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

Die Rolle des purinergen Stoffwechsels im Degenerationsprozess von Aortenklappen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pia Leuders

2023

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

gez.: Pia Leuders

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

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. P. Akhyari

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. M. Kelm

Zusammenfassung

Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (engl. *calcific aortic valve disease* – CAVD) ist eine fortschreitende Erkrankung, deren Manifestation von leichter Verdickung der Aortenklappe ohne Behinderung des Blutflusses, bis hin zu einer schweren Verkalkung mit starker Beeinträchtigung der Klappenfunktion reicht. CAVD galt lange Zeit als rein passiv degenerativer Prozess. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass es sich um einen aktiv regulierten Prozess handelt, welcher histomorphologisch durch eine Lipoproteinakkumulation, chronische Entzündung und gesteigerte Umbauprozesse innerhalb der extrazellulären Matrix (EZM) charakterisiert ist. Im fortgeschrittenen Stadium stehen kalzifizierende Prozesse im Vordergrund. Es gibt Hinweise dafür, dass eine Dysregulation extrazellulärer purinerger Enzyme die Pathogenese von CAVD mitbeeinflusst. Die Rolle membrangebundener Adenosintriphosphatasen (ATPasen) ist in diesem Kontext noch wenig erforscht. Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss membrangebundener ATPasen im pathophysiologischen Kontext von CAVD zu untersuchen. In CAVD involvierte Prozesse, einschließlich eines EZM Remodelings und einer Biomineralisierung sollten untersucht werden.

Ovine valvuläre Interstitialzellen (VIC), sowie Gewebeproben oviner Aortenklappen wurden in einem in vitro Modell unter pro-degenerativen Bedingungen mit ATPase-Inhibitoren (Suramin und Orthovanadat) behandelt. Die kalziumbasierte Mineralisierung wurde mittels Alizarin Rot-Färbung untersucht. Der Kalziumgehalt und die Zellvitalität wurden mittels Kalzium- und Laktat-Dehydrogenase Assay evaluiert. Zur Analyse der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) basierte Zymographie angewandt. Zur Evaluierung einer möglichen myofibroblastischen Transdifferenzierung wurde die Expression der kontraktilen Filamente Alpha smooth muscle actin (α -SMA) und Vimentin mittles Westernblot untersucht. Die real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) wurde zur Quantifizierung der Genexpression purinerger Schlüsselenzyme eingesetzt. Histologische Analysen dienten dem Nachweis kalzium- oder phosphatbasierter Mineralisierung mittels Alizarin Rot- oder von-Kossa-Färbung. Movat's Pentachrom- und Hämatoxylin & Eosin-Färbungen wurden zur Untersuchung von Veränderungen der EZM eingesetzt.

Die Inhibition von ATPasen führte zu einer verstärkten Biomineralisierung und einem verstärkten Umbau der EZM *in vitro*. Eine kalzium-, und phosphatbasierte Mineralisierung konnte verstärkt nachgewiesen werden. MMPs waren hochreguliert und die Expression von myofibroblastischen Markern war verändert. Schlüsselenzyme des purinergen Stoffwechsels waren unterschiedlich reguliert. Die Regulation purinerger Enzyme auf Genebene bei CAVD ist komplex. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Wirkungen einer purinergen Rezeptoraktivierung auf die Pathophysiologie von CAVD berichtet. Die Ergebnisse müssen in weiteren detaillierteren Modellen bestätigt werden. Unspezifische Nebenwirkungen der Substanzen limitieren die Aussagekraft der Ergebnisse.

Die Studie liefert wichtige Hinweise dafür, dass Enzyme des purinergen Stoffwechsels in Umbauprozesse der EZM und kalzifizierende Prozesse bei CAVD involviert sind. Die Regulierung von ATP konvertierenden Enzymen könnte in Zukunft therapeutische Ansätze für eine pharmakotherapeutische Beeinflussung von CAVD liefern. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um die Ergebnisse zu bestätigen.

Abstract

Calcific aortic valve disease (CAVD) is a progressive disease beginning with small alterations at the level of cell morphology and function, as well as alterations of the extracellular matrix, focal leaflet thickening and later macroscopic changes such as nodular calcific accumulations leading to functional impairment of the valve. For a long time CAVD was considered to be a passive and mainly degenerative disease, but there is increasing evidence that it is an actively regulated process involving lipoprotein accumulation, chronic inflammation and actively regulated changes within the extracellular matrix. Adenosintriphosphatases (ATPases) are a class of enzymes that catalyze the decomposition of ATP into ADP and a free phosphate ion. It has been shown that key enzymes of the purinergic signaling system profoundly affect the degeneration of this study was to analyze the role of transmembrane ATPases in the pathopysiology of CAVD. Calcification associated processes were evaluated including extracellular matrix (ECM) remodeling, quantification of biomineralization and purinergic as well as myofibroblastic gene expression.

Ovine valvular interstitial cells (VIC), as well as biopsies of ovine aortic valve cusps were cultured *in vitro* under pro-degenerative conditions and treated with ATPase inhibitors (suramine and orthovanadate). Calcium based mineralization was evaluated by Alizarin Red staining. Calcium content and cell vitality was evaluated using calcium and lactate dehydrogenase assays. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) based zymography of supernatants was performed to analyze the activity of involved matrixmetalloproteinases (MMPs) in the ECM remodeling process. The expression of alpha smooth muscle actin (α -SMA) and vimentin were quantified by Westernblot analysis. Key enzymes of the extracellular purinergic signaling were analyzed using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Histological analysis of either calcium- or phosphate-based mineralization was carried out by Alizarin Red- and von-Kossa staining. Movat's Pentachrom staining and Haematoxylin and Eosin (H&E) staining were used to detect changes in the composition and structure of the ECM.

Our main findings are that the inhibition of transmembrane ATPases increased *in vitro* biomineralization of aortic valve tissue and VIC cultures, enhanced remodeling of the ECM with increased MMP secretion and triggered myofibroblastic differentiation. Further, both ATPase inhibitors have effects on the expression of key enzymes of the purinergic signaling system. These findings suggest that a dysregulation of transmembrane ATPases leads to osteoblastic differentiation of VIC and enhanced biomineralization of aortic valve tissue. Specific purinergic gene regulation in the context of CAVD is complex. Various effects of purinergic receptors and related downstream effects in the aortic valve tissue have been reportet in the past. In the future more elaborated and detailed models are necessary to confirm our results. The findings of the study are limited due to the nonspecific binding of the herein applied ATPase inhibitors. Both suramine and orthovanadate have side effects and cytotoxic potential.

This study provides further evidence that enzymes of the purinergic signaling system play a pivotal role in CAVD. The inhibition of ATPases influences biomineralization *in vitro*. Regulation of ATP-conversing enzymes may be a promising approach to alter CAVD progression, but further investigations are necessary.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACTA-2	Alpha smooth muscle actin gene
ADK	Adenosinkinase
ADP	Adenosindiphosphat
ALP	Alkaline like phosphatase
AMP	Adenosinmonophat
АроЕ	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua _{dest}	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
aVIC	Activated valvular interstitial cells
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAVD	Calcific aortic valve disease
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col1A1	Alpha-1-Typ-I-Kollagen kodierendes Gen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EndMT	Endotheliale-mesenchymale Transition
ENPP1	Ektonukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
ENTPD1/CD39	Ektonukleosidtriphosphatdiphosphorylase 1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal calf serum
g	Drehzahl
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H&E	Hämatoxylin und Eosin
НА	Hydroxylapatit
hVIC	Humane valvuläre Interstitialzellen
Ig	Immunglobulin
ΙΚΚβ	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
1	Liter
LDH	Lakat-Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
М	Molare Masse
МАРК	Mitogen-activated protein kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl/Teilmenge
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

Natriumorthovanadat	Orthovanadat
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nm	Nanometer
NT5E/CD73	Ekto-5' Nukleotidase
obVIC	Osteoblastic valvular interstitial cells
OPN	Osteopontin
Р	Passage
р	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
Pi	Anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
РКА	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PPi	Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVIC	Progenitor valvular interstitial cells
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
qVIC	Quiescient valvular interstitial cells
R-SMADS	Receptor activated SMADS
RANK	Receptor Acitvator of NF- K B
RANKL	Receptor Acitvator of NF- K B Ligand
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonukleasen
rpm	Radiations per minute
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
S	Sekunde
SAVR	Surgical aortic valve replacement
SDS	Natriumaurylsulfat

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
SMAD	Small mother against decapentaplegic
SNP	Single nucleotide polymorphism
sog.	Sogenannt
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming growth factor eta
TNAP	Tissue non specific alkaline phosphatase
UTP	Uridintriphosphat
VEC	Valvular endothelial cells
VIC	Valvular interstitial cells
VIM	Vimentin
VSMC	Vascular smooth muscle cells
z.B.	Zum Beispiel
α-SMA	Alpha smooth muscle actin
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1.1 Epi	demiologie und Klinik der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung	1
1.2 Pat	homechanismus der Aortenklappendegeneration	2
1.2.1	Histomorphologischer Aufbau der Aortenklappe	2
1.2.2	Phänotypische Plastizität von VIC	3
1.3 Ext	razellulärer Nukleotidkatabolismus	4
1.3.1	Übersicht extrazellulärer purinerger Stoffwechselwege	4
1.3.2	Freisetzung von Adenosintriphosphat	5
1.3.3	Purinerge Enzyme	5
1.3.4	Purinerge Rezeptoren und Adenosin Inaktivierung	8
1.3.5	Purinerge Signalwege und Aortenklappendegeneration	9
1.3.6	Die Rolle von ATP bei CAVD	10
1.3.7	Die Rolle von Adenosin bei CAVD	10
1.3.8	Membranständige ATPasen	11
1.3.9	Wirkmechanismen der ATPase-Inhibitoren Suramin und Orthovanad	lat 12
1.4 Zie	le der Arbeit	13
2 Materia	l und Methoden	14
2.1 Ma	terial	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen	
2.1.4	Verwendete Kits	21
2.1.5	Medien und Zellkulturbestandteile	21
2.1.6	Verwendete Stimulanzien	22
2.1.7	Nährmedien	22
2.1.8	Puffer und Lösungen	

	2.1.9) P1	rimäre Antikörper	29
	2.1.1	10 Se	ekundäre Antikörper	29
	2.1.1	ll So	oftware	30
2.	2	Metho	den	31
2.	3	Zellbic	ologische Methoden	31
	2.3.1	l Ze	ellgewinnung und Zellpassagierung / Gewebepräparation	31
	2.3.2	2 Z	ellpassage und Herstellung von Zellsuspensionen	32
	2.3.3	B Ei	infrieren und Auftauen von VIC	33
	2.3.4	4 B	estimmung der Zellzahl	33
	2.3.5	5 St	timulation	33
	2.3.6	5 Ü	berstände und Zellernte	34
	2.3.7	7 A	lizarin Rot-Färbung von VIC-Kulturen	34
	2.3.8	8 A	uswertung der Alizarin Rot-Färbung von VIC-Kulturen	35
2.	4	SDS-P	AGE basierte Zymographie	36
	2.4.1	l Pı	robenaufbereitung	36
	2.4.2	2 G	elherstellung	37
	2.4.3	3 G	elelektrophorese/SDS-PAGE	38
	2.4.4	4 Ei	nzymatische Bandenvisualisierung	38
2.	5	Protein	nanalyse mittels Westernblot	38
	2.5.1	l Pı	robenvorbereitung für die Westernblotanalyse	39
	2.5.2	2 SI	DS-PAGE zur Westernblotanalyse	39
	2.5.3	3 W	Vesternblot und Antikörperbindung	39
2.	6	Kalziu	m Assay	40
2.	7	LDH A	Assay	41
2.	8	Quanti	tative Genanalyse mittels real-time semiquantitative polymerase cha	ain
re	actio	n (qPC	R)	41
2.	9	Histolo	ogische Methoden	42

	2.9.	1 Anfertigung der Gewebeschnitte	42
	2.9.	2 Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung	42
	2.9.	3 Alizarin Rot-Färbung	43
	2.9.	4 Von-Kossa-Färbung	43
	2.9.	5 Movat-Pentachrom-Färbung	43
	2.10	Software und statistische Auswertung	44
3	Erg	gebnisse	45
	3.1	Alizarin Rot-Färbung	45
	3.2	Zellüberleben	46
	3.3	Kalzium Assay	47
	3.4	Analyse der MMP-2 und -9 Sekretion	48
	3.5	Expression myofibroblastischer und osteogener Marker in VIC-Kulturen	50
	3.6	Expression purinerger Enzyme	52
	3.7	Westernblotanalyse der Vimentin und α -SMA Expression	54
	3.8	Histologische Analysen	56
	3.8.	1 Makroskopische Charakterisierung der Gewebeproben	56
	3.8.	2 Alizarin Rot-Färbung	57
	3.8.	3 Von-Kossa-Färbung	58
	3.8.	4 Quantitative Analyse der Kalzifizierung	59
	3.8.	5 H&E-Färbung	60
	3.8.	6 Movat-Pentachrom-Färbung	61
4	Disl	kussion	62
	4.1	Biomineralisierung in vitro nach ATPase-Inhibition	62
	4.2	Auswirkungen von ATPase-Inhibition auf das Zellüberleben	64
	4.3	EZM Remodeling	65
	4.4	Myofibroblastische Transdifferenzierung	67
	4.5	Regulation purinerger Enzyme auf Genebene	69

	4.6	Limitierungen der Studie	71
5	Sch	lussfolgerungen	72
6	Lite	eraturverzeichnis	73

1.1 Epidemiologie und Klinik der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung

Die kalzifizierende Aortenklappendegeneration (engl. Calcific aortic valve disease; CAVD) ist die häufigste behandlungsbedürftige Herzklappenerkrankung in den westlichen Industrienationen. Die Inzidenz von CAVD bei 50-59-Jährigen beträgt etwa 0,2 % und steigt bis zur 8. Lebensdekade auf ca. 9,8 % an (1). CAVD zeichnet sich durch eine zunehmende Klappenverdickung aus, der histologisch eine Ablagerung von Lipoproteinen, zelluläre Infiltration, sowie kalzifizierende Veränderungen der extrazellulären Matrix zugrunde liegen. Bei fortschreitender Erkrankung resultiert hieraus eine Funktionseinschränkung der Klappe (2). Die makroskopischen Veränderungen führen zu einer Verminderung der Klappenöffnungsfläche. Die Erkrankung wird zu diesem Zeitpunkt auch stenosierende Aortenklappenerkrankung genannt. Die Entwicklung von der Klappensklerose zur stenosierenden Aortenklappenerkrankung betrifft ca. 10-15% der Patienten innerhalb von fünf Jahren. Der linke Ventrikel kann die hieraus resultierende Druckbelastung zunächst kompensieren und hypertrophiert. Bei zunehmender Obstruktion jedoch, kann das Schlagvolumen sinken, die koronararterielle Versorgung des hypertrophierten Myokards wird zunehmend eingeschränkt und die Stenose wird klinisch manifest. Die Mortalitätsrate der symptomatischen Aortenklappenstenose beträgt unbehandelt etwa 50% in zwei Jahren (1, 3). Zum jetzigen Zeitpunkt stellt der operative (engl. surgical aortic valve replacement; SAVR) oder interventionelle katheterbasierte Klappenersatz die einzige effektive Therapieoption dar. Derzeit gibt es keine medikamentöse Therapie, die eine Regression bewirkt oder das Fortschreiten der Erkrankung stoppen kann (4). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen der CAVD sind bis heute nicht vollständig erklärt. Es handelt sich hierbei um einen aktiven und multifaktoriellen Prozess, der ätiopathogenetische Ähnlichkeiten zur Atherosklerose aufweist. So gelten Alter, arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Tabakkonsum als gemeinsame Risikofaktoren. Darüber hinaus konnten Veränderungen auf genetischer Ebene zum Beispiel (z.B.) im Bereich des Notch Signalwegs nachgewiesen werden (5). Die CAVD betrifft besonders häufig und frühzeitig bikuspide Aortenklappen, was einen Zusammenhang mit mechanischem Stress nahelegen könnte. Im Gegensatz zur Artherosklerose spielen vor allem im fortgeschrittenen Stadium kalzifizierende Prozesse eine stärkere Rolle (2, 6-8). Obwohl die hohe Prävalenz von CAVD im Alter einen reinen passiven degenerativen Prozess nahelegen könnte, konnte gezeigt werden, dass wesentliche Zellen der Herzklappe, sog. Valvuläre Interstitialzellen (VIC), aktiv an diesem Prozess beteiligt sind. Durch Beeinflussung der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) bestehend aus kollagenen Fasern, elastischen Fasern, Proteoglykanen und Glykoproteinen, halten sie die Integrität und Funktion der Klappe aufrecht (9-11). Die Identifizierung von zellvermittelten Stoffwechselprozessen bei CAVD könnte in Zukunft neue Möglichkeiten einer pharmakotherapeutischen Beeinflussung pathologischer Veränderungen an der Aortenklappe aufzeigen.

1.2 Pathomechanismus der Aortenklappendegeneration

1.2.1 Histomorphologischer Aufbau der Aortenklappe

Das ausdifferenzierte Gewebe der Aortenklappe zeigt einen spezialisierten Aufbau bestehend aus Zellen und extrazellulärer Matrix, die äußeren Einflüssen und dynamischen Veränderungen unterliegt. Das Gewebe zeigt histologisch einen typischen mehrschichtigen Aufbau, bestehend aus einer einschichtigen Endothelschicht, die an der Außenseite in das vaskuläre Endothel der großen Gefäße übergeht und an der Innenseite in das Endokard (Abb. 1). Der äußeren Endothelschicht liegt die dichte kollagenreiche *Lamina fibrosa* an. Ihr folgt nach ventrikulär eine glykosaminoglokanreiche lockere Schicht aus kollagenem Bindewegebe, die sog. *Lamina spongiosa*. Darunter liegt die elastinreiche *Lamina ventricularis*. Valvuläre Interstitialzellen sind der prädominante Zelltyp und in allen drei Schichten vorhanden (6, 12) Der dreischichtige Aufbau ist essenziell für die Klappenfunktion und ist in pathologisch verändertem Klappengewebe aufgehoben (10).



Abb. 1: Histomorphologischer Aufbau der Aortenklappe. Dargestellt ist der histomorphologische dreischichtige Aufbau der gesunden nativen Aortenklappe bestehend aus den *Laminae fibrosa, spongiosa und ventricularis*. Die Fibrosa enthält überwiegend Kollagen Typ I und III. Die Spongiosa und Ventrikularis enthalten Glykosaminoglykane und Proteoglykane, sowie Elastin. Die einschichtige Endothelzellschicht liegt sowohl der Fibrosa und Ventrikularis außen auf. VIC sind der prädominante Zelltyp und in allen drei Schichten vorhanden (modifiziert nach Alushi et al. 2020 (13)).

