

**Die Rolle der purinergen Signalkaskade in der Endotheliale zu  
Mesenchymalen Transition humaner Endothelzellen der  
Aortenklappe**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Vera Schmidt**

aus Bergisch Gladbach

Düsseldorf, November 2022

Aus der Forschungsgruppe der Experimentellen Chirurgie  
Klinik für Herzchirurgie der Uniklinik Düsseldorf

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Payam Akhyari  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Matias Zurbriggen

Betreuer: Dr. Andreas Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2023

*Ich traue  
– meistens in heiterer Gelassenheit –  
Allen Alles zu.  
Auch mir selber.*

Luisa Francia

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Zusammenfassung .....	X
Summary .....	XI
1 Einleitung .....	1
1.1 Das Endothel der Aortenklappe .....	1
1.1.1 Endothelfunktion .....	2
1.1.2 Endotheliale Dysfunktion .....	2
1.2 <i>Endothelial to Mesenchymal Transition</i> (EndMT) .....	3
1.2.1 EndMT in Entwicklung und Krankheit .....	4
1.2.2 Mechanismen der EndMT .....	5
1.3 Die purinerge Signaltransduktion .....	6
1.3.1 Die purinerge Signalkaskade in kardiovaskulären Erkrankungen .....	7
1.4 Ziel der Arbeit .....	8
2 Material und Methoden .....	10
2.1 Gewinnung primärer humaner Aortenklappen-Endothelzellen .....	10
2.1.1 Gewebegewinnung .....	10
2.1.2 Patientenkohorte .....	10
2.1.3 Zellisolation und Kultivierung .....	10
2.1.4 Aufreinigung mittels <i>magnetic cell separation</i> (MACS) .....	12
2.1.5 Charakterisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung .....	14
2.1.6 Fixierung der Zellen auf Glasplättchen .....	14
2.1.7 Vorbereitung der Gewebekontrolle .....	14
2.1.8 Immunfluoreszenzfärbung .....	15
2.2 <i>In-vitro</i> -Versuche mit primären humanen VEC .....	17
2.2.1 Zellzahlbestimmung .....	17

---

2.2.2	Aussaat und Behandlung .....	17
2.2.3	Durchlichtmikroskopie .....	20
2.2.4	Zelllyse.....	20
2.3	Genexpressionsanalysen .....	21
2.3.1	Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation aus primären humanen VEC.....	21
2.3.2	Reverse Transkription .....	21
2.3.3	Semiquantitative <i>real-time</i> PCR .....	22
2.4	Proteinbiochemie .....	24
2.4.1	Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay.....	24
2.4.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	25
2.4.3	Western-Blot .....	26
2.4.4	Immunodetektion.....	27
2.4.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	29
2.4.6	Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assay.....	29
2.5	Statistische Analysen .....	30
3	Ergebnisse .....	31
3.1	Anlegen einer primären Zellkultur humaner valvulärer Endothelzellen.....	31
3.1.1	Klinische Daten der Spenderkohorte .....	31
3.1.2	Aufreinigung und Charakterisierung der Zellpopulation .....	32
3.2	Manipulation der purinergen Signalkaskade in primären humanen VEC .....	35
3.2.1	Überprüfung auf zytotoxische Effekte .....	36
3.2.2	Auswirkung der Manipulation der purinergen Signalkaskade auf die Funktionalität primärer humaner VEC.....	37
3.2.2.1	Keine inflammatorische Aktivierung von VEC durch Manipulation der purinergen Signalkaskade .....	38
3.2.2.2	Dysregulation der purinergen Signalkaskade begünstigt endotheliale Dysfunktion in VEC	40
3.3	Untersuchung von EndMT Potential und Induktion in primären humanen VEC .....	42
3.3.1	Überprüfung auf Zytotoxische Effekte .....	42
3.3.2	Bestimmung der EndMT Dauer .....	43
3.3.3	TGFβ1 und TNFα induzieren EndMT in VEC nach 14 Tagen.....	44

3.4	Einfluss der purinergen Signalkaskade auf die EndMT in primären humanen VEC	47
3.4.1	Inhibition von CD39 induziert EndMT in primären humanen VEC	47
3.4.2	Inhibition von CD73 induziert EndMT in primären humanen VEC	50
3.5	Erste mechanistische Untersuchungen	53
3.5.1	Untersuchung EndMT assoziierter Mediatoren	53
3.5.1.1	Keine Beeinflussung der ERK1/2 Phosphorylierung	53
3.5.1.2	Erhöhte p38 Phosphorylierung unter TGFβ1 Stimulation und Inhibition von CD39 oder CD73	54
3.5.2	Untersuchung EndMT assoziierter Transkriptionsfaktoren	55
3.5.2.1	TGFβ1 induzierte EndMT führt zu Hochregulation von SNAIL während TNFα induzierte EndMT TWIST und ZEB1/2 reguliert	56
3.5.2.2	Inhibition von CD39 führt zu Herunterregulation von SLUG und TGFβ1 während BzATP SNAIL reguliert	57
3.5.3	Inhibition von CD73 führt zu Herunterregulation von SLUG und TGFβ1 während die Aktivierung von Adenosinrezeptoren SNAIL und ZEB1/2 reguliert	58
4	Diskussion	59
4.1	Aspekte der Isolation und Verwendung primärer humaner Zellen	59
4.2	Die purinerge Signalkaskade beeinflusst Morphologie und Funktionalität von VEC61	
4.3	TGFβ1 und TNFα als EndMT Induktoren in VEC	63
4.4	Die purinerge Signalkaskade beeinflusst EndMT in VEC	64
4.4.1	Inhibition von CD39 führt zu EndMT in VEC	64
4.4.2	Inhibition von CD73 führt zu EndMT in VEC	65
4.5	Erste mechanistische Hypothesen	66
4.6	Einschränkungen und Ausblick	70
4.7	Fazit	71
5	Literaturverzeichnis	72
	Veröffentlichungen und Projektförderungen	XII
	Eidesstattliche Erklärung	XIV
	Danksagung	XV

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau der Aortenklappe .....	1
Abbildung 2: Merkmale der Endothelialen zu Mesenchymalen Transition (EndMT).....	4
Abbildung 3: Mechanismen der EndMT .....	6
Abbildung 4: Die purinerge Signalkaskade .....	7
Abbildung 5: Isolation und Kultivierung primärer humaner Aortenklappen-Endothelzellen. ...	11
Abbildung 6: Aufreinigung primärer humaner Aortenklappen-Endothelzellen. ....	13
Abbildung 7: Inhibitoren und Agonisten der purinergen Signalkaskade. ....	18
Abbildung 8: Experimenteller Aufbau.....	19
Abbildung 9: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von primären VEC im Verlauf nach Isolation.....	33
Abbildung 10: Immunfluoreszenzbasierte Charakterisierung primärer humaner VEC.....	35
Abbildung 11: Effekte der eingesetzten Substanzen auf Apoptosemarker in VEC.....	36
Abbildung 12: Morphologie primärer humaner VEC nach Manipulation der purinergen Signalkaskade.....	38
Abbildung 13: Keine inflammatorische Aktivierung von VEC durch Manipulation der purinergen Signalkaskade.....	39
Abbildung 14: Erhöhte Endothelin-I Expression durch Dysregulation der purinergen Signalkaskade in VEC.....	41
Abbildung 15: Effekte von TGFβ1 und TNFα Behandlung auf Laktat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität und Apoptosemarker in VEC.....	43
Abbildung 16: Komplette EndMT in primären humanen VEC nach 14 Tagen.....	44
Abbildung 17: TGFβ1 und TNFα induzieren EndMT in primären humanen VEC nach 14 Tagen .....	45
Abbildung 18: EndMT Induktion mit TGFb1 und TNFα in primären humanen VEC.....	46
Abbildung 19: Inhibition von CD39 induziert EndMT Phänotyp in primären humanen VEC ..	48
Abbildung 20: Inhibition von CD39 induziert EndMT in primären humanen VEC .....	49
Abbildung 21: Inhibition von CD73 induziert EndMT Phänotyp in primären humanen VEC ..	51
Abbildung 22: Inhibition von CD73 induziert EndMT in primären humanen VEC .....	52
Abbildung 23: Keine Beeinflussung der ERK1/2 Aktivierung bei EndMT in VEC.....	54
Abbildung 24: Erhöhte p38 Aktivierung durch TGFβ1 oder Inhibition der Schlüsselenzyme ...	55

Abbildung 25: Regulation EndMT assoziierter Transkriptionsfaktoren in TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$ stimulierten VEC.....	56
Abbildung 26: Regulation EndMT assoziierter Transkriptionsfaktoren in VEC unter Manipulation der extrazellulären ATP Hydrolyse .....	57
Abbildung 27: Regulation EndMT assoziierter Transkriptionsfaktoren in VEC unter Manipulation des extrazellulären Adenosinstoffwechsels .....	58
Abbildung 28: Einfluss der purinerger Signalkaskade auf die EndMT in VEC - Graphical Abstract.....	69



---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zusammensetzung hVEC Kulturmedium .....	11
Tabelle 2: Zusammensetzung Einfriermedium.....	14
Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung.....	15
Tabelle 4: Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	16
Tabelle 5: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung .....	16
Tabelle 6: Agenzien zur Zellbehandlung.....	19
Tabelle 7: Puffer zur Zellysierung .....	20
Tabelle 8: Ansatz zur Entfernung genomischer DNA.....	22
Tabelle 9: Komponenten zur cDNA Synthese.....	22
Tabelle 10: Reaktionskomponenten qPCR.....	23
Tabelle 11: Temperatur- und Zeitprofil der qPCR .....	23
Tabelle 12: Primersequenzen für die qPCR.....	24
Tabelle 13: Ladepuffer SDS PAGE.....	25
Tabelle 14: Gelzusammensetzung SDS PAGE .....	25
Tabelle 15: Laufpuffer SDS PAGE .....	26
Tabelle 16: Transferpuffer Western-Blot.....	27
Tabelle 17: Primärantikörper für Western-Blot Analysen .....	27
Tabelle 18: TBST Puffer .....	28
Tabelle 19: Sekundärantikörper für Western-Blot Analysen.....	28
Tabelle 20: Spenderkohorte zur Isolation primärer Endothelzellen der Aortenklappe .....	32

---

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
a-Casp3	aktive Caspase 3
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-CP	Adenosin 5'-(α,β-methylen)diphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAY	BAY 60-6583
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	<i>Body mass index</i>
BzATP	2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosin5'-triphosphat triethylammonium Salz
CAVD	kalzifizierende Aortenklappenerkrankung
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGS	CGS-21680 Hydrochloridhydrat
CRP	c-reaktives Protein
CT	Messzyklus Schwellenwert
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid I
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen
EDN-1	Endothelin-1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epitheliale zu Mesenchymale Transition
EndMT	Endotheliale zu Mesenchymale Transition
eNOS	endothelialen NO Synthase 3
ENPP1	Ektonukleotid Pyrophosphatase-1
ENTPD1 / CD39	Ektonukleosid Triphosphat Diphosphohydrolase-1
ERK1/2	<i>extracellular-signal regulated kinases 1/2</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
h	Stunden
HRP	Meerrettichperoxidase
HTX	Herztransplantation
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL-6	Interleukin-6
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDH	Laktatdehydrogenase
MACS	Magnetische Zellseparation
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NT5E / CD73	Ekto-5'-Nukleotidase
P38	p38-mitogenaktivierte Proteininasen
PARP	Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pmol	Pikomol

pNFkB	phosphorylierter <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
POM-I	Natrium Polyoxotungstat
qRT-PCR	Semiquantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM-1	vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
VEC	valvuläre Endothelzellen
VE-cadherin	Vaskulär-endotheliales Cadherin
VIC	valvuläre Interstitialzellen
Vim	Vimentin
wWf	von Willebrand Faktor
αSMA	alpha-Glattmuskel-Aktin
x g	relative Zentrifugalbeschleunigung

## Zusammenfassung

Die Endotheliale zu Mesenchymale Transition ist ein dynamischer Prozess bei dem Endothelzellen funktionale und morphologische Änderungen durchlaufen und schließlich einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser Vorgang ist zwar entwicklungsphysiologisch für die regelrechte Herzentwicklung notwendig, wurde im adulten Organismus jedoch bereits mit verschiedensten Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung in Verbindung gebracht. Dysregulationen von Ektonukleotidasen, einer Gruppe membranständiger Enzyme, die den Abbau von extrazellulärem ATP und seiner Metabolite regulieren, steht ebenfalls mit dem Auftreten kardiovaskulärer Pathologien in Zusammenhang. Trotz der zahlreichen Studien, die diese Vorgänge separat untersuchen gab es bisher keine Erkenntnisse über einen möglichen Zusammenhang zwischen dysregulierter purinergem Signalkaskade und dem Auftreten von Endothelialer zu Mesenchymaler Transition in Endothelzellen der Aortenklappe. Das Hauptziel dieser Arbeit besteht daher darin, erstmals die Rolle der purinergen Signalkaskade in der Entstehung von Endothelialer zu Mesenchymaler Transition in humanen valvulären Endothelzellen der Aortenklappe zu untersuchen.

Es wurde gezeigt, dass eine Dysregulation der purinergen Signaltransduktion kurzfristig zunächst zu einer endothelialen Dysfunktion und langfristig zu einer partiellen Endothelialen zu Mesenchymalen Transition in Aortenklappenendothelzellen führt. Hierbei scheint besonders unter Inhibition der Schlüsselenzyme CD39 und CD73 die erhöhte Phosphorylierung von p38-mitogenaktivierte Proteininasen, sowie die Regulation des SLUG Transkriptionsfaktors eine Rolle zu spielen. Aktivierung von P<sub>2</sub>- oder A<sub>2</sub>-Adenosinrezeptoren verursachte ebenfalls, in verschiedenem Ausmaß, Endotheliale zu Mesenchymale Transition. Aufgrund gezeigter Unterschiede in der morphologischen Änderung und der Beeinflussung verschiedener Transkriptionsfaktoren, ist anzunehmen, dass sich die zugrundeliegenden Mechanismen unterscheiden müssen.

