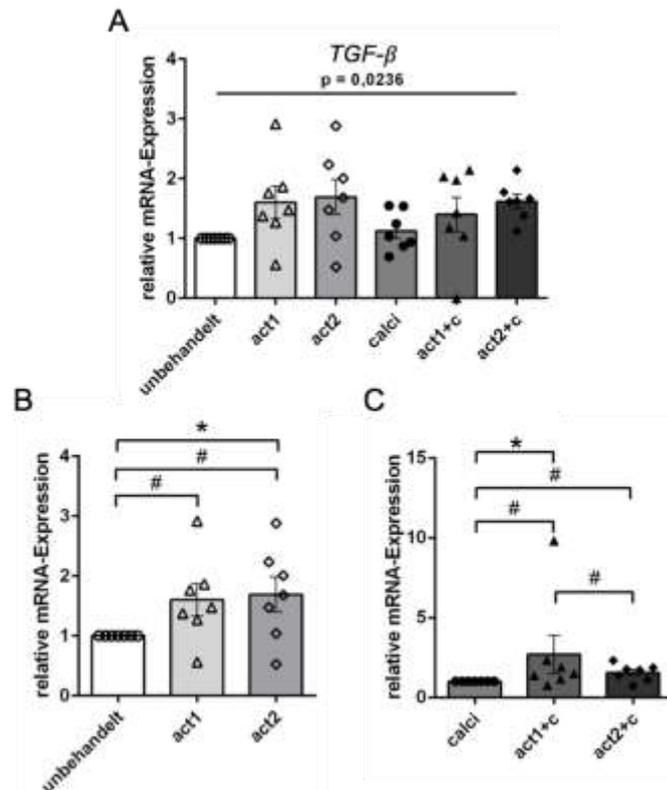


Abb. 24 Expression von Transforming growth factor beta (TGF- β) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Activin A. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen für sieben Individuen ($n = 7$) zu RLP29 (A). Die Expression von TGF- β ist nach Stimulation mit Activin A unter Normalbedingungen (B) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in beiden Konzentrationen signifikant erhöht. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) zeigen act1+c sowie act2+c ebenfalls eine signifikante Erhöhung der TGF- β -Expression. *: p -Wert < 0.05 Kruskal-Wallis. #: p -Wert < 0.05 Mann-Whitney U. Abkürzungen: act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

OPN

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 25A: Kruskal-Wallis Anova $p = 0,285$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 25B) konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden. Unter Normalbedingungen zeigte sich für act1 keine signifikant veränderte Genexpression von OPN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. act1: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U), während bei act2 die Expression signifikant niedriger war (unbehandelt vs. act2: $p = 0,1606$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0169$ Mann-Whitney).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 25C) zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Expression von OPN unter Activin A Stimulation in VIC (calci vs. act1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U; calci vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-

hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U). Weder unter Normal- noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurde eine signifikante Dosisabhängigkeit für Activin A beobachtet (act1 vs. act2: $p = 0,8180$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1801$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U).

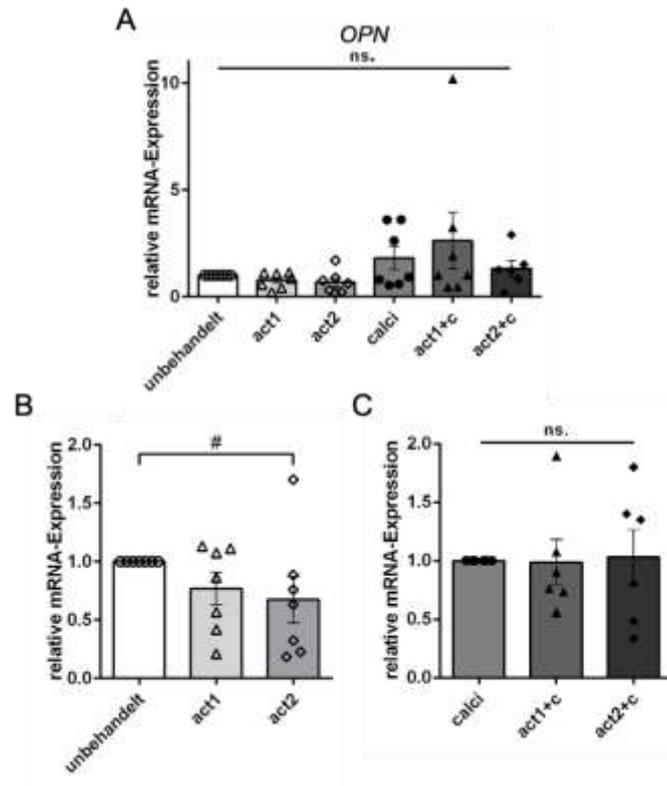


Abb. 25 Expression von Osteopontin (OPN) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Activin A. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen für sieben Individuen ($n = 7$) zu RLP29 (A). Die Expression von OPN nach Stimulation mit Activin A ist in Bezug zur unbehandelten Kontrolle unter Normalbedingungen (B) für act1 signifikant verringert. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) zeigt sich keine veränderte Expression von OPN nach Stimulation mit Activin A. #: p -Wert $< 0,05$ Mann-Whitney U. Abkürzungen: ns. = nicht signifikant, act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

4.3.3 Analyse der Kalzium-Akkumulation im 3D-Modell

Die Akkumulation von Kalzium als Hinweis auf pro-kalzifizierende Prozesse wurde für fünf biologische Replikate gemessen ($n = 5$). Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Kalziumgehalt (Abb. 26A: $p = 0,4273$ Kruskal-Wallis). Es konnte keine Zunahme der Kalzium-Akkumulation in der Gruppe mit pro-kalzifizierendem Medium im Vergleich zu Normalbedingungen detektiert werden (unbehandelt vs. calci: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,1508$ Mann-Whitney U). Unter Normalbedingungen zeigten beide

Konzentrationen Activin A keine Auswirkung auf den Kalziumgehalt in den VIC (unbehandelt vs. act1: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,8413$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,8413$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Kalziumgehalt detektiert (calci vs. act1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,5476$ Mann-Whitney U; calci vs. act2+c: $p = 0,3116$ Dunn's post-hoc; $p = 0,2222$ Mann-Whitney U). Auch eine Dosisabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden (act1 vs. act2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U; act1+c vs. act2+c: $p = 0,7737$ Dunn's post-hoc; $p = 0,2222$ Mann-Whitney U).

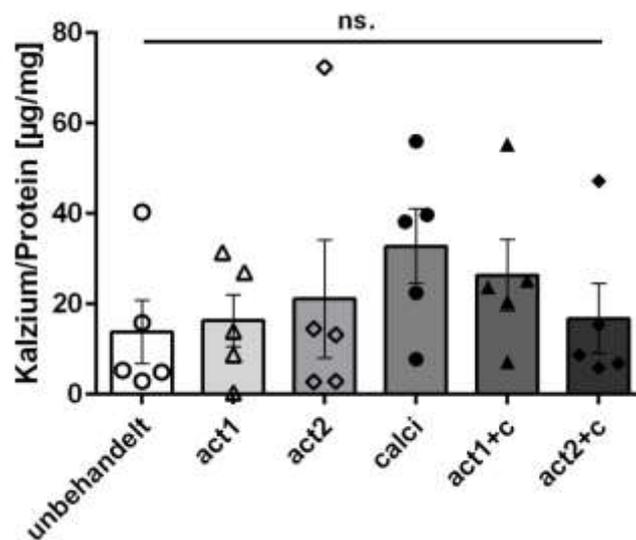


Abb. 26 Kalzium-Akkumulation in VIC mit Activin A im 3D-Modell. Die Stimulation mit Activin A führt im 3D-Modell unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Veränderung des Kalziumgehaltes in den VIC. Abkürzungen: ns. = nicht signifikant, act1 = 50 ng/ml Activin A, act2 = 100 ng/ml Activin A, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

4.4 Die Wirkung von Decorin im 2D-Modell

In einem klassischen 2D-*in vitro*-Modell wurde der Effekt von Decorin auf VIC untersucht.

4.4.1 Morphologie der VIC

Analog zu Activin A wurden im Hauptversuch mit Decorin je 125.000 ovine VIC von sechs verschiedenen Individuen ($n = 6$) über vier Tage kultiviert (siehe 4.2.1). Die Stimulation mit Decorin in zwei Konzentrationen (dec1: 50 ng/ml; dec2: 200 ng/ml) wurde sowohl in Normalmedium als auch in pro-kalzifizierendem Medium durchgeführt. Jedes Medium führte eine Kontrolle mit (unbehandelt/calci). Die Kultur der VIC wurde photographisch mittels Auflichtmikroskops dokumentiert. In Abb. 27 sind repräsentative Photographien der kultivierten VIC in allen Bedingungen exemplarisch für ein Individuum dargestellt.

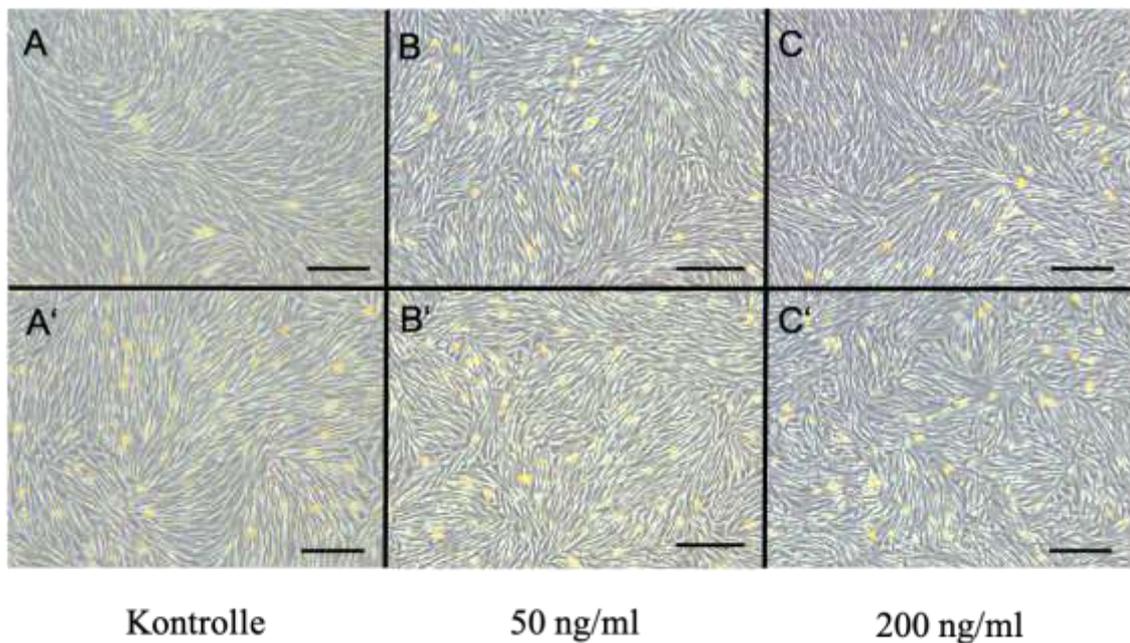


Abb. 27 Stimulation von VIC unter pro-kalzifizierenden Bedingungen mit Decorin. Photographisch dargestellt sind VIC aller Behandlungsgruppen eines repräsentativen Individuums am Tag der Ernte. Die Kultivierung von VIC erfolgte über vier Tage unter Normal- bzw. pro-kalzifizierenden Bedingungen bei Stimulation mit Decorin in je zwei Konzentrationen plus Kontrollgruppe. Morphologisch sind keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen. Legende: A/A' = unbehandelt/ calci, B/B' = dec1/ dec1+c, C/C' = dec2/ dec2+c. Abkürzungen: VIC = valvuläre Interstitialzellen. Maßstab: 200 μ m.

4.4.2 Analyse chondro-osteogener Marker im 2D-Modell

Chondro-osteogener Marker wurden mittels RT-PCR zur Beurteilung des Einflusses von Decorin auf Degeneration und EZM-Umbau in VIC analysiert. Die Expression der Ziel-Gene wurde dabei auf die Expression des HK-Gens *RPL29* normiert. Die erhobenen Daten entsprechen sechs Individuen (n = 6). Es wurden die Gene *Coll1A1*, *MMP2*, *TGF- β* und *OPN* getestet.

Coll1A1

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 28A; Kuskal-Wallis Anova $p = 0,4015$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 28B) konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 28C) waren keine Unterschiede sichtbar. Die Stimulation mit Decorin führte unter Normalbedingungen zu einer signifikant höheren Expression von *Coll1A1* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,0396$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0022$ Mann-Whitney U). Dec2 zeigte keine signifikante Veränderung der Expression zur Kontrolle (unbehandelt vs. dec2: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,9999$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurde keine signifikante Veränderung im Expressionsverhalten nach Stimulation mit Decorin detektiert (calci vs. dec1+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,9999$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,9999$ Mann-Whitney U). Eine Dosisabhängigkeit von Decorin war unter Normalbedingungen signifikant nachweisbar (dec1 vs. dec2: $p = 0,1422$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U), während für dec1+c und dec2+c keine Unterschiede beobachtet wurden (dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,9999$ Mann-Whitney U).

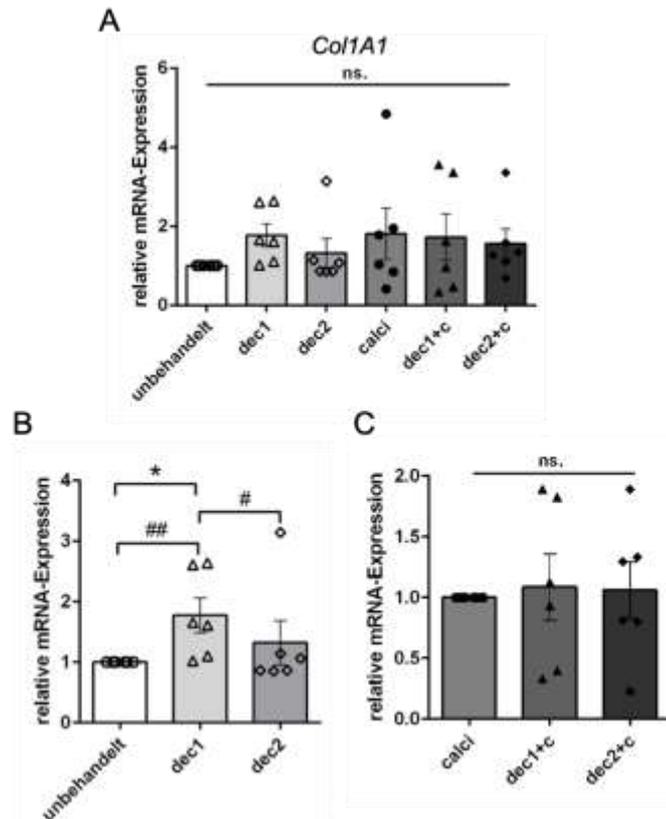


Abb. 28 Expression von Kollagen Typ 1 (Col1A1) in VIC im 2D-Modell nach Stimulation mit Decorin. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 6$). Die Expression von Col1A1 nach Stimulation mit Decorin ist in Bezug zur unbehandelten Kontrolle unter Normalbedingungen (B) für dec1 signifikant erhöht. Auch im Vergleich zu dec2 zeigt dec1 eine signifikant höhere Expression. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) lassen sich keine signifikanten Unterschiede detektieren. #: p -Wert < 0.05 , ##: p -Wert < 0.01 Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

MMP2

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Abb. 29A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,0147$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 29B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 29C) konnten ebenfalls Unterschiede beobachtet werden. Bei dec1 zeigt sich unter Normalbedingungen eine signifikant-verminderte Expression (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,0289$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0022$ Mann-Whitney U) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch dec2 führte zu einer Herunterregulation von MMP2 unter Normalbedingungen (unbehandelt vs. dec2: $p = 0,0536$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U).