1.2.2 Phänotypische Plastizität von VIC

Histopathologische Untersuchungen erkrankter Aortenklappen neben zeigen Kalziumablagerungen, Neovaskularisation und Ansammlungen von Immunzellen ausgeprägte Ansammlungen von VIC (14). Zellbasierte Umbau-, und Reparaturprozesse degenerativ veränderter Aortenklappen werden durch aktivierte VIC aufrecht erhalten (15). VIC üben vielfältige zelluläre Funktionen aus. Sie produzieren aktiv Bestandteile der EZM, wie Kollagen, Elastin und Proteoglykane. Daneben produzieren VIC Enzyme, die am Aufund Abbau der EZM beteiligt sind, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). MMPs sind eine Gruppe von kalzium- und zinkabhängigen Peptidasen, die über Synthese und Degradation von EZM Komponenten die Zusammensetzung der EZM im Gleichgewicht halten. Wichtige Vertreter sind die Gruppe der Gelatinasen, welcher die MMP-2 und -9 unterzuordnen sind (16-18). Darüber hinaus haben VIC wachstumsstimulierende Fähigkeiten. Angeregt durch Wachstumsfaktoren können VIC ihr Expressionsmuster ändern und zu unterschiedlichen phänotypischen Zellen differenzieren (9, 19). Ontogenetisch entstammen VIC Endothelzellen, die eine endotheliale-mesenchymale Transition (EndMT) durchlaufen (10, 20-22). Während der embyronalen Herzentwicklung wandern die transdifferenzierten Zellen der EndMT in das Endokardkissen ein, aus dem die adulten Semilunarklappen hervorgehen (23). Dort residieren sie als ruhende (quiescent, qVIC) VIC und halten die physiologische Klappenfunktion aufrecht (24). Weitere bekannte Phänotypen sind Vorläufer- (progenitor, pVIC) aktivierte (activated, aVIC) und osteoblastische (osteoblastic, obVIC) VIC. Unter pathologischen Bedingungen können qVIC zu aVIC transdifferenzieren. Zelluläre Reparaturmechanismen werden durch aVIC unterhalten (10). Weiterhin produzieren aVIC Isoformen der MMP-2 und -9, die entscheidend am Umsatz der EZM beteiligt sind. Aktivierte VIC zeigen myofibroblastische Eigenschaften und exprimieren α -smooth muscle actin (α -SMA), eine Unterform des kontraktilen Zellproteins Aktin. Die Zellen weisen ein gesteigertes Migrationsverhalten auf (25). In fortgeschrittenen Stadien von CAVD sind vermehrt obVIC nachweisbar. ObVIC produzieren ausgeprägte noduläre Kalziumeinlagerungen bestehend aus Hydroxylapatit, indem die Aktivität der membranständigen gewebeunspezifischen alkalischen Phosphatase (engl. tissue non specific alcaline phosphatase TNAP) hochreguliert wird (10, 26). Die TNAP baut antidegenerativ wirksames Pyrophosphat (PPi) ab fördert und so den Mineralisierungsprozess (27, 28). Neben der TNAP werden auch bone morphogenetic protein (BMP-2), Osteopontin (OPN) und Osteokalcin, die ebenfalls mit Osteogenese assoziiert sind, vermehrt exprimiert (29).

1.3 Extrazellulärer Nukleotidkatabolismus

1.3.1 Übersicht extrazellulärer purinerger Stoffwechselwege

Extrazelluläre purinerge Signalwege vermittelt durch Nukleotide und dessen Rezeptoren kurzwirksamen sind an zahlreichen Signalwegen des Menschen, wie etwa Neurotransmission zentralen Nervensystem, Kontraktilitätsverhalten im glatter Gefäßmuskelzellen, Regulation von Immunantworten und Thrombozytenaggregation beteiligt. Darüber hinaus sind langfristige Wirkungen im Bereich von Zellproliferation, differenzierung, und -überleben beschrieben. Diese sind beispielweise (bspw.) in Umbauprozesse von Knochengewebe und vaskulärem Gewebe involviert (30). Purinerge Signalwege sind an regulatorischen Prozessen wie bspw. der Thrombozytenaggregationshemmung beteiligt. Die Wirkung von ADP an P2Y1- und P2Y12-Rezeptoren im Rahmen der Thrombozytenaggregation ist ausführlich beschrieben. Es gibt Hinweise dafür, dass purinerge Signalwege auch an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligt sein könnten. Freigesetzte extrazelluläre Nukleotide werden durch einen mehrstufigen Prozess von sog. Ektonukleotidasen abgebaut und schließlich inaktiviert. Die Effekte werden durch Nukleotid-selektive Rezeptoren vermittelt (31). Einige Studien der jüngsten Vergangenheit legen nahe, dass der Mineralisierungsprozess von Aortenklappen durch die Expression von Ektonukleotidasen, deren Metaboliten und purinerge Rezeptoren mitreguliert werden könnte (32, 33).

1.3.2 Freisetzung von Adenosintriphosphat

Adenosintriphosphat (ATP) wird neben vielen anderen Zelltypen auch von VIC bereits durch geringe mechanische und hypoxische Reize freigesetzt. ATP gelangt durch Connexinund Pannexin-1-Hemikanäle in den Extrazellularraum. Darüber hinaus ist eine vesikuläre exozytotische Freisetzung von ATP beschrieben (30, 34). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass VIC kontinuierlich ATP freisetzen, welches in Zellkulturen zeitabhängig akkumuliert (35).

1.3.3 Purinerge Enzyme

Ektonukleotidasen sind eine Familie von membrangebundenen Enzymen, welche extrazelluläre Nukleotide umsetzen (Abb. 2). An der äußeren Membranseite von VIC befindet sich das Enzym Ektonukleosidtriphosphatdiphosphorylase 1 (ENTPD1, CD39), welches die Hydrolyse von ATP über Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) katalysiert. Ferner exprimieren VIC die Ektonukleotid-Pyrophosphatase 1 (ENPP1), welche ebenfalls ATP über ADP zu AMP abbaut. Das Enzym Ekto-5'-Nukleotidase (NT5E, CD73) katalysiert den weiteren Abbau von AMP zu Adenosin (31).



Abb. 2: Übersicht extrazellulärer purinerger Enzyme. Dargestellt sind die Schlüsselenzyme des extrazellulären purinergen Stoffwechsels. ENPP1, CD39 und CD73 bauen extrazelluläres ATP zu Adenosin ab. Adenosin kann durch die Adenosin-Desaminase weiter zu Inosin abgebaut werden. Inosin wird durch die Purin-Nukleosid-Phosphorylase weiter zu Hypoxanthin abgebaut.

Neben CD39 und CD73 sind in den Katabolismus von extrazellulären Nukleotiden noch weitere zelloberflächenassoziierte Enzyme involviert, wie etwa Phosphatasen, Pyrophosphatasen, Phosphodiesterasen, sowie aufbauende Enzyme, die Adenylatkinase (31). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität von CD39 und CD73 bei verschiedenen Krankheitsgeschehen dynamischen Veränderungen unterliegt. Es wird angenommen, dass die Pathogenese und der Verlauf von Infektionsgeschehen, Autoimmunerkrankungen und Atherosklerose durch Ektonukleotidasen verändert wird (32).

ENTPD1 (CD39) ist ein integrales Membranprotein, das Ca²⁺- und Mg²⁺- abhängig ATP, sowie weniger effektiv ADP, hydrolysiert (36). Es wird auf einer Vielzahl von Zelltypen, darunter *Vascular smooth muscle cells* (VSMC), *Vascular endothelial cells* (VEC), exokrines Pankreas, sowie dendritische Zellen und Lymphozyten exprimiert (37). Die ENTPD1 wurde geklont, sequenziert und als Zellaktivierungsantigen für B-Zellen, CD 39, identifiziert (38). CD39 ist ein Transmembranprotein bestehend aus zwei Domänen. Die extrazelluläre hydrophobe Domäne, sog. *Apyrase conserved region* (39) ist essenziell für die

katalytische Funktion von CD39 (31). Im vaskulären System ist ENTPD1 ein wichtiger Regulator der Hämostase. Die endotheliale ENTPD1 reguliert thrombogene Prozesse durch Abbau von ADP, das als parakriner Stimulus von Thombozyten freigesetzt wird (40, 41).

Der Familie der Ektonukleotid-Pyrophosphatasen (ENPPs) können sieben strukturell verwandte Ekto-Enzyme mit breiter Substratspezifität untergeordnet werden. ENPP1-3 sind membrangebundene Glykoproteine, welche ATP über ADP zu AMP hydrolysieren und dabei Pyrophosphat (PP_i) generieren (42). ENPP1 wird neben Knochen- und Knorpelgewebe auch auf VIC exprimiert. Im Knochengewebe ist ENPP1 der Haupterzeuger von PP_i. ENPP1 ist an der Hömostase einer physiologischen Knochenmatrix beteiligt. PP_i wirkt einer Kalzifizierung von Weichgeweben entgegen (43). Bei niedrigen extrazellulären PP_i Konzentrationen im Bereich von 0,01 - 0,1 mmol/l werden mineralisierende Prozesse verstärkt, wohingegen höhere Konzentrationen anti-kalzifizierend wirken. Die extrazelluläre Konzentration von PP_i besitzt eine enge physiologische Breite und wird durch gegensätzliche und teils reziproke Vorgänge aufrechterhalten. Hierbei spielen die ENPP als PP_i generierendes Enzym und die TNAPals abbauendes Enzym eine wichtige Rolle (44). Mäuse mit fehlender ENPP1-Enzymfunktion entwickeln bereits in jungem Alter eine verstärkte Kalzifikation der Gelenke (45).

Die Ekto 5[•]-Nukleotidase (CD73) ist ein Dimer, das über den C-terminalen Serinrest an Glykosylphosphatidyl-Inositol mit der Plasmamembran verankert ist. CD73 hydrolysiert effektiv 5[•]AMP zu Adenosin. Die C-terminale Domäne enthält die Bindungstasche für AMP. ATP und ADP gelten als kompetitive Inhibitoren von CD73 (46). CD73 wird ebenfalls in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Im Gefäßsystem wird es vorwiegend auf größeren Gefäßen, wie der Aorta, den Karotiden und den Koronararterien exprimiert. Auf reifen Zellen des Immunsystems, sog. regulatorischen T-Zellen, ist die Ko-Expression mit CD39 auf CD4⁺/CD25⁺-Zellen hervorzuheben. Das Endprodukt von CD73, Adenosin, aktiviert Adenosin A2_a-Rezeptoren auf Effektor-T-Zellen und hat eine anti-inflammatorische Wirkung mit Suppression der Zellproliferation und Zytokinproduktion zur Folge (37, 47).

CD39 und CD73 sind an komplexen atherogenen Prozessen beteiligt. *Buchheiser et al* zeigten das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion in einem Apolipoprotein E^{-/-} (ApoE)/CD73^{-/-}-*knockout* Mausmodell. Apo E^{-/-}/CD73^{-/-}-*knockout* führte zu einer

gesteigerten Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Ferner zeigte sich eine vermehrte Infiltration von Makrophagen in die Intima (48). Die Expression von CD73 scheint einer Atherosklerose protektiv entgegen zu wirken. Es wird angenommen, dass die protektiven Effekte von CD73 auf einer enzymatischen Bildung von Adenosin beruhen (49). Darüber hinaus konnten *St. Hilaire et al.* eine Korrelation zwischen Genmutationen im für CD73 kodierenden Gen, NT5E, und arterieller sowie artikulärer Kalzifikation nachweisen (50).

Alkaline Phosphatasen (ALPs) werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. ALPs zeigen eine breite Substratspezifität gegenüber Phospho-Monoestern, Pyrosphophaten und Adenin-Nukleotiden. Die gewebeunspezifische Alkaline Phospahatase, engl. *tissue non specific alkaline posphatase* (TNAP) wird in Knochengewebe stark exprimiert. Durch die Hydrolyse von PP_i, einem wichtigen Inhibitor mineralisierender Prozesse, wird eine Homöostase im mineralisierenden Knochenstoffwechsel aufrechterhalten (51).

1.3.4 Purinerge Rezeptoren und Adenosin Inaktivierung

Die Effekte von Purinen werden durch Nukleotid-selektive ATP- und Adenosin- Rezeptoren vermittelt (Abb. 3). Es können Adenosin sensible P1- und ATP sensible P2-Rezeptoren unterschieden werden. P2 Rezeptoren können wiederum in zwei größere Untergruppen unterteilt werden, sog. P2X- und P2Y-Rezeptoren. P2X-Rezeptoren sind Ligandengesteuerte Kanäle, welche nach Aktivierung durch ATP für Kationen durchlässig sind. Insgesamt können sieben verschiedene Subtypen (P2X1-7) unterschieden werden. P2Y-Rezeptoren sind Guanosintriphosphat-bindenedes Protein- (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren, die entweder an Gq-gekoppelt Phospholipase C-β aktivieren oder Gi-gekoppelt Adenylylzyklasen inhibieren und Ionenkanäle regulieren. Zu den P1 Rezeptoren zählen die Adenosinrezeptoren A1-3. Die Adenosin Rezeptoren A2_A und A2_B aktivieren die Adenylat-Cyclase. A1- und A3-Rezeptoren inhibieren die Adenylat-Cyclase (31).



Abb. 3: Übersicht purinerger Rezeptoren. Nukleotide vermitteln Effekte über ionotrope P2X-Rezeptoren oder über metabotrope P2Y-Rezeptoren, welche sich in der Affinität gegenüber ATP, ADP und anderen Nukleotiden unterscheiden. Adenosin wirkt an eigenen Rezeptoren. Es können vier verschiedene Adenosin Rezeptoren unterschieden werden.

1.3.5 Purinerge Signalwege und Aortenklappendegeneration

Einige Studien der jüngsten Vergangenheit zeigen die Beeinflussung degenerativer Veränderungen an der Aortenklappe durch purinerge Stoffwechselwege. Der Mineralisierungsprozess von Aortenklappen ist komplex und umfasst mineralisierungsfördernde, sowie antikalzifizierende Mechanismen. Hierbei könnten Stoffwechselprozesse, welche die Produktion von anorganischem Phosphat (Pi) und Pyrosphosphat (PPi) regulieren, eine Schlüsselrolle einnehmen. Die Familie der Ektonukleotidasen reguliert die extrazelluläre Produktion von Pi und PPi über die Hydrolyse von Nukleotiden. Eine unterschiedliche Expression von Ektonukleotidasen verändert die vorhandene Menge von extrazellulären Nukleotiden, Pi und PPi; und könnte so eine osteoblastische Transdifferenzierung von VIC fördern (52). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von CD39 und ENPP1 eine mineralisierungsfördernde Wirkung in zwei- und dreidimensionalen Zellkulturmodellen oviner VIC zur Folge hatte. Auf genetischer Ebene zeigte sich neben einer Hochregulierung der Ektonukleotidasen (CD39, E-NPP1, CD73) auch eine verstärkte Expression von transforming growth factor- β (TGF- β) und OPN. Die Aktivierung von Adenosin A2A- und A2B-Rezeptoren verstärkte die Kalzifizierung in VIC-Kulturen (35).

1.3.6 Die Rolle von ATP bei CAVD

Côté et al. konnten eine verstärkte Expression des ATP umsetzenden Enzyms ENPP1 in kalzifizierten Aortenklappen nachweisen. Die Transkription von ENPP1 korrelierte positiv mit der dopplersonographischen Flussbeschleunigung über der Aortenklappe. ENPP1 konnte immunhistochemisch verstärkt im Bereich kalzifizierter peripherer Areale von Aortenklappen nachgewiesen werden. Die Rolle von ENPP1 bei CAVD ist komplex, denn sowohl eine Überexpression als auch ein vollständiger *knockout* der ENPP1 fördern kalzifizierende Prozesse. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass ENPP1 eine zusätzliche Phosphataseaktivität hat. In der initialen Phase erfolgt der Umsatz von ATP zu ADP und P_i oder zu AMP und PP_i. Nachfolgend entsteht beim weiteren Abbau von ADP vermehrt mineralisierungsförderndes P_i.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass P2Y₂-Rezeptoraktivierung durch extrazelluläres ATP anti-degenerative Effekte zur Folge hatte. P2Y₂-Rezeptor *knockout* in VIC Zellkulturen führte zu einer verstärkten Mineralisierung. Die Effekte nach Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors könnten durch Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) vermittelt werden, da nach Inhibition der PI3K eine verstärkte Kalzifizierung nachgewiesen werden konnte (52, 53). Der PI3K-Akt Signalweg könnte über eine Beeinflussung des anti-apoptotischen Proteins Bcl das Zellüberleben von VIC beeinflussen (52, 54, 55). P2Y₂ -/- *knockout* Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte Mineralisierung der Aorta (56).

1.3.7 Die Rolle von Adenosin bei CAVD

Neben einer Überexpression der ENPP1 konnte auch eine vermehrte Expression von CD73 in degenerativ verändertem Klappengewebe nachgewiesen werden (57). Durch eine Hochregulierung von CD73 wird vermehrt Adenosin generiert, welches in der nachfolgenden Signalkaskade zu einer verstärkten Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren (sog. P1-Rezeptoren) führt. Die Aktivierung von P1-Rezeptoren führt zu einer Regulierung des zyklischen Adenosinmonophosphat-Proteinkinase-A-Signalwegs (cAMP, PKA). Der cAMP-PKA-Signalweg könnte in den Mineralisierungsprozess von CAVD involviert sein (58). *Mahmut et al.* wiesen in humanen VIC (hVIC) sklerotisch veränderter Aortenklappen eine Ko-expression von ENPP1 und CD 73 mit α -SMA nach. Hieraus könnte eine Transdifferenzierung zum aktivierten Phänotyp bei verstärkter Expression der ENPP1 und CD73 abgeleitet werden. In hVIC-Kulturen hatte die Zugabe von Adenosin pro-degenerative Auswirkungen. Hierfür könnte eine Aktivierung von $G\alpha_s$ gekoppelten Adenosin A2_A-Rezeptoren mit nachfolgender Aktivierung des cAMP-Proteinkinase-A- (PKA)-Signalwegs verantwortlich sein (57). Abb. 4 zeigt eine Übersicht des extrazellulären Nukleotidkatabolismus an der äußeren Membranseite von VIC mit nachgeschalteten Signalwegen, welche bei CAVD relevant sein könnten.



Abb. 4: Übersicht purinerger Stoffwechselwege im pathophysiologischen Kontext der CAVD. An der äußeren Membranseite der VIC befinden sich eine Vielzahl purinerger Rezeptoren. Es werden ATP sensible P2-Rezeptoren (P2X, P2Y₁ und P2Y₂), sowie Adenosin- (A2_a und A2_b) Rezeptoren exprimiert. Die extrazelluläre Bildung von Adenosin ist das Resultat der sequenziellen Dephosphorylierung von extrazellulärem ATP zu AMP durch die Aktivität der CD39 und ENPP1, gefolgt von der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73). Die TNAP baut antidegenerativ wirkendes PP_i ab. Die Aktivierung von P2Y₂-Rezeptoren könnte über den Phosphoinositid-3-Kinase Signalweg anti-degenerative Effekte ausüben. Die Aktivierung von A2_a-Rezeptoren fördert Mineralisationprozesse möglichweise über eine Aktivierung des cAMP-PKA-Signalweges.

1.3.8 Membranständige ATPasen

Die Rolle von membranständigen ATPasen im pathophysiologischen Kontext von CAVD ist zum jetzigen Zeitpunkt wenig erforscht. Durch Beeinflussung der Konzentration extrazellulär verfügbarer Nukleotide könnten sie neben CD39, ENPP1 und CD73 eine weitere Enzymklasse darstellen, welche an pathologischen Prozessen an der Aortenklappe beteiligt ist. Membranständige ATPasen sind ubiquitär vorhandene Enzyme, welche die Energie aus Hydrolyse oder Regeneration von ATP nutzen, um Ionen und Moleküle zwischen der äußeren Zellmembranen oder intrazellulär zwischen Zellorganellen und Zytosol zu transportieren (59). Es können verschiedene Typen unterschieden werden, darunter F-, V- und P-Typ ATPasen und ABC Transporter.

1.3.9 Wirkmechanismen der ATPase-Inhibitoren Suramin und Orthovanadat

Suramin ist ein polysulfonierter polyaromatischer Harnstoff, welcher ein potenter Inhibitor der Na⁺/K⁺-ATPase ist. Klinisch wird Suramin parenteral zur Behandlung von frühen Stadien der afrikanischen Trypanosomiasis eingesetzt. Der antiparasitäre Wirkmechanismus ist jedoch bis dato unklar. Suramin weist eine hohe Serumproteinbindung, sowie eine lange Halbwertszeit von bis zu 78 Tagen bei hoher metabolischer Stabilität im menschlichen Blut auf (60, 61). Neben einer Inhibition von P-ATPasen wird auch eine Inhibition von V-ATPasen beschrieben (62). Suramin entkoppelt intrazellulär G-Protein vom assoziierten Rezeptor. Suramin wird zudem als unspezifischer Inhibitor von purinergen P2-Rezeptoren eingesetzt (52, 63). *Yegutkin et al* untersuchten die inhibitorischen Effekte von purinergen P2-Rezeptorantagonisten auf Ekto-ATPasen in Leberzellen und zeigten für Suramin eine potente nicht kompetetive Mg²⁺-abhängige Hemmung der Ekto-ATPase-Aktivität (64). Darüber hinaus konnten antitumoröse Eigenschaften von Suramin, sowie eine positive Beeinflussung von ischämischen Ereignissen nachgewiesen werden (60, 65).