Die vorliegende Forschungsarbeit zeigt somit erstmals den Einfluss der purinergen Signalkaskade auf die Induktion einer Endothelialen zu Mesenchymalen Transition in humanen Endothelzellen der Aortenklappe, wobei die genauen mechanistischen Hintergründe weiterhin unklar sind. Im Zusammenhang mit bereits publizierten Daten aus Interstitialzellen der Aortenklappe, sowie dem aktuellen Verständnis von degenerativen Klappenerkrankungen, weisen die vorliegenden Daten weiterführend auf einen maßgeblichen Einfluss der purinergen Signaltransduktion auf die Pathophysiologie der Aortenklappe hin.

## Summary

Endothelial to mesenchymal transition is a dynamic process during which endothelial cells undergo profound morphological and functional changes, ultimately acquiring a mesenchymal phenotype. While this transition is crucial for cardiac development during embryogenesis, it has also been linked to various cardiovascular pathologies in the adult organism. Dysregulation of ectonucleotidases, a group of membrane-bound enzymes that regulate the metabolism of ATP and its metabolites, is also linked to cardiac diseases such as calcific aortic valve disease. Despite the many studies dealing with these processes separately, there is no knowledge about a possible relation between dysregulation of purinergic signaling and the occurrence of endothelial to mesenchymal transition in endothelium of the aortic valve.

Hence, the main aim of this thesis was to investigate the role of the purinergic signaling system in endothelial to mesenchymal transition of human aortic valve endothelial cells for the first time.

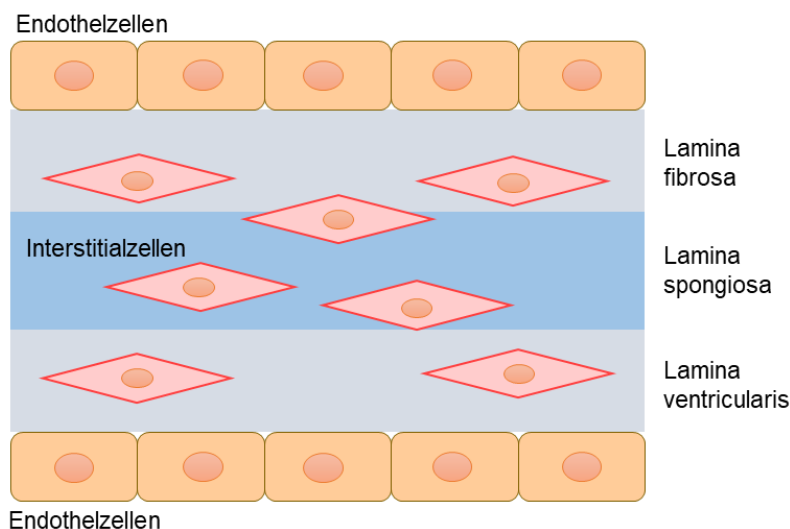
Dysregulation of purinergic signaling lead to endothelial dysfunction and ultimately to endothelial to mesenchymal transition. Inhibition of the key enzymes CD39 and CD73 seems to induce these changes via enhanced phosphorylation of p38-mitogen-activated protein kinase and regulation of the SLUG transcription factor. Interestingly, activation of P<sub>2</sub>- or A<sub>2</sub>-adenosine receptors lead, to different extends, to endothelial to mesenchymal transition as well. Concerning the diverse morphological changes and affected transcription factors, we propose that the underlying mechanisms may be different.

For the first time, this study shows the effects of the purinergic signaling system on endothelial to mesenchymal transition in human aortic valve endothelial cells, however the precise mechanisms are yet unknown. In accordance with already published data from interstitial cells of the aortic valve, as well as the general understanding of degenerative valve diseases, the obtained data suggest a profound effect of the purinergic signaling system on the pathophysiology of the aortic valve.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Endothel der Aortenklappe

Als Endothel bezeichnet man die einlagige Zellschicht, die das komplette kardiovaskuläre System auskleidet. Auch im Aufbau der Aortenklappe findet sich entsprechend eine äußere Schicht aus Endothelzellen wieder (valvuläre Endothelzellen, VEC), welche die drei innenliegenden Schichten extrazellulärer Matrix und Interstitialzellen (valvuläre Interstitialzellen, VIC) umgibt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Aufbau der Aortenklappe**

Schematische Darstellung des mehrschichtigen Aufbaus der Aortenklappe. Im Inneren der Klappe finden sich drei Schichten Extrazellulärmatrix unterschiedlicher Zusammensetzung, in der Interstitialzellen eingebettet sind. Eine einlagige Schicht aus Endothelzellen bildet die äußerste Schicht der Klappe.

Das Endothel der Aortenklappe wurde lange Zeit als wenig relevant für die Physiologie und Pathophysiologie der Klappe angesehen, da man davon ausging, dass Herzklappen passive Strukturen sind, die lediglich durch Druckänderung öffnen und schließen [1]. Heute ist bekannt, dass es sich bei den Aortenklappentaschen um ein aktives Gewebe handelt, und die verschiedenen Zelltypen maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Homöostase der Herzklappe beteiligt sind [2]. Im Gegensatz zu VIC sind VEC jedoch weiterhin weniger gut untersucht. Diese Zellart erscheint *in vitro*, wie andere Endothelzellen (EC) auch, in Kopfsteinpflastermorphologie (homogen, eher rundlich, enger Zell-Zell Kontakt) [3], scheint sich aber molekularbiologisch deutlich von anderen Endothelpopulationen abzuheben [4, 5]. Diese Erkenntnisse haben VEC eine neue Relevanz in der Erforschung kardiovaskulärer

Erkrankungen verliehen und die Ansicht, dass eine Dysfunktion dieser Zellen ein frühes Stadium von Pathologien wie der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (*calcific aortic valve disease*, CAVD) sein kann, wird zunehmend durch Studien unterstützt [6-9].

### **1.1.1 Endothelfunktion**

Endothelzellen sind eine heterogene, hochadaptive Zellart, die in permanentem Kontakt mit dem zirkulierenden Blut und allen darin enthaltenen Komponenten steht. Das Endothel bildet die innere Auskleidung aller Blut- und Lymphgefäße und des Herzens, somit ist es an zahlreichen Positionen des Körpers die Schnittstelle von Blut zu Gewebe [10]. Aufgrund dieser Stellung und der andauernden Exposition der Zellen gegenüber zahlreicher Stimuli besitzen EC die Fähigkeit, in Folge verschiedenster Reize systemische Reaktionen einzuleiten. Diese Dynamik ist eine wichtige Voraussetzung vieler regulatorischer Prozesse wie Entzündungsreaktionen, Blutdruckregulation oder Fibrinolyse [11]. Die Aktivierung von Endothelzellen in Reaktion auf variable externe Einflüsse ist somit zentral für die Aufrechterhaltung der Homöostase. Eine wichtige Rolle in dieser Endothelfunktion spielt das lösliche Gas Stickstoffmonoxid (NO), welches von der endothelialen NO Synthase 3 (eNOS) produziert wird. NO kann schnell durch die Plasmamembran diffundieren und somit die Zellen in Blut und umliegendem Gewebe beeinflussen. So bewirkt es Gefäßerweiterung durch Relaxation von Glattmuskelzellen und reguliert die Expression von Adhäsionsmoleküle wie interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) oder vaskuläres Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) [12, 13]. Die Balance zwischen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren ist in gesundem Endothel eine grundlegende Voraussetzung, da so Komplikationen wie Vasospasmen verhindert werden. Bei diesem Gleichgewicht sind NO als wichtigster antiproliferativer, antithrombotischer Vasodilatator und Endothelin-1 (EDN-1) als potentester proliferativer, prothrombotischer Vasokonstriktor des Endothels maßgebliche Größen [14].

### **1.1.2 Endotheliale Dysfunktion**

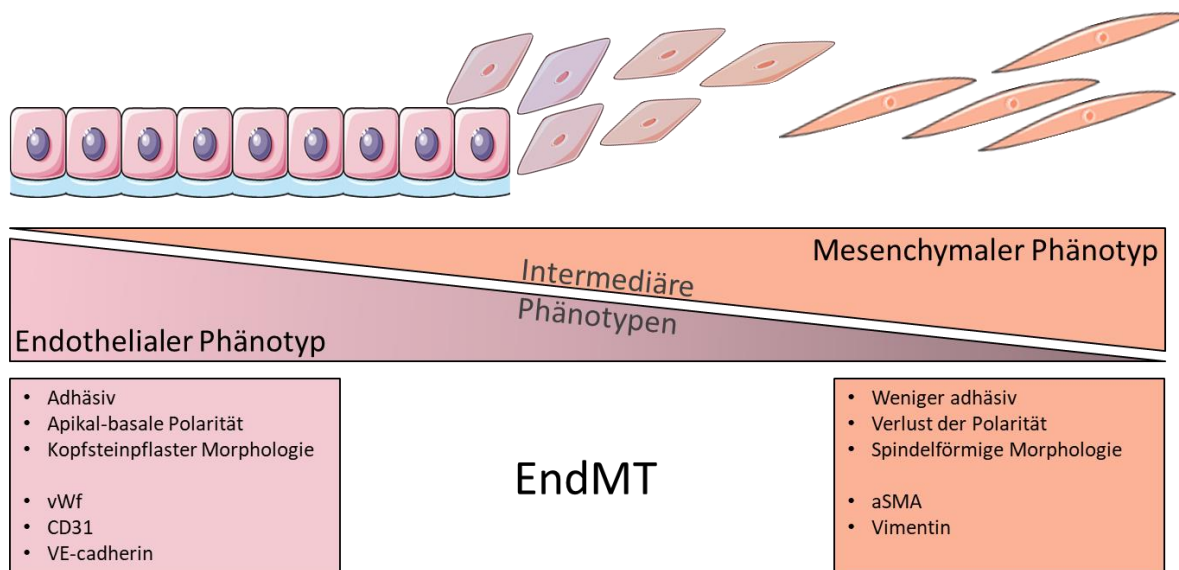
Eine nicht-adaptive Endothelaktivierung kann diverse Störungen der regulierenden Funktion des Endothels verursachen und wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet [15]. Unter physiologischen Bedingungen verhindert das Endothel unter anderem Vasospasmen, ungehinderte Leukozytenadhäsion und bildet eine nicht-thrombogene Oberfläche. Kommt es jedoch zu einer Dysfunktion, werden Adhäsionsmoleküle exprimiert, EC nehmen prothrombotische Eigenschaften an oder werden inflammatorisch aktiv. Hierbei kommt es speziell zu einer erhöhten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 mit Aktivierung des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NFkB) Signalwegs. Nehmen die Endothelzellen einen prothrombotischen Zustand an, ist die Balance zwischen eNOS Aktivität



und EDN-1 Sekretion gestört, wobei es in der Regel zu einer Verschiebung zu Gunsten von EDN-1 kommt [14, 16]. Die endotheliale Dysfunktion kann über die genannten Faktoren hinaus auch jegliche andere Bereiche der Funktionen von Endothelzellen umfassen und gilt daher als maßgeblich in der Entstehung und dem Fortschreiten verschiedenster kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK) oder Atherosklerose [17, 18].

## **1.2 Endothelial to Mesenchymal Transition (EndMT)**

Endothelzellen sind dazu in der Lage, einen Prozess zu durchlaufen, der als Endotheliale zu Mesenchymale Transition (engl.: *endothelial to mesenchymal transition*, EndMT) bezeichnet wird. Hierbei ändern die EC ihren Phänotyp von endothelial zu mesenchymal. Konkret bedeutet das, dass die Zellen makroskopisch ihre typische Kopfsteinplastermorphologie verlieren und eine eher spindelförmige, elongierte Form annehmen. Endothelzellmarker wie *Cluster of Differentiation 31* (CD31), Vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-cadherin) oder von Willebrand Faktor (vWf) werden herunterreguliert, bis hin zum völligen Verlust der Expression. Gleichzeitig werden mesenchymale Marker wie  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin ( $\alpha$ SMA) oder Vimentin (Vim) in diesen Zellen hochreguliert. Darüber hinaus verlieren Endothelzellen, die eine EndMT durchlaufen, ihre ursprüngliche Funktionalität und sind weniger adhäsiv [19]. Der Prozess der EndMT muss hierbei als ein Spektrum von möglichen Änderungen der Funktion und des Phänotyps verstanden werden, innerhalb dessen auch intermediäre Typen vorkommen, die Merkmale beider Zellarten exprimieren (Abbildung 2). Man kann daher diesen Prozess in partielle EndMT, bei der noch endotheliale Merkmale nachweisbar sind, und komplette EndMT unterscheiden. Methodisch ist zu beachten, dass die Untersuchung der EndMT nach wie vor wissenschaftlich herausfordernd ist. Es gibt zum einen keine standardisierten Methoden, um die Funktionalität der Zellen zu adressieren, und zum anderen keinen Konsens darüber, welche Kriterien konkret erfüllt sein müssen, damit von einer EndMT gesprochen werden kann.



**Abbildung 2: Merkmale der Endothelzellen zu Mesenchymalen Transition (EndMT)**

EndMT beschreibt eine funktionelle Transition adhäsiver, morphologisch regelrechter Endothelzellen zu mobilen, spindelförmigen Mesenchymzellen und geht mit dem Verlust endothelialer und dem entsprechenden Erlangen mesenchymaler Marker einher. Der Prozess der EndMT muss hierbei als ein Spektrum von möglichen Änderungen der Funktion und des Phänotyps verstanden werden, innerhalb dessen auch intermediäre Typen vorkommen, die Merkmale beider Zellarten exprimieren.