Die Ergebnisse nach Stimulation mit Decorin in pro-kalzifizierenden Bedingungen zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Expression von MMP2 (calci vs. dec1+c: $p = 0,9645$ Dunn's

post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p = 0,9645$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U). Eine Dosisabhängigkeit konnte lediglich unter pro-kalzifizierenden Bedingungen nachgewiesen werden (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U).

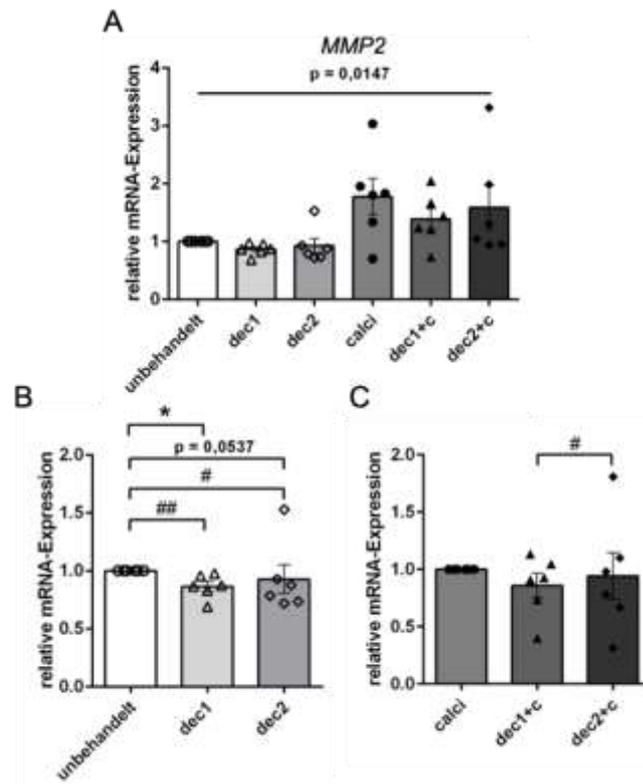


Abb. 29 Expression von Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2) in VIC im 2D-Modell nach Stimulation mit Decorin. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 6$). Die Expression von MMP2 nach Stimulation mit Decorin ist in Bezug zur unbehandelten Kontrolle unter Normalbedingungen (B) signifikant vermindert. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) lassen sich keine signifikanten Unterschiede zu calci detektieren, jedoch unterschieden sich die Dosen signifikant zueinander. *: p -Wert $< 0,05$ Kruskal-Wallis. #: p -Wert $< 0,05$, ##: p -Wert $< 0,01$ Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

TGF- β

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Abb. 30A; $p = 0,0025$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 30B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 30C) konnten ebenfalls Unterschiede beobachtet werden. Unter Normalbedingungen zeigten dec1 und dec2 eine signifikant verminderte Expression (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,2632$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0476$ Mann-Whitney

U; unbehandelt vs. dec2: $p = 0,0718$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0476$ Mann-Whitney U) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurde für dec1+c keine signifikante Veränderung der Expression von *TGF- β* im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (calci vs. dec1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U). Dec2+c hingegen zeigte eine signifikante Regulation (calci vs. dec2+c: $p = 0,4564$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U). Eine Dosisabhängigkeit konnte weder unter Normal- noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen nachgewiesen werden (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0476$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,999$, Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U).

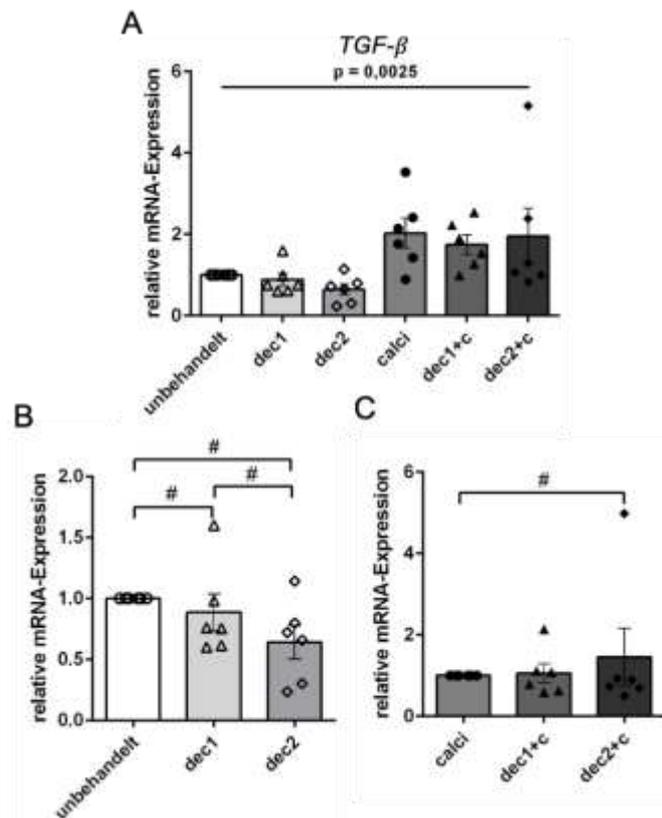


Abb. 30 Expression von Transforming growth factor beta (*TGF- β*) im VIC im 2D-Modell nach Stimulation mit Decorin. **A** zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 6$). Die Expression von *TGF- β* nach Stimulation mit Decorin ist in Bezug zur unbehandelten Kontrolle unter Normalbedingungen (**B**) für dec1 signifikant vermindert. Im Vergleich zu dec1 zeigt dec2 eine signifikant niedrigere Expression. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (**C**) lassen sich für dec2+c signifikante Unterschiede detektieren. **: p -Wert $< 0,01$ Kruskal-Wallis. #: p -Wert $< 0,05$ Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

OPN

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 31A; $p = 0,7494$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 31B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 31C) konnten ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden. Die Stimulation mit Decorin führte in den VIC unter Normalbedingungen nicht zur signifikanten Änderung der Expression von *OPN* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,7423$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen führte keine der Konzentrationen von Decorin zu einer signifikanten Veränderung der Expression von *OPN* (calci vs. dec1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U). Es konnte keine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U).

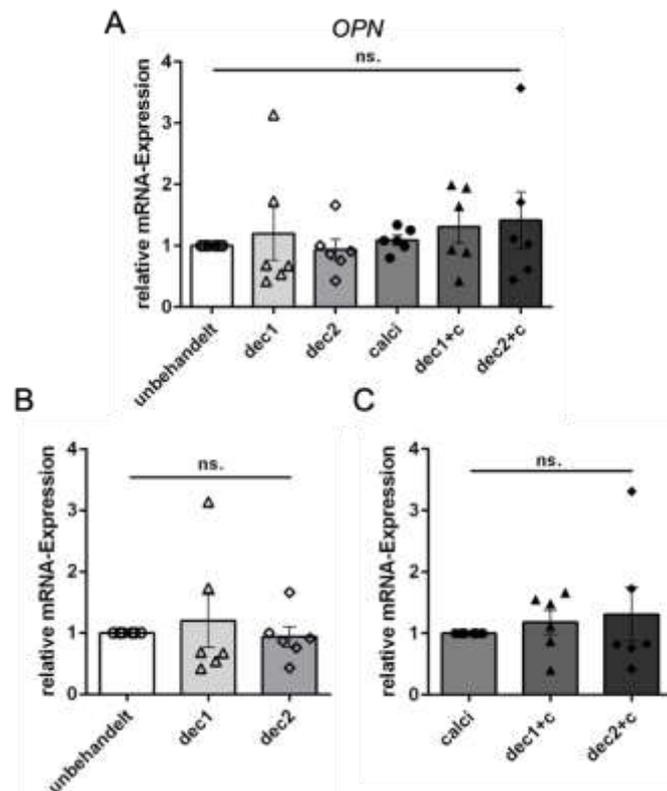


Abb. 31 Expression von Osteopontin (OPN) in VIC im 2D-Modell nach Stimulation mit Decorin. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 6$). Die Expression von OPN nach Stimulation mit Decorin ist weder unter Normalbedingungen (B) noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) signifikant verändert. Abkürzungen: ns. = nicht signifikant, dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

Westernblot-Analyse für Osteopontin

Im Western Blot wurde die Expression von OPN auf Proteinebene detektiert und auf das HK-Protein GAPDH bezogen. OPN wurde dabei als Marker für osteogene Differenzierung verwendet. Die Analyse erfolgte für sechs Individuen (n = 6).

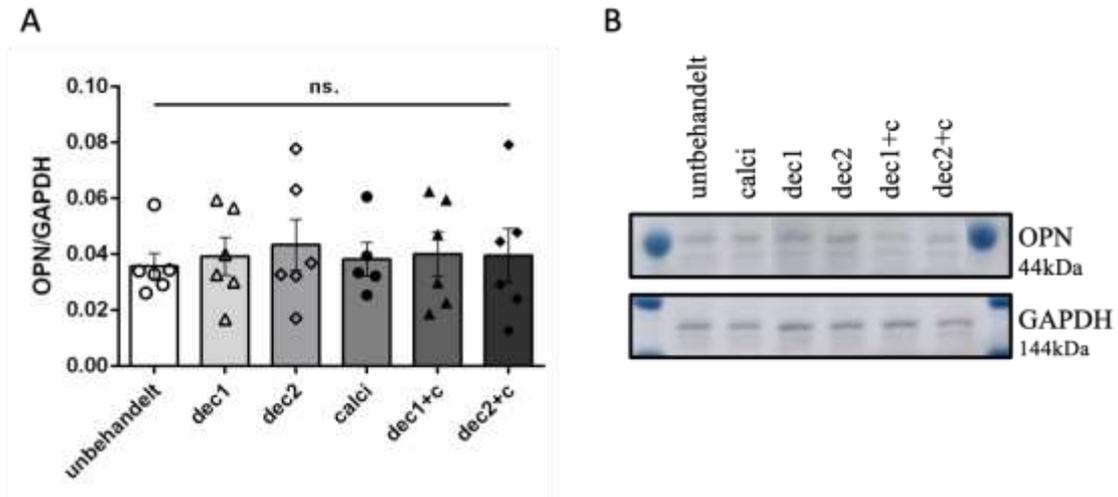


Abb. 32 Relative Proteinlevel von Osteopontin in VIC nach Stimulation mit Decorin. Die Proteinlevel von Osteopontin wurden im Westernblot (n = 6) betrachtet. Die Applikation von Decorin führt weder unter Normalbedingungen noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zu signifikant veränderten Proteinleveln (A). Exemplarisch sind Proteinbanden mit Referenzen für die verschiedenen Behandlungen aufgeführt (B). Abkürzungen: ns. = nicht signifikant, dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 32; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,9931$) Unter Normalbedingungen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Proteinlevel von OPN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. dec1: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,8182$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,5887$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen unter Decorin-Stimulation in VIC (calci vs. dec1+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,9307$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,9307$ Mann-Whitney U). Weder unter Normal- noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurde eine signifikante Dosisabhängigkeit für Decorin beobachtet (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6991$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,9372$ Mann-Whitney U).

4.4.3 Analyse inflammatorischer Marker

NF- κ B-Phosphorylierungsraten wurden als Indikator für NF- κ B vermittelte Inflammation betrachtet. Mittels Western Blot-Analyse wurden Proteinlevel von NF- κ B in ovinen VIC nach Stimulation mit Decorin unter pro-inflammatorischen Stimuli mit TNF- α und unter Normalbedingungen durchgeführt. Es wurden fünf Individuen betrachtet ($n = 5$). Für beide Bedingungen gab es je eine Kontrollgruppe. Die Phosphorylierungsrate als Aktivierungsmarker von NF- κ B wurde detektiert und auf die Proteinmenge von NF- κ B normiert. NF- κ B und pNF- κ B wurden dabei in Relation zum HK-Protein β -Aktin betrachtet. TNF- α stellt die Positivkontrolle für die Expression von NF- κ B dar.

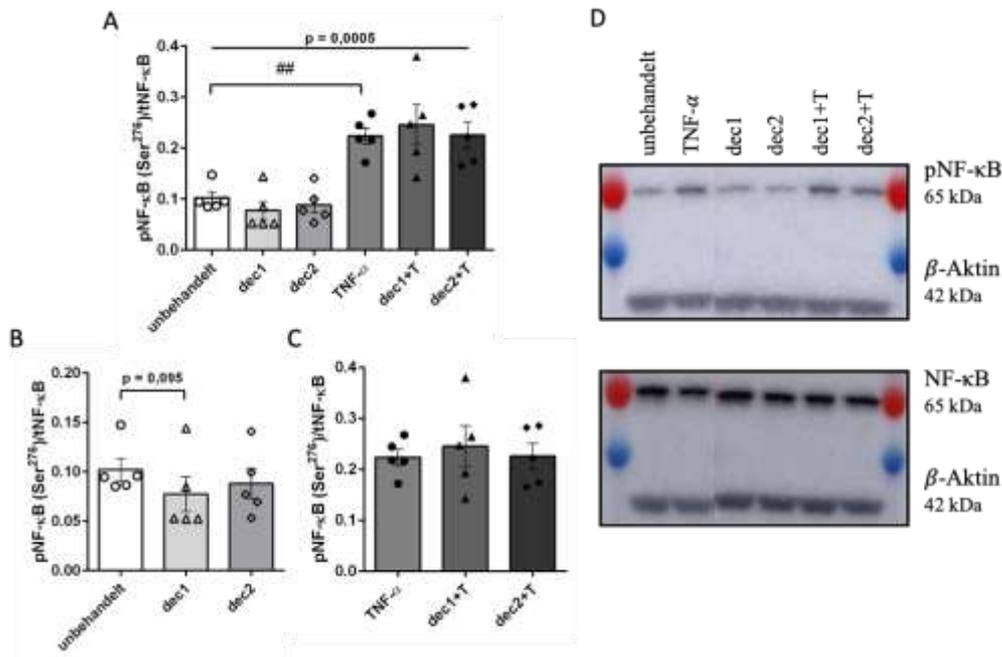


Abb. 33 Phosphorylierungsrate für NF- κ B in ovinen VIC nach Decorin Stimulation. Die Phosphorylierung von NF- κ B wurde im Westernblot ($n = 5$) detektiert (A). Die Applikation von Decorin führt weder unter Normal-(B) noch unter pro-inflammatorischen Bedingungen (C) zur Veränderung der Phosphorylierung. Exemplarisch sind Proteinbanden mit Referenzen für die verschiedenen Behandlungen aufgeführt (D). ###: p -Wert < 0.01 Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, T = TNF- α , HK = Housekeeper, p = phospho-.