Natriumorthovanadat (Orthovanadat; Na₃VO₄) ist eine anorganische chemische Verbindung aus Natrium und Vanadat, welche zu den Spurenelementen gehört und phosphatähnliche Eigenschaften aufweist (66). Die physiologische Konzentration von Vanadiumverbindungen in humanem Blut beträgt 0.06 µg/l und beruht hauptsächlich auf dem natürlichen Vorkommen von Vanadium in der Umwelt (67). Die Rolle von Orthovanadat als Mikronährstoff im menschlichen Körper ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar (68). Orthovanadat ist ein potenter Inhibitor von P-ATPasen, wie der Na⁺/K⁺-ATPase und der Ca²⁺-ATPase. Studien zum Wirkmechanismus legen nahe, dass Orthovanadat die Dephosphorylierung einer P-Domäne inhibiert und dadurch eine essentielle Konformationsänderung blockiert wird (69-71). Vanadiumsalze zeigen vielfältige biologische Wirkungen, wie etwa antitumoröse Wirkungen auf unterschiedliche Malignome (66). Orthovanadat inhibiert in vitro das Zellwachstum von sog. HL60/A-Zellen bei der akuten Promyelozyten-Leukämie und ist in pro-apoptotische Prozesse involviert (72).

1.4 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen weitere Enzyme des purinergen Stoffwechsels, die an degenerativen Prozessen in der Aortenklappe beteiligt sein könnten, identifiziert werden. Im Detail soll die Wirkung der ATPase-Inhibitoren Suramin und Orthovanadat auf den Degenerationsprozess untersucht werden. Hierzu soll ein etabliertes in vitro Modell aus VIC-Kulturen angewandt werden. Mineralisierungsfördernde Bedingungen werden durch die Zugabe von β-Glycerolphosphat und Kalziumchlorid (CaCl₂) zum Zellkulturmedium geschaffen und nachfolgend als CaCl2-Medium bezeichnet. Die kalziumbasierte Mineralisierung der VIC-Kulturen soll mit Hilfe der Alizarin Rot-Färbung analysiert werden. Des Weiteren sollen Analysen von Überständen des Mediums der kultivierten Proben durchgeführt werden. Der Kalziumgehalt und die Zellvitalität sollen mittels Kalzium- und Laktat-Dehydrogenase (LDH) Assay beurteilt werden. Die Aktivität der MMP-2 und -9 soll mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) basierten Zymographie bestimmt werden. Mittels real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) sollen Marker einer möglichen myofibroblastischen und Transdifferenzierung, sowie osteoblastischen eine mögliche Veränderung der Genexpression purinerger Enzyme untersucht werden. Mittels Westernblotanalyse soll die Expression myofibroblastischer Marker auf Proteinebene untersucht werden. In einem zweiten Teil sollen die Auswirkungen der ATPase-Inhibitoren in einem weiteren in vitro Modell bestätigt werden. Hierzu sollen definierte Biopsien aus ovinen Aortenklappensegeln über einen Zeitraum von 28 Tagen kultiviert werden. In diesem zweiten Modell soll die wechselseitige Beziehung zwischen EZM, VIC und valvulären Endothelialzellen (VEC) stärker berücksichtigt sein. Die Gewebeproben sollen anschließend makroskopisch und histomorphologisch untersucht werden. Zur Beurteilung der histomorphologischen Veränderungen sollen verschiedene histologische Färbemethoden angewandt werden. Die Aktivität der MMP soll mit Hilfe der SDS-PAGE basierten Zymographie aus Kulturüberständen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät

Abzug maXXima Amersham Imager 600 Autoklav VX-95 **Biophotometer plus** EpiChemie-II-Darkroom Einschweißgerät Folio **Eismaschine AF80 Electrophoresis Power Supply** Feinwaage Kühlschrank 4°C Kühlschrank 4°C Gefriertruhe -20°C Gefriertruhe -20° C(GS54NAW30) Gefriertruhe -20° C(Premium NoFrost) Gefrierschrank -80°C (REVCO) Heidolph REAX 2000 Vortex Mischer Homogenisator BRAUN-SONIC 125 Inkubator HERAcell 240i Kryostat Leica CM 1950 Kamera Magnetrührer RH basic 2 Microplate Reader infinite M1000 pro Mikroskop DM2000 Mikroskop DMIL LED Mini-Zentrifuge Nano Drop 1000

Hersteller

WRT Laborbau, Stadtlohn General Electric Holding GmbH. Systec, Wettenberg Eppendorf, Hamburg UVP Laboratory Products, Kalifornien Severin, Sundern Scotsman, Illinois General Electric Holding GmbH, Sartorius AG, Göttingen ThermoScientific, Waltham Lovibond, Dortmund **BOSCH**, Stuttgart SIEMENS, München LIEBHERR, Bulle ThermoScientific, Waltham Heidolph Instruments GmbH, Schwabach Quigley-Rochester Inc. ThermoFisher Scientific, Waltham Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Leica Microsystems GmbH, Wetzlar IKA, Staufen Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Leica Micorsystems GmbH, Wetzlar Carl Roth, Karlsruhe ThermoScientific, Waltham

Netzgerät Power Pac 200 Neubauer Zählkammer Objektplatte rund 30 mm Pipettierhelfer accu-jet pro Präparationsbesteck Saugpumpe Laboport Semidry Trans-Blot SD Gel Schüttler KS-15 Control Schüttler Vibrax-VXR SonoRex RK 156, Sonifizierungsbad StepOnePlus, Real Time PCR System Sterilbank HERAsafe KS Stickstofftank 35VHC T3000 Thermocycler Waage BP 110 S Wärmebad 1092 Wärmeschrank Function line Tischzentrifuge XCell SureLock Mini Cell Zentrifugen Universal 16 Zentrifuge Labofuge 300 Zentrifuge 5804 R Tabelle 1: Verwendete Geräte.

BIO RAD, Kalifornien Marienfeld, Lauda Königshofen Technomed, Graz, Österreich BRAND, Wertheim Aeskulap. Tuttlingen KNF Lab, New Jersey BIO RAD, Kalifornien Edmund Bühler, Hechingen IKA, Staufen Bandelin electronic GmbH und Co KG, ThermoFisher Scientific GmbH, ThermoFisher Scientifc GmbH, Schwerte Taylor Wharton, Minnesota Biometra GmbH, Göttingen Sartorius, Göttingen GFL, Hannover Thermo Scientific GmbH, Schwerte Biozym Scientific GmbH, Hessisch ThermoFisher Scientific, Schwerte Hettich, Tuttlingen ThermoScientific, Waltham Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zur Versuchsdurchführung wurden die im Folgenden aufgelisteten Verbrauchsmaterialien verwendet:

Produkt	Hersteller
Amersham Membran	GE Healthcare, Chalfont St. Giles
Biopsiestanze (5 mm)	Braun, Melsungen
Blottingpapiere ROTILABO [®]	Carl Roth, Karlsruhe
Cryovials	VWR Chemicals, Radnor
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Einbettschalen	Medite, Burgdorf
Stripetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Corning, NY, USA
Einschweiß-Folie	Carl Roth, Karlsruhe
Falcon 15 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster
Falcon 50 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Falcon 50 ml, konvex	Greiner Bio One, Kremsmünster
Gelkämme 10 er	ThermoFisher Scientific GmbH
Gelkassetten	ThermoFisher Scientific GmbH
KP-CryoCompound	VWR Chemicals, Radnor
MicroAmp 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Kalifornien
Multiwell Platten (6 - 96)	Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster
Nitrocellulose Membran	Bio-Rad, CA, US
Superfrost Plus Objektträger 76 x 26 x 1mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen, steril (10 – 1000 µl)	Starlab, Hamburg
PVDF Blotting Membran 0,45 µm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sorenson BioScience, Salt Lake City,
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Kisker, Steinfurt
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Kisker, Steinfurt

Skalpell (Feather) Spritzen (5 – 10 ml) Sterilfilter 0,45 µm Durchmesser Zellkulturflaschen (T25; T75) Zellkulturflaschen (T225) Zellschaber Tabelle 2:Verwendete Verbrauchsmaterialen. Wolfram Droh GmbH, Mainz Braun, Melsungen Roth, Karlsruhe Greiner Bio One, Kremsmünster Corning, New York, USA Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen

Chemikalie	Hersteller	
10 x Tris-Glycin SDS Puffer	Thermo Scientific Schwerte	
2-Methylbutan/Isopentan	Carl Roth, Karlsruhe	
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	
Alcianblau	Sigma Aldrich, St. Louis	
Alizarin Rot S	Carl Roth, Karlsruhe	
Ammoniumperoxosulfat	Sigma Aldrich, St. Louis	
Ammoniumhydroxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe	
Aqua dest.	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken	
Bis-Acrylamid 40 %	Carl Roth, Karlsruhe	
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe	
Brij L23	Sigma Aldrich, St. Louis	
Brilliant Crocrein R	Waldeck GmbH + Co. KG, Münster	
Bromphenol Blue	Sigma Aldrich, St. Louis	
Calciumchlorid - Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt	
cOmplete mini protease inhibitor cocktail Sigma-Aldrich, MO, US	Sigma-Aldrich, St. Louis	
Coomassie G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	
Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT)	Merck KGaA, Darmstadt	
DNase	QIAgen, Hilden	
Eisen-Chlorid-Hexahydrat (FeCl3-6H2O)	Sigma Aldrich, St. Louis	
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe	
Eosin B	Sigma Aldrich, St. Louis	
Ethanol $(70\% 96\% 99.8\%)$	Zentralapotheke	
Ethanor (7070, 9070, 99.870)	Universitätsklinikum Düsseldorf	
Fetales Kälberserum	Biochrom, MERCK, Darmstadt	
Formaldehyd-Lösung 4 %	Carl Roth, Karlsruhe	

Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Gelatine	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin Gili gebrauchsfertige Lösung	Thermo Scientific, Schwerte
Hämatoxylin	Sigma Aldrich, St. Louis
HCL 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis
Jod	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumiodid	Carl Roth, Karlsruhe
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	Carl Roth, Karlsruhe
KP-Cryo-compound	Klinipath, VWR Chemicals, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl2) Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Meyer's Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumaurylsulfat SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck KGgA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich, St. Louis
Page Ruler Prestain Plus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Phosphate buffered saline (PBS)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
PhosphotungisticAcid	Sigma Aldrich, St. Louis
PhosSTOP Tablets	Sigma-Aldrich, St, Louis
Pierce Western Blot Transfer Puffer, 10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Pikrinsäure	VWR Chemicals, Radnor
Restore-Westernblot-Stripping Puffer	ThermoScientific,
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, MO, USA
RLT Puffer	QIAgen, Hilden
RNase away	VWR Chemicals Radnor
	v wik Chemicals, Radiloi

Roti Histokitt II Eindeckmedium	Carl Roth, Karlsruhe
Runningbuffer	Thermo Scientific, Waltham
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich, St. Louis
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH + Co. KG, Münster
Säurefuchsin	Carl Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal Protein Ladder	ThermoScientific, Waltham
SuperSignal West Femto Maxium Sensitivity Substrate	ThermoScientific, Waltham
Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST-T)	Merck KGaA, Darmstadt
TEMED	Bio Rad, München
Tris-Base	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-HCL	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X	Sigma Aldrich, St. Louis
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma Aldrich, St. Louis
Weigert's Eisenhämatoxylin, Lösung A; B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Western Blot Stripping Buffer	ThermoScientific, Waltham
WesternBright Quantum	Advansta, Kalifornien
Xylol	VWR Chemicals, Radnor
β -Mercaptoehtanol	Sigma Aldrich, St. Louis

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen.

2.1.4 Verwendete Kits

	Kit	Hersteller	
	Abnova Calcium Assay Kit	Abnova, Taipeh, Taiwan	
	DC Protein Assay	BioRad, Hercules, CA, USA	
	GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Wisconsin	
	Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Scientific, München	
	QuantiTect Kit	QIAgen; Hilden	
	Qiagen RNeasy Mini Kit	QIAgen, Hilden	
,	Tabelle 4: Verwendete Kits.		

2.1.5 Medien und Zellkulturbestandteile

Komponente	Bezugsquelle	
Amphotericin B, 50mg, AmBisome	Gilead, Foster City, CA, USA	
Cell Freezing Medium-DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis	
Dulbecco's Modified Eagle	Sigma Aldrich, St. Louis	
Medium (DMEM)		
high glucose (4,5g/l) + Pyruvat		
+ Phenolrot		
Dulbecco's Phosphate-Buffered	Life Technologies, Kalifornien	
Saline (PBS)		
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin	
Gelatine	Sigma Aldrich, St. Louis	
Incidur-Spray	ECOLAB, Minnesota	
NaCl-Lösung 0,9%	Braun, Melsungen	
Nicht essentielle Aminosäuren	Sigma Aldrich, St. Louis	
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Kalifornien	
Trypsin EDTA 0,45%	Life Technologies, Kalifornien	
β-Glycerolphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis	
Tabelle 5: Medien und Zellkulturbestandteile.		

2.1.6 Verwendete Stimulanzien

Stimulanz	Bezugsquelle
Sodium Suramin	Merck KGaA, Darmstadt
Sodium Orthovanadat	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 6: Verwendete Stimulanzien.

2.1.7 Nährmedien

	Basalmedium	CaCl ₂ -Medium
DMEM	500 ml	500 ml
Fetales Kälberserum	10 %	10 %
Nicht essentielle Aminosäuren	1 %	1 %
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 %
β -Glycerolphosphat	-	0,01 %
Kalziumchlorid	-	0,001 %

Tabelle 7: Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellmedien. Das $CaCl_2$ -Medium basiert auf Basalmedium und enthält zusätzlich die prokalzifizierenden Substanzen β -Glycerolphosphat und Kalziumchlorid.

2.1.8 Puffer und Lösungen

2 % Coomassie	Destain Entfärbelösung
500 ml Aquadest	900 ml Auqadest.
10 g Coomassie G250	150 ml Eisessig
	450 ml Methanol

Tabelle 8: Zusammensetzung der Coomassie-Färbung und Destain-Entfärbelösung für die Gelatine Zymographie.

Lämmli Puffer 6-fach

2,1 ml Aquadest

5 mg Bromphenolblau

4,7 ml Glycerol

1,2 g SDS

1,2 ml Tris 0,5 M pH 6,8

Tabelle 9: Zusammensetzung des Lämmli Puffers für die Zymographie.

Entwicklungspuffer 10 x	Renaturierungspuffer 10 x
20 ml Brij 35	125 ml Triton-X-100
7,4 g CaCl ₂	500 ml Aquadest
0,1017 gMgCl ₂ Hexahydrat	
117 g NaCl	
12,1 gTris-Base	
63 g Tris-HCL	
1000 ml Aquadest	

Tabelle 10: Zusammensetzung des Entwicklungs- und Renaturierungspuffers für die Zymographie.

Lämmli Puffer 2-fach
0,5 M Tris HCL pH 6,8
4 ml 10 % SDS
2 ml Glycerol
2 M DTT in Aquadest
0,1 mg Bromphenolblau

Tabelle 11: Zusammensetzung des Lämmli Puffers für die Westernblotanalyse.

RIPA Puffer

2,15 ml R	IPA Puffer		2,15 ml
250 µl PhosSTOP solution		ition	250 µl
100 μl solution	cOmplete	Mini	100 µl

Tabelle 12: Zusammensetzung des vorbereiteten RIPA Puffers. PhosSTOP solution: 1 Tablette in 1 ml RIPA Puffer. cOmplete Mini solution: 1 Tablette in 2 ml RIPA Puffer.

	10x TRS	10x TRST
	104 105	
Tris Base	0,5 M	0,5 M
NaCl	1,5 M	1,5 M
Tween 20	-	0,1 %
FCS	-	-
BSA	-	-
pH	7,5	7,5

Tabelle 13: Lösungsansätze für 10x TBS und 10x TBST für die Westernblotanalyse.

Jodlösung	Eisenchlorid	Weigert's Eisenhämatoxylin
10 g Jod	12,4 g Eisen-Chlorid- Hexahydrat	60 ml Alkoholisches Hämatoxylin 2 %
20 g Kaliumiodid	5 ml Salzsäure (37 %)	40 ml Eisenchlorid
500 ml Aquadest	500 ml Aquadest.	20 ml Jodlösung

Tabelle 14: Herstellung von Weigert's Eisenhämatoxylin.
Säurefuchsin-Stock-	Brilliant-Crocein-R-	Crocein-Säurefuchsin-
Lösung	Stock- Lösung	Lösung
0,5 g Säurefuchsin	4g Brilliant Crocein R	20 ml Säurefuchsin Stock
497,5 ml Aquadest	398 ml Aquadest	80 ml Brilliant Crocein Stock

2,5 ml Essigsäure (100 %)

Tabelle 15: Herstellung von Crocein-Säurefuchsin-Lösung.

Bouin'sche Lösung
300 ml Pikrinsäure
100 ml Formaldehyd (37 %)
20 ml Essigsäure (100 %)
Tabelle 16: Herstellung von Bouin'scher Lösung.
Eosin-Lösung
1g Eosin
100 ml Ethanol (99,8 %)
20 ml Essigsäure (100 %)
200 µl Eisessig
100 ml Aquadest

Tabelle 17: Zusammensetzung der Eosin-Lösung.

Alizarin Rot S

2 % Alizarin Rot S

Aquadest pH 4, 1 - 4, 3

Tabelle 18: Zusammensetzung der Alizarin Rot S-Lösung.

1 % Alcianblau

2 g Alcianblau

200 ml Aquadest

Tabelle 19: Zusammensetzung der Alcianblau-Lösung.

1 % Gelatinelösung

1g Gelatine

500 ml PBS

Autoklaviert und steril filtriert

Tabelle 20: Zusammensetzung der Gelatinelösung.

5% Natriumthiosulfatlösung

10 g Natriumthiosulfat

Aquadest 200 ml

lichtgeschützt angesetzt

Tabelle 21: Zusammensetzung der Natriumthiosulfatlösung.

5% Phosphorwolframsäure

Phosphotungistic Acid 25 g

Aquadest 500 ml

Tabelle 22: Zusammensetzung der Phosphorwolframsäure.

5% Silbernitratlösung

200 ml Aquadest

10 g Silbernitrat

lichtgeschützt angesetzt

Tabelle 23: Zusammensetzung der Silbernitratlösung.

Alkoholischer Safran

12 g Safran du Gatinais

200 ml Ethanol 99,8 %

10 g Silbernitrat

In luftdichter Flasche über 48h bei 60° erhitzt und filtriert

Tabelle 24: Zusammensetzung des alkoholischen Safrans.

Alkalischer Alkohol

360 ml Ethanol (96%)

40 ml Ammoniumhydroxid 30%

Tabelle 25: Zusammensetzung des Alkalischen Alkohols.

Amphotericin Stock

50 mg Amphotericin B

100 ml NaCl 0,9 %

Tabelle 26: Herstellung des Amphotericin B Stocks.

Natriumcarbonat-Formaldehydlösung

150 ml Aquadest

50 ml Formaldehyd

10 g Natriumcarbonat

Tabelle 27: Zusammensetzung der Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung.

Tris/HCl 0.5 M (pH 6.8)	Tris/HCl 1.5 M (pH 8.8)
9,0855 g TrizmaBase	45,4275 g TrizmaBase
150 ml Aquadest	250 ml Aquadest

Tabelle 28: Zusammensetzung von Tris HCl 0,5 M und 1,5 M für die Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele.

RLT Puffer

1 ml RLT Puffer

20 µl Dichloridphenyltrichlorethan (DDT)

Tabelle 29: Zusammensetzung des RLT-Puffers.

2.1.9 Primäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
β-Aktin	mouse	1:2000	Sigma Aldrich, A2228
Glyceraldehyd-3- phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)	rabbit	1:2000	Cell Signalling, C52118
Vimentin (VIM)	guinea pig	1:1000	Progen, Heidelberg, Germany, GP53
α-SMA	rabbit	1:1000	Abcam, ab5694

Tabelle 30: Verwendete Primäre Antikörper. Die primären Antikörper wurden für die Westernblotanalyse in 5 % BSA / TBST verdünnt.