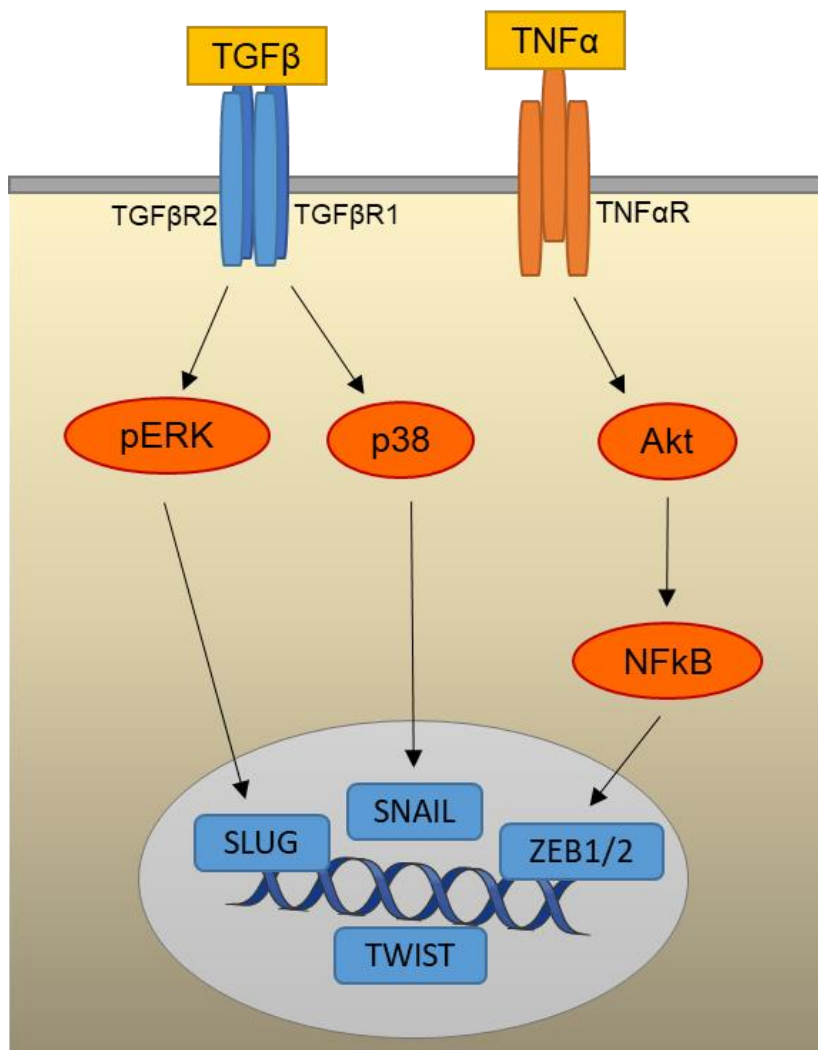
### 1.2.1 EndMT in Entwicklung und Krankheit

EndMT wurde erstmals in der Embryonalentwicklung beschrieben, wo der Prozess als Sonderform der Epithelzellen zu Mesenchymalen Transition (engl.: *epithelial to mesenchymal Transition*, EMT) bezeichnet wurde und Teil der Angiogenese und der Entstehung des Endokardkissens ist, aus dem schließlich die Herzklappen hervorgehen [20, 21]. Dieser Umstand lässt zwar eine Verbindung zwischen den Zellen der Herzklappen und der Fähigkeit EndMT zu durchlaufen vermuten, lange Zeit war jedoch unbekannt, ob dies im adulten Organismus noch möglich ist. Heute weiß man, dass VEC der adulten Aortenklappe, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, zu einer EndMT fähig sind [22]. Die Bedeutung dieses Prozesses im adulten Stadium ist weiterhin Gegenstand der Forschung, wurde aber bereits mit verschiedensten pathologischen Zuständen, wie Atherosklerose, fibrotischem Umbau von Herzklappen, oder auch Myokardinfarkt in Zusammenhang gebracht [23-25]. Auf der anderen Seite wird auch vorgeschlagen, dass die EndMT von VEC in Maßen ein physiologischer Vorgang sein könnte, aus dem neue VIC hervorgehen, die die Klappenstruktur aufrecht erhalten [26]. Mechanistisch wurde bereits gezeigt, dass EndMT in unterschiedlichen Endothelzellarten durch verschiedene Stimuli wie *Transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ) Signaling, inflammatorische Zytokine oder Scherstress initiiert wird [27-29]. Für VEC der

Aortenklappe ist außerdem spezifisch bekannt, dass EndMT durch Veränderungen der Extrazellulären Matrix verursacht, jedoch auch durch Interaktionen mit VIC unterdrückt werden kann [30, 31]. Die Vielzahl der Studien, die sich also mit verschiedenen Arten von EC, deren Fähigkeit, EndMT zu durchlaufen, und den zugrundeliegenden Stimuli beschäftigen, zeigt auf, dass dysfunktionales Endothel eine zentrale Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen einnimmt. EndMT steht dabei als eine spezielle Form der Dysfunktion im Fokus der Forschung. Die komplexen Mechanismen, vor allem in VEC der Aortenklappe, sind jedoch weiterhin unbekannt.

### **1.2.2 Mechanismen der EndMT**

Die zugrundeliegenden Signalwege der EndMT sind noch immer Gegenstand der aktuellen Forschung, da die Abläufe zwischen verschiedenen EC Typen sehr heterogen sein können. Eine Reihe von Stimuli, Mediatoren und Transkriptionsfaktoren wurde bereits mit EndMT in Zusammenhang gebracht und umfasst unter anderem das TGF $\beta$  Signaling und inflammatorische Einflüsse wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ) [27-29]. Die wohl bekanntesten und am besten untersuchten Induktoren von EndMT sind hierbei die TGF $\beta$  Isoformen, eine inflammatorische Aktivierung rückt jedoch zunehmend in den Fokus [32]. Es gibt zahlreiche Mediatoren dieser Signalwege, die auch synergistisch wirken können. Bekannte *downstream Targets* der TGF $\beta$  Signalkaskade sind unter anderem *extracellular-signal regulated kinases 1/2* (ERK1/2) und p38-mitogenaktivierte Proteininasen (p38). Ein zentraler Mediator des TNF $\alpha$  Signalwegs ist NF $\kappa$ B. Sowohl einzeln als auch in Kombination können TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  EndMT induzieren und zur Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren führen. Die bekanntesten bisher identifizierten Transkriptionsfaktoren sind SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB1 und ZEB2 [33, 34]. Die Snail Familie (SNAIL, *SNAI1*; SLUG, *SNAI2*) beinhaltet hierbei die am häufigsten untersuchten Kandidaten und wird mit dem TGF $\beta$ 1 Signalweg in Zusammenhang gebracht [35, 36]. TWIST, ZEB1 und ZEB2 wurden hingegen häufiger mit dem TNF $\alpha$  Signalweg assoziiert [37].



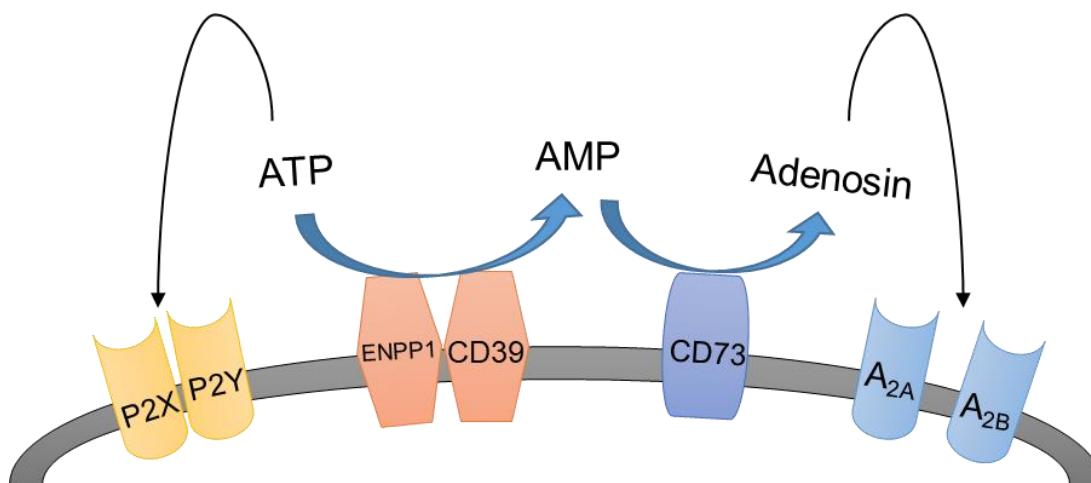
**Abbildung 3: Mechanismen der EndMT**

Verschiedene Stimuli, Mediatoren und Transkriptionsfaktoren wurden bereits mit EndMT in Zusammenhang gebracht. Darunter TGFβ und TNFα, die über p38, ERK oder NfκB diverse EndMT induzierende Transkriptionsfaktoren aktivieren. (angelehnt an [32])

### 1.3 Die purinerge Signaltransduktion

Das Konzept der purinergen Signaltransduktion bezeichnet die Verwendung von Purinnukleotiden als extrazelluläre Signalmoleküle und wurde erstmals 1972 von Burnstock beschrieben [38]. Diese Signalübertragung ermöglicht eine dynamische und schnelle lokale interzelluläre Kommunikation und beinhaltet drei Prozesse: Freisetzen von Nukleotiden, enzymatischer Abbau und Aktivierung von purinergen Rezeptoren [39]. Innerhalb der purinergen Signalkaskade werden freigesetzte Nukleotide im Extrazellulärraum von speziellen Enzymen der Zelloberfläche, den Ektonukleotidasen, hydrolytisch gespalten. Freigesetztes Adenosintriphosphat (ATP) wird dabei zunächst durch Ektonukleosid Triphosphat

Diphosphohydrolase-1 (ENTPD1, CD39) und Ektonukleotid Pyrophosphatase-1 (ENPP1) über Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut. Das so entstandene AMP wird in Folge durch Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) zu Adenosin dephosphoryliert [40]. Sowohl das Ausgangsmolekül ATP, als auch das Endprodukt Adenosin können ihrerseits purinerge Rezeptoren aktivieren (Abbildung 4). Diese Rezeptoren gehören zu einer Familie von Plasmamembranmolekülen, die in fast allen Zellarten zu finden sind und lassen sich in zwei Gruppen einteilen: P1 Rezeptoren, die durch Adenosin aktiviert werden und P2 Rezeptoren, die durch ATP aktiviert werden. P1 Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und werden nochmal in vier Typen aufgeteilt ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$ ). P2 Rezeptoren werden in die Ionen gesteuerten Kanäle P2X und die G-Protein gekoppelten P2Y Rezeptoren unterschieden. Bisher sind sieben P2X und acht P2Y Rezeptoren in Säugetieren bekannt [41, 42].



**Abbildung 4: Die purinerge Signalkaskade**

Freigesetztes ATP im Extrazellularraum wird durch Ektonukleosid Triphosphat Diphosphohydrolase-1 (ENTPD1, CD39) und Ektonukleotid Pyrophosphatase-1 (ENPP1) über ADP zu AMP abgebaut. AMP wird dann durch Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) zu Adenosin dephosphoryliert. Sowohl das Ausgangsmolekül ATP, als auch das Endprodukt Adenosin könne ihrerseits purinerge Rezeptoren aktivieren. P2 Rezeptoren werden durch ATP und A2 Rezeptoren durch Adenosin aktiviert.

### 1.3.1 Die purinerge Signalkaskade in kardiovaskulären Erkrankungen

Die purinerge Signaltransduktion spielt in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle. Die Aktivität purinerner Rezeptoren steht hierbei mit Thrombozytenaggregation, Regulation des Gefäßtonus aber auch der Entstehung von Atherosklerose in Zusammenhang [43]. Die Bedeutung der purinergen Signalkaskade für die Pathogenese von Gefäßkalzifizierung wurde erstmals durch Untersuchungen der infantilen Arterienkalzifikation (*idiopathic infantile arterial*

*calcification*, IIAC; ICD-10 Q28.8), einer autosomal rezessiven Erkrankung, bei der eine *loss-of-function*-Mutation des ENPP1 Gens ursächlich ist (OMIM 208000) [44] deutlich. Darüber hinaus wurden familiäre Formen von Mutationen des NT5E Gens (CD73) als potentieller Auslöser für Arterien- und Gelenksdegeneration identifiziert [45]. Auch die Rolle der purinergen Signalübertragung in der Pathogenese von CAVD wurde bereits untersucht [46]. Die aktuelle Forschung postuliert hierbei unter anderem, dass die Expression von CD73 auf VIC durch gesteigerte Adenosinspiegel und somit Aktivierung von A<sub>2A</sub> Rezeptoren die Degeneration vorantreibt [47]. Der Einfluss der purinergen Signalkaskade auf VEC ist in diesem Zusammenhang jedoch bisher weitestgehend unbekannt.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Sowohl die purinerge Signalkaskade als auch der Prozess der EndMT stellen wichtige Faktoren in der Physiologie und Pathophysiologie von Endothelzellen dar. Eine Dysregulation der purinergen Signaltransduktion im Sinne einer Funktionsänderung der Schlüsselenzyme CD39 und CD73 und daraus resultierendem Ungleichgewicht der Purinnukleotide steht nachweislich mit kardiovaskulären Erkrankungen wie CAVD oder Atherosklerose in Zusammenhang. Die EndMT ist entwicklungsphysiologisch für die regelrechte Herzentwicklung notwendig, findet sich im adulten Organismus jedoch ebenfalls im Zusammenhang mit diversen Herzkreislaufpathologien wieder. Trotz der zahlreichen Studien, die diese Vorgänge separat untersuchen gibt es bis heute keine Erkenntnisse über den möglichen Zusammenhang zwischen einer dysregulierten purinergen Signalkaskade und dem Auftreten von EndMT in VEC.

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht daher darin, erstmals die Rolle der purinergen Signalkaskade in der Entstehung von EndMT in VEC zu untersuchen. Die Hypothese dieses Forschungsprojektes ist, dass eine Dysregulation der purinergen Signaltransduktion die Funktionalität von VEC beeinflusst und zu EndMT führt. Da Endothelzellen, ihrem Ursprungsgewebe nach, eine große Heterogenität aufweisen, werden die Untersuchungen in primären humanen VEC durchgeführt, um eine direkte Interpretation der Ergebnisse im biomedizinischen Kontext zu ermöglichen. Die Umsetzung dieses Forschungsvorhabens wird hierbei in drei wesentliche Schritte unterteilt:

- I. Gewinnung primärer humaner VEC
- II. Untersuchung des Einflusses einer dysregulierten purinergen Signalkaskade auf Morphologie und Funktionalität von VEC

III. Untersuchung des Einflusses einer dysregulierten purinergen Signalkaskade auf das Auftreten von EndMT in VEC

Erste Einblicke in den potenziellen Zusammenhang zwischen einer dysregulierten purinergen Signalkaskade und dem Auftreten von EndMT in valvulären Endothelzellen können zu einem besseren Verständnis der Mechanismen valvulärer Pathologien beitragen und neue Ansätze zur pharmakologischen Intervention bieten. Darüber hinaus können Kenntnisse der untersuchten Prozesse zukünftige Konzepte zum kardiovaskulären Tissue Engineering unterstützen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Gewinnung primärer humaner Aortenklappen-Endothelzellen**

#### **2.1.1 Gewebegewinnung**

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität (Studiennummer: 2018-298-bio) wurden Herzklappen von Patienten herangezogen, die einem Eingriff zum AK-Ersatz oder einer Herztransplantation (HTX) zugeführt wurden. Das Vorgehen ist gemäß der Deklaration von Helsinki zu „Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen“[48]. Alle Patientinnen und Patienten gaben im Vorfeld des Eingriffes Ihr Einverständnis zur Gewebespende für Forschungszwecke.