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Abb. 33A; Kruskal-Wallis Anova $p = 0,0005$). Bei der isolierten Betrachtung von Normalbedingungen (Abb. 33B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 33C) konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Hier zeigt sich keine signifikant-veränderte Expression

von pNF- κ B bei dec1 und dec2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, allerdings zeigte dec1 einen Trend zur verminderten Phosphorylierung (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,1980$ Dunn's post-hoc test; $p = 0,0952$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,4206$ Mann-Whitney U).

Unter pro-inflammatorischen Stimuli ist die Phosphorylierung signifikant erhöht (unbehandelt vs. TNF- α : $p = 0,5582$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0079$ Mann-Whitney-U). Es zeigt sich jedoch keine veränderte Phosphorylierung von NF- κ B im Vergleich zur Kontrollgruppe für Decorin (TNF- α vs. dec1+T: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,8413$ Mann-Whitney U; TNF- α vs. dec2+T: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,8413$ Mann-Whitney U). Weder unter Normal- noch unter pro-inflammatorischen Bedingungen wurde eine signifikante Dosisabhängigkeit für Decorin beobachtet (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,402$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc test, $p > 0,999$ Mann-Whitney U).

4.4.4 Analyse der Kalzium-Akkumulation im 2D-Modell

Die Akkumulation von Kalzium als Hinweis auf pro-kalzifizierende Prozesse ist für die verschiedenen Behandlungsgruppen in im Verhältnis zum Proteingehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ dargestellt. Es wurde die Akkumulation in sechs Individuen ($n = 6$) detektiert. Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Abb. 34; Kruskal-Wallis Anova $p < 0,0001$).

In den beschriebenen Bedingungen konnte zwar eine Zunahme der Kalzium-Akkumulation in den Gruppen mit pro-kalzifizierendem Medium detektiert werden (unbehandelt vs. calci: $p = 0,1624$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0087$ Mann-Whitney U), jedoch zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Kalzium-Akkumulation nach Stimulation mit Decorin: Unter Normalbedingungen zeigte die Stimulation mit beiden Konzentrationen keine Auswirkung auf den Kalziumgehalt in den VIC (unbehandelt vs. dec1: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,8182$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p = 0,6408$ Dunn's post-hoc; $p = 0,4848$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Kalziumgehalt detektiert (calci vs. dec1+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,5310$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,9999$ Mann-Whitney U). Eine Dosisabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden (dec1 vs. dec2: $p = 0,5293$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0931$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,9999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6991$ Mann-Whitney U).

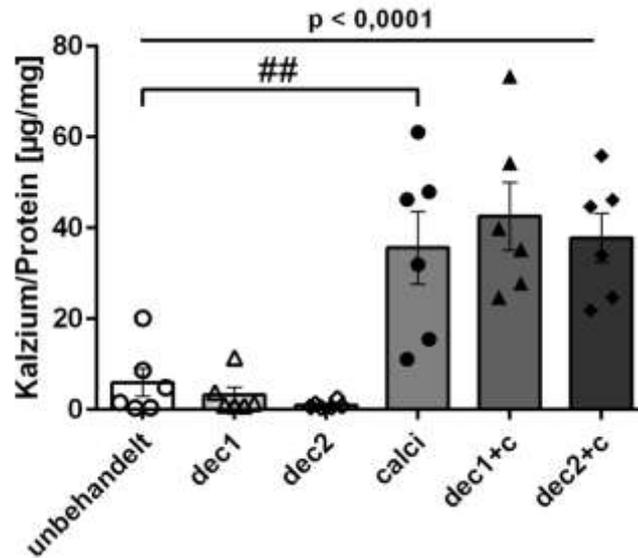


Abb. 34 Kalzium-Akkumulation in VIC mit Decorin im 2D-Modell. Die Kultivierung in pro-kalzifizierendem Medium führt zur gesteigerten Kalzium-Akkumulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Stimulation mit Decorin führt unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Veränderung des Kalziumgehaltes in den VIC. ##: p -Wert < 0.01 Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

4.5 Die Wirkung von Decorin auf VIC im 3D-Modell

Für Decorin wurde analog zum Versuchsaufbau mit Activin A ein 3D-Modell mit ovinen Klappen-Explantaten angewendet, um potenzielle Aktivierungs- oder Transformationsmechanismen der VIC in ihrem physiologischen Milieu im Gewebe nachvollziehen zu können und den Daten aus dem *in vitro* 2D-Modell gegenüberzustellen.

4.5.1 Histologische Färbungen

Übersichtsfärbungen HE und MP

Analog zum Versuch im 3D-Modell für Activin A (4.3.1) wurden für die Versuche mit Decorin Übersichtsfärbungen angefertigt und deskriptiv begutachtet.

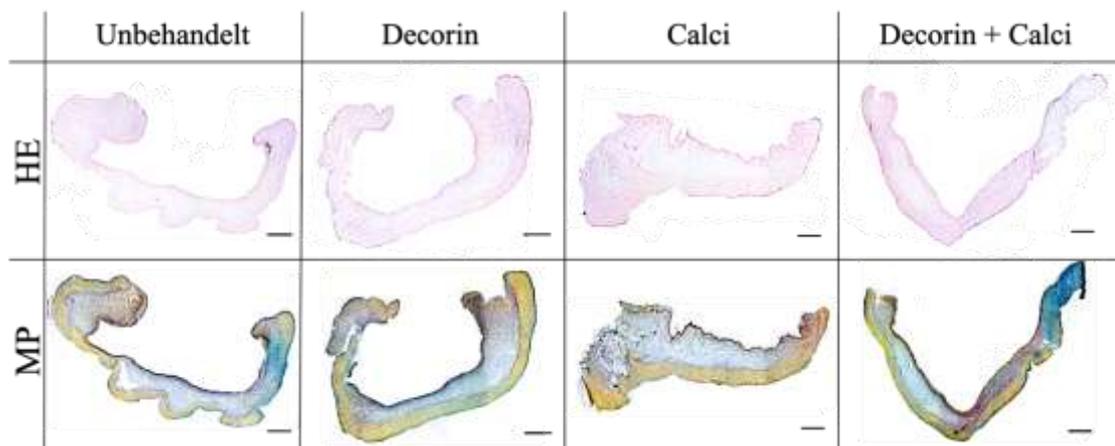


Tabelle 5 Histologie oviner Aortenklappen unter Einfluss von Decorin. Repräsentativ dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen oviner Aortenklappen. Die Präparate unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (calci) und unter Stimulation mit Decorin wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Fuchsin (HE) und Movat-Pentachrom (MP) gefärbt. Maßstab: 400 μ m. Vergrößerung: 5-fach.

In den Übersichtsfärbungen aus dem 3D-Modell für Decorin (Tabelle 5) sind die histologischen Gewebsschichten der Aortenklappenpräparate gut nachvollziehbar. Sowohl in den HE- als auch in den MP-Färbungen lässt sich unter Stimulation mit Decorin kein prägnanter Unterschied der Gewebearchitektur beobachten. Auch die Kultur in pro-kalzifizierenden Bedingung scheint in unserem Versuchs-Protokoll nicht zu einer deutlichen Modifikation zu führen.

Kalzifizierung

Die Färbung mit Von Kossa wurde zum Nachweis von Kalzium-Ablagerungen im Gewebe durchgeführt (Tabelle 6).

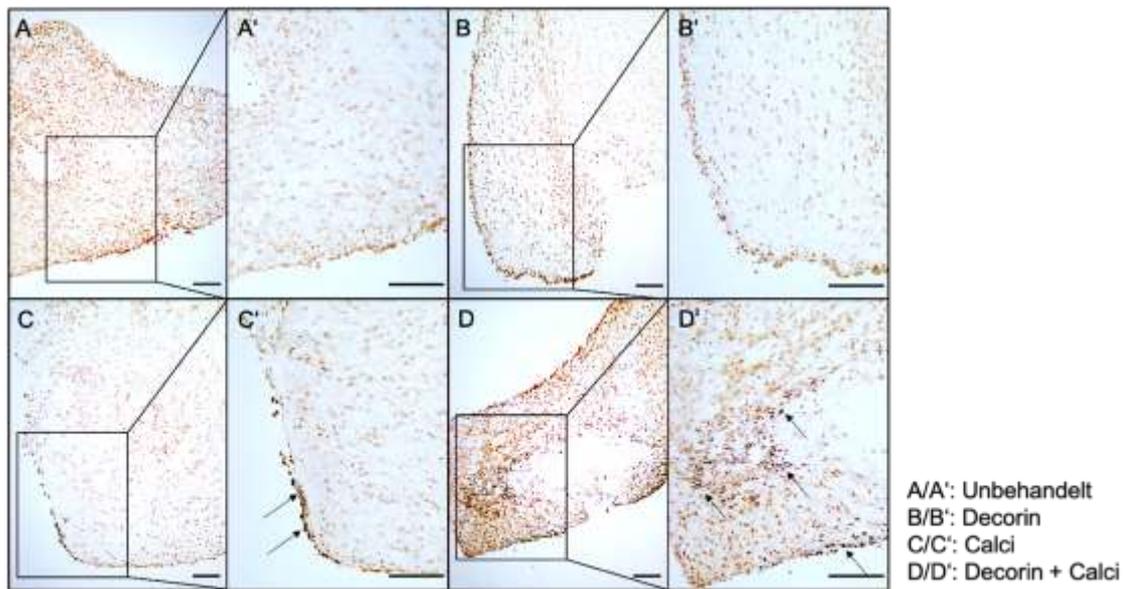


Tabelle 6 Histologischer Nachweis von Kalzium-Ablagerungen unter Einfluss von Decorin. Die Tabelle zeigt exemplarisch nach Von Kossa-gefärbte ovine Aortenklappen. Die Präparate wurden zuvor unter pro-kalzifizierenden Bedingungen und Decorin stimuliert. Gegenübergestellt sind mikroskopische Durchlicht-Aufnahmen in 5-fach- (A, B,C,D) und in 10-fach-Vergrößerung (A',B',C',D'). Maßstab: 200 μ m.

Die Kultur in pro-kalzifizierendem Medium führte vermehrt zu Kalziumablagerungen als in der unbehandelten Kontrolle (A vs. C; B vs. D). Die Stimulation mit Decorin unter Normalbedingungen führte in dem hier gezeigten Exemplar nicht zur Kalziumablagerung (A). Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen kam es unter Einfluss von Decorin zu intensiveren und breitflächigeren Kalzium-Ablagerungen von den Randbereichen der Präparate bis ins innen liegende Gewebe. Diese Beobachtungen waren nicht für alle Präparate nachvollziehbar.

4.5.2 Analyse chondro-osteogener Marker im 3D-Modell

Die Regulation chondro-osteogener Marker in VIC im 3D-Modell wurde analog zum 2D-Modell nach Stimulation mit Decorin für sieben Individuen ($n = 7$) analysiert. Es wurden die Gene *Col1A1*, *MMP2*, *TGF- β* und *OPN* getestet.

Col1A1

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Abb. 35A, $p = 0,0111$). Bei der isolierten Betrachtung unter Normalbedingungen (Abb. 35B) konnten keine Unterschiede beobachtet werden, während unter pro-kalzifizierenden

Bedingungen (Abb. 35C) Unterschiede nachweisbar waren. Es zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression von *Col1A1* unter Normalbedingungen für dec1 oder dec2 (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,8769$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1801$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Stimuli zeigte sich für dec1+c keine signifikante Veränderung der Expression (calci vs. dec1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U) während für dec2+c eine signifikante Verminderung der Expression von *Col1A1* im Vergleich zur Kontrollgruppe messbar war (calci vs. dec2+c: $p = 0,1776$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0239$ Mann-Whitney U). Es konnte keine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden (dec1 vs. dec2: $p = 0,7084$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p = 0,1606$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U).

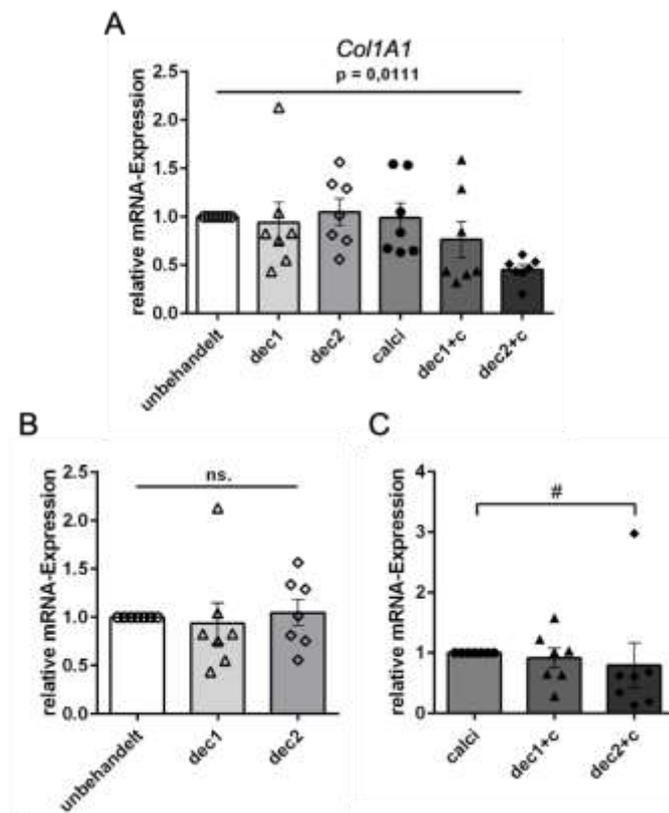


Abb. 35 Expression von Kollagen Typ 1 (*Col1A1*) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Decorin. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 7$). Die Expression von *Col1A1* nach Stimulation mit Decorin ist in Bezug zur Kontrolle unter Normalbedingungen nicht signifikant verändert (B). Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) zeigt dec2+c eine signifikant verminderte Expression. *: p -Wert $< 0,05$ Kruskal-Wallis. #: p -Wert $< 0,05$ Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

MMP2

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 36A $p = 0,1292$). Bei der isolierten Betrachtung unter Normalbedingungen (Abb. 36B) konnten keine Unterschiede beobachtet werden, während unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 36C) Unterschiede nachweisbar waren. *MMP2* als Marker für EZM-Umbau wurde unter Standardbedingungen durch Stimulation mit beiden Konzentrationen von Decorin nicht signifikant verändert exprimiert (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,708$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1801$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,690$ Mann-Whitney U).

Beide Konzentrationen führten unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zu einer verminderten Expression im Vergleich zu calci (calci vs. dec1+c: $p = 0,0757$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0169$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p = 0,053$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0169$ Mann-Whitney U). Es konnte keine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,690$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U).