2.1.10 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
anti rabbit IgG	goat	1:10000	Dianova, 111-035-003
anti mouse IgG + IgM	goat	1:10000	Jackson Immuno, 115-035-044
anti guinea pig IgG	goat	1:10000	Dianova, 106-035-003

Tabelle 31: Verwendete Sekundäre Antikörper. Sekundäre Antikörper wurden für die Westernblotanalyse in 5 % Milchpulver/TBST oder BSA verdünnt.

2.1.11 Software

Software	Hersteller
EndNote	Adept Scientific, Frankfurt
GraphPad PRISM v6	GraphPad Software, Inc
ImageJ vl.51	Wayne Rasband
Microsoft Office 2016	Microsoft, WA, USA
Leica Mikroskopsoftware DMIL LED	Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA
Tecan iControl	Tecan Trading AG
Tabelle 32: Verwendete Software.	

2.2 Methoden

2.3 Zellbiologische Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95% Wasserdampfsättigung kultiviert. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Materialen wurden zur Sterilisation autoklaviert oder mit Ethanol gründlich gereinigt.

2.3.1 Zellgewinnung und Zellpassagierung / Gewebepräparation

Zur Gewinnung oviner VIC wurden ovine Herzen von etwa 6 Monate alten Tieren aus dem lokalen Schlachhof Laame in Wuppertal (Nordrhein-Westfalen) bezogen. Nach der Organentnahme wurden die Herzen auf Eis gelagert, transportiert und unmittelbar weiterverarbeitet. Es erfolgte eine sterile Präparation der Aortenklappe. Hierzu wurde zunächst das Perikard entfernt und der Apex corids entfernt. Der linke Ventrikel wurde mit einer Schere aufgeschnitten. Danach wurde die Aorta auf Höhe einer der drei Kommissuren zwischen den Taschenklappen aufgeschnitten. Die Taschen wurden so weit freigelegt, dass sie mit einer anatomischen Pinzette unter sanftem Zug aufgehalten und dann mit einem Skalpell abgeschnitten werden konnten. Anschließend wurde die Tasche in vorgewärmtes PBS gelegt. Die Gewebeproben wurden mit Hilfe einer 5 Millimeter (mm) Biopsiestanze gewonnen. Bei der Biopsie wurde der Taschenrand ausgespart (Abb. 5). Pro Tasche konnten drei Gewebeproben gewonnen werden. Zur weiteren Isolation der Zellen wurden alle drei Klappen eines Herzens mit einer Schere in ca. 1 mm² große Fragmente geschnitten. Pro Herz wurde eine T25 Zellkulturflasche mit Gelatine beschichtet. Hierzu wurden 3 Milliliter (ml) Gelatine in die Flasche gegeben und diese nach zehn minütiger Inkubation bei 37°C wieder abgesaugt. Die Fragmente wurden mit 3 ml Basalmedium mit Hilfe einer 10 ml Pipette in die Zellkulturflaschen überführt, durch Schwenken gleichmäßig auf dem Boden verteilt und für sieben Tage inkubiert. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Präparation in 12 Well Platten inkubiert und für 28 Tage inkubiert.



Abb. 5: Definierte Gewebeproben aus ovinen Aortenklappen. A: Schematische Darstellung der Aortenklappe im Querschnitt und 12 *well* Platte. Aus einer Tasche der Aortenklappe können jeweils 3 Gewebeproben à 5 mm mittels Biopsiestanze gewonnen werden. Somit können aus einem Herzen insgesamt neun Gewebeproben gewonnen werden. B: Gewebeprobe in Kulturmedium. C: Nahaufnahme der Gewebeprobe nativ vor Kultivierung.

2.3.2 Zellpassage und Herstellung von Zellsuspensionen

Bei einer Konfluenz von > 90 % wurden die Zellen passagiert. Tabelle 33 zeigt das Schema und die Zeitpunkte, an welchen die VIC Zellen passagiert wurden. Zum *Splitting* wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit vorgewärmtem PBS zweimal vorsichtig gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA für drei Minuten bei 37°C und einem pCO² von 5% inkubiert, sodass sie sich aus ihrem Zellverband lösten. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von Basalmedium im Verhältnis 2:1 inhibiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach blasenfrei auf- und abpipettiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden für fünf Minuten (min) bei 1000 g zentrifugiert und abpelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen durch Streichen auf einem Gitter resuspendiert und je nach Zellzahl mit Basalmedium verdünnt, sodass die Zellzahl 1 Million/ml entsprach. Von Passage (P) 0 auf P1 und von P1 auf P2 wurden die Zellen jeweils in größere Kulturflaschen ausgesät, sodass sie ab P2 in T225 Flaschen ausgesät waren. Passage P0 - P1

Passage P1 - P2

>90% der Zellen konfluent; T225 Flasche

Tabelle 33: Zellpassagen und Zeitpunkte des Splittings.

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von VIC

Für ein späteres Verwenden der Zellen wurden diese bei -80°C eingefroren. Dabei wurden die Zellen zunächst trypsinisiert, pelletiert und in DMSO-Medium (FCS, 10% DMSO) suspendiert und nachfolgend in *cryovials* bei -80° eingefroren. Zur späteren Verwendung wurden die Zellen durch die Zugabe von auf 37°C erwärmtem Basalmedium aufgetaut. Es wurden stets 1 ml Zellsuspension mit 6 ml Basalmedium zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in frischem Basalmedium suspendiert und in eine mittels Gelatine vorbeschichtete Kultivierungsflasche gegeben.

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Jeweils 50 µl der gewonnenen Zellsuspension wurden mit 50 Mikroliter (µl) Trypanblau-Lösung (Verhältnis 1:1) vermischt und in einer Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch ausgezählt. Die anionische Trypanblau-Lösung durchdringt die Zellmembran avitaler Zellen und erlaubt so eine Abgrenzung gegenüber den lebenden Zellen. Anschließend wurden nur die vitalen, nicht angefärbten Zellen, ausgezählt. Die verwendete Zählkammer besteht aus neun Quadranten wobei jedes Quadrat 0,1 µl fasst. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter wurde die ermittelte Zellzahl pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert.

2.3.5 Stimulation

Die VIC wurden mit jeweils 200.000 Zellen pro *Well* auf einer 6 *Well* Platte mit jeweils 2 ml Basalmedium ausgesät und stets bei 37 ° C ,5 % CO₂ und 95 % Wasserdampfsättigung kultiviert. Nach zwei Tagen war der Zellrasen konfluent. Danach erfolgte die Inkubation gemäß Schema (Tabelle 34). Es erfolgte ein Wechsel des Mediums an Tag zwei und Tag vier.

Die Gewebeproben der ovinen Aortenklappe wurden unmittelbar nach Präparation kultiviert. Hierzu wurden die Gewebeproben mit jeweils 3 ml Basalmedium auf einer 12

Well Platte inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 28 Tage mit einem wöchentlichen Mediumwechsel an Tag sieben, Tag 14, Tag 21 und Tag 28.

Basalmedium	Basalmedium +	Basalmedium +
	Suramin 100 µM	Orthovanadat 10 µM
CaCl ₂ -Medium	CaCl ₂ -Medium +	CaCl ₂ -Medium +
	Suramin 100 µM	Orthovanadat 10 μ M

Tabelle 34: Versuchsaufbau der Behandlung mittels ATPase-Inhibitoren.

2.3.6 Überstände und Zellernte

Die Zellen wurden für sechs Tage inkubiert und jeweils an Tag zwei und Tag sechs der Kultivierung wurde von den Überständen 1 ml für Überstandsanalysen in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Vor der Zellernte wurden die Wells mit 1 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Die Zellen zur Analyse mittels Kalzium Assay wurden mit 100 μ l 0,1 M Tris pro *Well* abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Die Zellen für die RNA-Analysen wurden mit 350 μ l RLT Puffer pro *Well* abgeschabt und in Ribonuklease (RNase) -freie Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen für die Protein Analysen wurden mit 100 μ l RIPA Puffer ebenfalls abgeschabt und in 1,5 ml RNase-freie Reaktionsgefäße überführt. Alle Proben wurden bei -80°C weggefroren.

Aus den Überständen der Gewebeproben wurden jeweils an Tag sieben; Tag 14; Tag 21 und Tag 28 der Kultivierung 1 ml von den Überständen abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden bei -80°C weggefroren. Die Gewebeproben wurden nach Ende der Kultivierungsdauer unmittelbar zur histologischen Analyse weiterverarbeitet.

2.3.7 Alizarin Rot-Färbung von VIC-Kulturen

Durch eine Färbung mit Alizarin Rot lassen sich Kalziumablagerungen in Geweben nachweisen. Alizarin Rot S ist ein Derivat aus der Familie der Anthrachinon-Farbstoffe. Während der Färbung lagert sich Alizarin Rot als Chelat an Kalzium an. Der dabei entstehende Alizarin Rot-Kalzium Komplex erscheint lichtmikroskopisch rot. Die Zellkulturplatten wurden jeweils nach sechs Tagen Behandlung mit ATPase-Inhibitoren gefärbt. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Fixierung mit 1 ml 4%-igen Formaldehyd für fünf min. Als nächstes wurde das Formaldehyd vorsichtig abgesaugt und der Zellrasen erneut mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min in 1 ml 2%-iger Alizarin Rot-Lösung gefärbt. Nach Entfernen der Alizarin Rot-Lösung wurden die *Wells* erneut zweimal mit 3 ml PBS gewaschen.

2.3.8 Auswertung der Alizarin Rot-Färbung von VIC-Kulturen

Die Zellkulturplatten wurden noch etwas feucht unter einem Leuchtmikroskop bei vierzigfacher Vergrößerung abfotografiert. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung der morphologischen Veränderungen der Zellkultur durch unabhängige Beobachter. Zu diesem Zweck wurde eine, durch die Forschungsgruppe entwickelte, Wertung verwendet, welche die verschiedenen Stadien der Degeneration mit Punkten von 0 bis maximal 8 Punkten bewertete (Tabelle 35).

Punktzahl Stadium

0	Normalstadium	Zellen vital, keine erkennbare Beeinträchtigung
1		Zellen vital, geringfügig erkennbare Beeinträchtigung
2	Initiationsstadium	Zellen vital, geringfügig erkennbare Degeneration
3	Kalzifizierungsstadium	Zellen vital, einzelne Degenerationsknötchen erkennbar
4		Zellen vital, mehrere Degenerationsknötchen erkennbar
5		Verschlechterung der Zellvitalität, starke Degeneration
6		Hohe Anzahl toter Zellen, starke Degeneration
7	Aponekrosestadium	Abgelöste Zellschicht, sehr hohe Anzahl toter Zellen
8		Keine Zellen, kleine Reste von Zelltrümmern

Tabelle 35: Kalzifizierungs-Wertung. In Abhängigkeit von der Zellmorphologie, Vitalität und Degeneration wurde eine Punktzahl vergeben. 0-1= Normalstadium; 2= Initiationsstadium; 3-6 = Kalzifizierungsstadium; 7-8 = Aponekrosestadium.

2.4 SDS-PAGE basierte Zymographie

Zur Analyse der enzymatischen Funktion der Proteasen, im spezifischen der Gelatinasen, wurden Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt (73). Anschließend wurde das SDS extrahiert, das Gel in eine Pufferlösung überführt und der Substratumsatz schließlich mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

2.4.1 Probenaufbereitung

Die SDS basierte Zymographie ist eine Methode zur Sichtbarmachung der enzymatischen Aktivität von Proteinasen durch den Umsatz eines Substrates. Bei der hier beschriebenen Zymographie handelt es sich um eine Methode zum Nachweis der Aktivität der Gelatinasen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung setzten die Gelatinasen die dem SDS Gel hinzugefügte Gelatine um. Zur Probenvorbereitung wurden je 10 μ l *6x Laemmli ohne DDT* und 50 μ L Zellkulturüberstand vermischt. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-Page wurden die Proben nicht im Probenpuffer aufgekocht, sodass keine Denaturierung stattfand und eine spätere Messung der enzymatischen Aktivität der Enzyme möglich wurde.

2.4.2 Gelherstellung

Die Herstellung des Polyacrylamid-Gels erfolgte stets am Vortag der Elektrophorese. Zunächst wurde ein 10% iges Polyacrylamid-Trenngel (Tabelle 36: Zusammensetzung von 4%-igem Sammelgel und 10 %-igem Trenngel für die Zymographie.hergestellt, mit welchem die Gelkassette nachfolgend zu ³/₄ befüllt wurde. Zu dem SDS-Gel wurde Gelatine für die anschließende Zymographie hinzugefügt. Als Elektrolyt diente Tris-Glycin-SDS-Puffer. Zur Verhinderung von Blasenbildung auf der Geloberfläche wurde 1 ml Propanolol auf das Trenngel in die Kassette gegeben. Nach Polymerisation wurde das Propanolol entfernt und 4% iges Polyacrylamid-Sammelgel aufgetragen. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm mit 10 Taschen gesteckt. Schließlich wurde das Gel in feuchte Zellstofftücher gewickelt und bis zum nächsten Tag bei 4°C gelagert.

Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
315 µl 40% Bis-Acrylamid	0,1 ml 10 % SDS
625 µl 0,5 M Tris-HCL	2,5 ml 40 % Bis-Acrylamid
25 μl APS 10%	2,5 ml 1,5 M Tris-HCL
1,5 ml Aqua dest.	0,1 ml APS 10 %
5 μl TEMED	4,7 ml Aquadest
	0,1 ml Gelatine 10%
	20 μl TEMED

Tabelle 36: Zusammensetzung von 4%-igem Sammelgel und 10 %-igem Trenngel für die Zymographie.

2.4.3 Gelelektrophorese/SDS-PAGE

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde die Gelkassette in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. In die Geltaschen wurden jeweils 35 µl der aufbereiteten Probe und 5 µl *PageRule Prestained Protein Ladder* als Marker pipettiert. Nachfolgend wurde die Elektrophoresekammer zur Erzeugung eines elektrischen Feldes an den *BIO-RAD Powerpac 200* angeschlossen. Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld. Negativ geladene Teilchen wandern in Richtung Anode, wobei kleinere Proteine schneller wandern als größere und so eine Auftrennung nach der Molekülmasse erreicht wird. Die Elektrophorese wurde zunächst mit 50 Volt gestartet, bis die Bromphenollauffront das Trenngel erreicht hatte und die Spannung danach auf 150 Volt erhöht. Die elektrophoretische Auftrennung wurde nach 50 min gestoppt, als die Lauffront das untere Ende der Gelkassette erreicht hatte.

2.4.4 Enzymatische Bandenvisualisierung

Zur enzymatischen Bandenvisualisierung wurden die Gele nach der Elektrophorese zunächst drei Mal für jeweils 20 min in Renaturierungspuffer gewaschen. Hierbei extrahiert das Triton X-100 das SDS. Danach wurden die Gele zweimal hintereinander für jeweils 20 min in Entwicklungspuffer gewaschen und verblieben anschließend für 18 Stunden bei 37°C im Puffer. Hierbei dient der Entwicklungspuffer zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität der Gelatinasen. Nach 18 Stunden wurde das Polyacrylamidgel in 2%-iger Coomassie-Lösung unter kontinuierlichem leichtem Schütteln für 1½ Stunden gefärbt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel mit Hilfe der *Destain*-Lösung entfärbt und in Leitungswasser gewaschen. Nach der Zymographie zeigte sich der Umsatz der Gelatine in Form eines Anti-Zymogramms durch helle Banden.

2.5 Proteinanalyse mittels Westernblot

Die Proteinanalyse mittels Westernblot erfolgt nach Auftrennung der Proteine entlang ihrer Größe und Ladung mittels SDS-PAGE. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Membran übertragen und mittels Antikörperreaktion sichtbar gemacht. Die Untersuchungen zu α-SMA und Vimentin wurden sowohl aus VIC-Kulturen als auch aus Gewebeproben der Aortenklappe durchgeführt.

2.5.1 Probenvorbereitung für die Westernblotanalyse

Die Zellen wurden mit *RIPA* Puffer, *PhosStop* und *complete mini protease inhibitor* lysiert und auf Eis gelegt. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurde der Zellrasen homogenisiert und bei 14.000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Die Gewebeproben der Aortenklappen wurden in Flüssigstickstoff gefroren und mittels Mörser zerdrückt und mit *RIPA* Puffer lysiert. Es wurden jeweils 100 µl Laemmli Puffer (2x) zu 100 µl der zuvor in RIPA Puffer lysierten Probe hinzugefügt und für 5 min bei 95 °C denaturiert, sodass die Proteine in ihrer Primärstruktur vorlagen.

2.5.2 SDS-PAGE zur Westernblotanalyse

Das Protein Homogenat wurde anschließend in 10%-igem SDS-Polyacrylamid Gel (Tabelle 37) mit Hilfe der Laemmli Methode aufgetrennt. Hierzu wurden 10 µl Probe in die Geltaschen pipettiert, sowie 5 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder*. Zunächst wurde der Lauf für 15 min mit einer Spannung von 60 Volt gestartet und anschließend mit 150 Volt für 80 min fortgesetzt.

Sammelgel (6 %)	Trenngel (12 %)
1,5 ml 40% Bis-Acrylamid	6 ml 40 % Bis-Acrylamid
2,5 ml 0,5 M Tris-HCL	5 ml 1,5 M Tris-HCL
5,8 ml Aqua dest.	8,6 ml Aquadest
100 µl 10 % SDS	200 µl 10% SDS
20 µl TEMED	40 µl TEMED
100 µl APS	200 µl APS

Tabelle 37: Zusammensetzung von 6%-igem Sammelgel und 12 %-igem Trenngel für die Westernblot Analyse.

2.5.3 Westernblot und Antikörperbindung

Mit Hilfe der Westernblotmethode wurden die aufgetrennten Proteinenbanden auf eine Membran übertragen. Hierzu wurden die Filterpapiere (8,5 x 6,5 cm) in 1x Transferpuffer gelegt. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert. Nun wurden nacheinander die Filterpapiere, das Polyacrylamidgel, die PVDF Membran, ein weiteres Stück Filterpapier in Transferpuffer an den *electrophoresis Power supply EPS 301* angeschlossen. Für den Proteintransfer wurde nun für ca. 60 min eine Spannung von 70 Volt angelegt. Danach wurden die unspezifischen Epitope der Proteine 60 min mit 10 ml 5 %igem Milchpulver gelöst in TBST blockiert. Danach wurde der Primärantikörper über Nacht bei kontinuierlichem Schwenken der Blotmembran bei 4°C aufgetragen. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für 15 min in TBST Puffer gewaschen. Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 90 min. Zum Schluss wurde die Blotmembran dreimal für 15 min in TBST gewaschen.

Die Proteine wurden mit Primärantikörpern für Vimentin (1:1000) und α -SMA (1:1000) detektiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin (1:2000) oder Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 1:2000) verwendet. Für die Detektion der Primärantikörper wurden *HRP*-konjugierte Sekundärantikörper verwendet: *goat anti rabbit IgG* (1:10000) *goat-anti mouse IgG* + *IgM* (1:1000) und *goat anti guinea pig IgG* (1:10000). Die Proteinbanden wurden mittels *Western Bright*TM*Quantum Western Blotting Detection System* visualisiert. Die Membranen wurden mittels Amersham Imager 600 aufgenommen und nachfolgend densitometrisch mit Hilfe der *Image J* Software gemessen.

2.6 Kalzium Assay

Der Kalziumgehalt der VIC-Kultur wurde durch ein Kalzium Assay Kit bestimmt, das auf einer spezifischen Reaktion zwischen Phenolsulfonphthalein und Kalzium beruht. Die Reaktion führt zu einer Blaufärbung, deren Intensität proportional zur Menge des darin enthaltenen Kalziums ist. Dazu wurden die geernteten VIC im Ultraschallbad für 20 min lysiert. Die Durchführung des Assay Kits erfolgte gemäß Angaben des Herstellers. Es wurden 20 µl Probe eingesetzt und die Absorption bei 612 nm im Tecan *Microplate Reader* gemessen. Die Ergebnisse des Kalziumassays wurden auf ihre Proteingehalte normalisiert. Die Proteingehalte wurden mit Hilfe eines Protein Assays bestimmt. Die Reaktion beruht auf dem nach Oliver Lohry entwickelten Reagenz zur Bestimmung des Proteingehalts. Für den Protein Assay wurden 10 µl Probe eingesetzt. Die Absorption wurde bei 750 nm im Tecan *Microplate Reader* gemessen.