Unmittelbar nach Entnahme des Gewebes im Operationssaal wurde eine Tasche der Aortenklappe in sterile phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; Kat.-Nr. 10010-023, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) überführt und zur Aufarbeitung in das Forschungslabor gebracht. Das Taschengewebe wurde erneut in PBS gewaschen, um Blut- und Geweberückstände zu entfernen, und im Anschluss fotodokumentiert.

#### **2.1.2 Patientenkohorte**

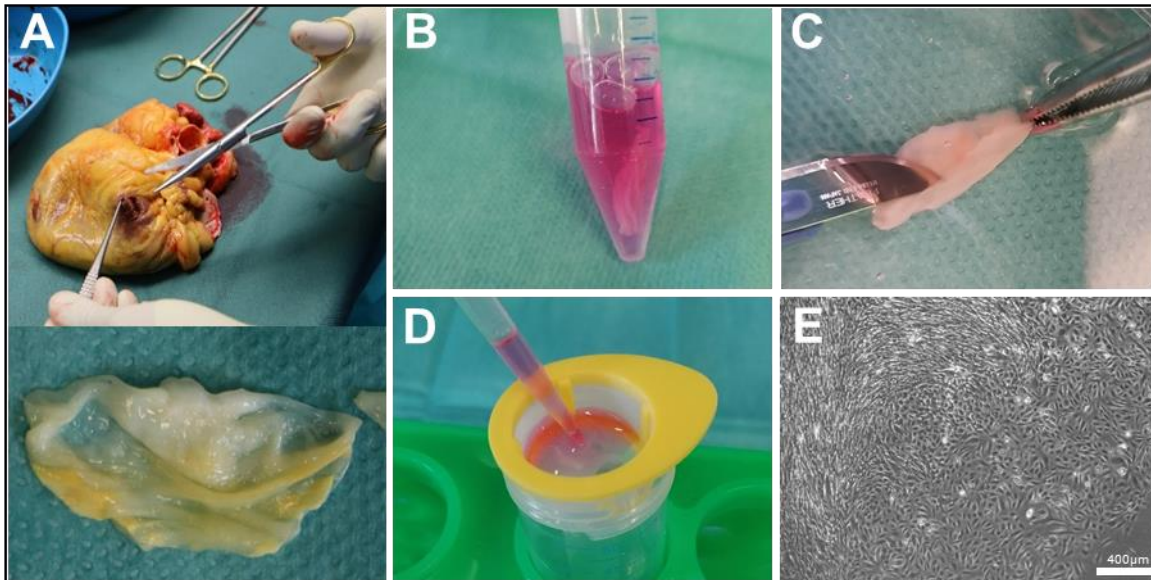
In dem durchgeführten Forschungsprojekt wurde Material von Spendern verwendet, die sich im Zeitraum zwischen Oktober 2018 und Mai 2021 einer der genannten operativen Eingriffe unterzogen haben. Informationen über Vorerkrankungen, Voroperationen und weitere klinische Parameter wurden zur zuverlässigen Beurteilung der Forschungsergebnisse für jeden Spender dokumentiert.

#### **2.1.3 Zellisolation und Kultivierung**

Primäre VEC wurden unmittelbar nach Entnahme und Dokumentation aus den humanen Aortenklappentaschen gewonnen. Dafür wurde das zuvor in PBS gereinigte Gewebe zunächst in steriler Umgebung (Zellkulturbank HERASafe KS, Thermo Fisher Scientific) in 5 ml 0,25 %iger Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (Trypsin-EDTA; Kat.-Nr. 25200-56, Gibco®, Thermo Fisher Scientific) bei 37°C für 4 Minuten inkubiert (Abbildung 5 B). Die Reaktion wurde nach Ablauf der Zeit durch Zugabe von Kulturmedium (Tabelle 1) gestoppt und die Oberfläche des Gewebes leicht mit einem Skalpell abgeschabt (Abbildung 5 C). Die Klappentasche wurde entfernt und die Suspension durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße (Kat.-Nr. CC8111-0102, Starlab, Hamburg, DE) gefiltert, um Geweberückstände zu entfernen (Abbildung 5 D). Schließlich wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert



(Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific), und das Pellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die so gewonnenen Zellen wurden in eine mit 1 %iger Gelatine (Art.-Nr. G9391, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 1 % in PBS, autoklaviert und sterilfiltriert) beschichtete 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz inkubiert. Hier zeigte sich nicht selten eine Mischkultur mit entsprechend heterogener Morphologie (Abbildung 5E).



**Abbildung 5: Isolation und Kultivierung primärer humaner Aortenklappen-Endothelzellen.**

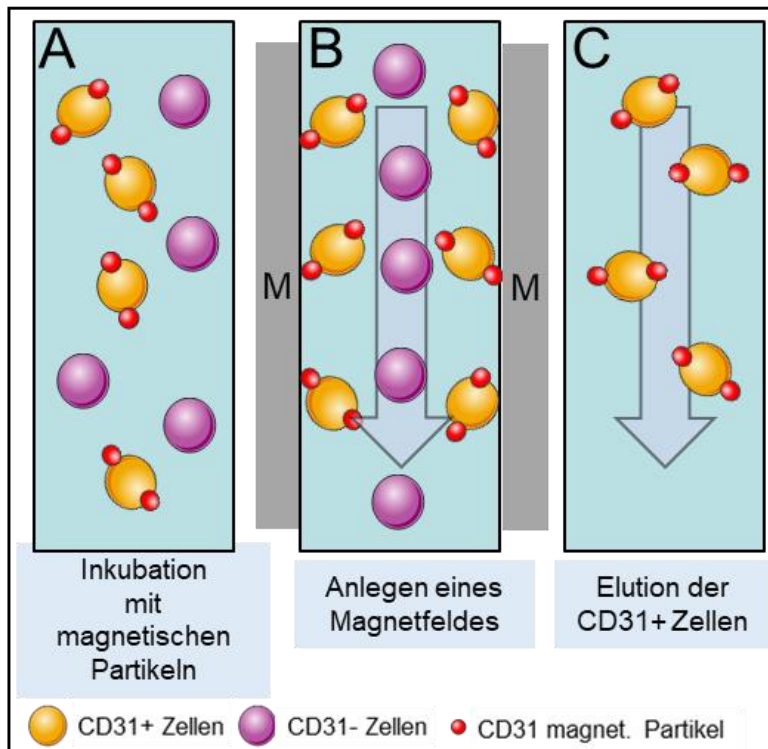
Eine Tasche der Aortenklappe wurde unter sterilen Bedingungen im Operationssaal aus dem entnommenen Empfängerherz im Rahmen einer HTX herauspräpariert und in PBS gereinigt (A). Die Tasche wurde für die Dauer von 4 Minuten in Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert (B), und die Oberfläche anschließend mit einem Skalpell abgeschabt (C). Die Suspension wurde durch ein Zellsieb gefiltert (D). Nach Zentrifugation und Aufnehmen der gewonnenen Zellen in frischem Kulturmedium erfolgte die Kultivierung in 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bis zur Konfluenz (E, Maßstab 400 µm).

**Tabelle 1: Zusammensetzung hVEC Kulturmedium**

<i>Endothelial Cell Growth Medium MV*</i> (EC Medium)	500 ml
Penicillin / Streptomycin	1 %
Amphotericin B	1 %
*MV Medium Kit; Kat.-Nr. C-22120, PromoCell, Heidelberg, DE.	

#### 2.1.4 Aufreinigung mittels *magnetic cell separation* (MACS)

Die Aufreinigung der zuvor isolierten primären humanen Zellen wurde mit dem Verfahren der magnetischen Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS®) durchgeführt. Als Marker für Endothelzellen wurde CD31 verwendet. Bei dem Verfahren binden spezielle magnetische Partikel in Suspension an CD31 positive Zellen, diese Zellsuspension wird dann in einer Säule einem starken magnetischen Feld ausgesetzt, in dem entsprechend die magnetisch markierten Zellen im Inneren der Säule gehalten werden, während nicht-markierte Zellen ausgewaschen werden. Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld kann die CD31-positive Zellfraktion eluiert werden. Für dieses Verfahren wurde eine Vorrichtung der Firma Miltenyi Biotec (MidiMACS® Separator mit MACS® MultiStand, Kat.-Nr. 130042302; 130042303 Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DE), sowie ein Set zur CD31 spezifischen Zellmarkierung mit magnetischen Partikeln (CD31 MicroBead Kit human, Kat.-Nr. 130091935, Miltenyi Biotec) und Trennsäulen (LS Columns, Kat.-Nr. 130042401, Miltenyi Biotec) derselben Firma genutzt. Die Zellen wurden, wie beschrieben, aus einer Tasche der Aortenklappe isoliert und in Passage 0 bis zur Konfluenz kultiviert. Eine erste Passagierung in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche erfolgte vor der Aufreinigung um sicherzustellen, dass ausreichend Zellmaterial für den Prozess vorhanden war. Die Zellen wurden dann in Passage 1 nach zweimaligem Waschen mit PBS mittels 0,25 %igem Trypsin-EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst und für fünf Minuten bei 300 x g (Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific). Das Zellpellet wurde in 60 µl serumfreiem EC Medium aufgenommen, mit 20 µl Blockierlösung versetzt und einige Sekunden gemischt (Vortexmischer IKA MS1 Minishaker, Sigma-Aldrich, USA). Im Anschluss wurden 20 µl CD31 magnetische Partikel hinzugegeben und die Suspension für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, um die Bindung der Partikel an die Zellen zu ermöglichen (Abbildung 6 A). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen durch erneute Zentrifugation bei 300 x g für 3 Minuten pelletiert und in 1 ml serumfreiem EC Medium resuspendiert. Zeitgleich wurde die Säule in das magnetische Feld eingebracht und mit 3 ml serumfreiem EC Medium vorbereitend gespült. Die Suspension der markierten Zellen wurde im magnetischen Feld auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss aufgefangen. Die Säule wurden dann mit 3 ml serumfreiem EC Medium gespült. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male, jeweils nach vollständigem Durchfluss des aufgetragenen Volumens, wiederholt (Abbildung 6 B). Im letzten Schritt wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, die markierten Zellen eluiert (Abbildung 6 C) und, wie zuvor beschrieben, pelletiert.



**Abbildung 6: Aufreinigung primärer humaner Aortenklappen-Endothelzellen.**

Die Zellsuspension wurde in Passage 1 mit spezifischen magnetischen Partikeln inkubiert, die an CD31 positive Zellen binden (A, CD31+ Zellen). Diese markierte Suspension wurde in einer Trennsäule einem starken Magnetfeld (M) ausgesetzt, wobei magnetisch markierte Zellen in der Säule gehalten wurden, während nicht-markierte Zellen ausgewaschen wurden (B, CD31- Zellen). Nach dem Auswaschen wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die enthaltene, CD31 positive, Zellfraktion eluiert (C).

Diese CD31 positive Zellfraktion wurde schließlich in EC Medium aufgenommen, in eine Gelatine beschichtete 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die aufgereinigten Zellen wurden bis Passage vier weiterkultiviert, um eine ausreichende Zellzahl für die nachfolgenden Experimente zu erreichen. In Passage vier wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS mittels 0,25 %igem Trypsin-EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst und für fünf Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in ca. 1 ml Einfriermedium (Tabelle 2) pro 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert und in Kryoröhrchen (Low temperature freezer vials, Art.-Nr. 4791262, VWR, Radnor, PA, USA) überführt. Zur Kryokonservierung wurde diese Zellsuspension stufenweise bei -80°C in einem Gefrierbehälter mit Propan-2-ol Kühlmittel (Nalge Nunc International Corporation, Rochester, New York, USA) heruntergekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die Zelllösungen in einen Flüssigstickstofftank (Cryotank 35VHC, Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA) überführt.

**Tabelle 2: Zusammensetzung Einfriermedium**

Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 %
Fötale Kälberserum*	10 ml

\**Fetal Calve Serum* (FCS); Ch. Nr. : BCCC0665, Sigma-Aldrich)

### 2.1.5 Charakterisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die isolierten und nach CD31 aufgereinigten primären humanen Endothelzellen der Aortenklappe wurden vor der Verwendung in Experimenten mittels Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert, um eine möglichst reine Kultur sicherzustellen. Hierzu wurden sowohl von Willebrand Faktor (vWf) als Endothelmarker als auch Vimentin und *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) als mesenchymale Marker bestimmt (Tabelle 4). Als Positivkontrolle wurde in jeder Färbung eine Gewebeprobe humanes Myokard mitgeführt.

### 2.1.6 Fixierung der Zellen auf Glasplättchen

Die Zellen wurden auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen (Cover slips 12 mm, Gerhard mezel GmbH, Braunschweig, DE) in einer 6-Well Kulturplatte (Cellstar® Multiwellplatte, Art.-Nr. 657160, Geriner Bio-One, Frickenhausen, DE) ausgesät und bis zu 80% Konfluenz kultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS erfolgte die Fixierung mit 4 % Formaldehyd (Roti-Histofix, Art.-Nr. P087.5, Carl Roth, Karlsruhe, DE). Hierzu wurde die Fixierlösung langsam über die Plättchen gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die Formaldehydlösung wurde anschließend abgenommen und die Plättchen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Immunfluoreszenzfärbung, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, durchgeführt.

### 2.1.7 Vorbereitung der Gewebekontrolle

Humanes Myokard wurde in ca. 1 cm große Stücke zerteilt und in Einbettmedium (Tissue-Tek®, Art.-Nr. SA62550, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL) in Kryoformen (Tissue-Tek® Cryomold®, Art.-Nr. SA62534, Sakura Finetek) gebettet. Anschließend wurde das Präparat in Isopentan (2-Methylbutan, Art.-Nr. 3927.2, Carl Roth, DE) auf die Temperatur von Flüssigstickstoff heruntergekühlt. Zur Gewinnung histologischer Schnitte wurde der gefrorene Präparatblock im Kryomikrotom (Kryostat CM1950, Leica Biosystems, Wetzlar, DE) auf -20°C temperiert und dann 5  $\mu$ m dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden sofort auf Glasobjektträger (SuperFrost® Plus Objektträger, Art.-Nr. 03-0060, R. Langenbrinck, Emmendingen, DE) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Vor

der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebeschnitte, wie in 2.2.3.1 beschrieben, ebenfalls für 10 Minuten in 4% iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend in PBS gewaschen.