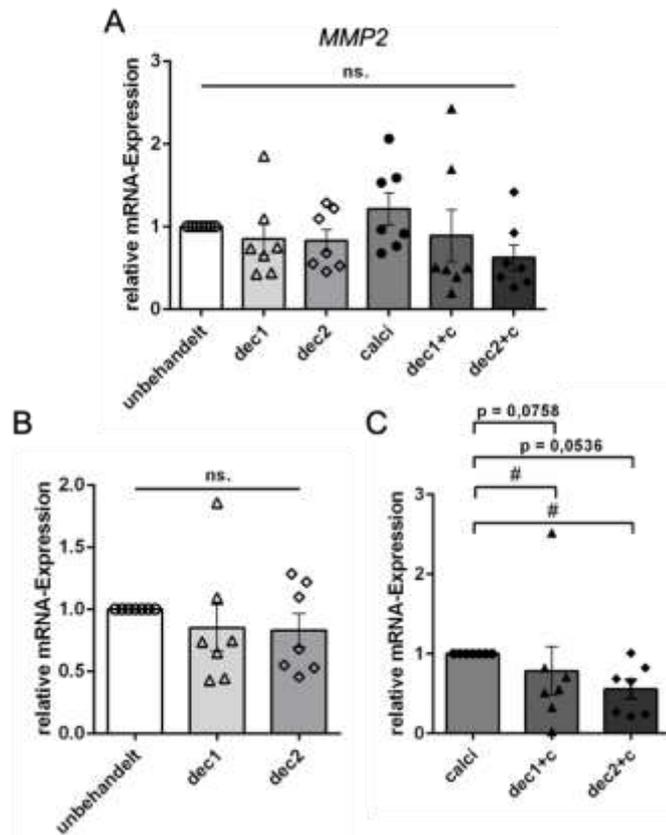


Abb. 36 Expression von Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Decorin. Dargestellt ist (A) die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 7$). Die Expression von MMP2 nach Stimulation mit Decorin ist in Bezug zur unbehandelten Kontrolle unter

Normalbedingungen (B) nicht signifikant verändert. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) zeigen dec1+c und dec2+c eine signifikant verminderte Expression. #: p-Wert < 0.05 Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

TGF- β

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 37A, $p = 0,5892$). Bei der isolierten Betrachtung unter Normalbedingungen (Abb. 37B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 37C) konnten ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und den Behandlungen unter Normalbedingungen (unbehandelt vs. dec1: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p = 0,9386$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1801$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen konnte keine veränderte Expression von TGF- β nach Stimulation mit Decorin in beiden Konzentrationen beobachtet werden (calci vs. dec1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U). Es konnte keine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1801$ Mann-Whitney U).

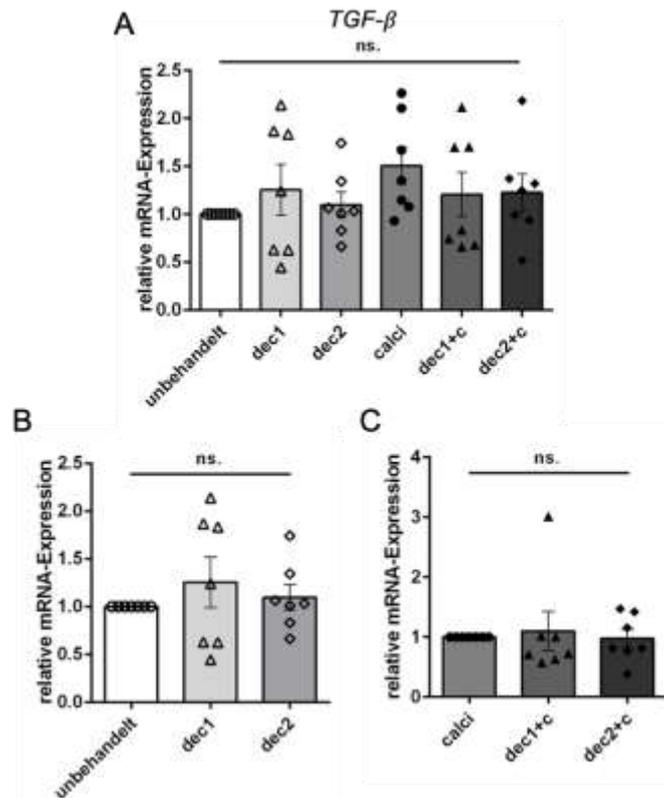


Abb. 37 Expression von Transforming growth factor beta (TGF-β) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Decorin. Dargestellt (A) ist die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 7$). Die Expression von TGF-β ist nach Stimulation mit Decorin unter Normalbedingungen (B) sowie unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) nicht verändert. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

OPN

Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Abb. 38A; $p = 0,0459$). Bei der isolierten Betrachtung unter Normalbedingungen (Abb. 38B) und pro-kalzifizierenden Bedingungen (Abb. 38C) konnten ebenfalls Unterschiede beobachtet werden. OPN zeigte signifikante Veränderungen nach Stimulation mit Decorin unter Normalbedingungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,0035$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0006$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p = 0,0675$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0169$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen kann dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden (calci vs. dec2+c: $p = 0,1479$ Dunn's post-hoc; $p = 0,0291$ Mann-Whitney U), während dec1+c nicht zur Veränderung der Expression führt (calci vs. dec1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,6900$ Mann-Whitney U). Weder unter Normal- noch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen konnte eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p =$

0,1801 Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p = 0,4548$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3636$ Mann-Whitney U).

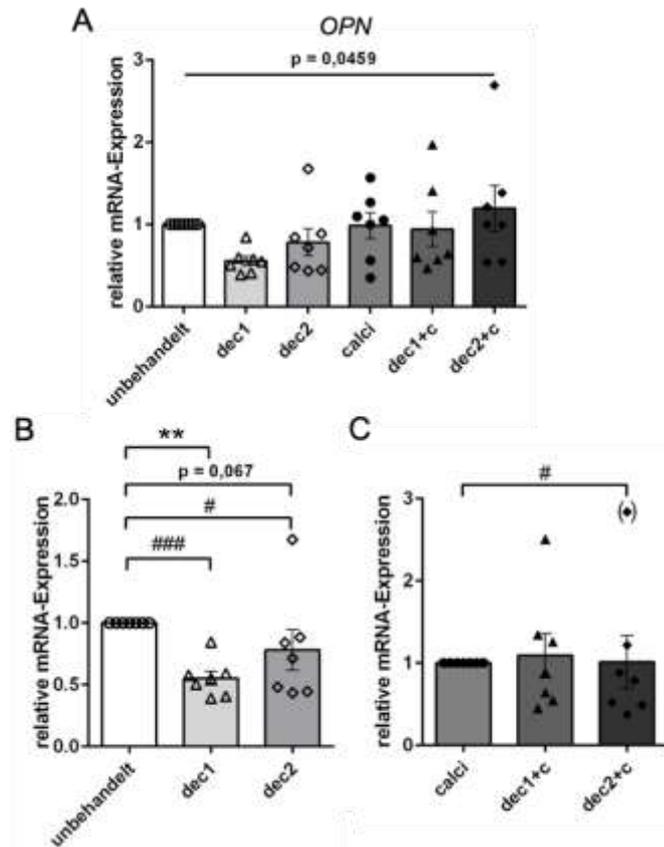


Abb. 38 Expression von Osteopontin (OPN) in VIC im 3D-Modell nach Stimulation mit Decorin. A zeigt die relative mRNA-Expression aller Behandlungsgruppen ($n = 7$). Die Expression von OPN nach Stimulation mit Decorin ist in Bezug zur unbehandelten Kontrolle unter Normalbedingungen (B) signifikant verändert. Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen (C) ist für dec2+c eine signifikant verminderte Expression detektierbar. *: p -Wert $< 0,05$, **: p -Wert $< 0,01$ Kruskal-Wallis. #: p -Wert $< 0,05$, ###: p -Wert $< 0,001$ Mann-Whitney U. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

4.5.3 Analyse der Kalzium-Akkumulation im 3D-Modell

Es wurde die Akkumulation von Kalzium in fünf Individuen ($n = 5$) detektiert. Bei einem gruppenübergreifenden Test zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression (Kruskal-Wallis Anova $p = 0,0307$).

In den beschriebenen Bedingungen konnte zwar eine Zunahme der Kalzium-Akkumulation in pro-kalzifizierendem Medium detektiert werden (unbehandelt vs. calci: $p = 0,6640$ Dunn's post-hoc test, $p = 0,0952$ Mann-Whitney U), unter Normalbedingungen zeigte sich jedoch für die

Stimulation mit beiden Konzentrationen keine Auswirkung auf den Kalziumgehalt in den VIC (unbehandelt vs. dec1: $p = 0,1980$ Dunn's post-hoc; $p = 0,1508$ Mann-Whitney U; unbehandelt vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3095$ Mann-Whitney U).

Unter pro-kalzifizierenden Bedingungen wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Kalziumgehalt detektiert (calci vs. dec1+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p > 0,999$ Mann-Whitney U; calci vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,5476$ Mann-Whitney U). Eine Dosisabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden (dec1 vs. dec2: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,3095$ Mann-Whitney U; dec1+c vs. dec2+c: $p > 0,999$ Dunn's post-hoc; $p = 0,4206$ Mann-Whitney U).

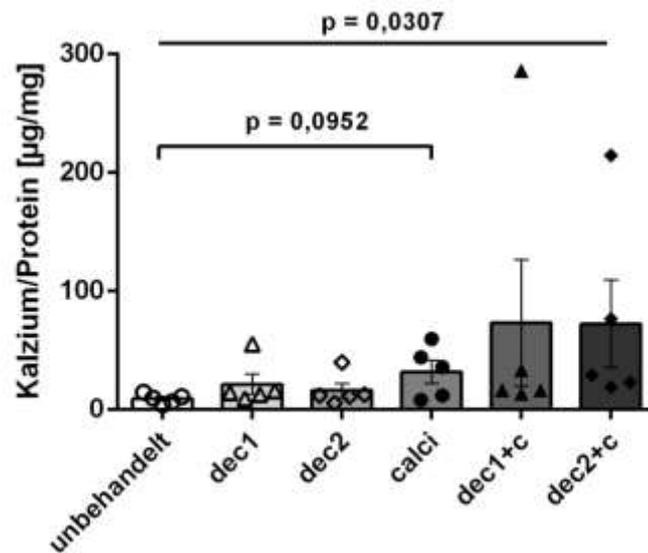


Abb. 39 Kalzium-Akkumulation in VIC mit Decorin im 3D-Modell. Der Kalziumgehalt dargestellt im Verhältnis zum Proteingehalt ($n = 5$). Die Stimulation mit Decorin führt unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Veränderung des Kalziumgehaltes in den VIC im 3D-Modell. Abkürzungen: dec1 = 50 ng/ml Decorin, dec2 = 200 ng/ml Decorin, calci/+c = pro-kalzifizierende Bedingungen.

5 Diskussion

5.1 Mikroskopische Indizien für Fibrose und Kalzifizierung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten liefern möglicherweise Beweise für die Involvierung von Activin A und Decorin in den Pathomechanismus der DAVD. Die gesteigerte Proliferation der VIC unter Stimulation mit Activin A in den Vorversuchen bestätigt Erkenntnisse zahlreicher Studien, die eine proliferationsfördernde Wirkung von Activin A auf unterschiedliche Zelltypen identifizieren (72, 74-77), u.a. in Fibroblasten des Herzens und dem Myokard (78-80). Exogen appliziertem Decorin wird unterdessen in verschiedenen Studien eine modulierende, anti-proliferative Rolle zugeschrieben (63, 81-83). Zhang et al. (84) beschreibt eine dosisabhängige anti-proliferative Wirkung in Fibroblasten. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine Dosisabhängigkeit mit einer potenziell proliferativen Wirkung von 50 ng/ml appliziertem Decorin in den Vorversuchen, während steigende Konzentrationen die Zellteilung sukzessiv verringerten. Die Proliferation von VIC steht in der Entwicklung der DAVD im Zusammenhang mit der fibrotischen Verdickung der Aortenklappe (68, 85). Daher könnten diese Beobachtungen erste Hinweise auf die Rolle von Activin A bzw. Decorin in der DAVD liefern.

Das Fehlen morphologischer Unterschiede nach Applikation mit Activin A bzw. Decorin gibt keinen eindeutigen Hinweis auf den Aktivierungszustand der VIC. Man vermutet jedoch einen aktivierten Zustand der VIC in Kultur, der abhängig von der Passage, Konfluenz und weiteren Faktoren zu sein scheint (25). Dass in der Zellkultur und im 3D-Modell unter pro-kalzifizierenden Stimuli keine Kalzium-Akkumulationen sichtbar sind, ist vermutlich durch die Kürze des Protokolls zu begründen, da in anderen Arbeiten mit ähnlichen Bedingungen die sichtbare Ablagerung von Kalzium erst im Verlauf auftrat (28, 71). Die Mineralisierung von nativen Aortenklappen beginnt in der Fibrosa und breitet sich über das umliegende Gewebe aus, wie histologische Sektionen von kalzifizierten Aortenklappen zeigen (32, 33, 86). Neueste Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Kalzium-Akkumulation von Aortenklappen in einem ähnlichen 3D-Modell zunächst in der Ventrikularis beginnt und sich von dort weiter ausbreitet (87). Hier zeigten sich die ersten deutlichen Kalzium-Ablagerungen allerdings auch erst nach 14 Tagen (28, 87).

5.2 Kalzium-Akkumulation als Zeichen der Degeneration: 2D vs. 3D

Die Akkumulation von Kalzium im Sinne der Degeneration der Klappe ist ein wichtiger Aspekt im Progress der DAVD. Für Activin A wird nach exogener Zufuhr in verschiedenen Studien eine abschwächende Rolle bezüglich Mineralisierung beschrieben (88, 89). Auf der anderen Seite

führt Activin A aber auch zur vermehrten Mineralisierung im Knochenstoffwechsel (90-92). In der kalzifizierten Aorta uremischer Ratten geht der Kalzium-Deposition die Erhöhung von Activin A interessanterweise voraus (93). Allerdings konnte eine regulierende Rolle von Activin A in Bezug auf Kalzium-Akkumulation in unserem Versuchsaufbau nicht beobachtet werden.

Fischer et al. (67) zeigte *in vitro* eine erhöhte Akkumulation von Kalzium in glatten Muskelzellen der Aorta nach exogener Applikation sowie eine erhöhte Expression von Decorin und beschreibt die Assoziation von Decorin mit Kalzifizierung in Koronararterien. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde der Einfluss von Decorin auf Mineralisierung untersucht, wobei Decorin-reiches Kollagen Kalzifizierung zu verhindern scheint, während die Abwesenheit von Decorin sie fördert (94, 95). Jedoch zeigen neue Studien, dass Decorin in der DAVD in kalzifizierten Stadien nicht erhöht vorliegt (68). Die fehlende Regulation der Kalzium-Akkumulation der VIC in unserem Versuchsaufbau mit Decorin könnte also unterstreichen, dass Decorin zumindest keinen unmittelbaren Einfluss auf diese Prozesse in VIC hat.

5.3 Extrazellulärmatrix-Umbau im 2D- vs. 3D-Modell

5.3.1 *Coll1A1*.