2.7 LDH Assay

Zur Beurteilung der Zellvitalität wurde das *Pierce LDH Cytotoxity* Assay Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Der Assay beruht auf einer kolorimetrischen Methode zur Messung des Laktatdehydrogenase (LDH) Gehalts in Zellkulturüberständen. Die LDH ist ein zytosolisches Enzym, das bei Zerstörung der Zellmembran in das umgebende Medium freigesetzt wird. Die LDH katalysiert die Konversion von Laktat zu Pyruvat über eine Reduktion von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)+ zu NADH (74). Das entstandene NADH reduziert das im Assay enthaltene Tetrazoliumsalz zu einem roten Formazan Produkt. Der Gehalt an Formazan wird durch Absorption bei 490 nm und 680 nm im Tecan *Microplate Reader* gemessen und ist proportional zum LDH Gehalt. Es wurden jeweils 50 µl Zellkulturüberstand doppelt auf eine 96*Well* Zellkulturplatte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl Reaktionsmixtur dazugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Stop-Lösung hinzugefügt und die Absorption gemessen.

2.8 Quantitative Genanalyse mittels *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qPCR)

Die Genexpression wurde mittels qPCR analysiert. Zunächst wurde aus den Zellen der jeweiligen Versuchsansätze mRNA gewonnen, welche nachfolgend in cDNA ungeschrieben und der spezifischen Genanalyse mittels qPCR zugeführt wurde. Die RNA Isolation erfolgte unter Anwendung des Qiagen RNeasy Mini Kits. Die Proben wurden gemäß Kit weiterverarbeitet und schließlich bei -80°C weggefroren oder auf Eis gestellt und weiterverarbeitet. Im nachfolgenden Schritt wurde die isolierte RNA mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit in cDNA umgeschrieben. Zwecks Primer Annealing wurden die Proben für 30 min bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Schließlich wurden die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt und wieder abgekühlt und bei -20°C gelagert. Für die qPCR wurde das StepOnePlus real time PCR System von Allplied Biosystems als Thermocycler, verwendet. Zur Amplifikation und Signaldetektion wurde der GoTag gPCR Master Mix verwendet. Der dreiphasige Amplifikationszyklus aus Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation wurde 40 Mal durchlaufen. Das PCR Protokoll beinhaltete einen ersten Schritt für 2 min bei 50 °C, gefolgt von 2 min bei 95°C, 40 Zyklen für 15s bei 95°C und 30s bei 60°C, gefolgt von einzelnen Schritten 15 s bei 95°C, 1 min bei 60°C und 15 s bei 95°C. Die Auswertung erfolgte anhand der $\Delta\Delta$ Ct- Methode.

Gen	Vorwärts (5'-3')	Rückwärts (5' – 3')
RPL-29A	CCAAGTCCAAGAACCACACC	TATCGTTGTGATCGGGGTTT
ACTA2	GATAGAGCACGGCATCATCA	GAAGGGTTGGATGCTCTTCA
COL1A1	AAGACATCCCACCAGTCACC	TAAGTTCGTCGCAGATCACG
VIM	GACCTGGAGCGTAAAGTGGA	CTCTTGAATCTGGGCCTGAA
TGF-β1	GAGCCAGAGGCGGACTACTA	TCGGACGTGTTGAAGAACAT
OPN	GATGGCCGAGGTGATAGTGT	TCGTCTTCTTAGGTGCGTCA
ENTPD1	GTTTTCTTACCGCCACTCCA	TGGTAGCCATTCAGGAGGAG
NT5E	TCTTCTCAACAGCAGCATCC	CCCAATTCCTGGGTTGAATA
ENPP1	CCAAGGACCCC AACACCTAT	AACAGCGACCTTTGCAACTT

Tabelle 38: Verwendete Primer Sequenzen.

2.9 Histologische Methoden

2.9.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die Gewebebiopsien wurden mittels KP-*Cryocompound* in Einbettschälchen eingebettet. Hierzu wurde Isopentan in einem Stickstoffbad heruntergekühlt und das Einbettschälchen anschließend für 15 s in Isopentan eingetaucht. Das eingebettete Präparat wurde anschließend bei -80°C weggefroren. Die Proben wurden in einem Gefriermikrotom bei -20°C geschnitten. Vor dem Schneiden wurden die Proben für 20 min im Kroystaten gelagert. Die Schnittdicke betrug stets 5 µm. Der angefertigte Schnitt wurde auf einen beschichteten Objektträger aufgenommen. Alle Objektträger wurden bei -20°C gelagert. Alle Schnitte wurden kurz vor ihrer Färbung, sofern nicht anders beschrieben, für einige Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut.

2.9.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung

Die Objektträger wurden jeweils für eine min nacheinander in Hämatoxylin, Aquadest, 5% iger Essigsäure und erneut in Aquadest gefärbt. Danach wurden sie für zwei min mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Schnitte in 70% igen Alkohol getaucht, für 15 min in Eosin-Lösung gefärbt und abschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurden die Schnitte getrocknet und mit *Roti HistoKitt II* eingedeckt.

2.9.3 Alizarin Rot-Färbung

Das Prinzip der Alizarin Rot-Färbung von histologischen Schnitten beruht auf derselben Reaktion wie bei der Färbung von VIC-Kulturen. Die Schnitte wurden zunächst für drei min in 2%iger Alizarin Rot-Lösung gefärbt. Dann wurden sie 20 Mal in Aceton eingetaucht und dehydriert. Anschließend wurden sie 20 Mal in eine 1:1 Aceton-Xylene-Lösung eingetaucht. Zum Schluss wurden die Schnitte für eine min in Xylol geklärt.

2.9.4 Von-Kossa-Färbung

Nach Fixierung und Trocknung wurden die Schnitte für 15 min unter Lichteinfluss in einer 5% igen Silbernitratlösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte für zwei min in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung reduziert. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült und für fünf min in 5% iger Natriumthiosulfatlösung fixiert. Nach erneuten Spülschritten erfolgte die Kernfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung. Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit *Roti HistoKitt II* eingedeckt.

2.9.5 Movat-Pentachrom-Färbung

Mit Hilfe der Movat-Pentachrom-Färbung können verschiedene Bestandteile des Bindegewebes und somit auch Veränderungen der EZM nachgewiesen werden. Es werden fünf Einzelfärbungen kombiniert: Eine Alcianblau-Färbung, eine *Verhoeff* Hämatoxylin-Färbung, eine Brilliant-Crocein-Färbung in Kombination mit einer Säurefuchsin-Färbung und eine Safran-Färbung. Das Ergebnis der Färbung ist die folgende Differenzierung (Tabelle 39).

Komponente	Farbe
Kerne und elastische Fasern	schwarz
Muskulatur	rot
Kollagen und retikuläres Bindegewebe	gelb
Glykosaminoglykane	grün
Grundsubstanz, Muzin	blau

Tabelle 39: Farbdifferenzierung der Movat-Pentachrom-Färbung.

Vor dem eigentlichen Färbeprozess wurden die Objektträger über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C erwärmt und anschließend mit 4% iger Formalinlösung fixiert. Die Schnitte wurden zunächst für zehn min in auf 50°C erhitzte Bouin's Lösung getaucht und in 5% iger Natriumthiosulfatlösung fixiert und gespült. Dann wurden die Schnitte für 20 min in 1% iger Alcianblau-Lösung gefärbt und erneut gespült. Danach wurden die Schnitte für zehn min in, auf 60°C erhitztem alkalischen Alkohol stabilisiert und in Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung gefärbt. Danach erfolgte die Färbung mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung und eine Differenzierung in 5% iger Phosphorwolframsäure. Als Nächstes wurden die Schnitte acht min in alkoholischem Safran gefärbt und schließlich dehydratisiert und eingedeckt.

2.10 Software und statistische Auswertung

Die Polyacrylamidgele wurden im Anschluss an die Zymographie im Amersham Imager 600 kolorimetrisch auf dem trans Board unter Verwendung eines Diffusor Boards ausgemessen. Die Photointensitätsmessungen zur Signalauswertung der Zymographie und Westernblotanalyse wurden mittels ImageJ 1,48v software durchgeführt. Die Aufnahmen der histologischen Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Leica DM2000 und der Leica Application Software LAS v3.1 angefertigt. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 6 durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Unterschiede wurden ab einem p-Wert von $p \le 0.05$ als signifikant bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Alizarin Rot-Färbung

Mit Hilfe der Alizarin Rot-Färbung wurden kalziumbasierte Mineralisierungsprozesse nachgewiesen. Die lichtmikroskopisch sichtbaren Chelatkomplexe aus Alizarin Rot und Kalzium stellen sich als rot-bräunliche Ansammlungen dar (Abb. 6). Es zeigte sich keine relevante Mikrokalzifizierung nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren in Basalmedium. In der Kontrolle in CaCl₂-Medium zeigte sich eine beginnende Mikrokalzifizierung. Nach 6-tägiger Behandlung mit Suramin in CaCl₂-Medium war die Mikrokalzifizierung ubiquitär über den gesamten Zellrasen nachweisbar. Nach Behandlung mit Orthovanadat in CaCl₂-Medium waren die kalzifizierten Ansammlungen dicht und teilweise konfluierend vorhanden. Im Bereich der kalzifizierten Bereiche war die Integrität des Zellrasens aufgehoben. Nach Behandlung mit Orthovanadat waren einzelne Zellen unscharf abgegrenzt und verkleinert.



Abb. 6: Darstellung von VIC-Kultur nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren und Alizarin Rot-Färbung in Basal- (A, B, C) und CaCl₂-Medium (D, E, F) nach sechstägiger Kultivierung. A: Kontrolle in Basalmedium. B: Behandlung mit Suramin. C: Behandlung mit Orthovanadat. D: Kontrolle in CaCl₂-Kondition. E: Behandlung mit Suramin in CaCl₂-Kondition. E: Behandlung mit Orthovanadat in CaCl₂-Kondition. Maßstäbe = 400 μ m. Rot=Alizarin Rot-Kalzium Komplex.

Zur Beurteilung der degenerativen Veränderungen wurde die in Tabelle 35 beschriebene Kalzifizierungs-Wertung angewandt. Die Wertung berücksichtig neben der Kalzifizierung auch die Zellvitalität. Abb. 7 zeigt die statistische Auswertung der Degeneration nach Anwendung der Kalzifizierungs-Wertung. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen in Basalmedium. Die alleinige Kultivierung in CaCl₂- Medium konnte nach sechs Tagen eine Bildung einzelner Degenerationsknötchen bei erhaltener Zellvitalität hervorrufen. Suramin und Orthovanadat führten zu einer signifikanten Zunahme der Kalzifizierung in CaCl₂-Medium. Die Behandlung mit Orthovanadat hatte zudem eine verminderte Zellvitalität zur Folge.



Abb. 7: Bewertung der Degeneration in VIC-Kulturen anhand des Kalzifizierungsscores. Statistische Auswertung der Kalzifizierung nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren. n=8; ** $p \le 0.01$; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. In Basalmedium (1,89±0,49), nach Stimulation mit Suramin (2,04 ±0,46) und nach Stimulation mit Orhtovanadat (2,39±0,52) zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. In CaCl₂-Medium zeigt sich ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle in Basalmedium (3,25±0,61). Nach Stimulation mit Suramin (4,43±0,58) und Orthovanadat (5,0±0,81) zeigte sich in CaCl₂-Medium ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle in CaCl₂-Medium. Die p-Werte wurden anhand des *Kruskal Wallis*-Tests mit *Dunn's multiple comparison* berechnet.

3.2 Zellüberleben

Der LDH-Gehalt ist ein Indikator für die Vitalität der Zellen und wurde mittels LDH Assay quantifiziert (Abb. 8.). In Basalmedium zeigte sich eine höhere LDH-Konzentration nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren. Die Behandlung mit Orthovanadat führte zu einem signifikanten Anstieg des LDH-Gehalts in Basalmedium. In CaCl₂-Medium zeigten sich nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren ein signifikant erhöhter LDH-Gehalt. Der LDH-Gehalt war nach Behandlung mit Orthovanadat sowohl in Basal-, als auch in CaCl₂-Medium höher als nach Behandlung mit Suramin.



Abb. 8: Bestimmung des LDH-Gehalts in Überständen der VIC-Kulturen mittels LDH Assay. Statistische Auswertung der LDH-Konzentration. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der LDH-Konzentration nach Behandlung mit Orthovanadat in der Basalkondition. In CaCl₂-Medium zeigt sich sowohl nach Behandlung mit Suramin, als auch mit Orthovanadat ein signifikanter Unterschied der LDH-Konzentration. n=14; ** p ≤ 0.01 . Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

3.3 Kalzium Assay

Der Kalziumgehalt in den VIC-Kulturen nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren wurde mit Hilfe des Kalzium Assays gemessen (Abb. 9). Der Kalziumgehalt wurde in mg/mg Protein erfasst. Zusammenfassend ließ sich nach sechstägiger Kultivierung weder in Basalmediun. in ein signifikanter noch CaCl₂-Medium Unterschied der Kalziumkonzentration nach Stimulation mit Suramin und Orthovanadat im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Im Vergleich zur Kultivierung in Basalmedium zeigte sich jedoch in CaCl₂-Medium ein leichter Trend zu höheren Kalziumkonzentration nach Stimulation mit Suramin (p=0,055) und Orthovanadat (p=0,43). Insgesamt war der Kalziumgehalt mit etwa 0,15 mg/mg Protein in der CaCl₂-Suramin-Behandlung am höchsten.



Abb. 9: Bestimmung des Kalziumgehalts in Überständen der VIC-Kulturen mittels Kalzium Assay. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Kalziumkonzentration zwischen Basalmedium und CaCl₂ Medium (p < 0,0001). Die Messung des Kalziumgehalts in der Kontrollkondition in Basalmedium ($0,03\pm0,01$ mg/mg) zeigt gegenüber der Behandlung mit Suramin ($0,028\pm0,015$; p=0,99) und Orthovanadat ($0,025\pm0,0$; p=0,99) keine Unterschiede. Der mittlere Kalziumgehalt ist nach Stimulation mit Suramin in CaCl₂-Medium am höchsten ($0,15\pm0,05$ mg/mg), jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrolle in CaCl₂-Medium erhöht (p=0,055). Der Kalziumgehalt nach Behandlung mit Orthovanadat ist gegenüber der Kontrollkondition in CaCl₂-Medium nicht signifikant erhöht (p=0,43). n=14. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

3.4 Analyse der MMP-2 und -9 Sekretion

Zur Quantifizierung der MMP-2 und MMP-9 Aktivität auf Proteinebene wurde eine SDS-PAGE basierte Zymographie aus Zellkulturüberständen nach sechstägiger Kultivierung mit ATPase-Inhibitoren angewandt (Abb. 10). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MMP-2 und MMP-9 Aktivität nach Behandlung mit Orthovanadat. Die Behandlung mit Suramin hatte keinen Effekt auf die Aktivität der MMP-2 und -9.



Abb. 10: Analyse der MMP-Sekretion nach sechs Tagen. Es erfolgten Dichteanalysen für die Quantifizierung der MMPs. A: Graphische Darstellung der Dichteanalyse der MMP-2 Bande (92 kDa). B: Graphische Darstellung der Dichteanalyse der pro-MMP-2 Bande (72 kDa). C: Graphische Darstellung der Dichteanalyse der MMP-9 Bande (58 kDa). D: Repräsentative Gelatine Zymographie aus Überständen von VIC-Kulturen nach sechstägiger Kultivierung mit Suramin und Orthovanadat in Basal- und CaCl₂-Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$ Die P-Werte wurden mittels Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison post hoc Test ermittelt.

Ferner erfolgte eine Analyse der MMP-Aktivität aus Kulturüberständen nach 21-tägiger Kultivierung der Gewebebiopsien (Abb. 11). Die Behandlung mit Orthovanadat hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von MMP-2 und MMP-9. Die Behandlung mit Suramin führte zu einer vermehrten Aktivität der MMP-2. Unter Suramin zeigte die MMP-9 in Basalmedium eine vermehrte Aktivität, während die MMP-9 in CaCl₂-Medium eine signifikant verminderte Aktivität zeigte.



Abb. 11: Analyse der MMP-Sekretion nach 21-tägiger Kultivierung der Gewebeproben. Es erfolgten Dichteanalysen für die Quantifizierung der MMPs. A: Graphische Darstellung der Dichteanalyse der MMP-2 Bande (92 kDa). B: Graphische Darstellung der Dichteanalyse der pro-MMP-2 Bande (72 kDa). C: Graphische Darstellung der Dichteanalyse der MMP-9 Bande (58 kDa). D: Repräsentative Abbildung einer Gelatine Zymographie aus Kulturberständen von Gewebebiopsien oviner Aortenklappensegel nach 21-tägiger Kultivierung mit Suramin und Orthovanadat in Basal- und CaCl₂-Medium. n=6. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$ Die P-Werte wurden mittels *Kruskal Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison post hoc* Test ermittelt.

3.5 Expression myofibroblastischer und osteogener Marker in VIC-Kulturen

Es wurden PCR-Analysen zur Quantifizierung von osteogenen und myofibroblastischen Markern durchgeführt (Abb. 12). Die Behandlung mit beiden ATPase Inhibitoren führte zu einer Hochregulierung des OPN Gens. Während die Behandlung mit Orthovanadat sowohl in Basal- als auch in CaCl₂-Medium zu einer signifikanten Hochregulierung führte, war OPN nach Behandlung mit Suramin nur in der CaCl₂-Kondition hochreguliert. Kollagen Typ 1 war nach Behandlung mit Orthovanadat herunterreguliert. Suramin hatte keinen Effekt auf

die Genexpression von Kollagen Typ 1. Die Behandlung mit Orthovanadat führte zu einer signifikant verstärkten TGF-β-Genexpression in Basal- und CaCl₂-Medium. Suramin führte zu einer signifikanten Hochregulierung der TGF-β-Genexpression in CaCl₂-Medium. Die ACTA-2 Genexpression war nach Behandlung mit Suramin in beiden Konditionen signifikant hochreguliert. Die Behandlung mit Orthovanadat führte zu einer signifikanten Herunterregulierung der ACTA-2 sowohl in Basal- als auch in CaCl₂-Medium.



Abb. 12: PCR-Analyse der Genexpression myofibroblastischer und osteogener Marker. A: OPN-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta$ Ct- Methode. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der OPN Genexpression nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren. *p ≤ 0.05 ; ***p ≤ 0.001 ; *n*=6. B: Col1A1 Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta$ Ct- Methode. Nach Behandlung mit Orthovanadat zeigt sich eine signifikant niedrigere Kollagen Typ 1 Genexpression. **p ≤ 0.01 ; *n*=6. C: TGF β -Genexpression, graphische Darstellung der Auswertung nach $\Delta\Delta$ Ct- Methode. Es zeigt sich eine signifikant verstärkte TGF- β Genexpression nach Behandlung mit Orthovanadat in Basalmedium. In CaCl₂-Medium zeigen sich gegensätzliche Effekte. *p ≤ 0.05 ; **p ≤ 0.01 ; ***p ≤ 0.001 *n*=6. D: ACTA-2 Genexpression, graphische Darstellung nach $\Delta\Delta$ Ct- Methode. Nach Behandlung mit Suramin zeigt sich eine verstärkte ACTA-2 Genexpression, während ACTA-2 nach Behandlung mit Orthovanadat herrunterreguliert war. *p ≤ 0.05 ; **p ≤ 0.001 ; *n*=6.