### 2.1.8 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger zunächst mit Fettstift (Dako-Pen, Art.-Nr. S2002, Dako, Glostrup, DK) umrandet und dann gemeinsam mit den Zellen weiterbehandelt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor jedem Färbedurchgang frisch angesetzt (Tabelle 3). Als erstes erfolgte ein Permeabilisierungsschritt mit 0,25 % iger Triton-X Lösung für 10 bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit PBS (3x 1 Minute) wurde über 60 Minuten mit 5 % iger boviner Serumalbuminlösung (Fraction-V, Tabelle 3) bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre blockiert.

**Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung**

Lösung	Hersteller	Zusammensetzung
PBS		137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Triton-X 100	NeoLab; Art.Nr. 1139LT001	0,25 % in PBS
Tween 20	Sigma-Aldrich; Art.-Nr. P1379	0,1 % in PBS
Polyoxyethylen (20)-sorbitan- monolaurat		
Fraction-V	Sigma-Aldrich; Art.-Nr. A9418	1 % 5 % in 0,1 % iger Tween 20 Lösung

Anschließend wurde dreimal für 1 Minute in Tween-20 Lösung (Tabelle 3) gewaschen und die Primärantikörper (Tabelle 4) aufgetragen. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte immer bei 4°C in feuchter Atmosphäre über Nacht. Am Folgetag wurde die Antikörperlösung in drei fünfminütigen Waschschritten mit Tween-20 Lösung abgewaschen und die Präparate für 60 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre und unter Ausschluss von Licht mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (Tabelle 5) inkubiert.

**Tabelle 4: Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung**

Antigen	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Von Willebrand Faktor	Kaninchen	Dako, Agilent Technologies Art.-Nr. A0082	1:200
Vimentin	Maus	Progen Biotechnik Art.-Nr. 10515	1:50
αSMA	Maus	Sigma-Aldrich Art.-Nr. A5228	1:100

Die verwendeten Antikörper wurden in 1 % iger Serumalbuminlösung verdünnt (siehe Tabelle 3)

**Tabelle 5: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung**

Antigen	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Maus IgG* (H+L**)	Ziege	Thermo Fisher Scientific Art.- Nr. A11029	1:400
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Thermo Fisher Scientific Art.- Nr. A11010	1:500
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)		Carl Roth Art.-Nr. 6335.1	1:1000

\*IgG : Immunglobulin G

\*\* H+L : *Heavy and Light chains* = schwere und leichte Ketten der Antikörperstruktur

Die verwendeten Antikörper wurden in 1 % Fraction-V Lösung verdünnt (siehe Tabelle 3)

Ein weiterer Waschschrift mit PBS (3 x 5 Minuten) und eine Kernfärbung mit DAPI (Tabelle 5) erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre. Die Präparate wurden nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser und kurzer Trocknung bei Raumtemperatur mit Medium (CV Ultra, Art.-Nr. 14070937891, Leica, USA) eingedeckt und bis zur Mikroskopie lichtgeschützt gelagert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Leica DM 2000 LED Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, DE) angefertigt und die Bildverarbeitung erfolgte mit der Software LASX (Leica Application Suite X, Version 3.7.4.23463, Leica, USA).

## **2.2 *In-vitro*-Versuche mit primären humanen VEC**

Für die *In-vitro* Versuche wurden primäre humane VEC der Passagen vier bis fünf verwendet. Die Zellen wurden kryokonserviert gelagert und durch Zugabe von 37°C warmem Kulturmedium aufgetaut. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 300 x g (Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific), und das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine mit 1 %iger Gelatine beschichtete 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz inkubiert.

### **2.2.1 Zellzahlbestimmung**

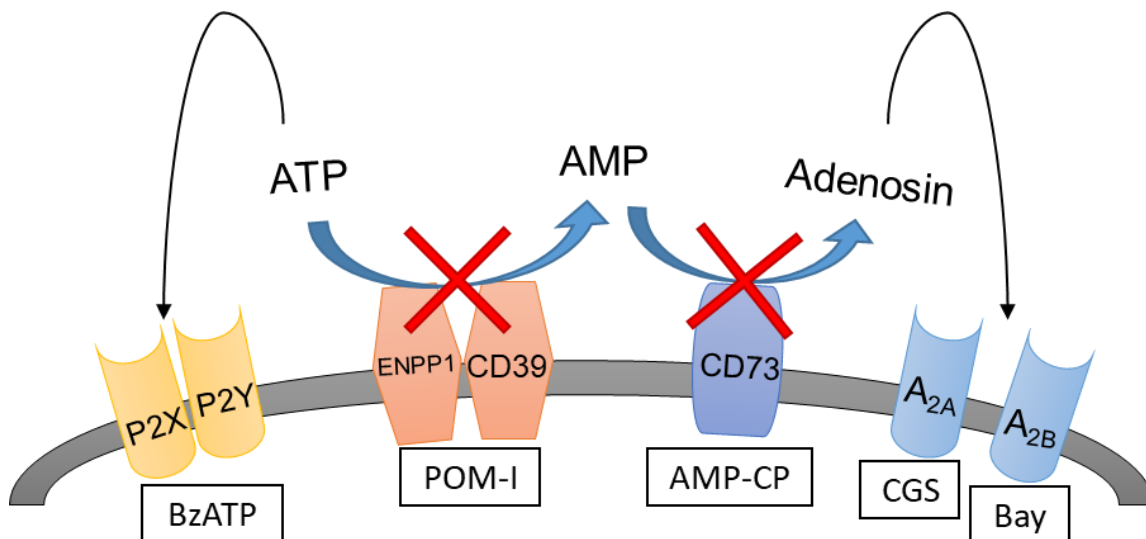
Die Zellzahl der kultivierten humanen VEC wurde vor der Aussaat in 6-Well Platten bestimmt, um eine über die Replikate gleichbleibende Anzahl Zellen für die Experimente zu verwenden. Der Zellrasen einer 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurde dazu nach zweimaligem Waschen mit PBS mittels 0,25 %igem Trypsin-EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst und für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden 40 µl im Verhältnis 1:1 mit 0,4 %iger Trypanblau-Lösung (Art.-Nr. K940, VWR, USA) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön) quantifiziert. Hierzu wurde im ersten Schritt die durchschnittliche Zellzahl von vier Quadranten ermittelt und mit dem Kammerfaktor  $2 \times 10^4$  multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Im zweiten Schritt wurde der Wert mit dem totalen Volumen der Zellsuspension (10 ml) multipliziert um die zu Verfügung stehende Anzahl an Zellen zu ermitteln.

### **2.2.2 Aussaat und Behandlung**

Die *In-vitro* Versuche wurden mit 100.000 Zellen pro Well in 2 ml Medium in einer 6-Well Kulturplatte durchgeführt. Hierzu wurde die zuvor ermittelte Zellzahl in einem entsprechenden Volumen Kulturmedium gelöst und in die zuvor mit 1 %iger Gelatine beschichteten und mit

Medium versehenen Wells gegeben. Nach Erreichen von Konfluenz wurde mit der Behandlung der Zellen begonnen.

Als etablierte Induktoren von EndMT wurden TGF $\beta$ 1 [49, 50] und TNF $\alpha$  [32] gemäß der Literatur in Konzentrationen von 10 oder 5 ng/ml eingesetzt [51]. Die purinerge Signalkaskade wurde, wie bereits in einer vorherigen Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe publiziert [52], durch Behandlung mit Inhibitoren der Schlüsselenzyme CD73 (*Adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene)diphosphate*; AMP-CP) und CD39 (*Sodium polyoxotungstate*; POM-I), sowie mit Agonisten der P2 (*2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt*; BzATP) und A2-Rezeptoren (für A<sub>2A</sub>: *CGS-21680 hydrochloride hydrate*; CGS und für A<sub>2B</sub>: *BAY 60-6583*; Bay) manipuliert (Abbildung 7; Tabelle 6).



**Abbildung 7: Inhibitoren und Agonisten der purinergen Signalkaskade.**

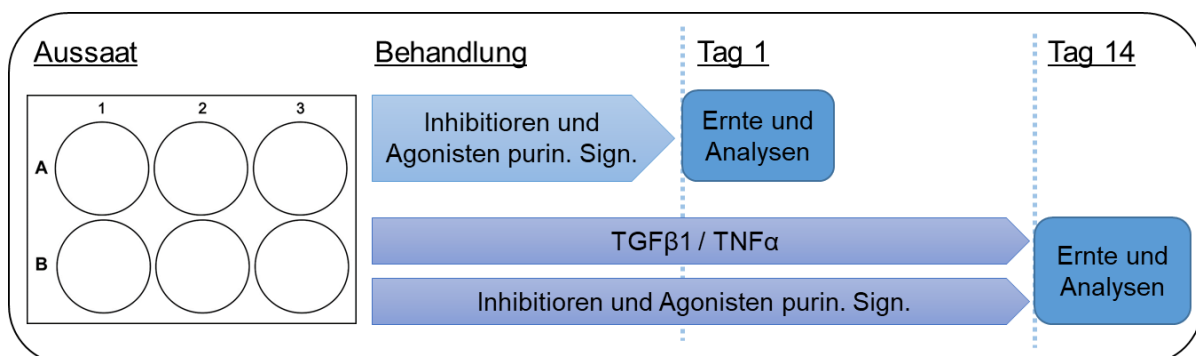
Die Schlüsselenzyme der purinergen Signalkaskade wurden mittels *Sodium polyoxotungstate* (POM-I) oder *Adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene)diphosphate* (AMP-CP) inhibiert. Zusätzlich wurden *2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt* (BzATP) als P2 Rezeptor Agonist und *CGS-21680 hydrochloride hydrate* (CGS) und *BAY 60-6583* (Bay) als A2 Rezeptor Agonisten eingesetzt.



**Tabelle 6: Agenzien zur Zellbehandlung**

Substanz	Art.-Nr. & Hersteller	Konzentration
TGF- $\beta$ 1	7754-BH-005; R&D Systems	10 ng / ml
TNF $\alpha$	H8916; Sigma-Aldrich	5 ng / ml
POM-I	2689; Tocris	10 $\mu$ M
BzATP	B6396; Sigma-Aldrich	25 $\mu$ M
AMP-CP	M8386; Sigma-Aldrich	10 $\mu$ M
CGS	C141; Sigma-Aldrich	10 $\mu$ M
Bay	606583; Sigma-Aldrich	10 $\mu$ M

Die Behandlung der VEC erfolgte für die Untersuchungen bezüglich Endothelfunktion über 24 h, um sicherzustellen, dass noch keine Transition zu einem mesenchymalen Zelltyp stattgefunden hat. Analysen der EndMT erfolgten nach 14 Tagen. Als Referenz wurden VEC mitgeführt, in denen mit TGF $\beta$ 1 oder TNF $\alpha$  EndMT induziert wurde (Abbildung 8).

**Abbildung 8: Experimenteller Aufbau**

Primäre humane VEC wurden in 6-Well Kulturplatten ausgesät und ab Konfluenz mit Inhibitoren und Agonisten der purinergen Signalkaskade behandelt. Die behandelten Zellen wurden für Analysen der Endothelfunktion nach 24 h und zur EndMT Untersuchung nach 14 Tagen geerntet.

### 2.2.3 Durchlichtmikroskopie

Kulturverlauf, Morphologie und Zelldichte der verwendeten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen durchlichtmikroskopisch (Leica DM IL LED, Leica Microsystems, DE) kontrolliert. Nach erfolgter Behandlung wurde die Zellmorphologie zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert (Mikroskopkamera DFC425 C, Leica Microsystems, DE), die Bildverarbeitung erfolgte mit der Software LAS (Leica Application Suite Version 3.8).

### 2.2.4 Zellyse

Für weiterführende Analysen mittels proteinbiochemischer Methoden oder Genexpressionsanalysen wurden Lysate der behandelten Zellen hergestellt. In jedem Fall wurden die Kulturüberstände zunächst abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit  $100\ \mu\text{l}$  RIPA Puffer oder  $350\ \mu\text{l}$  RLT Puffer (Tabelle 7) überschichtet. Der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber (Art.-Nr. 20003521, Sarstedt, Nümbrecht, DE) abgetragen und mechanisch lysiert. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung in  $1,5\ \text{ml}$  Eppendorf Reaktionsgefäßen (Microtube, Art.-Nr. 72.690.550, Sarstedt, DE) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 7: Puffer zur Zelllysierung**

Lösung	Art.-Nr. & Hersteller	Zusammensetzung
RIPA Puffer	20-188; Merck Millipore	RIPA Puffer (10x)
	04693124001; Roche	Protease Inhibitor Cocktail
	04906837001; Roche	Phosphatase Inhibitor Cocktail
		dH <sub>2</sub> O
RLT Puffer	1015762; Qiagen	RLT Puffer
	R0862; Invitrogen	1% Dithiothreitol (DTT)

## 2.3 Genexpressionsanalysen

### 2.3.1 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation aus primären humanen VEC

Die RNA-Isolation aus primären humanen VEC erfolgte mit dem *QIAshredder* (Kat.-Nr. 79656, Qiagen, Hilden, DE) und *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen (Art.-Nr. 74106, Qiagen, DE). Dieses kommerzielle System basiert auf einer Säulen Methode, bei der die RNA an eine Siliciumdioxidmembran gebunden wird. Hierbei wird die gebundene RNA durch mehrere Waschschriffe und einem Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau schrittweise aufgereinigt und schließlich in RNase freiem Wasser eluiert.