In der DAVD ist der Umbau der EZM u.a. durch die Mineralisierung von Kollagenfasern charakterisiert (96). Aktivierte, myofibroblastisch differenzierte VIC exprimieren dabei vermehrt Kollagen und führen durch die Sekretion proteolytischer Enzyme zur Einlagerung von Hydroxyapatit (25). Daher ist die Expression von Kollagen ein Merkmal der EZM-Umstrukturierung und liefert gegebenenfalls Hinweise auf stattfindende Fibrose. Die beobachtete erhöhte Expression von *Coll1A1* im 2D-Modell spricht für einen pro-fibrotischen Einfluss von Activin A in den VIC. Dies scheint plausibel, denn es ist beschrieben, dass die exogene Applikation von Activin A in Fibroblasten unterschiedlichen Gewebes *in vitro* vor dem Hintergrund der Fibrosierung zur erhöhten Expression von *Coll1A1* führt und die Differenzierung zu einem myofibroblastischen Phänotyp mit erhöhter Produktion von *Coll1A1* fördert (53, 79, 97-101). Die Blockierung von Activin A direkt oder durch Unterbrechen des Signalweges resultiert wiederum in der Abschwächung der *Coll1A1*-Expression und der Fibrosierung des Gewebes (79, 99, 102, 103). In Kulturen aus bovinen Endothelzellen der Aorta und aus Fibroblasten der menschlichen Lunge führt Activin A unterdessen zur Kontraktion und Umstrukturierung von Kollagen-Gelen (102, 104). Schließlich ist Activin A in rheumatischen Herzklappen signifikant erhöht und mit einer vermehrten *Coll1A1*-Expression assoziiert (58). In Fibroblasten des Herzens kommt es ebenfalls zur erhöhten Expression von *Coll1A1* (79). Dass diese Effekte zwar im 2D-Modell, allerdings nicht im 3D-Modell für *Coll1A1* in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, könnte für eine komplexe Regulation der VIC im Gewebe sprechen, die die Wirkung von Activin

A moduliert. Manche Beobachtungen zeigen demnach, dass die Stärke des Effekts von Activin A deutlich von anderen Faktoren abhängig sein kann (98, 99). Es wurden zudem Dosisabhängigkeiten für die Wirkung von Activin A auf die Expression von *Coll1A1* beschrieben (99, 102), die in unserem Modell als Trend bestätigt wurden. Die im 3D-Modell verwendeten Dosen von Activin A konnten demnach nicht die im 2D-Modell beobachteten Daten replizieren. Die Ergebnisse deuten schlussfolgernd auf einen Einfluss von Activin A auf VIC bezüglich der *Coll1A1*-Expression hin, der zur vermehrten Fibrosierung von Klappengewebe führen könnte und möglicherweise durch weitere Mechanismen im Mikro-Milieu der Klappe beeinflusst ist.

Decorin wird vor allem eine umstrukturierende Rolle in der Anordnung von Kollagenfibrillen zugeordnet (63, 105-108). In arteriellen Glattmuskelzellen von Karotiden führt die Decorin-Synthese zur verstärkten Expression von *Coll1A1* sowie zur Kontraktion in Kollagen-Gelen und hat damit einen modulierenden Einfluss auf den EZM-Umbau (109). Chen et al. (110) beschreiben allerdings eine Decorin-vermittelte verringerte Expression von *Coll1A1* in fibrotischem Leberparenchym *in vitro* und *in vivo* und weitere Studien ordnen Decorin ebenfalls eine anti-fibrotische Wirkung zu (111-113). Auch auf die Fibrose und die *Coll1A1*-Expression des Herzens in Ratten wirkt Decorin hemmend (114, 115). Im 2D-Modell der vorliegenden Arbeit lässt sich eine erhöhte *Coll1A1*-Expression unter der geringeren Decorin-Konzentration verzeichnen, bei der höheren Decorin-Konzentration dagegen ist *Coll1A1* signifikant vermindert exprimiert im Vergleich zur niedrigeren Konzentration. Die dosisabhängige Wirkung von Decorin scheint naheliegend, da es auch im 3D-Modell unter pro-kalzifizierenden Bedingungen zu einer verminderten Expression von *Coll1A1* unter der höheren Decorin-Konzentration bei gleichzeitiger pro-kalzifizierender Stimulation kommt. Decorin ist in der DAVD in frühen und damit fibrotischen Stadien signifikant höher als in kalzifizierten Stadien exprimiert, jedoch nicht höher als in gesunden Klappen (68). Ein modulierender Einfluss von Decorin auf die Fibrosierung in der DAVD ist daher wahrscheinlich, und in diesem Zuge potenziell abhängig von seiner Konzentration und dem umgebenden Milieu der VIC.

5.3.2 *MMP2*.

Entzündungsreaktionen werden von MMPs vergesellschaftet: so liegt in stenotisch veränderten Aortenklappen eine erhöhte Expression von MMPs vor, die zur Bildung von Osteonectin beitragen (35). Dort kommt es durch Produktion von Peptidfragmenten aus Elastin von MMPs auch vermutlich zur vermehrten osteogenen Differenzierung der VIC und der Biomineralisierung der Aortenklappe. MMP2 ist u. a. für den Abbau von Kollagen Typ 1 verantwortlich und sorgt so für die Freilegung von Bindungsstellen in der EZM (48). Die Regulation von *MMP2* steht somit im Zusammenhang mit pro-degenerativen Prozessen der VIC im Rahmen der DAVD. Die erhöhte

Expression von *MMP2* im 2D-Modell der vorliegenden Arbeit unter Activin-A-Behandlung und die dabei angedeutete Dosisabhängigkeit lässt daher vermuten, dass durch Activin A über die Regulation der *MMP2*-Expression eine pro-degenerative Gewebsmodifikation in der Klappe begünstigt wird. In verschiedenen humanen Geweben werden gesteigerte Konzentrationen Activin A mit einer erhöhten *MMP2*-Expression assoziiert (116), u. a. perioperativ bei Patienten mit Herzklappenersatz und in der kalzifizierenden Aortenwand von Ratten (57, 93). Hier stehen Activin A und MMPs im Zusammenhang mit Inflammation (117, 118). Die exogene Applikation von Activin A *in vitro* fördert zudem die Expression und Produktion von *MMP2* in verschiedenen Zelltypen (118-123), und reguliert die Aktivität und Expression von *MMP2* dosisabhängig (121, 123). Auch in humanen Osteoblasten und Glattmuskelzellen wird dieser Effekt im Kontext des EZM-Umbaus beobachtet (52). Die Hemmung von Activin A führte indessen zur Abschwächung oder gar Ausbleiben dieses Effektes (119-122). Im unserem 3D-Modell konnte im Gegensatz zum 2D-Modell keine erhöhte *MMP2*-Expression durch Activin A beobachtet werden. In der Literatur finden sich in Co-Kulturen ebenfalls Modulationen des Effekts von Activin A auf die *MMP2*-Expression, die in reinen Fibroblasten-Kulturen noch sichtbar waren (121). Möglich ist also, dass die potenzielle pro-degenerative Wirkung von Activin A auf VIC, die im 2D-Modell beobachtet wurde und zur erhöhten Expression von *MMP2* führt, im 3D-Modell einer komplexen Regulation des umliegenden Gewebes unterliegt.

Decorin moduliert die Expression von *MMP2*: In einigen Studien scheint Decorin dabei eine hemmende Funktion zu haben, so ist *MMP2* in Trophoblasten durch Decorin herunter reguliert (124). Außerdem führt die erhöhte Expression von Decorin in venösen Glattmuskelzellen in Ratten zur verminderten *MMP2*-Aktivität (125, 126). Mao et al. (127) beschreibt zuletzt eine gesteigerte *MMP2*-Expression in Decorin-defizienten Mäusen. Vor diesem Hintergrund ist eine hemmende Funktion von Decorin auf die Expression von *MMP2* in VIC, so wie sie in dieser Arbeit im 2D- und 3D-Modell beobachtet wurde, schlüssig, obgleich in Kulturen mit Fibroblasten und im Kontext der Fibrolyse auch erhöhte Expressionen beschrieben wurden (128-130).

5.3.3 *TGF-β*.

Als Zytokin besitzt *TGF-β* anti-inflammatorische Fähigkeiten und ist beteiligt an Signalwegen im Kontext der Heilungsreaktion und dem fibrotischem Umbau der EZM (44). Auch in kardiovaskulären Erkrankungen leistet es einen relevanten Beitrag zur Umstrukturierung von kardialem Gewebe, bspw. bei Herzversagen nach Myokardinfarkt (46). In stenosierten Aortenklappen scheint die Aktivierung von *TGF-β* zur myofibroblastischen Differenzierung von VIC zu führen und führte in VIC von Schweinen zur vermehrten Bildung von Kalzium-Knötchen in den Klappen (85, 86). Auch die Kalzifizierung von osteoblasten-ähnlichen Zellen wird durch

TGF- β getriggert (131). Die Expression von TGF- β steht daher im Zusammenhang mit dem Progress der DAVD im Sinne von myofibroblastischer Differenzierung der VIC und möglicherweise der Kalzifikation der Klappe. Activin A ist in der Lage, die Expression von TGF- β zu induzieren (73). Exogen appliziert reguliert Activin A in bestimmten Zellen die Expression von TGF- β hoch und führt zur Transformation in einen pro-fibrotischen Phänotyp mit konsekutiv erhöhter Expression von *Coll1A1* und TGF- β (98). Daher suggeriert die hier im 2D-Modell detektierte Hochregulation der TGF- β -Expression sowohl unter Normal- als auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen durch Activin A eine pro-degenerative Rolle auf VIC. Die hier vorliegende Dosisabhängigkeit bestärkt diese Annahme und repliziert dabei Beobachtungen in ähnlichen Konzentrationen Activin A in anderen Modellen (98). Die Ergebnisse des 3D-Modells unterstreichen die Vermutung einer pro-degenerativen Rolle von Activin A, dessen Effekt auch im Gewebe nachweisbar ist. Auch hier bewirkt Activin A die vermehrte Expression von TGF- β sowohl unter Normal- als auch unter pro-kalzifizierenden Bedingungen signifikant. Neueste Erkenntnisse von Jenke et al (132) identifizieren in einem ähnlichen 3D-Modell mit VIC eine pro-fibrotische Rolle von TGF- β , zu dessen Superfamilie Activin A gehört. TGF- β führt hier zur Differenzierung in Myofibroblasten und Etablierung von Fibrose in der DAVD.

Decorin ist imstande mit TGF- β zu interagieren (133). Viele Studien beschreiben demnach eine regulatorische, meist inhibitorische Wirkung mit anti-fibrotischer Komponente in unterschiedlichem Gewebe (113, 133-136). In kultivierten Glattmuskelzellen der Aorta führt die erhöhte Expression von Decorin zur Regulation der Aktivität von TGF- β (137) und auch durch exogene Zufuhr von rekombinanten Decorin wird seine Expression in Wundfibroblasten gehemmt (84). Hier wird eine Decorin-vermittelte Dosisabhängigkeit auf die pro-fibrotische Wirkung von TGF- β beschrieben, die Decorin eine hemmende Funktion zuweist (138). Zwar konnte in unserem 3D-Modell keine Regulation von TGF- β nachgewiesen werden, eine anti-fibrotische Funktion für Decorin liegt jedoch nahe, welche in unserem 2D-Modell für VIC in der reduzierten Expression von TGF- β unterstrichen wird. Auch eine Dosisabhängigkeit lässt sich wiederfinden, die einen modulierenden Einfluss von Decorin in der DAVD suggeriert.

5.4 Osteogene Differenzierung: Expression von Osteopontin

OPN ist in kalzifizierten Aortenklappen verstärkt vorhanden und korreliert mit dem Schweregrad der Kalzifizierung (139-144). Die Expression von OPN korreliert des weiteren mit der Kalzium-Akkumulation in kalzifizierten Aortenklappen (68, 143). In aktivierten VIC von Patienten mit DAVD ist OPN erhöht exprimiert und mit Mineralisierung assoziiert (145, 146). OPN gilt daher in der DAVD als Marker für osteogene Differenzierung in VIC (146, 147).

Activin A ist mehrfach *in vitro* sowie *in vivo* als Induktor osteogener Differenzierung beschrieben worden (75, 91, 92, 148, 149). Es ist in kardiovaskulären Erkrankungen mit einer erhöhten Expression von *OPN* assoziiert (93, 150). Hier zeigen sich jedoch ambivalente Daten bezüglich des Effektes von Activin A, teilweise in Abhängigkeit der Dosis und des Applikationszeitpunktes (88, 89). Die erhöhte Expression von *OPN* in VIC unter Activin A-Stimulation im 2D-Modell der vorliegenden Arbeit lässt sich sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter prokalzifizierenden Bedingungen beobachten. Interessanterweise zeigen die Daten für das 3D-Modell gegensätzliche Ergebnisse. In den durchgeführten Western-Blot-Analysen konnte keine Veränderung der *OPN*-Translation detektiert werden. *In vitro* steigern verschiedene exogen-applizierte TGF- β -Isoformen aus der gemeinsamen Superfamilie die Expression von *OPN* in Osteoblasten (151). Unterdessen scheint TGF- β allerdings die osteoblastische Differenzierung von VIC in der DAVD zu verringern und Kalzifizierung zu verhindern (132). Bloise et al (92) beschreibt den Einfluss von Activin A auf die osteogene Differenzierung als abhängig von der Zellherkunft und der Mikroumgebung. Eventuell induziert Activin A in VIC also osteogene Differenzierung, wobei dieser Effekt in 3D aufgrund der hier vorliegenden Mikroumgebung, also der EZM, moduliert werden kann.

Während Decorin die Kalzium-Akkumulation in VIC nicht zu verändern scheint, führt es im 3D-Modell zur signifikanten Reduktion der *OPN*-Expression. So ist es diskutabel, dass Decorin eine modulierende Rolle für osteogene Differenzierung in VIC einnehmen könnte, die abhängig von der im 3D-Modell vorhandenen EZM ist. Es zeigt sich, dass Decorin das Verhalten von Osteoblasten modulieren kann, hier spielt seine GAG-Kette eine wichtige Rolle in der Interaktion (152). Als physiologischer Bestandteil der Klappe könnte im 3D-Modell die Funktion von Decorin durch exogene Applikation verstärkt worden sein. Das von uns verwendete rekombinante Protein ist moduliert und deglykosyliert, weshalb im 2D-Modell ein Ausbleiben des Effekts von Decorin begründet werden könnte, während im 3D-Modell eine Regulation beobachtet wurde.

5.5 Inflammation in VIC

In mineralisierten Aortenklappen wurden ca. 15 % der 715 Gene mit Inflammation assoziiert (153). Auch wurde der Zusammenhang von Inflammation mit dem Umbau sowie der Biomineralisation der EZM im Rahmen der DAVD beschrieben (36). Es wird angenommen, dass Makrophagen und andere Inflammation-modulierende Zellen diesen Prozess vorantreiben (34). Dabei steht die Leukozyten-Dichte im Zusammenhang mit der Expression von TNF- α und der hämodynamischen Verschlechterung der Krankheit (35). TNF- α scheint diesbezüglich eine prägnante Rolle zu spielen und es ist bekannt, dass es in VIC über verschiedene Signalwege zur Intensivierung der Mineralisierung kommt (38, 154-156). Interessant ist, dass in einem Maus-

Modell bei erhöhten TNF- α -Leveln verdickte Aortenklappen vorlagen, während Knockout-Mäuse für IL1 und TNF- α keine DAVD entwickelten (37). Die Wirkung von TNF- α und die im Zusammenhang stehende Phosphorylierungsrate von NF- κ B zu aktivem pNF- κ B liefert daher Hinweise auf die Entzündungsaktivität in der Klappe und den VIC.