3.6 Expression purinerger Enzyme

Zur Quantifizierung der Expression purinerger Enzyme auf Genebene wurden die qPCR nach sechstägiger Kultivierung von VIC mit ATPase-Inhibitoren durchgeführt (Abb. 13). Es zeigte sich eine signifikante Hochregulierung des ENPP1 Gens. In CaCl₂-Medium waren die Effekte in allen Behandlungsgruppen signifikant nachweisbar. Die Behandlung mit Orthovanadat führte sowohl in Basal- als auch in CaCl₂-Medium zu einer signifikanten Herunterregulierung von ENTPD1. Nach Behandlung mit Suramin war die ENTPD1 Genexpression in CaCl₂-Medium signifikant hochreguliert. Das CD73 kodierende Gen,

NT5E, zeigte nach Behandlung mit beiden ATPase-Inhibitoren eine Hochregulierung. Nach Behandlung mit Orthovanadat in Basalmedium war NT5E hochreguliert Die Adenosin-Kinase (ADK) war nach Behandlung mit Orthovanadat in Basalmedium signifikant hochreguliert.



Abb. 13: PCR-Analyse der Genexpression purinerger Enzyme. A: ENPP1-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta$ Ct- Methode. Es zeigt sich eine signifikante Hochregulierung der ENPP1 nach Behandlung mit Orhtovanadat. *p ≤ 0.05 ; n=6. B: ENTPD1-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta$ Ct- Methode. Während die Behandlung mit Suramin zu einer Hochregulierung führt, ist die ENTPD1 in der Behandlungsgruppe mit Orthovanadat herunterreguliert. *p ≤ 0.05 ; **p ≤ 0.01 ; n=6. C: NT5E-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Es zeigt sich eine Tendenz zur Hochregulierung der NT5E nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren. *p ≤ 0.05 ; n=6. D: ADK-Genexpression, graphische Darstellung der PCR-Auswertung nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Der Effekt war nach Behandlung mit Orthovanadat in Basalmedium signifikant. *p ≤ 0.05 ; n=6.

3.7 Westernblotanalyse der Vimentin und α -SMA Expression

Zur Untersuchung einer möglichen myofibroblastischen Transdifferenzierung von VIC wurden die Expression von Vimentin und α -SMA auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse untersucht (Abb. 14.). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg von α -SMA nach Behandlung mit Suramin sowohl in Basal- als auch in CaCl₂-Medium. Die Behandlung mit Orthovanadat führte zu einer verminderten α -SMA Expression. In CaCl₂-Medium war α -SMA nach Behandlung mit Orthovanadat signifikant vermindert exprimiert. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der Vimentin Expression in VIC in der Behandlung mit Suramin in CaCl₂-Medium.



Abb. 14: Quantifizierung der α -SMA- und Vimentin-Expression in VIC-Kulturen nach siebentägiger Behandlung mit Suramin und Orthovanadat mittels Westernblotanalyse. A: Graphische Darstellung des Gehalts an α -SMA. B: Graphische Darstellung des Gehalts an Vimentin. C: Abbildung eines repräsentativen Bandenmusters für α -SMA und Vimentin, sowie β -Actin als Ladekontrolle. Die P-Werte sind mittels *Kruskal Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison post hoc* Test berechnet. *p ≤ 0.05 ; **p ≤ 0.01 ; n=6. Expression relativ zu Kontrollbedingungen.

Ferner wurden Analysen der Expression von Vimentin und α -SMA nach 28-tägiger Kultivierung der Gewebeproben mit ATPase-Inhibitoren durchgeführt (Abb. 15). Die α -SMA-Proteinexpression war in beiden Behandlungsgruppen signifikant gesteigert. Vimentin war nach Behandlung mit Suramin in der Basalkondition vermindert und in der CaCl₂-Kondition signifikant vermindert exprimiert. Die Behandlung mit Orthovanadat führte in der Basalkondition zu einer signifikant vermehrten Expression von Vimentin, während in der CaCl₂-Kondition keine signifikanten Effekte nach Behandlung mit Orthovanadat auf die Vimentin Expression festgestellt werden konnten.



Abb. 15: Quantifizierung von α -SMA und Vimentin mittels Westernblotanalyse nach 28-tägiger Kultivierung der Gewebebiopsien. A: Graphische Darstellung des Gehalts an α -SMA. B: Graphische Darstellung des Gehalts an Vimentin. C: Abbildung eines repräsentativen Bandenmusters für α -SMA und Vimentin, sowie GAPDH als Ladekontrolle. Die p-Werte sind mittels *Kruskal Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison post hoc Test* berechnet. *p ≤ 0.05 ; **p ≤ 0.01 ; n=6. Expression relativ zu Kontrollbedingungen.

3.8 Histologische Analysen

3.8.1 Makroskopische Charakterisierung der Gewebeproben

In fotographischen Aufnahmen der Gewebebiopsien nach 28-tägiger Kultivierung und Behandlung mit ATPase-Inhibitoren zeigten sich makroskopische Unterschiede (Abb. 16). Es zeigten sich noduläre Verdichtungen am äußeren Rand der Gewebebiopsien nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren, welche in der Behandlungsgruppe mit Orthovanadat am stärksten ausgeprägt waren. Weitere makroskopisch sichtbare Veränderungen waren eine unregelmäßige Randbegrenzung und weißliche Auflagerungen.



Abb. 16: Fotografische Aufnahme der Gewebeproben. A: Repräsentative Aufnahmen der Gewebeproben an Tag 0 nach Präparation auf dem Leuchtpad. Durchmesser = 5 mm. B: Repräsentative Aufnahme nach-28 tägiger Kultvierung und Behandlung mit Suramin und Orthovanadat in Basal- und CaCl₂-Medium.

3.8.2 Alizarin Rot-Färbung

Mit Hilfe der Alizarin Rot-Färbung konnten in den Gewebeproben nach 28-tägiger Kultivierung kalziumbasierte Degenerationsprozesse sichtbar gemacht werden. In der Basalkondition konnte keine Kalzifizierung nachgewiesen werden. In der CaCl₂-Kondition zeigten sich beginnende Mikrokalzifizierungen mit deutlicher Verdichtung am äußeren Rand der Gewebeprobe. Nach Behandlung mit Suramin und Orthovanadat in CaCl₂-Medium zeigte sich eine deutliche Verdichtung der Mikrokalzifizierungen. Nach Behandlung mit Orthovanadat waren teils konfluierende Kalzifizierungen sichtbar. Die Kalzifizierung war bis in die fibrösen und spongiösen Anteile der Klappe ausgedehnt. Die zentralen Anteile der Gewebeprobe weisen im Vergleich zu den äußeren Bereichen eine geringere Kalzifizierung auf.



Abb. 17: Alizarin Rot-Färbung der Gewebeproben nach 28 tägiger Kultivierung. A, B: Kontrolle in Basalkondition. C, D: Kontrolle in CaCl₂-Kondition. E, F: Behandlung mit Suramin in CaCl₂-Kondition. G, H: Behandlung mit Orthovanadat in CaCl₂-Kondition-Kondition. Die EZM zeigt eine blassgelbe Farbanreicherung. Rot-braun = Alizarin Rot-Kalzium-Komplex. Maßstäbe = 400 μ m (A, C, E, G) und 100 μ m (B, D, F, H).

3.8.3 Von-Kossa-Färbung

Zum Nachweis phosphatbasierter Mineralisierung nach 28-tägiger Kultvierung der Gewebeproben wurde die Von-Kossa-Färbung angewandt. In der Kontrolle in Basalmedium konnte keine Mineralisierung nachgewiesen werden. In CaCl₂-Medium zeigten sich eine Mineralisierung innerhalb der Ventrikularis. Nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren zeigte sich ein deutlicher Nachweis der phosphatbasierten Mineralisierung mit zunehmender Beteiligung der spongiösen Anteile der Klappe.



Abb. 18: Von-Kossa-Färbung der Gewebebiopsien nach 28-tägiger Kultivierung. A, B: Kontrolle in Basalkondition. C, D: Kontrolle in CaCl₂-Kondition. E, F: Behandlung mit Suramin in CaCl₂-Kondition. G, H: Behandlung mit Orthovanadat in CaCl₂-Kondition. Die EZM zeigt eine rosa-beige Farbanreicherung. Schwarz= Mikrokalzifizierung, rot = Zellkerne Maßstäbe = 400 μ m (A, C, E, G) und 100 μ m (B, D, F, H).

3.8.4 Quantitative Analyse der Kalzifizierung

Die quantitative Auswertung der angefärbten kalzifizierten Bereiche in der Alizarin Rot-Färbung und Von-Kossa Färbung ergab eine signifikante Zunahme kalzifizierter Bereiche nach Behandlung mit Orthovanadat und Suramin in CaCl₂-Medium (Abb. 19). In Basalmedium waren keine signifikanten Veränderungen der kalzifizierten Bereiche nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren nachweisbar.



Abb. 19: Quantitative Auswertung der Alizarin Rot-Färbung und Von-Kossa-Färbung der Gewebeproben nach 28-tägiger Kultivierung. A: Graphische Auswertung der rot angefärbten Bereiche in der Alizarin-Rot-Färbung. B: Graphische Darstellung der schwarz angefärbten Bereiche in der Von-Kossa-Färbung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Die p-Werte wurden mittels *Kruskal Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison post hoc* Test berechnet. *p<0,05, ***p<0,001.

3.8.5 H&E-Färbung

Zur Übersicht und Charakterisierung von Strukturveränderungen wurden H&E Färbungen angefertigt (Abb. 20). Im Bereich der äußeren Begrenzung der Gewebeproben zeigte sich nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren eine zunehmende Zellschrumpfung und zelluläre Umorganisation. Der Kontrast der Zellkerne nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren war verstärkt. Im Bereich der mittels Von-Kossa- und Alizarin Rot-Färbung nachgewiesenen mineralisierten Bereiche ließ sich eine deutliche Anreicherung der basophilen Farbstoffe feststellen.


Abb. 20: H&E Färbung der Gewebeproben nach 28-tägiger Kultivierung mit ATPase Inhibitoren. A, B: Kontrolle in Basalkondition. C, D: Kontrolle in CaCl₂-Kondition. E, F: Behandlung mit Suramin in CaCl₂-Kondition. G, H: Behandlung mit Orthovanadat in CaCl₂-Kondition. Rosa = Kollagen, blau = Zellkerne. Maßstäbe = 400 μ m (A, C, E, G) und 100 μ m (B, D, F, H).

3.8.6 Movat-Pentachrom-Färbung

Mit Hilfe der Movat-Pentachrom-Färbung ließen sich weitere strukturelle Veränderungen der EZM nachweisen (Abb. 21). In der Basal- und CaCl₂-Kondition konnte ein hoher Anteil der blass-grün verfärbten Glykosaminoglykane innerhalb der *Lamina spongiosa* nachgewiesen werden. Die kollagenreiche EZM der Fibrosa und Ventrikularis ist in allen Konditionen gelb angefärbt. Es zeigten sich eine Tendenz zu einer verdichteten Kollagensubstanz in der Movat-Pentachrom-Färbung in den Behandlungsgruppen.



Abb. 21: Movat-Pentachrom-Färbung der Gewebebiopsien nach 28-tägiger Kultivierung mit ATPase-Inhibitoren. A, B: Kontrolle in Basalkondition. C, D: Kontrolle in CaCl₂-Kondition. E, F: Behandlung mit Suramin in CaCl₂-Kondition. G, H: Behandlung mit Orthovanadat in CaCl₂-Kondition. Kerne und elastische Fasern = schwarz, Muskulatur = rot, Kollagen und retikuläres Bindegewebe = gelb, Glykosaminoglykane = grün, Grundsubstanz und Muzin = blau. Maßstäbe = 400 μ m (A, C, E, G) und 100 μ m (B, D, F, H).

4 Diskussion

4.1 Biomineralisierung in vitro nach ATPase-Inhibition

Das Verständnis purinerger Signalwege im pathophysiologischen Kontext von CAVD hat sich in den letzten Jahren spezifiziert (13, 33, 53, 57). In bisherigen eigenen Arbeiten konnte eine Beeinflussung der Biomineralisation von VIC-Kulturen in vitro durch die Ektonukleotidasen CD39, ENPP1 und CD73, sowie durch purinerge P1-Rezeptoren belegt werden (35). Der extrazelluläre Nukleotidkatabolismus könnte über eine Beeinflussung der extrazellulären Pi und PPi-Level, wie in Kapitel 1.3.5 beschrieben, Einfluss auf mineralisierende Prozesse haben (52). Es gibt Hinweise dafür, dass lösliche ATPasen in inflammatorische vaskuläre Prozesse zur kompensatorischen Regulation akut erhöhter lokaler Nukleotid- und Nukleosidkonzentrationen involviert sind (31, 75). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass eine Dysregulation von membranständigen ATPasen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten von CAVD einnehmen könnten. Mit Hilfe von ovinen VIC-Kulturen und Gewebeproben der Aortenklappe konnten wir zeigen, dass die Inhibition von ATPasen zu einer verstärkten Biomineralisierung in vitro führte. Suramin und Orthovanadat führten in VIC-Kulturen nach sieben Tagen, trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen, zu einer Verstärkung der kalziumbasierten Mineralisierung. Die histologischen Untersuchungen der Gewebeproben nach 28 Tagen zeigten sowohl nach Von-Kossa-, und Alizarin Rot-Färbung eine Zunahme der phosphatbzw. kalziumbasierten Mineralisierung.

Die verstärkte Biomineralisierung könnte auf einer erhöhten Bioverfügbarkeit von extrazellulärem ATP beruhen, welches infolge der ATPase-Inhibition akkumulieren könnte. Nachfolgend sollen die Einflüsse der extrazellulären ATP-Konzentration und P2Y2-Rezeptorakitivierung auf CAVD diskutiert werden. Die Hypothese, dass die Bioverfügbarkeit von ATP einen Einfluss auf mineralisierende Prozesse an der Aortenklappe hat, wird durch eine Studie von Côté et al. gestützt. Die Level von ATP waren in VIC-Kulturen unter pro-kalzifizierenden Bedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen deutlich (ca. 90%) reduziert (52). Infolge einer erhöhten Bioverfügbarkeit von ATP könnten purinerge P2-Rezeptoren verstärkt aktiviert werden. In mehreren Studien konnten mineralisierungsfördernde Effekte nach Aktivierung von purinergen P2-Rezeptoren gezeigt werden. Beispielsweise steigerte die Behandlung mit dem ATP-Analogon 2'(3')-O-4-Benzoylbenzoyl-ATP die Mineralisierung in VIC-Kulturen (76).

Es konnte gezeigt werden, dass P2Y2-Rezeptor-Aktivierung die Kalzifikation arterieller Gefäße fördert (77). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Inhibition von CD39 und ENPP1 die Bioverfügbarkeit von ATP in vitro erhöht war und mit einer verstärkten Mineralisierung von VIC-Kulturen assoziiert war (35). Osman et. al. zeigten, dass die Zugabe von ATP, sowie eine Inhibition von P2Y2-Rezeptoren durch den stabilen Antagonisten ATP-y-S zu einer signifikant gesteigerten Aktivität der ALP in hVIC-Kulturen führte (78). Eine verstärkte ALP-Aktivität könnte die Mineralisierung durch vermehrte Generierung von Pi hervorrufen. Die ALP gilt als Marker einer osteoblastischen Transdifferenzierung und könnte daher im Mineralisationsprozess eine Schlüsselrolle einnehmen. Mathieu et al. wiesen nach, dass die Inhibition von ALP in VIC-Kulturen die Bildung von nodulären Kalziumablagerungen verhinderte und zudem zu einer verminderten Expression von Osteonektin führte (26). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass P2Y2-Signaling den Phospholipase C- (PLC) Signalweg aktivieren könnte. Die Aktivierung des PLC-Signalweges führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Eine steigende intrazelluläre Kalziumkonzentration wiederum kann eine Hochregulierung von Receptor Activator of NF-κB (RANK), einem Transmembranprotein auf Osteoklasten und dessen Liganden (RANKL) sowie des Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), einem für Osteoblasten spezifischen Transkriptionsfaktor, bewirken (79).

Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer Studie von *Cóté et al.*, welche protektive Effekte einer P2Y₂-Rezeptoraktivierung auf die Mineralisierung und das Zellüberleben von VIC-Kulturen zeigt. Die Behandlung mit dem P2Y₂-Rezeptor-Agonisten 2-thio-UTP reduzierte die Mineralisierung *in vitro*. In einem murinen P2Y₂-Rezeptor *knockout* Modell konnte eine verstärkte valvuläre Mineralisierung beobachtet werden (52). *El Husseini et al.* zeigten, dass die Aktivierung von P2Y₂-Rezeptoren zu einer Aktivierung des PI3/Akt Signalwegs führte und phosphatinduzierte Mineralisierung verhinderte. Zudem war die Aktivierung von Akt1 in hVIC mit einer verminderten Expression des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin 6 (IL-6) assoziiert. IL-6 kodierende mRNA war in P2Y₂Rezeptor-/- *knockout* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-6, werden von VIC produziert und halten inflammatorische Prozesse an der Aortenklappe aufrecht (80, 81). Die Hypothese einer Involvierung von Akt in CAVD konnte durch *in vivo* Analysen humaner erkrankter Aortenklappen weiter gestützt werden. Akt und phosporyliertes Akt (pAkt) waren in CAVD Geweben stark reduziert. P2Y₂-Signaling könnte über Akt den *nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells* (NF-κB)-Signalweg unterdrücken. Es konnte gezeigt werden, dass Akt die Translokation des NFκ-B-p65 Komplexes in den Zellkern unterdrückt (53). Eine Aktivierung des NFκB-Signalwegs ist an der Einleitung pro-inflammatorischer Prozesse bei CAVD beteiligt (81). Die Aktivierung von P2Y₂-Rezeptoren kann drei verschiedene Signalwege aktivieren, den PLC-, den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)- und den PI3K-Signalweg (82). *Côté el al.* zeigten, dass PI3K Inhibierung, nicht aber eine Inhibierung von MAPK und PLC, die Mineralisierung von VIC beeinflusste (52). Diese Erkenntnis könnte Studien, welche die verstärkte Mineralisierung auf die Aktivierung des PLC-Signalwegs zurückführen, in Frage stellen.

P2Y₂-Signaling ist komplex und die Existenz verschiedener intrazellulärer Signalwege könnte die unterschiedlichen Effekte in VIC-Kulturen erklären. Zellspezifische Antworten auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren variieren und unterliegen dem Einfluss der Expression ihrer Effektorproteine. Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedliche Ergebnisse in Studien zur P2Y₂-Rezeptorakitivierung im pathophysiologischen Kontext von CAVD sein.

4.2 Auswirkungen von ATPase-Inhibition auf das Zellüberleben

Neben einer verstärkten Biomineralisation konnten zudem ein erhöhter LDH-Gehalt der VIC-Kulturen nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren festgestellt werden. Die LDH gilt als unspezifischer Marker für vermehrtes Zellsterben (74). Hieraus könnte abgeleitet werden, dass ATPase-Inhibition die Vitalität von VIC beeinflusst. Die Konfluenz des Zellrasens war insbesondere im Bereich der stark kalzifizierten Bereiche in CaCl2-Medium nach Behandlung mit Suramin und Orthovanadat aufgehoben. Die Bedeutung der Apoptose im Kontext mit CAVD wird anhand von Gewebeanalysen aus pathologisch veränderten Aortenklappen deutlich. Im umliegenden Gewebe kalzifizierter Bereiche konnte eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen festgestellt werden (83). Purinerge Signalwege könnten apoptotische Prozesse mit beeinflussen. Vermittelt durch P2Y2-Signaling konnte das antiapoptotische Protein bcl2, welches unter kalzifizierenden Bedingungen vermindert war, regeneriert werden (52). Die Auswirkungen auf das Zellsterben könnten jedoch auch auf toxische Nebenwirkungen von Suramin und Orthovanadat zurückzuführen sein. Der Einfluss von Orthovanadat auf Apoptose-vermittelnde Signalwege wird stark angenommen. Abhängig vom Zelltyp sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkungen von Orthovanadat bekannt. Vanadiumverbindungen verhindern p53-abhängige Apoptose in p53-

funktionsfähigen Zellen und fördern den Eintritt in die Synthese-Phase des Zellzyklus. Zudem könnte Orthovanadat den NF-ĸ-B-Signalweg aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass Vanadiumverbindungen in Makrophagen über eine Aktivierung von inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKKβ) den NF-κ-B-Signalweg aktivieren (66). Der NF-ĸ-B Signalweg reguliert Proliferation, Differenzierung und Apoptose und kann antiapoptotisch wirken (84). Die Anwendung von Suramin im Rahmen von klinischen Studien bei Malignomerkrankungen zeigte das toxische Nebenwirkungspotenzial von Suramin (60, 85). Im Gegensatz zu Orthovanadat, führte die Behandlung mit Suramin nur in CaCl2-Medium zu einem Anstieg des LDH-Gehalts. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Suramin nicht membrangängig ist. Suramin muss aktiv in die Zellen transportiert werden. Folglich wirkt Suramin vor allem in Zellen mit beschädigter Zellmembran (61, 86). Einige Studien zeigen, dass eine fortgeschrittene Kalzifikation einen zunehmendem Zellschaden verursacht und die Membranintegrität stört (87). Bereits die Behandlung in der CaCl₂-Kondition verursachte Zellschäden, sodass die Wirkung von Suramin entfaltet werden konnte. Die Ergebnisse der Vitalitätsmessung können nur eingeschränkt zur Interpretation von ATPase-Inhibition auf das Zellüberleben herangezogen werden. Die Beteiligung von Vanadiumverbindungen bei apoptotischen Prozessen, sowie toxische Nebenwirkungen von Suramin limitieren die Interpretation.