Zunächst wurden die in RLT Puffer gelagerten Zelllysate (siehe 2.2.4 Zelllyse) auf Eis aufgetaut und auf die *QIAshredder* Säulen gegeben. Ein 1 Min. Zentrifugationsschritt bei 11.000 x g (Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, DE) folgte, um die Zellsuspension einem abschließenden Lyse-Schritt zu unterziehen. Das Lysat wurde dann mit demselben Volumen 70%igen Ethanol (Art.-Nr. SZBF236EV, Sigma-Aldrich) versetzt. Diese Mischung wurde auf das *RNeasy* Säulen-System aufgetragen und bei 8.000 x g erneut für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss der Säulen wurde nach jedem Schritt verworfen. Durch Zugabe von 350 µl PW1-Puffer aus dem verwendeten Kit und anschließende Zentrifugation bei 8.000 x g für 1 Min. erfolgte der erste Waschschrift. Danach wurde gemäß Herstellerangaben der DNase Puffer (*RNase free DNase Set* Art.-Nr. 79254, Qiagen) angesetzt, direkt auf die Membran der Säule aufgetragen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein weiterer Waschschrift mit RW1-Puffer, gefolgt von zwei weiteren Waschschriffen mit je 500 µl RPE-Puffer der ebenfalls dem Kit beiliegt. Nach Überführung der Säulen in neue Auffanggefäße wurden noch einmal für 1 Min. bei 8.000 x g eventuelle Pufferrückstände abzentrifugiert. Die Säulen wurden in neue Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und die Elution der aufgereinigten RNA erfolgte abschließend durch Zugabe von 40 µl RNase freiem Wasser und Zentrifugation bei 8.000 x g für 1 Minute. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.3.2 Reverse Transkription

Die aufgereinigte RNA wurde unter Verwendung des *QuantiTect RT Kit* der Firma Qiagen (Art.-Nr. 205313, Qiagen) in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und die Konzentration mit einem Mikroplattenleser (Infinite 1000 Pro, Tecan, Männedorf, CH) durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt.

Zur Synthese der cDNA wurden im ersten Schritt die in Tabelle 8 aufgelisteten Komponenten in ein 200 µl Reaktionsgefäß gegeben und der Ansatz für 2 Minuten bei 42°C in einem Thermocycler (Thermocycler T3000, Biometra, Göttingen, DE) inkubiert.

**Tabelle 8: Ansatz zur Entfernung genomischer DNA**

Komponente	Konzentration / Volumen
gDNA Wipeout Buffer 7x	2 µl
RNA	≤ 1 µg, variabel
RNase-freies Wasser	ad 14 µl

Im Anschluss wurden die restlichen Komponenten (Tabelle 9) hinzugefügt, wobei die Reverse Transkriptase als Letztes zugegeben wurde. Der Ansatz wurde im Thermocycler zunächst 15 Minuten bei 42°C und dann 3 Minuten bei 95°C inkubiert, um die Reaktion abzuschließen.

**Tabelle 9: Komponenten zur cDNA Synthese**

Komponente	Konzentration / Volumen
RT Buffer 5x	4 µl
Primer Mix	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Die so erhaltenen cDNA wurde auf eine einheitliche Konzentration von 5 ng/µl eingestellt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.3.3 Semiquantitative *real-time* PCR

Die mRNA Expression wurde mittels semiquantitativer *real-time* PCR analysiert. Hierzu wurde der GoTaq qRT-PCR Master Mix mit Referenzfarbstoff (Art.-Nr. A6002, Promega, Mannheim, DE) gemäß Herstellerangaben verwendet (Tabelle 10), und jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Alle Messungen wurden mit dem *StepOne plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Das Temperatur- und Zeitprofil der Reaktion ist in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 10: Reaktionskomponenten qPCR**

Komponente	Menge pro Reaktion
GoTaq qRT-PCR Master Mix	1x
Primer*	3 pmol
cDNA	10 ng

\*gilt für Vorwärts- und Rückwärtsprimer; Reaktionsvolumen 20  $\mu$ l

**Tabelle 11: Temperatur- und Zeitprofil der qPCR**

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

Die Auswertung der erhobenen Expressionsdaten wurde mit der integrierten Software des Gerätes vorgenommen (*StepOne Software Version 2.3*, Applied Biosystems, USA). Hierbei wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode [53] zur relativen Quantifizierung genutzt, bei der die mRNA Expression des Zielgens auf die Expression einer endogenen Kontrolle (Housekeeper) bezogen wird. Bei den verwendeten Proben wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeper verwendet. Alle analysierten Gene sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12: Primersequenzen für die qPCR**

Zielgen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
GAPDH *	CTGCACCACCAACTGCTTAG	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT
SNAI1	CACTATGCCGCGCTCTTT	TAGGGCTGCTGGAAGGTAAA
TWIST1	GGCTCAGCTACGCCTTCTC	TCCTTCTCTGGAACAATGACA
SNAI2	GCCAAACTACAGCGAACTGG	CACAGTGATGGGGCTGTATG
ZEB1	AACCCAACTTGAACGTCACA	TTACACCCAGACTGCGTCAC
ZEB2	AACAAGCCAATCCCAGGAG	GTTGGCAATACCGTCATCCT
TGFB1	CTGAACCCGTGTTGCTCTC	GAGGTATCGCCAGGAATTGT
EDN-1	TGGGAAAAGTGTATTTATCAGCA	GGAGCCCATGCAGATGTACT
NOS3	GACGCTACGAGGAGTGAAG	CCTGTATGCCAGCACAGCTA

\* Referenzgen zur Normalisierung (Housekeeper)

## 2.4 Proteinbiochemie

### 2.4.1 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay

Der Proteingehalt der Zellysate wurde mit einem kommerziellen Bicinchoninsäure-Assay [54] (Pierce™BCA Protein Assay Kit, Art.-Nr. 23225, Sigma-Aldrich, DE) nach Herstellerangaben bestimmt. Hierzu wurden Standards von bovinem Serumalbumin in verschiedenen Konzentrationen vorbereitet und die Reaktionslösung aus 50 Teilen Reagent A (Bicinchoninsäure) und 1 Teil Reagent B (Kupfer-II-Sulfat) hergestellt. Die Proben wurden in der Verdünnung 1:5 verwendet, und die Reaktion erfolgte in 96-Well Platten. Sowohl die Standards als auch die Proben wurden in Duplikaten pipettiert, mit 200 µl Reaktionslösung pro Well versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde anschließend bei 560 nm im Mikroplattenleser gemessen. Eine Standardkurve die die Standardkonzentrationen gegen die gemessene Absorption zeigt wurde generiert und die entsprechende Geradengleichung genutzt, um die Proteinkonzentrationen der Proben zu errechnen.

## 2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) wurde angewendet, um die in den Zelllysaten enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen [55, 56]. Die Proben wurden dazu mit Ladepuffer (Tabelle 13) versetzt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert.

**Tabelle 13: Ladepuffer SDS PAGE**

Komponente	Art.-Nr. & Hersteller	Endkonzentration in der Probe
Tris-HCl pH 6,8	4855.5; Roth	62,5 mM
SDS	CN30.4; Roth	70 mM
Glycerin	3793.2; Roth	10 %
Dithiothreitol	R0862; Thermo Fisher	100 mM
Bromphenolblau	B0126; Sigma-Aldrich	0,01 %

Die vorbereiteten Proben wurden in ein Polyacrylamid-Gel (Tabelle 14) geladen, und die SDS PAGE wurde anschließend in Laufpuffer (Tabelle 15) im Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Kat.-Nr. 165-8001, Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) bei initial 60 V für 15 min und anschließend bei 120 V für ca. 60 min durchgeführt.

**Tabelle 14: Gelzusammensetzung SDS PAGE**

Komponente	Art.-Nr. & Hersteller	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
40% Acrylamid- /Bisacrylamid Stammlösung	A515.1; Roth	2,5 ml	500 µl
1 M Tris-Base in dH <sub>2</sub> O (pH 6,8)	4855.5; Roth	--	1,26 ml
1,5 M Tris-Base in dH <sub>2</sub> O (pH 8,8)	4855.5; Roth	2,5 ml	--

10 % SDS (w/v in dH <sub>2</sub> O)	CN30.4; Roth	100 µl	
10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v in dH <sub>2</sub> O)	215589; Merck	50 µl	25 µl
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	161-0801; Bio-RAD	5 µl	5 µl
dH <sub>2</sub> O		4,85 ml	3,18 ml

**Tabelle 15: Laufpuffer SDS PAGE**

Komponente	Art.-Nr. & Hersteller	Endkonzentration
Tris-Base	4855.5; Roth	25 mM
Glycin	23390.03; Serva	200 mM
SDS	CN30.4; Roth	0,1 %

der pH wurde im gebrauchsfertigen Puffer auf 8,3 eingestellt

### 2.4.3 Western-Blot

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden auf eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran (Art.-Nr. 1620115, Bio-RAD, USA) übertragen [57, 58]. Hierbei wurde das Mini Trans-Blot® System (Art.-Nr. 170-3935, Bio-RAD, USA) verwendet, bei dem der Transfer im Nassverfahren durchgeführt wird. Zwei Schwämme und zwei Filterpapiere wurden dazu in gekühltem Transferpuffer (Tabelle 16) getränkt. Ein Schwamm wurde in die innere Kammer gelegt, gefolgt von einem Filterpapier und dem Elektrophorese-Gel. Die Nitrozellulosemembran wurde für einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert und auf das Gel aufgelegt. Darauf wurden das verbliebene Filterpapier und der Schwamm geschichtet. Die Blotkammer wurde schließlich mit Transferpuffer gefüllt, und die innere Kammer wurde mit der



Membranseite zur Anode eingelegt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 80 Minuten unter 4°C Kühlung.

**Tabelle 16: Transferpuffer Western-Blot**

Komponente	Art.-Nr. & Hersteller	Endkonzentration
Tris-Base	4855.5; Roth	25 mM
Glycin	23390.03; Serva	200 mM
Methanol	20847.320; VWR	20 %

#### 2.4.4 Immunodetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran entnommen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 %iger BSA Lösung blockiert. Im Anschluss wurde die Membran mit Zielprotein spezifischen Primärantikörpern (Tabelle 17) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde überschüssige Primärantikörperlösung durch dreimaliges Waschen in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBST; Tabelle 18) entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 19) für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

**Tabelle 17: Primärantikörper für Western-Blot Analysen**

Antigen	Art.-Nr. & Hersteller	Spezies	Verdünnung
Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase (PARP)	9532; Cell Signaling	Kaninchen	1 : 250
Active Caspase 3 (a-Casp3)	2302; Abcam	Kaninchen	1 : 200
β-Actin	4967; Cell Signaling	Kaninchen	1 : 2000
α-Glattmuskel-Aktin (αSMA)	A5228; Sigma-Aldrich	Maus	1:1000

Vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-cadherin)	33168; Abcam	Kaninchen	1:1000
<i>Cluster of Differentiation 31</i> (CD31)	Pa851852; Cusabio	Kaninchen	1:1000
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	2118; Cell Signaling	Kaninchen	1:2000

**Tabelle 18: TBST Puffer**

Komponente	Art.-Nr. & Hersteller	Endkonzentration
Tris-Base	4855.5; Roth	10 mM
NaCl	9265.2; Roth	150 mM
Tween-20	Sigma-Aldrich; Art.-Nr. P1379	0,1%

**Tabelle 19: Sekundärantikörper für Western-Blot Analysen**

Antigen	Art.-Nr. & Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti-Kaninchen HRP gekoppelt	111-035-003; Jackson Immuno	Ziege	1 : 10000
Anti-Maus HRP gekoppelt	115-035-044; Jackson Immuno	Ziege	1 : 10000

Die Detektion der Zielproteinbanden erfolgte nach erneutem Waschen in TBST mittels Chemilumineszenzverfahren. Dazu wurde die Substratlösung (WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum, Art.-Nr. 541015, Biozym Scientific, Oldendorf, DE) aufgetragen und die Membran in einem CCD Kamera basierendem Imager System (Amersham Imager 600, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) ausgelesen. Die Intensität der Banden wurde mit der Software ImageJ [59] um den Hintergrund korrigiert und zur Auswertung als Maß für die Menge des exprimierten Proteins herangezogen. Die so ermittelte Proteinexpression

wurde mittels der Ladekontrolle Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) auf die Gesamtmenge des verwendeten Probenmaterials normiert.

#### **2.4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Von primären VEC sezernierte Marker wurden mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Hierzu wurden das *Human IL-6 DuoSet ELISA Kit* (Art.-Nr. DY206-05) und das *Endothelin Pan Specific DuoSet ELISA Kit* (Art.-Nr. DY1160) der Firma R&D Systems (Bio-technie, Minneapolis, MN, USA) nach Herstellerangaben angewandt. Hierbei wurde zunächst eine Mikrotiterplatte mit einem Zielprotein-spezifischen Antikörper (*Capture* Antikörper) beschichtet. Ein entsprechender Standard oder Zellkulturüberstände wurden als Proben zugegeben und inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die ungebundenen Probenanteile in mehreren Waschschritten entfernt und ein weiterer, ebenfalls Zielprotein spezifischer, Biotin-konjugierter Antikörper (*Detection* Antikörper) aufgetragen. Durch einen weiteren Waschschriff wurde ungebundener Antikörper nach Ablauf der Inkubationszeit ebenfalls entfernt. Abschließend wurde Meerrettichperoxidase-konjugiertes Avidin durch 20-minütige Inkubation an den Detection Antikörper gebunden und eine Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben um eine Farbreaktion auszulösen. Die Intensität der Reaktion wurde in einem Mikroplattenleser bei 450 nm gemessen und um den Hintergrund korrigiert. Die Bestimmung aller Proben erfolgte in Duplikaten. Zur Errechnung der Menge des sezernierten Zielproteins wurde eine Standardkurve erstellt.

#### **2.4.6 Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Assay**

Die Zytotoxizität der verwendeten Behandlungen in der Zellkultur wurde mittels LDH Assay (*Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit*, Art.-Nr. PI88953, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt. Die verwendete Methode basiert auf der Detektion von aus beschädigten Zellen freigesetzter Laktatdehydrogenase [60]. Hierbei wurden 50 µl Zellkulturüberstand in Duplikaten in eine 96-Well Platte gegeben und mit Reaktionsreagenz versetzt. Während einer 30-minütigen Inkubationszeit wandelt die LDH aus der Probe Lactat zu Pyruvat um, das folglich verfügbare NADH führt schließlich zu einer kolorimetrischen Reaktion, bei der ein roter Formazanfarbstoff als Produkt entsteht. Die Farbreaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit gestoppt und die Farbtintensität in einem Mikroplattenleser bei 490 nm und 680 nm gemessen.