Activin A wird meist eine pro-inflammatorische Rolle zugeordnet: Erhöhte Spiegel von Activin A und pNF- κ B wurden in unterschiedlichen Entzündungsprozessen beschrieben (157). Zudem zeigt sich speziell in der rheumatischen Herzklappenerkrankung eine Assoziation zwischen erhöhter Phosphorylierung von NF- κ B und der Expression von Activin A im Kontext von Inflammation und Fibrose (58). *In vivo* führt die Hemmung von Activin A zur verminderten Aktivierung von NF- κ B und Invasion von Entzündungszellen in Rattenherzen nach Myokardinfarkt (158). Auch bezüglich des Knochenstoffwechsels wird Activin A als pro-inflammatorischer Effektor für NF- κ B beschrieben. (159). So führt eine aktivierende Mutation im Activin A Typ 1 Rezeptor zur verlängerten Aktivierung von NF- κ B (159). Aktivierende Faktoren wie RANKL/RANK verstärken die Wirkung von Activin A im Prozess der Osteoklastenbildung und dies führt *in vitro* zur vermehrten Phosphorylierung von NF- κ B (160-163). In unserem Versuchsaufbau führt die Stimulation mit Activin A jedoch zur verminderten Phosphorylierung von NF- κ B. Stromazellen aus dem Knochenmark, die Activin A sezernierten, führten in einer Studie interessanterweise zur Regression von Aortenaneurysmata. Hier zeigte sich eine verminderte Aktivierung NF- κ B in Mäusen (164). In Makrophagen kann Activin A interessanterweise die Funktion je nach Aktivitätsstatus modulieren (165). So wird beschrieben, dass Activin A in Makrophagen (und anderen Zellen des Immunsystems) im Ruhemodus zur Aktivierung von NF- κ B führt, während es im aktivierten Zustand der Makrophagen NF- κ B abschwächen kann und zur Abmilderung von pro-inflammatorischen Prozessen führt (77, 165-169). Auf der anderen Seite ist NF- κ B als Regulator der Activin A-Expression beschrieben (77, 170). Generell wird in inflammatorischen und immunologischen Prozessen eine frühe Ausschüttung von Activin A aus Zellen des Immunsystems beschrieben (92, 165, 169, 171-173). Activin A zeigt also pro- und anti-inflammatorische Effekte. Ob Activin A entzündungsfördernd oder -hemmend wirkt, scheint abhängig von seiner Konzentration, dem Status des Entzündungsprozesses und der Aktivierung der Zielzelle zu sein (173-178). Es lässt sich also diskutieren, dass die VIC in unserem Versuchsaufbau aktiviert vorliegen und die verwendeten Konzentrationen Activin A denen in etablierten Entzündungsprozessen ähnelten, womit Activin A einen anti-inflammatorischen Effekt haben könnte. Diese Wirkung ist unter Stimulation mit TNF- α jedoch lediglich als Trend nachweisbar. Dennoch ist die Erkenntnis, dass Activin A eine potenziell konzentrations- und aktivierungs-abhängige anti-inflammatorische Wirkung auf VIC hat ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis der Rolle von Activin A in der DAVD.

Obwohl Decorin vorrangig eine pro-inflammatorische Rolle in Entzündungen zugeschrieben wird, gibt es Daten, die zeigen, dass Decorin die Phosphorylierung von NF- κ B in Tumorzellen hemmen kann (136, 179). Laut der These von Merline et al (180) entfaltet Decorin demnach lediglich seine pro-inflammatorische Wirkung als integres Protein inklusive GAG-Kette und Proteinkern, während der isolierte Kern kompetitiv Rezeptoren bindet und konsekutiv Inflammation unterdrücken könnte (181). Eine verminderte Aktivität von NF- κ B unter Einfluss von Decorin, die in unserem Versuchsaufbau angedeutet ist, könnte daher auf die deglykosylierte Form der verwendeten Rekombinante zurück zu führen sein ((182), s. Material). Auf der anderen Seite wird eine Decorin-vermittelte anti-inflammatorische Funktion im kardiologischen Kontext diskutiert. Hier führt Decorin in Kardiomyozyten zur Abschwächung des diabetes-induzierten NF- κ B-Signalweges und vermag es pro-inflammatorische Zytokine zu verringern (115). Eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung von Decorin auf VIC in der DAVD ist daher möglich, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

5.6 Fazit für Activin A und Decorin

Der Verdacht liegt nahe, dass Activin A über proliferative Wirkung und erhöhter Expression von chondro-osteogenen Markern in VIC einen Beitrag zum EZM-Umbau und Fibrosierung in der DAVD leistet. Activin A zeigt Potential zur Induktion osteogener Differenzierung von VIC, eine *de facto* erhöhte Akkumulation von Kalzium konnte in dem hier getesteten Versuchsaufbau jedoch nicht nachgewiesen werden. Als Teil der TGF- β -Superfamilie deuten sich Parallelen zur Rolle für TGF- β in der DAVD an. Interessanterweise suggerieren die von uns gewonnenen Erkenntnisse eine mögliche anti-inflammatorischen Wirkung von Activin A in VIC. Schlussfolgernd könnte die vermutlich primär pro-degenerative Rolle von Activin A auf VIC in der DAVD potenzielle Ansatzpunkte für Therapie und Diagnostik bieten.

Decorin scheint einen modulierenden, vorrangig anti-fibrotischen Einfluss auf VIC zu haben. Hier stellt sich in den Ergebnissen teilweise eine Dosisabhängigkeit dar, die sowohl auf die Proliferation als auch auf den chondro-osteogenen EZM-Umbau Einfluss hat. Eine mögliche Induktion von Kalzifizierung konnte zwar in dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht beobachtet werden, jedoch könnte Decorin eine entzündungshemmende Rolle in VIC einnehmen. Diese Erkenntnisse erhärten den Verdacht, dass Decorin in der DAVD die Funktion der VIC moduliert und damit einen anti-degenerativen Effekt auf den Krankheitsverlauf haben könnte.

5.7 Mögliche Interaktion von Activin A vs. Decorin

Activin A und Decorin wurden auf ihre Rollen in der DAVD isoliert untersucht. Vermeintlich haben sie bezüglich der Regulation chondro-osteogener Marker und Proliferation demnach teilweise gegensätzliche Effekte auf VIC (s.o.). Wie interagieren Activin A und Decorin aber miteinander?

Andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie interagieren mit Decorin auf vielfältige Weise (183): Decorin hat zwei Bindungsstellen mit TGF- β und kann es selbst gebunden an Kollagen in der EZM halten und dann den Signalweg von TGF- β hemmen (184, 185). TGF- β hingegen besitzt die Fähigkeit, die Expression von Decorin in Fibroblasten zu hemmen (186). Durch die Bindung von Decorin an Myostatin kommt es zur Veränderung der Proliferation von Myoblasten (187). Allerdings kommt es in Kardiomyozyten ohne Decorin zur abgeschwächten Expression von Myostatin, während die exogene Behandlung mit Decorin dosisabhängig die Wirkung von Myostatin auf Kardiomyozyten hemmt. Myostatin reguliert hier Signalwege, die der Aktivierung des Activin-Rezeptors folgen (188). Die Wirkung von Activin C wird durch die Interaktion mit Decorin ebenfalls abgeschwächt (189). Inhibin- β -A-Ketten können durch Dimerisierung Activin formen, nehmen allerdings fast gegensätzliche biologische Funktionen ein. Decorin und Inhibin-A hingegen fungieren ähnlich in der Regeneration von Nierenzellen (190). In Osteoblasten führt Activin A zur Hochregulation von Decorin, was mit einer abgeschwächten Mineralisierung assoziiert ist (89). Scheinbar fungieren Decorin und Activin A folglich zeitweise als Gegenspieler und können sich gegenseitig regulieren. Ob dies auch in der DAVD zu veränderten Signalwegen führt, sollte weiter untersucht werden.

5.8 Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beinhaltet Limitationen bezüglich der Übertragbarkeit der verwendeten Substanzen auf humane Aortenklappen, da hier ov. VIC und Aortenklappen aus Schafsherzen verwendet wurden. Die Aussagekraft der erhobenen Daten bezüglich Kalzifizierung der Aortenklappe sind mit Berücksichtigung der zeitlichen Kürze der Versuchsprotokolle zu betrachten. Die Messungen mittels kolorimetrischem Kalzium-Assay in 3D waren scheinbar nicht geeignet, eine Induktion der Kalzium-Akkumulation unter pro-kalzifizierenden Stimuli zu reproduzieren, wie sie im 2D-Modell zwischen den Kontrollgruppen sichtbar war. Daher ist die Verlässlichkeit der hier erzielten Ergebnisse auf die Wirkung von Activin A und Decorin kritisch zu hinterfragen. Die unterschiedlichen Einflussgrößen des 3D-Modells, welche teilweise zu modulierten oder konträren Ergebnissen im Vergleich zum 2D-Modell führen, sollten in Zukunft weiter erörtert und möglichst definiert werden. Die Interaktion von VIC und VEC in 3D, sowie die Rolle der Mikroumgebung, also der EZM, bedürfen spezifischeren Untersuchungen, um die

erhobenen Daten besser einordnen zu können. Weiterhin könnten die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine in ihrem Aufbau von den *in vivo* vorkommenden Formen abweichen und zu heterogenen Interaktionen führen. Es ist bekannt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen geschlechtsspezifischen Regulationen unterliegen. Diese Ansatzpunkte sind in der vorliegenden Arbeit nicht integriert.

5.9 Ausblick für weitere Forschung

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Activin A den Progress der DAVD unterstützt, indem es proliferative, pro-fibrotische und pro-degenerative Effekte auf die VIC befördert. Eine Hemmung der Wirkung von Activin A bzw. seines Signalweges, wie es in zahlreichen anderen Zelltypen bereits untersucht wurde, könnte also ggf. einen modulierenden Einfluss auf die DAVD haben. Folglich könnte hier ein Ansatzpunkt für Therapiemöglichkeiten identifiziert werden. Die potenzielle Dosisabhängigkeit für die Wirkung auf VIC könnte schließlich Therapie-Monitoring erlauben oder als klinischer Marker zur Risikostratifizierung dienen. In weiteren, sich dem menschlichen Organismus annähernden Versuchsmodellen sollte zudem die hier identifizierte Wirkung von Activin A auf VIC möglichst reproduziert werden. Könnte in diesem Zuge auch die anti-inflammatorische Wirkung von Activin A bestätigt werden, gäbe dies ggf. Hinweise auf frühe, entzündliche Stadien der DAVD als Krankheitsmarker.

Die mögliche anti-fibrotische Interaktion von Decorin mit VIC könnte man sich unterdessen als günstigen prognostischen Faktor zu Nutze machen, sofern Versuche *in vivo* und mit humanem Gewebe diese Funktion bestätigten. Interessant wäre eine etwaige Therapieoption mit Decorin, um den Verlauf der DAVD zu schwächen oder gar zu stoppen. Generell wäre die weitere Testung von verschiedenen Dosierungen Decorin auf Grundlage der hier gewonnenen Erkenntnisse vorausgesetzt und wünschenswert. Die Regulierung der Expression von Decorin als Bestandteil der Aortenklappe im Verlauf der Erkrankung *in vitro* würde zudem weitere Erkenntnisse bezüglich der Rolle von Decorin in den verschiedenen Stadien der DAVD liefern. Die erhobenen Daten bieten vorrangig die Grundlage für zukünftige Forschungsansätze bezüglich der Rolle von Activin A und Decorin in VIC im Kontext der DAVD. Darauf aufbauend könnten zielgerichtete *in vivo* Untersuchungen einen weiteren Schritt zum umfassenden Verständnis des Pathomechanismus leisten. Mit der vorliegenden Arbeit ist somit ein weiterer Schritt in Richtung Früherkennung, Risikostratifizierung, Verlaufskontrolle und idealerweise der Behandlung in der DAVD getan.

6 Quellen- und Literaturverzeichnis

1. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003;24(13):1231-43.
2. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*. 2006;368(9540):1005-11.
3. Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, et al. Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. *Circulation*. 2020;141(21):1670-80.
4. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res*. 2011;108(11):1392-412.
5. Alushi B, Curini L, Christopher MR, Grubitzsch H, Landmesser U, Amedei A, et al. Calcific Aortic Valve Disease-Natural History and Future Therapeutic Strategies. *Front Pharmacol*. 2020;11:685.
6. Sun L, Rajamannan NM, Sucusky P. Defining the role of fluid shear stress in the expression of early signaling markers for calcific aortic valve disease. *PLoS One*. 2013;8(12):e84433.
7. Bardon KM, Garelnabi M. The impact of altered mechanobiology on aortic valve pathophysiology. *Arch Biochem Biophys*. 2020;691:108463.
8. Small A, Kiss D, Giri J, Anwaruddin S, Siddiqi H, Guerraty M, et al. Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(4):623-32.
9. Ma X, Zhao D, Yuan P, Li J, Yun Y, Cui Y, et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Calcific Aortic Valve Disease. *Acta Cardiol Sin*. 2020;36(3):183-94.
10. Warren BA, Yong JL. Calcification of the aortic valve: its progression and grading. *Pathology*. 1997;29(4):360-8.
11. Mohler ER, 3rd, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(3):547-52.
12. Steiner I, Kasparova P, Kohout A, Dominik J. Bone formation in cardiac valves: a histopathological study of 128 cases. *Virchows Arch*. 2007;450(6):653-7.
13. Perrucci GL, Zanobini M, Gripari P, Songia P, Alshaikh B, Tremoli E, et al. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Mitral Regurgitation. *Compr Physiol*. 2017;7(3):799-818.
14. O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1721-8.
15. Tohno Y, Tohno S, Minami T, Ichii M, Okazaki Y, Utsumi M, et al. Age-related change of mineral content in the human thoracic aorta and in the human cerebral artery. *Biol Trace Elem Res*. 1996;54(1):23-31.
16. Sathyamurthy I, Alex S. Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis? *Indian Heart J*. 2015;67(5):503-6.
17. Kostyunin A, Mukhamadiyarov R, Glushkova T, Bogdanov L, Shishkova D, Osyayev N, et al. Ultrastructural Pathology of Atherosclerosis, Calcific Aortic Valve Disease, and Bioprosthetic Heart Valve Degeneration: Commonalities and Differences. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
18. Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med*. 2014;371(8):744-56.
19. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005;111(24):3316-26.
20. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1343-56.
21. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J, Investigators A. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression

- observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation*. 2010;121(2):306-14.
22. Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Eur Cardiol*. 2015;10(2):108-12.
23. Lauten A, Figulla HR, Mollmann H, Holzhey D, Kotting J, Beckmann A, et al. TAVI for low-flow, low-gradient severe aortic stenosis with preserved or reduced ejection fraction: a subgroup analysis from the German Aortic Valve Registry (GARY). *EuroIntervention*. 2014;10(7):850-9.
24. Wernly B, Jirak P, Lichtenauer M, Veulemans V, Zeus T, Piayda K, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of Interventional Emergency Treatment of Decompensated Severe Aortic Stenosis. *J Invasive Cardiol*. 2020;32(1):30-6.
25. Liu. The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. *American Society for Investigative Pathology*. 2007.
26. Desmouliere A, Badid C, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(1):19-30.
27. Li C, Xu S, Gotlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(1):1-8.
28. Mathieu P, Voisine P, Pepin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(3):353-7.
29. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011;124(16):1783-91.
30. Rajamannan NM. Calcific aortic valve disease: cellular origins of valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):2777-8.
31. Rattazzi M, Bertacco E, Iop L, D'Andrea S, Puato M, Buso G, et al. Extracellular pyrophosphate is reduced in aortic interstitial valve cells acquiring a calcifying profile: implications for aortic valve calcification. *Atherosclerosis*. 2014;237(2):568-76.
32. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(4):523-32.
33. Cote C, Pibarot P, Despres JP, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ, et al. Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart*. 2008;94(9):1175-80.
34. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 1994;90(2):844-53.
35. Charest A, Pepin A, Shetty R, Cote C, Voisine P, Dagenais F, et al. Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart*. 2006;92(12):1844-9.
36. Cote N, Mahmut A, Bosse Y, Couture C, Page S, Trahan S, et al. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation*. 2013;36(3):573-81.
37. Isoda K, Matsuki T, Kondo H, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):708-15.
38. Galeone A, Brunetti G, Oranger A, Greco G, Di Benedetto A, Mori G, et al. Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Cardiol*. 2013;169(4):296-304.
39. Gee T, Farrar E, Wang Y, Wu B, Hsu K, Zhou B, et al. NFkappaB (Nuclear Factor kappa-Light-Chain Enhancer of Activated B Cells) Activity Regulates Cell-Type-Specific and Context-Specific Susceptibility to Calcification in the Aortic Valve. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(3):638-55.