4.3 EZM Remodeling

Ein weiterer wichtiger Teilprozess von CAVD sind gesteigerte Umbauprozesse, ein sog. Remodeling innerhalb der EZM. Veränderungen in der Komposition, der Organisation, sowie der mechanischen Eigenschaften der EZM sind Kennzeichen von CAVD (6, 19). Der dreischichtige Aufbau der Aortenklappe wird unter anderem durch eine spezifische Sezernierung von Proteinen der EZM aufrechterhalten. Die EZM hat neben der strukturellen Funktion auch eine biologische Funktion und moduliert zelluläre Signalwege (19). Die EZM nimmt eine wichtige Rolle bei der Einleitung und Vermittlung von pro-degenerativen Veränderungen an der Aortenklappe ein (17, 88). Die vorliegende Promotionsarbeit zeigt, dass beide ATPase-Inhibitoren die Struktur der EZM veränderten. Die histologischen Analysen der Gewebeproben zeigen eine veränderte Verteilung von glykosaminoglykan (GAG) -haltigen Anteilen innerhalb der drei Schichten (86). In gesunden Klappen kommen GAG und Proteoglykane (PG) vorwiegend in der *Lamina spongiosa* vor. Bei CAVD ist ein vermehrtes Vorkommen in allen drei Schichten, sowie in der Umgebung kalzifizierter Bereiche beschrieben (89). GAG könnten neben Lipiden, verstärkter Mineralisierung und vermehrter zellulärer Proliferation zu einer Klappenverdickung beitragen. GAG und PG sind in inflammatorische Prozesse bei Atherosklerose involviert. Die Bindung von Makrophagen an Hyaluronan über den CD44-Rezeptor steigert Inflammation (90, 91). GAG und PG könnten das Eindringen von Lipoproteinen und inflammatorischen Zellen in die Aortenklappe erleichtern (92). Die hiesige Studie liefert Hinweise dafür, dass ATPase-Inhibition die Verteilung von GAG veränderte. Infolgedessen könnten inflammatorische Prozesse begünstigt werden.

In erkrankten Klappen wird eine verstärkte Fibrose der Lamina fibrosa beobachtet (93). In der Lamina fibrosa kommen vor allem Kollagen Typ 1 und Typ 3 vor. Ein weiteres Merkmal von CAVD ist eine starke Fibrosierung, sowie eine Umorganisation der kollagenen Fasern innerhalb der Lamina fibrosa (93). Die histologische Analyse der Gewebebiopsien zeigte eine Verdichtung von kollagenen Fasern nach ATPase-Inhibition. Die Auswirkung einer ATPase-Inhibition auf die Kollagen Typ 1-Expression auf Genebene zeigte, dass Kollagen Typ 1 nach Behandlung mit Orthovanadat herunterreguliert war. Suramin hatte keine Auswirkungen auf die Genexpression von Kollagen Typ 1. Schlussfolgernd zeigte sich kein Hinweis für ein verstärktes Remodeling von Kollagen Typ 1 nach ATPase-Inhibition. Derzeit ist unklar inwiefern Kollagene zu einer Verdickung der Klappe beitragen, da sie in erkrankten Klappen nur einen geringen Anteil des Gesamtproteins ausmachen (94). EZM Remodeling wird durch die Expression und Aktivierung von MMPs mitbeeinflusst (17, 95). Eine verstärkte MMP-Expression ist auch in atherosklerotische Prozesse involviert. MPPs sind bei CAVD hochreguliert und beeinflussen über Veränderung der Komposition der EZM pro-fibrotische und pro-kalzifizierende Prozesse (96). Beide ATPase-Inhibitoren steigerten die Aktivität der Isoformen Typ-2 und Typ-9. Die MMP-9 ist vor allem mit Inflammation und Gewebeaktivierung assoziiert (18). In der vorliegenden Studie zeigte sich jedoch eine unterschiedliche Regulation der MMPs in VIC-Kulturen im Vergleich zu den Gewebeproben. In VIC-Kulturen führte nur die Behandlung mit Orthovanadat zu einer verstärkten Aktivität der MMP-2 und MMP-9. Die Kultivierung der Gewebeproben zeigte nach 21 Tagen eine erhöhte Aktivität der MMP-2 nach Behandlung mit Suramin in Basalund CaCl₂-Medium. Die MMP-9 war nach Behandlung mit Suramin in Basalmedium hochreguliert, in CaCl2-Medium jedoch herunterreguliert. Orthovanadat hatte keine Effekte auf die MMP Typ 2- und Typ 9-Aktivität nach 21-tägiger Kultivierung der Gewebeproben.

Sowohl die verstärkte Aktivität der MMP-2 als auch der MMP-9 sind weitere Indikatoren eines verstärkten Remodelings nach ATPase-Inhibition. Die längere Kultivierungsdauer der Gewebeproben könnte einen Einfluss auf die Aktivität der MMP-2 und MMP-9 in den Behandlungsgruppen gehabt haben. Vor dem Hintergrund der erhobenen Zytoxizitätsmessungen in VIC-Kulturen erscheint die verminderte Sekretion von MMP-9 in CaCl₂-Medium plausibel.

4.4 Myofibroblastische Transdifferenzierung

Im Rahmen von pathologischen Prozessen an der Aortenklappe kommt es zu einer Aktivierung von VIC wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie dendritische Zellen und Makrophagen, aktivieren VIC durch Freisetzung von Zytokinen (IL-6, IL1-β) (81). Als Reaktion auf die freigesetzten Stimuli können VIC einen myofibriblastischen Phänotyp annehmen. Der myofibroblastische Phänotyp ist an Umbauprozessen der EZM aktiv beteiligt (10, 15). Es wird angenommen, dass aVIC selbst Zytokine, wie TGF-β, mit autokriner Wirkung freisetzen (97, 98). Die Genexpression von TGF-B1 war in VIC-Kulturen nach Behandlung mit Suramin und Orthovanadat hochreguliert. Demzufolge könnten VIC durch Inhibition membranständiger ATPasen verstärkt aktiviert werden. Der Wachstumsfaktor TGF-B hat Einfluss auf Proliferation und Fibrosierung im Aortenklappengewebe. TGF-\u00df1 vermittelt über eine Aktivierung von small mother against decapentaplegic (SMAD)-vermittelten Signalwegen die Expression pro-fibrotischer Gene. Nach Bindung von TGF-β1 an den Typ 1 Rezeptor bilden die sog. Receptor activated SMADS (R-SMADS) einen Komplex mit SMAD 4, wandern in den Zellkern und regulieren die Expression von Zielgenen. Während SMAD 2 und 3 Fibrose fördern, werden Fibrose-vermittelnde Signalwege über SMAD 7 durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf TGF-\u00b31 gehemmt. (99, 100). Auch der mitogenactivated protein kinase (MAPK) Signalweg wird durch TGF- β1 aktiviert (100). Inwiefern die verstärkte Biomineralisierung in VIC Kulturen nach ATPase-Inhibition auf eine vermehrte Expression von TGF-\beta1 zurückzuführen sein könnte, ist derzeit unklar. Die osteoblstische Transdifferenzierung von VIC nach Stimulation mit TGF-β1 wird kontrovers diskutiert (101). Die Anwendung von TGF-\u03b31 in verschiedenen zwei- oder dreidimensionalen Zellkulturmodellen konnte in der Vergangenheit teils gegensätzliche Ergebnisse erzielen (25, 97). In dreidimensionalen Kultivierungsmodellen konnte eine Unterdrückung osteoinduktiver Signalwege gezeigt werden. Aus den vorhandenen Studien ergeben sich starke Hinweise dafür, dass TGF-B1 die Aktivierung von SMAD 1/5/8

vermittelt durch BMP-2 unterdrückt (101, 102). Die starke Hochregulierung der TGF-β Expression nach ATPase-Inhibition könnte Ausdruck einer kompensatorischen Gegenregulation auf verstärkt aktivierte osteoinduktive Signalwege sein. Die Berücksichtigung der OPN Genexpression könnte diese Hypothese stützen. OPN war nach Behandlung mit Orthovanadat in beiden Kultivierungsbedingungen signifikant hochreguliert. Auch die Behandlung mit Suramin in der CaCl2-Kondition steigerte die Expression von OPN signifikant. OPN verhindert eine ektope Kalzifizierung durch Bindung der Hydroxylapatitkristalle an serin- und aspartatreichen Regionen. Diese Interpretation könnte man aufgrund des zweidimensionalen Kultivierungsmodells in Frage stellen. Clark-Greuel et al. und Jian et al. zeigten, dass die Zugabe von TGF-\beta1 in VIC-Kulturen zu einer verstärkten Bildung von nodulären Kalziumablagerungen führte. Zudem war die Expression der ALP erhöht und vermehrt Apoptose nachweisbar (25, 97). Die zelluläre Reaktion auf unterschiedliche Stimuli in VIC weist eine starke Abhängigkeit von den biomechanischen auf und kann Kultivierungsbedingungen insbesondere in zweidimensionalen Kultivierungsmodellen variieren (103). Die alleinige Zugabe von CaCl₂-Medium hatte keinen Effekt auf die OPN- und TGF-β-Expression, sodass ein substanzvermittelter Effekt der ATPase-Inhibitoren anzunehmen ist.

Der myofibroblastische Phänotyp exprimiert vermehrt kontraktile Filamente des Zytoskeletts, wie α -SMA (104). Die Untersuchungen zur Auswirkung von ATPase Inhibition auf die α -SMA Expression auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse legen nahe, dass ATPase-Inhibition einen deutlichen Einfluss auf die Expression kontraktiler Filamente ausübt. Suramin führte zu einer vermehrten Expression von α -SMA in VIC-Kulturen. In den Gewebeproben führten beide ATPase-Inhibitoren zu einer verstärkten α -SMA Expression. Dies könnte durch den Einfluss der vorhandenen EZM Komponenten auf VIC in den Gewebeproben erklärt werden. Die wechselseitige Beziehung von EZM und VIC kann zur Differenzierung in einen bestimmten Phänotyp beitragen (105). Zudem könnte der weiterer vorhandener Zellen in den Gewebeproben zur veränderten Einfluss Proteinexpression beigetragen haben. Valvuläre Endothelzellen (VEC), welche eine EndMT durchlaufen, könnten das Fortschreiten von CAVD fördern (106, 107). Die kultvierten Gewebeproben weisen an der äußeren Seite der Laminae ventrikularis und fibrosa die physiologische äußere Endothelzellschicht auf. Auch VEC könnten während der Kultivierung einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Während die Expression von typischen Endothelzellmarkern, wie CD31, vermindert ist, ist die Expression von

kontraktilen Filamenten nach EndMT hochreguliert (108). Hieraus könnte eine verstärkte Hochregulierung von α -SMA in Gewebeproben im Vergleich zu VIC Zellkulturen resultieren. Berücksichtigt man auch die Genexpressionsanalyse, so war auch ACTA-2, das α -SMA kodierende Gen, nach Behandlung mit Suramin hochreguliert. Im Gegensatz zu α -SMA, welches eine Hochregulierung im myofibroblastischen Phänotyp ausweist, ist die Expression von Vimentin im myofibroblastischen Phänotyp herunterreguliert (109). Die Proteinexpression von Vimentin war nach Behandlung mit Suramin in VIC-Kulturen und in den Gewebeproben signifikant herunterreguliert. Die Behandlung mit Orthovanadat hingegen führte zu einer vermehrten Expression von Vimentin in den Gewebeproben. Die hier angewandten Modelle können die komplexen Interaktionen der EZM mit zellulären Komponenten nur eingeschränkt abbilden. Die Analysen zeigen jedoch einen deutlichen Einfluss beider Substanzen auf die Expression myofibroblastischer Merkmale in VIC und in Gewebeproben.

4.5 Regulation purinerger Enzyme auf Genebene

Eine Dysregulation von purinergen Enzymen und Rezeptoren bei CAVD wird stark angenommen. Der Nukleotidmetabolismus ist in stenosierten Aortenklappen stark verändert. Der Umsatz von Adenosin korreliert mit klinischen Risikofaktoren für CAVD (110). Die Analysen zur Genexpression puringerger Enzyme zeigten, dass Schlüsselenzyme des extrazellulären Nukleotidkatabolismus hochreguliert waren. Die gesteigerte Expression könnte eine kompensatorische Reaktion darstellen, um dem vermehrten Substratangebot von ATP entgegenzuwirken. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse einer Studie von Kutryb-Zajak et al. In dieser konnte gezeigt werden, dass der Umsatz von ATP in stenotischen Aortenklappen auf der aortalen (=Lamina fibrosa zugewandten) Seite der Klappe, im Vergleich zu Klappen mit normaler Funktion, reduziert war. Ferner wurde Adenosin schneller deaminiert (111). Beide hier verwendeten ATPase-Inhibitoren führten zu einem signifikanten Anstieg der ENPP1 Expression. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die fehlende als auch eine deutlich verstärkte Aktivität der ENPP1 eine Mineralisierung der Aortenklappe fördert. Die vermehrte Expression von ENPP1, zusammen mit einer verstärkten Biomineralisierung nach Behandlung mit ATPase-Inhibitoren sind vereinbar mit fortgeschrittener Degeneration. Die ENPP1-Expression in humanen von CAVD betroffenen Aortenklappen ist erhöht. Darüber hinaus weist die ENPP1 Aktivität eine positive Korrelation mit dem Kalziumgehalt der Klappe auf (52).

Die Expression von CD39 war in der vorliegenden Arbeit in beiden Behandlungsgruppen gegensätzlich reguliert. Orthovanadat führte zu einer Herunterregulierung, während Suramin die Expression von CD39 signifikant verstärkte. Während die ENPP1 beim Abbau von ATP auch Pyrophosphat mit protektiver Wirkung generiert, entstehen beim Abbau von ATP zu AMP durch CD39 zwei Phosphate. Eine Vielzahl von Studien weist auf eine Dysregulation von CD39 bei CAVD hin (33, 35, 112). Die Expression von CD39 ist in humanen VIC Kulturen von erkrankten Klappen vermindert (33). VSMC aus CD39 *knockout*-Mäusen zeigen ferner eine verminderte Migration (113).

Darüber hinaus führte ATPase-Inhibition zu einer signifikanten (Orthovanadat) und nicht signifikanten (Suramin) Hochregulierung von CD73 auf Genebene. Wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben katalysiert CD73 den Abbau von AMP zu Adenosin. Mahmut et al. zeigten, dass Adenosin, welches von CD73 gebildet wird, die Mineralisierung über eine Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren fördert. Folglich könnte eine stärkere Expression von NT5E nach ATPase-Inhibition zu einer höheren Bioverfügbarkeit von Adenosin führen und die Mineralisierung durch Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren fördern (57). In eigenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Adenosin A2A- und A2B-Rezeptoren mit einer verstärkten Mineralisierung und EZM Remodeling einherging. Die Inhibition von CD73 sowie verminderte Adenosin-Level, konnten die Biomineralisierung unterdrücken (35). Es gibt Hinweise dafür, dass der A2A-Rezeptor der am häufigsten vorkommende Rezeptor-Subtyp in VIC- und VEC-Kulturen von humanen gesunden, sowie degenerativ veränderten Aortenklappen ist. Die Expression von A2A- und A2B-Rezeptoren scheint in stenosierten Klappen herunterreguliert zu sein (110). Die Wirkung von Adenosin im pathophysiologischen Kontext von CAVD ist nicht eindeutig geklärt. Während bei atherosklerotischen Prozessen und im Rahmen eines Myokardinfarktes eine protektive und anti-inflammatorische Wirkung von CD73 und Adenosin angenommen wird, konnten Untersuchungen bei CAVD gegensätzliche Ergebnisse zeigen (50). Es gibt Hinweise dafür, dass CD73 im Rahmen von CAVD vornehmlich in Bereichen verstärkter Kalzifizierung verstärkt exprimiert wird, jedoch in nicht kalzifizierten Bereichen herunterreguliert ist. In einem murinen ApoE^{-/-}/LDL-Rezeptor^{-/-} knockout Modell war die systemische Anwendung Adenosin-Deaminase Inhibitors Deoxycoformycin mit einer verminderten des Klappendicke assoziiert (110).

Die ADK war nach Behandlung mit Orthovanadat hochreguliert. Suramin hatte keinen Effekt auf die Genexpression der ADK. Die ADK ist eine 5'Phosphotransferase und katalysiert den γ -Phosphattransfer von ATP zu Adenosin, bei welchem ADP und AMP generiert wird (114). Unter der Hypothese einer vermehrten Bioverfügbarkeit von ATP durch ATPase-Inhibition erscheint eine vermehrte Expression der ADK bedingt durch ein höheres Substratangebot plausibel. Infolgedessen könnte vermehrt anfallendes AMP durch CD73 zu Adenosin abgebaut werden. Die Relevanz der ADK im Kontext von CAVD ist wenig erforscht. Durch eine Homöostase der Adenosinlevel ist die ADK ein hochrelevantes Enzym. Eine Dysfunktion der ADK ist in verschiedene Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus involviert. Die Expression der ADK wird insulinabhängig durch Attivierung der MAPK-Signalkaskade positiv reguliert (115). Die Ergebnisse zeigen, dass ATPase-Inhibition in VIC zu einer stark veränderten Expression von Schlüsselenzymen der extrazellulären purinergen Enzyme auf Genebene führte.

4.6 Limitierungen der Studie

In vitro-Studien zur Pathogenese von CAVD stellen aufgrund einer begrenzten Verfügbarkeit von humanem Aortenklappengewebe weiterhin ein wichtiges Instrument zur Analyse fehlgeleiteter Prozesse bei CAVD dar. Insbesondere die Verfügbarkeit von gesundem humanem Gewebe der Aortenklappe als Kontrollbedingung ist stark begrenzt. In der Vergangenheit konnten *in vitro*-Studien zur Pathophysiologie von CAVD im Hinblick auf zellvermittelte Signalwege teils widersprüchliche Ergebnisse liefern (116). Die in dieser Studie angewandten *in vitro*-Modelle können die physiologischen Bedingungen der humanen Aortenklappe nicht vollständig nachahmen. Insbesondere hämodynamische und systemische Einflüsse bleiben unberücksichtigt.

Eine weitere Limitierung stellt das Nebenwirkungspotenzial beider Substanzen dar. Neben der Inhibition von ATPasen, beeinflussen Suramin und Orthovanadat noch weitere Stoffwechselwege. Suramin inhibiert neben ATPasen und purinergen P2-Rezeptoren auch die Adenylylcyclase, sowie die NAD⁺-abhängige Deacetylase (117, 118). Da Suramin neben ATPasen auch purinerge P2-Rezeptoren inhibiert, welche auf VIC expimiert werden, könnten die Ergebnisse folglich auch auf der Inhibition des Rezeptors beruhen. Ferner hat Suramin eine protektive Wirkung auf T-Lymphozyten, welche *in vitro* die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus verhinderte (119). Interessant im Kontext von CAVD ist, dass Suramin das Binden von Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1, *Epidermal growth factor*

und *fibroblast growth factor* unterdrückt (120). Orthovanadat inhibiert Protein-Tyrosin-Phosphatasen und die Alkaline Phosphatase. Ferner aktiviert Orthovanadat Tyrosinkinasen und fördert die Mitogenese (121, 122). Die phosphatähnlichen Eigenschaften der Substanz könnten zudem direkt einen Einfluss auf die Mineralisierung gehabt haben.