## 2.5 Statistische Analysen

Die statistische Analyse und grafische Aufarbeitung der erhobenen Daten erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Die Ergebnisse wurden immer als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM, *standard error off the mean*) dargestellt. Die Daten der experimentellen Vergleichsgruppen wurden ab einem p-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant verschieden bezeichnet. Abhängig von der Art der Daten, Gruppengröße und Gruppenanzahl wurden verschiedene Testverfahren verwendet um die erhobenen Datensätze zu analysieren.

Kardinale Variablen, wie das Alter der Spende, wurden zunächst mit einem *D'Agostino – Pearson omnibus normality test* auf parametrische Verteilung untersucht. Alle Spenderdaten lagen als Variablen innerhalb einer Gruppe vor und wurden entsprechend mit einem *one sample t-test* verglichen.

Experimentell erhobenen Daten, die relativ zu einer Kontrolle betrachtet wurden, wurden mittels nicht-parametrischen Analysen verglichen. Hierzu wurde der *Kruskal-Wallis test* mit *Dunn's multiple comparisons test*, sowie ein anschließender zweiseitigen *Mann-Whitney U test* zum paarweisen Vergleich experimenteller Gruppen verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Anlegen einer primären Zellkultur humaner valvulärer Endothelzellen

Im vorliegenden Forschungsprojekt wurde eine humane, primäre Zellkultur von Endothelzellen der Aortenklappe angelegt. Als Ursprungsmaterial wurden Aortenklappen von Patienten, die zwischen Oktober 2018 und Februar 2021 am Universitätsklinikum Düsseldorf Empfänger eines Spenderherzes wurden, verwendet. In einzelnen Fällen wurden darüber hinaus auch Klappen verwendet, die bei Herzklappenersatzoperationen intraoperativ durch den Chirurgen als makroskopisch regelrecht beurteilt wurden.

#### 3.1.1 Klinische Daten der Spenderkohorte

Endothelzellen der Aortenklappe wurden aus Gewebespenden (n=11) von Empfängern orthotoper Herztransplantationen (73 %) oder von Patienten nach Klappenersatz-operation (27 %) gewonnen. Die Spender waren signifikant häufiger männlichen als weiblichen Geschlechts, Alter und *body mass index* (BMI) der Kohorte waren normalverteilt. Der durchschnittliche BMI aller Spender lag bei  $28 \pm 5$  und wich daher nicht signifikant vom oberen Grenzwert der Präadipositas (29,9; [61]) ab. Bezogen auf die Gesamtheit der Spender litten 45 % an arterieller Hypertonie, andere erhobene kardiovaskuläre Risikofaktoren, sowie Komorbiditäten, traten selten auf (Chronische Niereninsuffizienz: 27%; koronare Herzkrankheit: 18 %; Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Dyslipoproteinämie: 9 %; Tabelle 20). Als Medikation nahmen 73 % Diuretika, 55 % Antikoagulanzen und 36 % Statine ein. Blutdruckmedikation wurde ebenfalls erfasst, jedoch lediglich von einem geringen Anteil der Kohorte eingenommen (27 %). Die präoperativen Laborwerte zeigten im Mittel eine Thrombozytenzahl von  $222.000 \pm 46 /\mu\text{l}$ , einen C-reaktives Protein (CRP) Wert von  $2 \pm 2 \text{ mg/dl}$  und eine Leukozytenzahl von  $8.000 \pm 4 /\mu\text{l}$  wobei alle Werte im Normbereich (Thrombozyten:  $<400.000$ , CRP:  $<5$ , Leukozyten  $<10.000$ ) lagen (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Spenderkohorte zur Isolation primärer Endothelzellen der Aortenklappe**

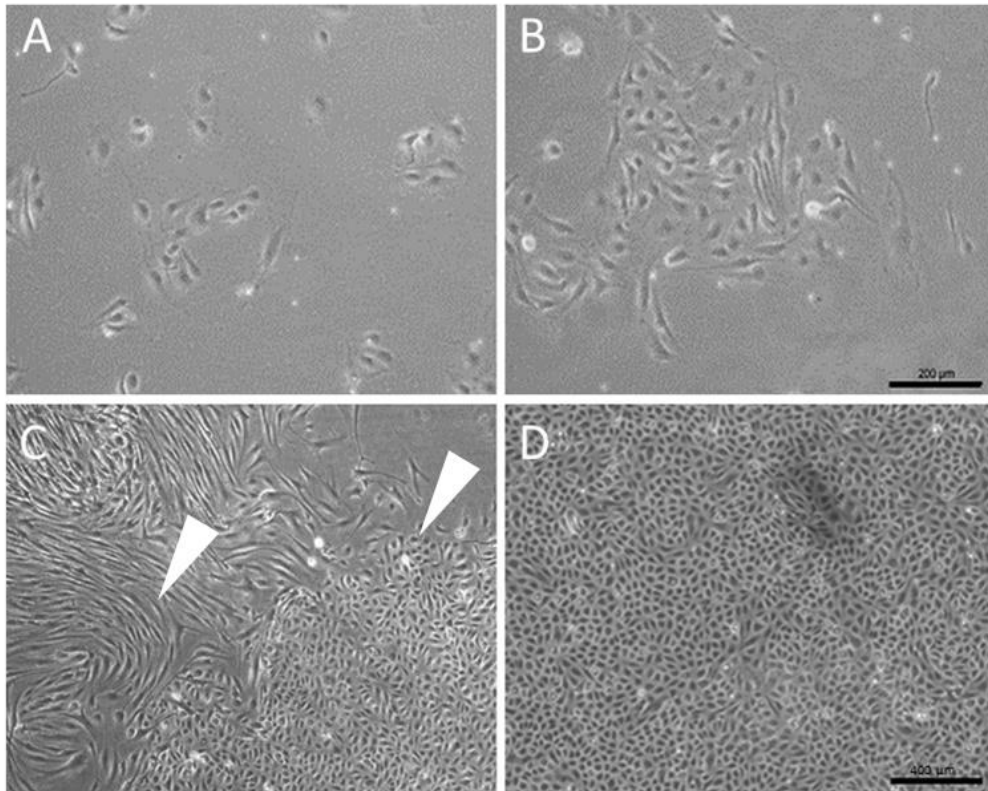
Klinische Parameter der Patienten, deren Gewebespende (Aortenklappentaschen) zur Isolation primärer Endothelzellen verwendet wurde. Kategoriale Variablen sind als Anzahl betroffener Spender (n) und prozentualer Anteil dieser an der Gesamtgruppe (%) dargestellt und kardinale Variablen sind als Mittelwert  $\pm$  SEM aufgeführt. Kardinale Variablen wurden erst mit einem *D'Agostino – Pearson omnibus normality test* auf parametrische Verteilung untersucht, dann wie die übrigen Parameter mittels *one sample t-test* verglichen, wobei der BMI und Laborwerte im Vergleich zu maximalen Referenzwerten analysiert wurden. Abkürzungen: n.v. – normalverteilt, BMI – *body mass index*, n.a. – nicht auswertbar, ACE – Angiotensin konvertierendes Enzym.

	alle Patienten	Unterschied (p-Wert)
<b>Spender [Anzahl], n</b>	11	
<b>Geschlecht [männlich], n (%)</b>	8 (73)	<b>0,0004</b>
<b>Alter [Jahre]</b>	60 $\pm$ 13	n.v.
<b>Körpermasseindex [kg/m<sup>2</sup>]</b>	28 $\pm$ 5	0,1751
<b>Primärindikation, n (%)</b>		
Herztransplantationsempfänger	8 (73)	<b>0,0004</b>
Klappenersatz	3 (27)	0,0816
<b>kardiovaskuläre Risikofaktoren, n(%)</b>		
Raucher oder ehemalige Raucher	1 (9)	0,3409
arterielle Hypertonie	5 (45)	<b>0,0162</b>
Dyslipoproteinämie	1 (9)	0,3409
<b>Komorbiditäten, n (%)</b>		
Chronische Niereninsuffizienz	3 (27)	0,0816
koronare Herzkrankheit	2 (18)	0,1669
extrakardiale Gefäßerkrankungen	0 (0)	n.a.
Diabetes mellitus	1 (9)	0,3409
<b>Medikamente, n (%)</b>		
Statine	4 (36)	<b>0,0379</b>
Diuretika	8 (73)	<b>0,0004</b>
ACE-Hemmer	3 (27)	0,0816
$\beta$ -Adrenorezeptor-Antagonisten	3 (27)	0,0816
Antikoagulanzen	6 (55)	<b>0,0061</b>
<b>Laborwerte</b>		
Thrombozyten [x1000/ $\mu$ l]	222 $\pm$ 46	<b>&lt;0,0001</b>
Leukozyten [x1000/ $\mu$ l]	8 $\pm$ 4	<b>0,0158</b>
C-reaktives Protein [mg/dl]	2 $\pm$ 2	<b>&lt;0,0001</b>

### 3.1.2 Aufreinigung und Charakterisierung der Zellpopulation

Die aus dem Spendergewebe isolierten Zellen wurden Anhand ihrer Bindung über den Endothelzellmarker CD31 aufgereinigt und anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen den zusätzlichen Endothelmarker von Willebrand Faktor, sowie den mesenchymalen Marker  $\alpha$ SMA charakterisiert, um eine möglichst reine Kultur zu gewährleisten.

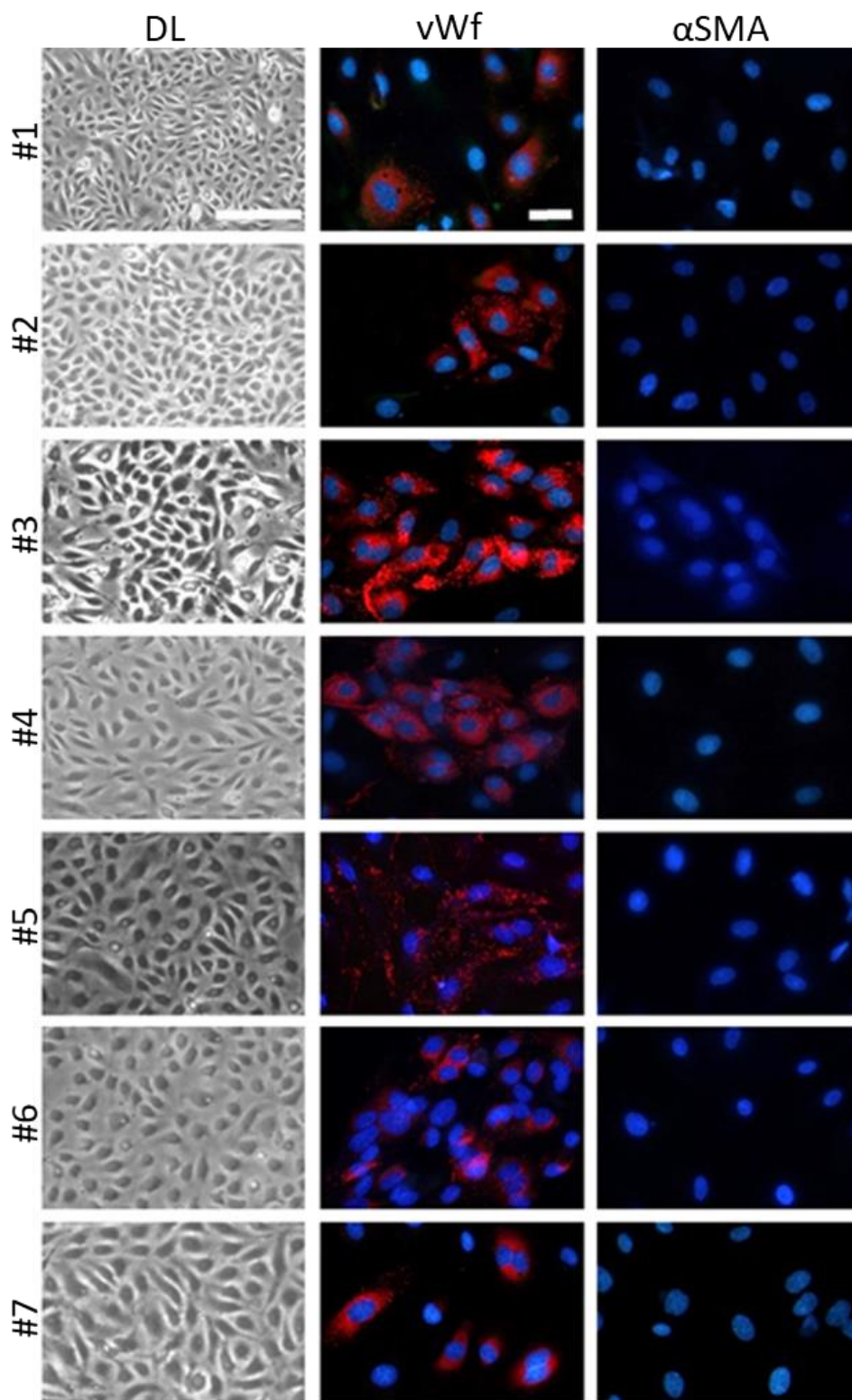
Die Zellen waren nach 24 h am Boden der Kulturf Flasche adhärent und nach durchschnittlich 48 h (Abbildung 9, A) konnte makroskopisch eine Proliferation beobachtet werden. Die Zellen ordneten sich im Verlauf zunächst in Gruppierungen an (Abbildung 9, B) und bei Konfluenz zeigten sich zwei morphologisch distinkte Zellpopulationen (Abbildung 9, C). Nach der magnetischen Zellseparation mittels Bindung über CD31 zeigte die Kultur schließlich eine homogene Zellpopulation mit rundlicher, kopfsteinpflasterartiger Morphologie (Abbildung 9, D).