40. Rivest S. Activation of the nuclear factor kappa B (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) genes in cerebral blood vessels in response to systemic inflammation. *Mol Psychiatry*. 1999;4(6):500.
41. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.
42. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res*. 2004;95(3):253-60.
43. Cushing MC, Liao JT, Anseth KS. Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor-beta1 interactions with matrix molecules. *Matrix Biol*. 2005;24(6):428-37.
44. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(5).
45. Lee SC, Kim SH, Koh HJ, Kwon OW. TGF-betas synthesized by RPE cells have autocrine activity on mesenchymal transformation and cell proliferation. *Yonsei Med J*. 2001;42(3):271-7.
46. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):184-95.
47. Radosinska J, Barancik M, Vrbjar N. Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9. *Panminerva Med*. 2017;59(3):241-53.
48. Kaden JJ, Vocke DC, Fischer CS, Grobholz R, Brueckmann M, Vahl CF, et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in calcific aortic stenosis. *Z Kardiol*. 2004;93(2):124-30.
49. Farkhondeh T, Llorens S, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, Talebi M, Shakibaei M, et al. An Overview of the Role of Adipokines in Cardiometabolic Diseases. *Molecules*. 2020;25(21).
50. Larsen BA, Laughlin GA, Cummins K, Barrett-Connor E, Wassel CL. Adipokines and severity and progression of coronary artery calcium: Findings from the Rancho Bernardo Study. *Atherosclerosis*. 2017;265:1-6.
51. Sehnal D, Bittrich S, Deshpande M, Svobodova R, Berka K, Bazgier V, et al. Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W431-W7.
52. Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derkx P, Uitterlinden AG, et al. The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(11):2949-60.
53. Bao H, Sin TK, Zhang G. Activin A induces tumorigenesis of leiomyoma via regulation of p38beta MAPK-mediated signal cascade. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;529(2):379-85.
54. Wu H, Chen Y, Winnall WR, Phillips DJ, Hedger MP. Regulation of activin A release from murine bone marrow-derived neutrophil precursors by tumour necrosis factor-alpha and insulin. *Cytokine*. 2013;61(1):199-204.
55. Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Murohara T. Protective Roles of Adipocytokines and Myokines in Cardiovascular Disease. *Circ J*. 2016;80(10):2073-80.
56. Mahmoudabady M, Mathieu M, Dewachter L, Hadad I, Ray L, Jaspers P, et al. Activin-A, transforming growth factor-beta, and myostatin signaling pathway in experimental dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2008;14(8):703-9.
57. Bjornstad JL, Neverdal NO, Vengen OA, Knudsen CW, Husebye T, Pepper J, et al. Alterations in circulating activin A, GDF-15, TGF-beta3 and MMP-2, -3, and -9 during one year of left ventricular reverse remodelling in patients operated for severe aortic stenosis. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(12):1201-7.
58. Xian S, Chen A, Wu X, Lu C, Wu Y, Huang F, et al. Activation of activin/Smad2 and 3 signaling pathway and the potential involvement of endothelialmesenchymal transition in the valvular damage due to rheumatic heart disease. *Mol Med Rep*. 2021;23(1).

59. Das DK, Graham ZA, Cardozo CP. Myokines in skeletal muscle physiology and metabolism: Recent advances and future perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020;228(2):e13367.
60. Barbalho SM, Prado Neto EV, De Alvares Goulart R, Bechara MD, Baisi Chagas EF, Audi M, et al. Myokines: a descriptive review. *J Sports Med Phys Fitness*. 2020;60(12):1583-90.
61. Vu TT, Marquez J, Le LT, Nguyen ATT, Kim HK, Han J. The role of decorin in cardiovascular diseases: more than just a decoration. *Free Radic Res*. 2018;52(11-12):1210-9.
62. Severinsen MCK, Pedersen BK. Muscle-Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocr Rev*. 2020;41(4).
63. Hultgardh-Nilsson A, Boren J, Chakravarti S. The small leucine-rich repeat proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis. *J Intern Med*. 2015;278(5):447-61.
64. Krusius T, Ruoslahti E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(20):7683-7.
65. Iozzo RV, Karamanos N. Proteoglycans in health and disease: emerging concepts and future directions. *FEBS J*. 2010;277(19):3863.
66. Dupuis LE, Kern CB. Small leucine-rich proteoglycans exhibit unique spatiotemporal expression profiles during cardiac valve development. *Dev Dyn*. 2014;243(4):601-11.
67. Fischer JW, Steitz SA, Johnson PY, Burke A, Kolodgie F, Virmani R, et al. Decorin promotes aortic smooth muscle cell calcification and colocalizes to calcified regions in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(12):2391-6.
68. Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, Kiene LS, Raschke S, et al. Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve. *Diab Vasc Dis Res*. 2019;16(3):254-69.
69. Neufeld EB, Zadrozny LM, Phillips D, Aponte A, Yu ZX, Balaban RS. Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):113-21.
70. Song R, Zeng Q, Ao L, Yu JA, Cleveland JC, Zhao KS, et al. Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(11):2711-20.
71. Selig JI, Ouwens DM, Raschke S, Thoresen GH, Fischer JW, Lichtenberg A, et al. Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells - A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(9):2526-37.
72. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, et al. Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes*. 2010;59(10):2513-21.
73. Andersen GO, Ueland T, Knudsen EC, Scholz H, Yndestad A, Sahraoui A, et al. Activin A levels are associated with abnormal glucose regulation in patients with myocardial infarction: potential counteracting effects of activin A on inflammation. *Diabetes*. 2011;60(5):1544-51.
74. Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;74(3):255-69.
75. Rosenberg N, Soudry M, Rosenberg O, Blumenfeld I, Blumenfeld Z. The role of activin A in the human osteoblast cell cycle: a preliminary experimental in vitro study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2010;118(10):708-12.
76. Zhao Z. TGFbeta and Wnt in cardiac outflow tract defects in offspring of diabetic pregnancies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2014;101(5):364-70.
77. Chen L, De Menna M, Groenewoud A, Thalmann GN, Kruithof-de Julio M, Snaar-Jagalska BE. A NF-kB-Activin A signaling axis enhances prostate cancer metastasis. *Oncogene*. 2020;39(8):1634-51.
78. Zhao Z. Activin-A in diabetes-induced cardiac malformations in embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2013;98(3):260-7.
79. Hu J, Wang X, Wei SM, Tang YH, Zhou Q, Huang CX. Activin A stimulates the proliferation and differentiation of cardiac fibroblasts via the ERK1/2 and p38-MAPK pathways. *Eur J Pharmacol*. 2016;789:319-27.

80. Molloy CJ, Taylor DS, Pawlowski JE. Novel cardiovascular actions of the activins. *J Endocrinol.* 1999;161(2):179-85.
81. De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 1996;271(31):18961-5.
82. Tralhao JG, Schaefer L, Micegova M, Evaristo C, Schonherr E, Kayal S, et al. In vivo selective and distant killing of cancer cells using adenovirus-mediated decorin gene transfer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2003;17(3):464-6.
83. Horvath Z, Kovalszky I, Fullar A, Kiss K, Schaff Z, Iozzo RV, et al. Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis. *Matrix Biol.* 2014;35:194-205.
84. Zhang Z, Li XJ, Liu Y, Zhang X, Li YY, Xu WS. Recombinant human decorin inhibits cell proliferation and downregulates TGF-beta1 production in hypertrophic scar fibroblasts. *Burns.* 2007;33(5):634-41.
85. Chen JH, Simmons CA. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ Res.* 2011;108(12):1510-24.
86. Hutcheson JD, Venkataraman R, Baudenbacher FJ, Merryman WD. Intracellular Ca(2+) accumulation is strain-dependent and correlates with apoptosis in aortic valve fibroblasts. *J Biomech.* 2012;45(5):888-94.
87. Weber A, Pfaff M, Schottler F, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P. Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitial Cells. *Biomedicine.* 2021;9(5).
88. Ikenoue T, Jingushi S, Urabe K, Okazaki K, Iwamoto Y. Inhibitory effects of activin-A on osteoblast differentiation during cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Biochem.* 1999;75(2):206-14.
89. Alves RD, Eijken M, Bezstarosti K, Demmers JA, van Leeuwen JP. Activin A suppresses osteoblast mineralization capacity by altering extracellular matrix (ECM) composition and impairing matrix vesicle (MV) production. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(10):2890-900.
90. Sakai R, Fujita S, Horie T, Ohyama T, Miwa K, Maki T, et al. Activin increases bone mass and mechanical strength of lumbar vertebrae in aged ovariectomized rats. *Bone.* 2000;27(1):91-6.
91. Gaddy-Kurten D, Coker JK, Abe E, Jilka RL, Manolagas SC. Inhibin suppresses and activin stimulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Endocrinology.* 2002;143(1):74-83.
92. Bloise E, Ciarmela P, Dela Cruz C, Luisi S, Petraglia F, Reis FM. Activin A in Mammalian Physiology. *Physiol Rev.* 2019;99(1):739-80.
93. Hortells L, Sosa C, Guillen N, Lucea S, Millan A, Sorribas V. Identifying early pathogenic events during vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* 2017;92(6):1384-94.
94. Mochida Y, Duarte WR, Tanzawa H, Paschalis EP, Yamauchi M. Decorin modulates matrix mineralization in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(1):6-9.
95. Licini C, Vitale-Brovarone C, Mattioli-Belmonte M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;49:59-69.
96. Fartasch M, Haneke E, Hornstein OP. Mineralization of collagen and elastic fibers in superficial dystrophic cutaneous calcification: an ultrastructural study. *Dermatologica.* 1990;181(3):187-92.
97. Yamashita S, Maeshima A, Kojima I, Nojima Y. Activin A is a potent activator of renal interstitial fibroblasts. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(1):91-101.
98. Kiagiadaki F, Kampa M, Voumvouraki A, Castanas E, Kouroumalis E, Notas G. Activin-A causes Hepatic stellate cell activation via the induction of TNFalpha and TGFbeta in Kupffer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(3):891-9.
99. Zhang Z, Wang J, Chen Y, Suo L, Chen H, Zhu L, et al. Activin a promotes myofibroblast differentiation of endometrial mesenchymal stem cells via STAT3-dependent Smad/CTGF pathway. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):45.

100. Kauerhof AC, Nicolas N, Bhushan S, Wahle E, Loveland KA, Fietz D, et al. Investigation of activin A in inflammatory responses of the testis and its role in the development of testicular fibrosis. *Hum Reprod.* 2019;34(8):1536-50.
101. Wietecha MS, Pensalfini M, Cangkrama M, Muller B, Jin J, Brinckmann J, et al. Activin-mediated alterations of the fibroblast transcriptome and matrisome control the biomechanical properties of skin wounds. *Nat Commun.* 2020;11(1):2604.
102. Ohga E, Matsuse T, Teramoto S, Ouchi Y. Activin receptors are expressed on human lung fibroblast and activin A facilitates fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Life Sci.* 2000;66(17):1603-13.
103. Zhang H, Ju B, Nie Y, Song B, Xu Y, Gao P. Adenovirus-mediated knockdown of activin A receptor type 2A attenuates immune-induced hepatic fibrosis in mice and inhibits interleukin-17-induced activation of primary hepatic stellate cells. *Int J Mol Med.* 2018;42(1):279-89.
104. Hayashi Y, Maeshima K, Goto F, Kojima I. Activin A as a critical mediator of capillary formation: interaction with the fibroblast growth factor action. *Endocr J.* 2007;54(2):311-8.
105. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol.* 1997;136(3):729-43.
106. Zhang Z, Li XJ, Liang DR, Li YY, Xu WS. [The antagonistic effect of recombinant human decorin on TGF-beta1 stimulation of fibroblasts in collagen lattices]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2006;22(3):207-10.
107. Zhang G, Ezura Y, Chervoneva I, Robinson PS, Beason DP, Carine ET, et al. Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J Cell Biochem.* 2006;98(6):1436-49.
108. Zhang Z, Garron TM, Li XJ, Liu Y, Zhang X, Li YY, et al. Recombinant human decorin inhibits TGF-beta1-induced contraction of collagen lattice by hypertrophic scar fibroblasts. *Burns.* 2009;35(4):527-37.
109. Jarvelainen H, Vernon RB, Gooden MD, Francki A, Lara S, Johnson PY, et al. Overexpression of decorin by rat arterial smooth muscle cells enhances contraction of type I collagen in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):67-72.
110. Chen G, Zhu Y, Liang X, Wang X, Yu W, Guo J, et al. The Effect of Lecithins Coupled Decorin Nanoliposomes on Treatment of Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis. *Biomed Res Int.* 2020;2020:8815904.
111. Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ, Gauldie J. Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(6):L1327-34.
112. Kolb M, Margetts PJ, Galt T, Sime PJ, Xing Z, Schmidt M, et al. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(3 Pt 1):770-7.
113. Jiang N, Zhang Q, Chau MK, Yip MS, Lui SL, Liu S, et al. Anti-fibrotic effect of decorin in peritoneal dialysis and PD-associated peritonitis. *EBioMedicine.* 2020;52:102661.
114. Yan W, Wang P, Zhao CX, Tang J, Xiao X, Wang DW. Decorin gene delivery inhibits cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats by modulation of transforming growth factor-beta/Smad and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Hum Gene Ther.* 2009;20(10):1190-200.
115. Chen F, Lai J, Zhu Y, He M, Hou H, Wang J, et al. Cardioprotective Effect of Decorin in Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:479258.
116. Incorvaia L, Badalamenti G, Rini G, Arcara C, Fricano S, Sferrazza C, et al. MMP-2, MMP-9 and activin A blood levels in patients with breast cancer or prostate cancer metastatic to the bone. *Anticancer Res.* 2007;27(3B):1519-25.
117. Hardy JT, Buhimschi IA, McCarthy ME, Zhao G, Laky CA, Shook LL, et al. Imbalance of Amniotic Fluid Activin-A and Follistatin in Intraamniotic Infection, Inflammation, and Preterm Birth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(7):2785-93.