5 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnte die vorliegende Studie wichtige Hinweise für eine Involvierung von membranständigen ATPasen in die Pathogenese von CAVD liefern. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Dysregulation von membranständigen ATPasen die Pathogenese von CAVD mitbestimmen könnte. Es zeigte sich eine verstärkte Ablagerung von Kalzium und Phosphat im Sinne einer verstärkten Biomineralisierung nach ATPase-Inhibition. Wichtige Schlüsselenzyme des purinergen Stoffwechsels (CD39, ENPP1, CD73) wiesen eine veränderte Genexpression auf. Darüber hinaus konnten Merkmale eines aktiven EZM-Umbauprozesses durch verstärkte Aktivität der MMP-2 und -9 nachgewiesen werden. Eine Aktivierung von VIC wurde durch die veränderte Expression von kontraktilen Filamenten des Zytoskeletts gezeigt. Die Ergebnisse sollten jedoch aufgrund der geringen Spezifität der Substanzen und der Limitierung von in vitro-Modellen in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Eine Regulierung von Enzymen des purinergen Stoffwechsels könnte in Zukunft einen therapeutischen Ansatz für eine pharmakotherapeutische Beeinflussung von CAVD darstellen. Die Beeinflussung purinerger Signalwege bei kardiovaskulären Erkrankungen stellt jedoch eine Herausforderung dar, da purinerge Rezeptoren ubiquitär exprimiert werden. Folglich ist eine selektive Beeinflussung spezifischer Zellen schwierig und das Nebenwirkungsprofil schwer vorhersehbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Eveborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study. Heart. 2013;99(6):396-400.

2. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. Circulation. 2005;111(24):3316-26.

3. Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. N Engl J Med. 2014;371(8):744-56.

4. Dutta P, Lincoln J. Calcific Aortic Valve Disease: a Developmental Biology Perspective. Curr Cardiol Rep. 2018;20(4):21.

5. Garg V. Notch Signaling in Aortic Valve Development and Disease. In: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H, editors. Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology. Tokyo: Springer

Copyright 2016, The Author(s). 2016. p. 371-6.

6. 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.

7. Kamath AR, Pai RG. Risk factors for progression of calcific aortic stenosis and potential therapeutic targets. Int J Angiol. 2008;17(2):63-70.

8. Mohler ER, Sheridan MJ, Nichols R, Harvey WP, Waller BF. Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors--a causal relationship? A clinical morphologic study. Clin Cardiol. 1991;14(12):995-9.

9. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35(2):113-8.

10. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. Am J Pathol. 2007;171(5):1407-18.

11. Mohler ER, 3rd. Mechanisms of aortic valve calcification. Am J Cardiol. 2004;94(11):1396-402, a6.

12. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. Circulation. 2008;118(18):1864-80.

13. Alushi B, Curini L, Christopher MR, Grubitzch H, Landmesser U, Amedei A, et al. Calcific Aortic Valve Disease-Natural History and Future Therapeutic Strategies. Front Pharmacol. 2020;11:685.

14. Butany J, Collins MJ, Demellawy DE, Nair V, Israel N, Leong SW, et al. Morphological and clinical findings in 247 surgically excised native aortic valves. Can J Cardiol. 2005;21(9):747-55.

15. Durbin AD, Gotlieb AI. Advances towards understanding heart valve response to injury. Cardiovasc Pathol. 2002;11(2):69-77.

16. Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. Cardiovasc Pathol. 2000;9(5):281-6.

17. Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, et al. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. Eur Heart J. 2005;26(13):1333-41.

18. Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, et al. Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. Ann Thorac Surg. 2003;76(3):681-8; discussion 8.

19. 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.

20. Hortells L, Sur S, St Hilaire C. Cell Phenotype Transitions in Cardiovascular Calcification. Front Cardiovasc Med. 2018;5:27.

21. Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. Circulation. 2012;125(14):1795-808.

22. Choy M, Armstrong MT, Armstrong PB. Regulation of proliferation of embryonic heart mesenchyme: role of transforming growth factor-beta 1 and the interstitial matrix. Dev Biol. 1990;141(2):421-5.

23. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. Circ Res. 2004;95(5):459-70.

24. Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shiomi T, Kimura N, et al. Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. Nat Med. 2006;12(10):1151-9.

25. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, 3rd, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. Ann Thorac Surg. 2003;75(2):457-65; discussion 65-6.

26. 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.

27. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. Kidney Int. 2008;73(9):1024-30.

28. Villa-Bellosta R, O'Neill WC. Pyrophosphate deficiency in vascular calcification. Kidney Int. 2018;93(6):1293-7.

29. Mohler ER, 3rd, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. J Heart Valve Dis. 1999;8(3):254-60.

30. Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. Keio J Med. 2013;62(3):63-73.

31. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta. 2008;1783(5):673-94.

32. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends Mol Med. 2013;19(6):355-67.

33. Kaniewska-Bednarczuk E, Kutryb-Zajac B, Sarathchandra P, Pelikant-Malecka I, Sielicka A, Piotrowska I, et al. CD39 and CD73 in the aortic valve-biochemical and immunohistochemical analysis in valve cell populations and its changes in valve mineralization. Cardiovasc Pathol. 2018;36:53-63.

34. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. Pharmacol Rev. 2011;63(1):1-34.

35. Weber A, Barth M, Selig JI, Raschke S, Dakaras K, Hof A, et al. Enzymes of the purinergic signaling system exhibit diverse effects on the degeneration of valvular interstitial cells in a 3-D microenvironment. Faseb j. 2018;32(8):4356-69.

36. Wang TF, Guidotti G. CD39 is an ecto-(Ca2+,Mg2+)-apyrase. J Biol Chem. 1996;271(17):9898-901.

37. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med. 2007;204(6):1257-65.

38. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. J Immunol. 1994;153(8):3574-83.

39. Pawade T, Clavel MA, Tribouilloy C, Dreyfus J, Mathieu T, Tastet L, et al. Computed Tomography Aortic Valve Calcium Scoring in Patients With Aortic Stenosis. Circ Cardiovasc Imaging. 2018;11(3):e007146.

40. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). J Thromb Haemost. 2003;1(12):2497-509.

41. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal. 2006;2(2):409-30.

42. Goding JW, Grobben B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. Biochim Biophys Acta. 2003;1638(1):1-19.

43. Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. Am J Physiol Cell Physiol. 2001;281(1):C1-c11.

44. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissuenonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(14):9445-9.

45. Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Nat Genet. 1998;19(3):271-3.

46. Sträter N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. Purinergic Signal. 2006;2(2):343-50.

47. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. J Immunol. 2006;177(10):6780-6.

48. Buchheiser A, Ebner A, Burghoff S, Ding Z, Romio M, Viethen C, et al. Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. Cardiovasc Res. 2011;92(2):338-47.

49. Zernecke A, Bidzhekov K, Ozüyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Lüscher-Firzlaff JM, et al. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. Circulation. 2006;113(17):2120-7.

50. St Hilaire C, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, et al. NT5E mutations and arterial calcifications. The New England journal of medicine. 2011;364(5):432-42.

51. Whyte MP. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. Nat Rev Endocrinol. 2016;12(4):233-46.

52. Cote N, El Husseini D, Pepin A, Guauque-Olarte S, Ducharme V, Bouchard-Cannon P, et al. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. J Mol Cell Cardiol. 2012;52(5):1191-202.

53. El Husseini D, Boulanger MC, Mahmut A, Bouchareb R, Laflamme MH, Fournier D, et al. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease. J Mol Cell Cardiol. 2014;72:146-56.

54. Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. Biochem J. 2008;415(3):333-44.

55. Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. Biochim Biophys Acta. 2004;1644(2-3):169-77.

56. Hoebertz A, Mahendran S, Burnstock G, Arnett TR. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. J Cell Biochem. 2002;86(3):413-9.

57. Mahmut A, Boulanger MC, Bouchareb R, Hadji F, Mathieu P. Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. Cardiovasc Res. 2015;106(1):109-20.

58. Mahmut A, Boulanger MC, El Husseini D, Fournier D, Bouchareb R, Després JP, et al. Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization. J Am Coll Cardiol. 2014;63(5):460-9.

59. Pedersen PL. Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview. J Bioenerg Biomembr. 2005;37(6):349-57.

60. McGeary RP, Bennett AJ, Tran QB, Cosgrove KL, Ross BP. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. Mini Rev Med Chem. 2008;8(13):1384-94.

61. Fortes PA, Ellory JC, Lew VL. Suramin: a potent ATPase inhibitor which acts on the inside surface of the sodium pump. Biochim Biophys Acta. 1973;318(2):262-72.

62. Moriyama Y, Nelson N. Inhibition of vacuolar H+-ATPases by fusidic acid and suramin. FEBS Lett. 1988;234(2):383-6.

63. Lambrecht G, Braun K, Damer M, Ganso M, Hildebrandt C, Ullmann H, et al. Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. Curr Pharm Des. 2002;8(26):2371-99.

64. Yegutkin GG, Burnstock G. Inhibitory effects of some purinergic agents on ecto-ATPase activity and pattern of stepwise ATP hydrolysis in rat liver plasma membranes. Biochim Biophys Acta. 2000;1466(1-2):234-44.

65. Kharlamov A, Jones SC, Kim DK. Suramin reduces infarct volume in a model of focal brain ischemia in rats. Exp Brain Res. 2002;147(3):353-9.

66. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. Acta Biochim Pol. 2012;59(2):195-200.

67. Kucera J, Byrne AR, Mravcová A, Lener J. Vanadium levels in hair and blood of normal and exposed persons. Sci Total Environ. 1992;115(3):191-205.

68. Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol. 2002;42(3):249-65.

69. Karlish SJ, Beaugé LA, Glynn IM. Vanadate inhibits (Na++K+)ATPase by blocking a conformational change of the unphosphorylated form. Nature. 1979;282(5736):333-5.

70. Searle BM, Higashino H, Khalil F, Bogden JD, Tokushige A, Tamura H, et al. Vanadate effect on the Na,K-ATPase and the Na-K pump in in vitro-grown rat vascular smooth muscle cells. Circ Res. 1983;53(2):186-91.

71. Cantley LC, Jr., Josephson L, Warner R, Yanagisawa M, Lechene C, Guidotti G. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. J Biol Chem. 1977;252(21):7421-3.

72. Zhang L, Wei N, Guan G, Song T, Xu Y, Wang S, et al. Sodium orthovanadate inhibits growth of acute leukemia HL60 cells and HL60/A cells in vitro. Biosci Rep. 2020;40(9).

73. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.

74. Kabakov AE, Gabai VL. Cell Death and Survival Assays. Methods Mol Biol. 2018;1709:107-27.

75. Cotter K, Stransky L, McGuire C, Forgac M. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. Trends Biochem Sci. 2015;40(10):611-22.

76. Côté N, El Husseini D, Pépin A, Bouvet C, Gilbert LA, Audet A, et al. Inhibition of ectonucleotidase with ARL67156 prevents the development of calcific aortic valve disease in warfarin-treated rats. Eur J Pharmacol. 2012;689(1-3):139-46.

77. Fish RS, Klootwijk E, Tam FW, Kleta R, Wheeler DC, Unwin RJ, et al. ATP and arterial calcification. Eur J Clin Invest. 2013;43(4):405-12.

78. Osman L, Chester AH, Amrani M, Yacoub MH, Smolenski RT. A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification: a potential target for atorvastatin. Circulation. 2006;114(1 Suppl):I566-72.

79. Kaden JJ, Dempfle CE, Kilic R, Sarikoc A, Hagl S, Lang S, et al. Influence of receptor activator of nuclear factor kappa B on human aortic valve myofibroblasts. Exp Mol Pathol. 2005;78(1):36-40.

80. Raddatz MA, Madhur MS, Merryman WD. Adaptive immune cells in calcific aortic valve disease. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019;317(1):H141-h55.

81. Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease. J Immunol Res. 2015;2015:851945.

82. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. Pflugers Arch. 2006;452(5):552-62.

83. Coté N, Mahmut A, Bosse Y, Couture C, Pagé S, Trahan S, et al. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. Inflammation. 2013;36(3):573-81.

84. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. Oncogene. 2003;22(56):8961-82.

85. Kaur M, Reed E, Sartor O, Dahut W, Figg WD. Suramin's development: what did we learn? Invest New Drugs. 2002;20(2):209-19.

86. McCain DF, Wu L, Nickel P, Kassack MU, Kreimeyer A, Gagliardi A, et al. Suramin derivatives as inhibitors and activators of protein-tyrosine phosphatases. J Biol Chem. 2004;279(15):14713-25.

87. Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. Faseb j. 1995;9(2):219-28.

88. Hutson HN, Marohl T, Anderson M, Eliceiri K, Campagnola P, Masters KS. Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture. PLoS One. 2016;11(9):e0163858.

89. Stephens EH, Saltarrelli JG, Baggett LS, Nandi I, Kuo JJ, Davis AR, et al. Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves. Cardiovasc Pathol. 2011;20(6):334-42.

90. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27(5):1159-65.

91. Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. Arteriosclerosis. 1989;9(1):1-20.

92. Derbali H, Bossé Y, Côté N, Pibarot P, Audet A, Pépin A, et al. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Tolllike receptor 2. Am J Pathol. 2010;176(6):2638-45.

93. Mazzone A, Epistolato MC, De Caterina R, Storti S, Vittorini S, Sbrana S, et al. Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis. J Am Coll Cardiol. 2004;43(9):1670-6.

94. 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.

95. Jung JJ, Razavian M, Challa AA, Nie L, Golestani R, Zhang J, et al. Multimodality and molecular imaging of matrix metalloproteinase activation in calcific aortic valve disease. J Nucl Med. 2015;56(6):933-8.

96. Perrotta I, Sciangula A, Aquila S, Mazzulla S. Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Calcified Human Aortic Valves: A Histopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2016;24(2):128-37.

97. Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, Narula NR, Rapoport HS, Mohler ER, 3rd, et al. Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. Ann Thorac Surg. 2007;83(3):946-53.

98. 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.

99. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, Feng YL, Cao G, Vaziri ND, et al. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis. Chem Biol Interact. 2018;292:76-83.

100. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017;9(2).

101. Jenke A, Kistner J, Saradar S, Chekhoeva A, Yazdanyar M, Bergmann AK, et al. Transforming growth factor- β 1 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.

102. Guerrero F, Herencia C, Almadén Y, Martínez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodriguez-Ortiz ME, et al. TGF- β prevents phosphate-induced osteogenesis through inhibition of BMP and Wnt/ β -catenin pathways. PLoS One. 2014;9(2):e89179.

103. Wyss K, Yip CY, Mirzaei Z, Jin X, Chen JH, Simmons CA. The elastic properties of valve interstitial cells undergoing pathological differentiation. J Biomech. 2012;45(5):882-7.

104. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stensløkken KO, et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. J Am Heart Assoc. 2017;6(9).

105. Rodriguez KJ, Piechura LM, Masters KS. Regulation of valvular interstitial cell phenotype and function by hyaluronic acid in 2-D and 3-D culture environments. Matrix Biol. 2011;30(1):70-82.

106. Hjortnaes J, Shapero K, Goettsch C, Hutcheson JD, Keegan J, Kluin J, et al. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. Atherosclerosis. 2015;242(1):251-60.

107. Farrar EJ, Butcher JT. Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to TNF α . Ann Biomed Eng. 2014;42(1):149-61.

108. Yu W, Liu Z, An S, Zhao J, Xiao L, Gou Y, et al. The endothelial-mesenchymal transition (EndMT) and tissue regeneration. Curr Stem Cell Res Ther. 2014;9(3):196-204.

109. Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, Schoen FJ. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. J Heart Valve Dis. 2004;13(5):841-7.

110. Kutryb-Zajac B, Jablonska P, Serocki M, Bulinska A, Mierzejewska P, Friebe D, et al. Nucleotide ecto-enzyme metabolic pattern and spatial distribution in calcific aortic valve disease; its relation to pathological changes and clinical presentation. Clin Res Cardiol. 2020;109(2):137-60.

111. Kutryb-Zajac B, Jablonska P, Serocki M, Bulinska A, Mierzejewska P, Friebe D, et al. Nucleotide ecto-enzyme metabolic pattern and spatial distribution in calcific aortic valve disease; its relation to pathological changes and clinical presentation. Clin Res Cardiol. 2019. 112. Olkowicz M, Jablonska P, Rogowski J, Smolenski RT. Simultaneous accurate quantification of HO-1, CD39, and CD73 in human calcified aortic valves using multiple enzyme digestion - filter aided sample pretreatment (MED-FASP) method and targeted proteomics. Talanta. 2018;182:492-9.

113. Behdad A, Sun X, Khalpey Z, Enjyoji K, Wink M, Wu Y, et al. Vascular smooth muscle cell expression of ectonucleotidase CD39 (ENTPD1) is required for neointimal formation in mice. Purinergic Signal. 2009;5(3):335-42.

114. Boison D. Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. Pharmacol Rev. 2013;65(3):906-43.

115. Pawelczyk T, Sakowicz M, Podgorska M, Szczepanska-Konkel M. Insulin induces expression of adenosine kinase gene in rat lymphocytes by signaling through the mitogenactivated protein kinase pathway. Exp Cell Res. 2003;286(1):152-63.

116. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, et al. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020;40(4):885-900.

117. Hall DA, Hourani SM. Effects of suramin on increases in cytosolic calcium and on inhibition of adenylate cyclase induced by adenosine 5'-diphosphate in human platelets. Biochem Pharmacol. 1994;47(6):1013-8.

118. Trapp J, Meier R, Hongwiset D, Kassack MU, Sippl W, Jung M. Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD+-dependent histone deacetylases (sirtuins). ChemMedChem. 2007;2(10):1419-31.

119. Mitsuya H, Matsushita S, Yarchoan R, Broder S. Protection of T cells against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III in vitro. Princess Takamatsu Symp. 1984;15:277-88.

120. Gansler T, Vaghmar N, Olson JJ, Graham SD. Suramin inhibits growth factor binding and proliferation by urothelial carcinoma cell cultures. J Urol. 1992;148(3):910-4.

121. Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, et al. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. J Biol Chem. 1997;272(2):843-51.

122. Alcón S, Camello PJ, García LJ, Pozo MJ. Activation of tyrosine kinase pathway by vanadate in gallbladder smooth muscle. Biochem Pharmacol. 2000;59(9):1077-89.

Danksagungen

Zu aller erst bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg für die Möglichkeit in der Klinik für Herzchirurgie promovieren zu dürfen.

Mein besonderer und ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari für die Überlassung des Themas der Dissertation, die hervorragenden Hilfestellungen, die außerordentliche Betreuung und den wertschätzenden Umgang während der gesamten Zeit. Ich möchte mich für diese Zeit, in der ich viel lernen durfte, bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Andreas Weber bedanken, für die herausragende Betreuung und exzellente Einarbeitung im Labor. Ich danke dir für die stetige Unterstützung, die Weitergabe deines fachlichen Wissens und die liebevolle Integration in deine Arbeitsgruppe.

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth und Frau Dr. rer. nat. Jessica Selig bedanken für die lehrrreichen Anregungen zur Methodik. Unserer MTA, Frau Gisela Müller, danke ich für die Ermöglichung der reibungslosen Abläufe im Labor. Bei allen Doktoranden der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und vielen Unternehmungen.

Des Weitern möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm und Frau Dr. med. Christine Quast für die Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Annette Kemper-Leuders und Josef Leuders, die mir meinen bisherigen Weg geebnet und meine Ausbildung ermöglicht haben. Ich danke euch für den stetigen Rückhalt. Ich möchte mich bei meinem Bruder Theo bedanken, der mich ebenfalls stets ermutigt hat. Ich bedanke mich bei meinem Partner Christian für seinen unermüdlichen Optimismus und die Unterstützung in allen Lebenslagen.