118. Ogawa K, Funaba M, Mathews LS, Mizutani T. Activin A stimulates type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) production in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* 2000;165(6):2997-3003.
119. Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology.* 1997;138(9):3976-86.
120. Jones RL, Findlay JK, Farnworth PG, Robertson DM, Wallace E, Salamonsen LA. Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology.* 2006;147(2):724-32.
121. Myers M, Gay E, McNeilly AS, Fraser HM, Duncan WC. In vitro evidence suggests activin-A may promote tissue remodeling associated with human luteolysis. *Endocrinology.* 2007;148(8):3730-9.
122. Li Y, Klausen C, Zhu H, Leung PC. Activin A Increases Human Trophoblast Invasion by Inducing SNAIL-Mediated MMP2 Up-Regulation Through ALK4. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(11):E1415-27.
123. Szarek M, Bergmann M, Konrad L, Schuppe HC, Kliesch S, Hedger MP, et al. Activin A target genes are differentially expressed between normal and neoplastic adult human testes: clues to gonocyte fate choice. *Andrology.* 2019;7(1):31-41.
124. Zou Y, Yu X, Lu J, Jiang Z, Zuo Q, Fan M, et al. Decorin-Mediated Inhibition of Human Trophoblast Cells Proliferation, Migration, and Invasion and Promotion of Apoptosis In Vitro. *Biomed Res Int.* 2015;2015:201629.
125. Wong AP, Nili N, Strauss BH. In vitro differences between venous and arterial-derived smooth muscle cells: potential modulatory role of decorin. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):702-10.
126. Dong FQ, Li H, Wu F, Yao HP. [Effects of overexpression of decorin on matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat mesangial and tubular cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008;88(48):3444-7.
127. Mao L, Yang J, Yue J, Chen Y, Zhou H, Fan D, et al. Decorin deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and colon cancer metastasis. *Matrix Biol.* 2021;95:1-14.
128. Schonherr E, Schaefer L, O'Connell BC, Kresse H. Matrix metalloproteinase expression by endothelial cells in collagen lattices changes during co-culture with fibroblasts and upon induction of decorin expression. *J Cell Physiol.* 2001;187(1):37-47.
129. Al Haj Zen A, Lafont A, Durand E, Brasselet C, Lemarchand P, Godeau G, et al. Effect of adenovirus-mediated overexpression of decorin on metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and cytokines secretion by human gingival fibroblasts. *Matrix Biol.* 2003;22(3):251-8.
130. Hill LJ, Mead B, Blanch RJ, Ahmed Z, De Cogan F, Morgan-Warren PJ, et al. Decorin Reduces Intraocular Pressure and Retinal Ganglion Cell Loss in Rodents Through Fibrolysis of the Scarred Trabecular Meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(6):3743-57.
131. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest.* 1994;93(5):2106-13.
132. Jenke A, Kistner J, Saradar S, Chekhoeva A, Yazdanyar M, Bergmann AK, et al. Transforming growth factor-beta1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2020;319(5):H1123-H41.
133. Cabello-Verrugio C, Santander C, Cofre C, Acuna MJ, Melo F, Brandan E. The internal region leucine-rich repeat 6 of decorin interacts with low density lipoprotein receptor-related protein-1, modulates transforming growth factor (TGF)-beta-dependent signaling, and inhibits TGF-beta-dependent fibrotic response in skeletal muscles. *J Biol Chem.* 2012;287(9):6773-87.
134. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature.* 1990;346(6281):281-4.
135. Wu F, Yao H, Bader A, Dong F, Zhu F, Wu N, et al. Decorin gene transfer inhibited the expression of TGFbeta1 and ECM in rat mesangial cells. *Eur J Med Res.* 2007;12(8):360-8.

136. Dawoody Nejad L, Biglari A, Annese T, Ribatti D. Recombinant fibromodulin and decorin effects on NF-kappaB and TGFbeta1 in the 4T1 breast cancer cell line. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4475-80.
137. Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, Clowes AW, Wight TN. Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(5):777-84.
138. Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(4):262-8.
139. Canver CC, Gregory RD, Cooler SD, Voytovich MC. Association of osteopontin with calcification in human mitral valves. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2000;41(2):171-4.
140. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation.* 2003;107(17):2181-4.
141. Yu PJ, Skolnick A, Ferrari G, Heretis K, Mignatti P, Pintucci G, et al. Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(1):196-9.
142. Sainger R, Grau JB, Poggio P, Branchetti E, Bavaria JE, Gorman JH, 3rd, et al. Dephosphorylation of circulating human osteopontin correlates with severe valvular calcification in patients with calcific aortic valve disease. *Biomarkers.* 2012;17(2):111-8.
143. Kapelouzou A, Tsourelis L, Kaklamanis L, Degiannis D, Kogerakis N, Cokkinos DV. Serum and tissue biomarkers in aortic stenosis. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2015;2015(4):49.
144. Passmore M, Nataatmadja M, Fung YL, Pearse B, Gabriel S, Tesar P, et al. Osteopontin alters endothelial and valvular interstitial cell behaviour in calcific aortic valve stenosis through HMGB1 regulation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015;48(3):e20-9.
145. Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, Kleppe L, Veinot J, Edwards WD, et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest.* 1997;99(5):996-1009.
146. Zhiduleva EV, Irtyuga OB, Shishkova AA, Ignat'eva EV, Kostina AS, Levchuk KA, et al. Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification. *Bull Exp Biol Med.* 2018;164(3):371-5.
147. Liu L, Qin C, Butler WT, Ratner BD, Jiang S. Controlling the orientation of bone osteopontin via its specific binding with collagen I to modulate osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A.* 2007;80(1):102-10.
148. Sakai R, Eto Y, Hirafuji M, Shinoda H. Activin release from bone coupled to bone resorption in organ culture of neonatal mouse calvaria. *Bone.* 2000;26(3):235-40.
149. Woeckel VJ, van der Eerden BC, Schreuders-Koedam M, Eijken M, Van Leeuwen JP. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates activin A production to fine-tune osteoblast-induced mineralization. *J Cell Physiol.* 2013;228(11):2167-74.
150. Schafer MJ, Zhang X, Kumar A, Atkinson EJ, Zhu Y, Jachim S, et al. The senescence-associated secretome as an indicator of age and medical risk. *JCI Insight.* 2020;5(12).
151. Fagenholz PJ, Warren SM, Greenwald JA, Bouletreau PJ, Spector JA, Crisera FE, et al. Osteoblast gene expression is differentially regulated by TGF-beta isoforms. *J Craniofac Surg.* 2001;12(2):183-90.
152. Douglas T, Hempel U, Mietchak C, Viola M, Vigetti D, Heinemann S, et al. Influence of collagen-fibril-based coatings containing decorin and biglycan on osteoblast behavior. *J Biomed Mater Res A.* 2008;84(3):805-16.
153. Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P, Mathieu P. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(5):489-98.
154. Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem.* 1998;273(13):7547-53.
155. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A, et al. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2589-96.

156. Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(1):1087-92.
157. Harmsen MJ, Wong CFC, Mijatovic V, Griffioen AW, Groenman F, Hehenkamp WJK, et al. Role of angiogenesis in adenomyosis-associated abnormal uterine bleeding and subfertility: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2019;25(5):647-71.
158. Hu J, Wang X, Tang YH, Shan YG, Zou Q, Wang ZQ, et al. Activin A inhibition attenuates sympathetic neural remodeling following myocardial infarction in rats. *Mol Med Rep.* 2018;17(4):5074-80.
159. Barluet E, Morales BM, Cain CJ, Ton AN, Wentworth KL, Chan TV, et al. NF-kappaB/MAPK activation underlies ACVR1-mediated inflammation in human heterotopic ossification. *JCI Insight.* 2018;3(22).
160. Murase Y, Okahashi N, Koseki T, Itoh K, Udagawa N, Hashimoto O, et al. Possible involvement of protein kinases and Smad2 signaling pathways on osteoclast differentiation enhanced by activin A. *J Cell Physiol.* 2001;188(2):236-42.
161. Sugatani T, Alvarez UM, Hruska KA. Activin A stimulates IkappaB-alpha/NFkappaB and RANK expression for osteoclast differentiation, but not AKT survival pathway in osteoclast precursors. *J Cell Biochem.* 2003;90(1):59-67.
162. Kajita T, Ariyoshi W, Okinaga T, Mitsugi S, Tominaga K, Nishihara T. Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation by activin-A. *J Cell Biochem.* 2018;119(8):6974-85.
163. Liu X, Chen Z, Lan T, Liang P, Tao Q. Upregulation of interleukin-8 and activin A induces osteoclastogenesis in ameloblastoma. *Int J Mol Med.* 2019;43(6):2329-40.
164. Yamawaki-Ogata A, Oshima H, Usui A, Narita Y. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells regress aortic aneurysm via the NF-kB, Smad3 and Akt signaling pathways. *Cytotherapy.* 2017;19(10):1167-75.
165. Aleman-Muench GR, Soldevila G. When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(2):137-48.
166. Zhang XJ, Li Y, Tai GX, Xu GY, Zhang PY, Yang Y, et al. Effects of activin A on the activities of the mouse peritoneal macrophages. *Cell Mol Immunol.* 2005;2(1):63-7.
167. Cuschieri J, Bulger E, Grinsell R, Garcia I, Maier RV. Insulin regulates macrophage activation through activin A. *Shock.* 2008;29(2):285-90.
168. Wang SY, Tai GX, Zhang PY, Mu DP, Zhang XJ, Liu ZH. Inhibitory effect of activin A on activation of lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Cytokine.* 2008;42(1):85-91.
169. Lee J, Ko J, Yi JY. Histone deacetylase inhibitor (HDACi) upregulates activin A and activates the Smad signaling pathway in melanomas. *J Dermatol Sci.* 2018;90(1):13-20.
170. Alexander S, Watt F, Sawaji Y, Hermansson M, Saklatvala J. Activin A is an anticatabolic autocrine cytokine in articular cartilage whose production is controlled by fibroblast growth factor 2 and NF-kappaB. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3715-25.
171. Jones KL, Mansell A, Patella S, Scott BJ, Hedger MP, de Kretser DM, et al. Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(41):16239-44.
172. Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(2):153-64.
173. Morianos I, Papadopoulou G, Semitekolou M, Xanthou G. Activin-A in the regulation of immunity in health and disease. *J Autoimmun.* 2019;104:102314.
174. Jones KL, de Kretser DM, Patella S, Phillips DJ. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;225(1-2):119-25.
175. Sugama S, Takenouchi T, Kitani H, Fujita M, Hashimoto M. Activin as an anti-inflammatory cytokine produced by microglia. *J Neuroimmunol.* 2007;192(1-2):31-9.
176. Zhou J, Tai G, Liu H, Ge J, Feng Y, Chen F, et al. Activin A down-regulates the phagocytosis of lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Cell Immunol.* 2009;255(1-2):69-75.

-
177. Hedger MP, Winnall WR. Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;359(1-2):30-42.
178. de Kretser DM, O'Hehir RE, Hardy CL, Hedger MP. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;359(1-2):101-6.
179. Zeng-Brouwers J, Pandey S, Trebicka J, Wygrecka M, Schaefer L. Communications via the Small Leucine-rich Proteoglycans: Molecular Specificity in Inflammation and Autoimmune Diseases. *J Histochem Cytochem.* 2020;68(12):887-906.
180. Merline R, Moreth K, Beckmann J, Nastase MV, Zeng-Brouwers J, Tralhao JG, et al. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal.* 2011;4(199):ra75.
181. Zhang W, Ge Y, Cheng Q, Zhang Q, Fang L, Zheng J. Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment. *Oncotarget.* 2018;9(4):5480-91.
182. Roughley PJ, White RJ. Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. The properties of dermatan sulphate proteoglycans I and II. *Biochem J.* 1989;262(3):823-7.
183. Gubbiotti MA, Vallet SD, Ricard-Blum S, Iozzo RV. Decorin interacting network: A comprehensive analysis of decorin-binding partners and their versatile functions. *Matrix Biol.* 2016;55:7-21.
184. Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem.* 1994;269(51):32634-8.
185. Markmann A, Hausser H, Schonherr E, Kresse H. Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction. *Matrix Biol.* 2000;19(7):631-6.
186. Mauviel A, Santra M, Chen YQ, Uitto J, Iozzo RV. Transcriptional regulation of decorin gene expression. Induction by quiescence and repression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 1995;270(19):11692-700.
187. Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A, Hennebry A, Berry CJ, et al. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(2):675-80.
188. Barallobre-Barreiro J, Gupta SK, Zoccarato A, Kitazume-Taneike R, Fava M, Yin X, et al. Glycoproteomics Reveals Decorin Peptides With Anti-Myostatin Activity in Human Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2016;134(11):817-32.
189. Bi X, Xia X, Fan D, Mu T, Zhang Q, Iozzo RV, et al. Oncogenic activin C interacts with decorin in colorectal cancer in vivo and in vitro. *Mol Carcinog.* 2016;55(11):1786-95.
190. Sallustio F, Curci C, Aloisi A, Toma CC, Marulli E, Serino G, et al. Inhibin-A and Decorin Secreted by Human Adult Renal Stem/Progenitor Cells Through the TLR2 Engagement Induce Renal Tubular Cell Regeneration. *Sci Rep.* 2017;7(1):8225.

7 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bedanken,

bei **Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari** unter dessen Aufsicht ich die Forschungsarbeiten im Rahmen meiner Doktorarbeit durchführen und meinen Weg in die Wissenschaft finden konnte. bei **Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg**, dafür, dass ich meine Promotion an der Klinik für Herzchirurgie durchführen durfte! Vielen Dank für Ihre Supervision!

bei **Dr. rer. nat. Mareike Barth**, ohne deren achtsame Betreuung und Unterstützung der letzten Jahre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dir gilt besonderer Dank!

bei **Dr. rer. nat. Jessica I. Selig**, deren Ambition stets eine Inspiration beim Erstellen dieser Arbeit war und deren Hilfsbereitschaft grenzenlos zu sein scheint,

bei allen **AGs und Mitarbeitern** der Experimentellen Chirurgie für die konstruktive und lehrreiche Zusammenarbeit, insbesondere bei **Neslihan Odabasi**, die mit ihrer Neugierde Naturwissenschaft wie ein Wunderland erscheinen lässt und mich liebevoll von Beginn dieser Arbeit an bei experimentellen Tätigkeiten an die Hand nahm.

bei all meinen **Kommilitonen und Freunden**, die ich während meines Studiums an der Heinrich-Heine-Universität gewonnen habe und die mich stets forderten und inspirierten. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle **Elias J. Kortenbruck, Dr. med. Robin M. Frese** und **Hellen B. Lesmann**. Eure Unterstützung in den letzten Jahren weiß ich in besonderem Maße zu schätzen.

bei **Melanie Müller** und **Deborah Falkenberg**, zwei schlaunen und einzigartigen Frauen, die mir stets neue Perspektiven zeigen.

bei **Severin Mauel**, meinem guten Freund und treuen Begleiter.

Außerordentlich großer und aufrichtiger Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter **Gabriele D. Pracht**, meinem Vater **Anton W. Pracht**, meinem Bruder **Thomas B. Pracht** sowie meiner Schwester und Verbündeten **Manuela Pracht**. Ohne euch und eure unermüdliche Unterstützung wäre dieser Lebensweg für mich nicht denkbar. Dafür bin ich euch ewig zu Dank verpflichtet!