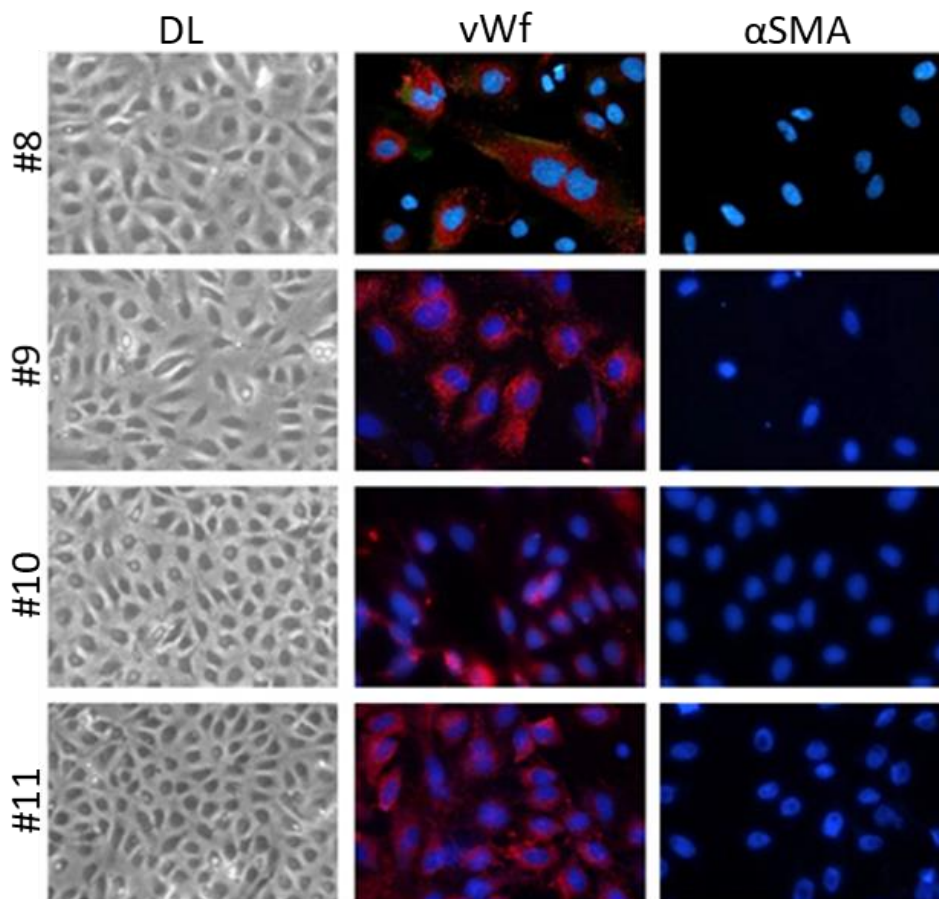
**Abbildung 9: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von primären VEC im Verlauf nach Isolation**

Durchlichtmikroskopie primärer humaner VEC 48 h (A) und 4 Tage (B) nach Isolation. An Tag 7 waren zwei morphologisch distinkte Zellpopulationen zu erkennen (C), davon eine Population mit spindelförmig elongierter Form (Pfeil links, C) und eine weitere mit rundlicher Erscheinung (Pfeil rechts, C) geformt. Nach der magnetischen Zellseparation zeigte sich eine homogene Zellpopulation mit rundlicher, kopfsteinpflasterartiger Morphologie (D). Maßstab 200 µm (A, B) bzw 400 µm (C, D).

Die Immunfluoreszenzfärbung der aufgereinigten Zellpopulation gegen von Willebrand Faktor zeigte bei allen Spendern ein positives Signal (Abbildung 10, vWf) bei gleichzeitig negativem Signal in der  $\alpha$ SMA Färbung (Abbildung 10,  $\alpha$ SMA).







**Abbildung 10: Immunfluoreszenzbasierte Charakterisierung primärer humaner VEC.**

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen (DL) isolierter primärer humaner VEC aller Spender (#1-11) zeigten eine kopfsteinpflasterartige Morphologie. Immunfluoreszenzfärbung gegen von Willebrand Faktor (vWf, rot) zeigte ein positives Signal bei gleichzeitig negativer *alpha smooth muscle actin* Färbung ( $\alpha$ SMA, grün). Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid blau gefärbt. Maßstab 100  $\mu$ m (DL) bzw. 50  $\mu$ m (vWf,  $\alpha$ SMA).

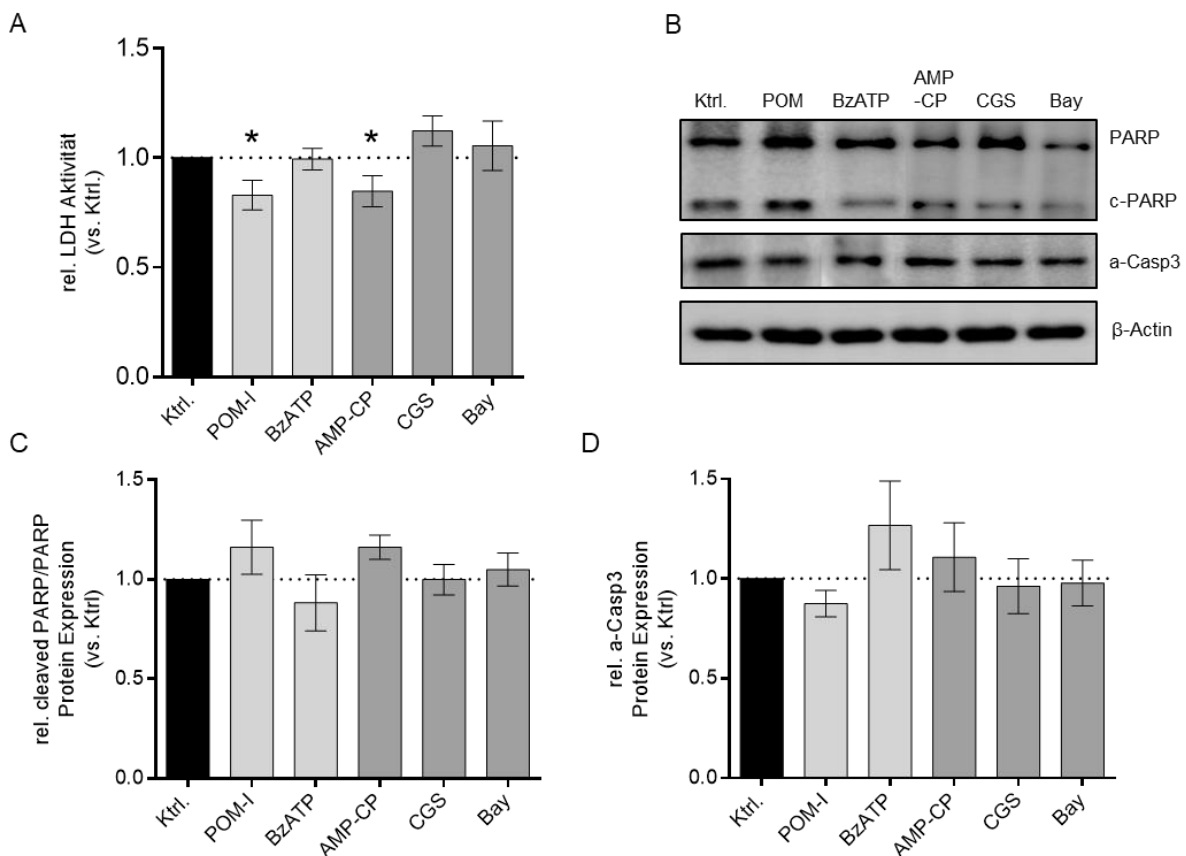
### 3.2 Manipulation der purinergen Signalkaskade in primären humanen VEC

Die purinerge Signalkaskade der primären humanen VEC wurde durch Behandlung mit Inhibitoren der Schlüsselenzyme CD73 (*Adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene)diphosphate*; AMP-CP) und CD39 (*Sodium polyoxotungstate*; POM-I), sowie mit Agonisten der P2 (*2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt*; BzATP) und A<sub>2</sub>-Rezeptoren (für A<sub>2A</sub>: *CGS-21680 hydrochloride hydrate*; CGS und für A<sub>2B</sub>: *BAY 60-6583*; Bay) manipuliert, um die Auswirkung einer Dysregulation dieses Systems zu untersuchen. Der Einfluss auf die Funktionalität der Endothelzellen wurden nach 24-stündiger Inkubation analysiert.

### 3.2.1 Überprüfung auf zytotoxische Effekte

Die eingesetzten Substanzen wurden zunächst mittels LDH Assay hinsichtlich möglicher zytotoxischer Wirkung auf die VEC Kultur untersucht.

Die LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen war, im Vergleich zur Kontrolle, durch keine der Behandlungen signifikant erhöht. Zellen, die mit POM-I oder AMP-CP behandelt wurden, zeigten eine Reduktion der LDH Aktivität ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 11 A).



**Abbildung 11: Effekte der eingesetzten Substanzen auf Zellschädigung und Apoptosemarker in VEC**

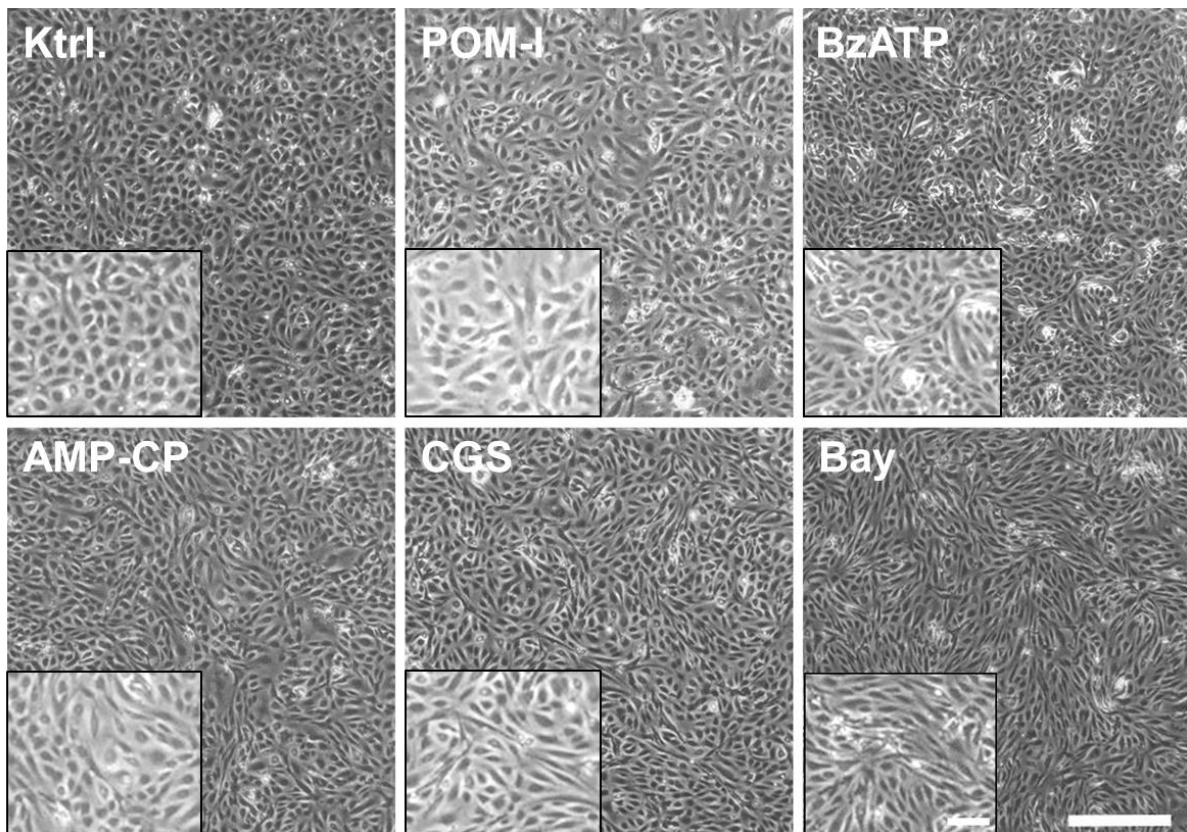
Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 24 h mit Inhibitoren der Schlüsselenzyme des purinergen Signalings (10  $\mu$ M POM-I: CD39 Inhibitor; 10  $\mu$ M AMP-CP: CD73 Inhibitor), oder mit Agonisten der P2 (25  $\mu$ M BzATP) und A<sub>2</sub>-Rezeptoren (A<sub>2A</sub>: 10  $\mu$ M CGS; A<sub>2B</sub>: 10  $\mu$ M Bay) behandelt. Dargestellt ist die relative LDH Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) (n=10 pro Behandlung) (A). Die Apoptosemarker Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP), gesplante PARP (*cleaved PARP*; c-PARP) und aktivierte Caspase 3 (a-Casp3) wurden mittels Western-Blot bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Analysen. Zur Normierung wurde die Expression von  $\beta$ -Actin herangezogen (B). Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl) dargestellt (C/D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n $\geq$ 5 pro Behandlung). Die Statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

Zusätzlich zur LDH Analyse wurde die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine in Zelllysaten der behandelten VEC untersucht. Das Enzym Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP) katalysiert in vitalen Zellen die DNA-Reparatur und ist im Zellkern lokalisiert. Kommt es zur Apoptose, wird PARP als erstes Molekül gespalten (*cleaved PARP*; c-PARP) und das Verhältnis dieses Spaltproduktes kann als Marker für beginnende apoptotische Prozesse herangezogen werden [62]. Als weiterer Marker wurde die aktivierte Form der Caspase 3 (a-Casp3) untersucht, welche unter apoptotischen Bedingungen vorliegt und verschiedene Strukturproteine der Zelle abbaut [63]. Das Verhältnis von gespaltenener PARP zur nicht-gespaltenen Form war unter keiner Behandlung signifikant erhöht (Abbildung 11 B/C). Die Proteinexpression der aktivierten Caspase 3 in VEC war ebenfalls unter keiner Bedingung signifikant erhöht (Abbildung 11 B/D).

### **3.2.2 Auswirkung der Manipulation der purinergen Signalkaskade auf die Funktionalität primärer humaner VEC**

Die Effekte der Manipulation der purinergen Signalkaskade in primären humanen VEC wurden zunächst hinsichtlich der Zellfunktionalität untersucht. Hierbei standen verschiedene Marker der endothelialen Dysfunktion im Fokus, die in der Literatur bereits mit Pathologien des Herzkreislaufsystems in Zusammenhang gebracht wurden. Morphologie, Sekretion und Proteinexpression der Zellen wurden nach 24 stündiger Behandlung analysiert.

Morphologisch zeigten unbehandelte Zellen (Ktrl.) nach 24 h weiterhin eine homogene, rundliche Form. Unter Behandlung mit POM-I und BzATP konnte diese Zellform weiterhin bei einem großen Anteil der Population beobachtet werden, jedoch durchzogen mit spindelförmigen Zellen. AMP-CP und CGS Behandlung führten zu einem ähnlichen morphologischen Bild mit deutlichen Anteilen spindelförmiger, gestreckter Zellen. Die mit Bay behandelten VEC zeigten ausschließlich die bereits beschriebene, gestreckte Morphologie (Abbildung 12).

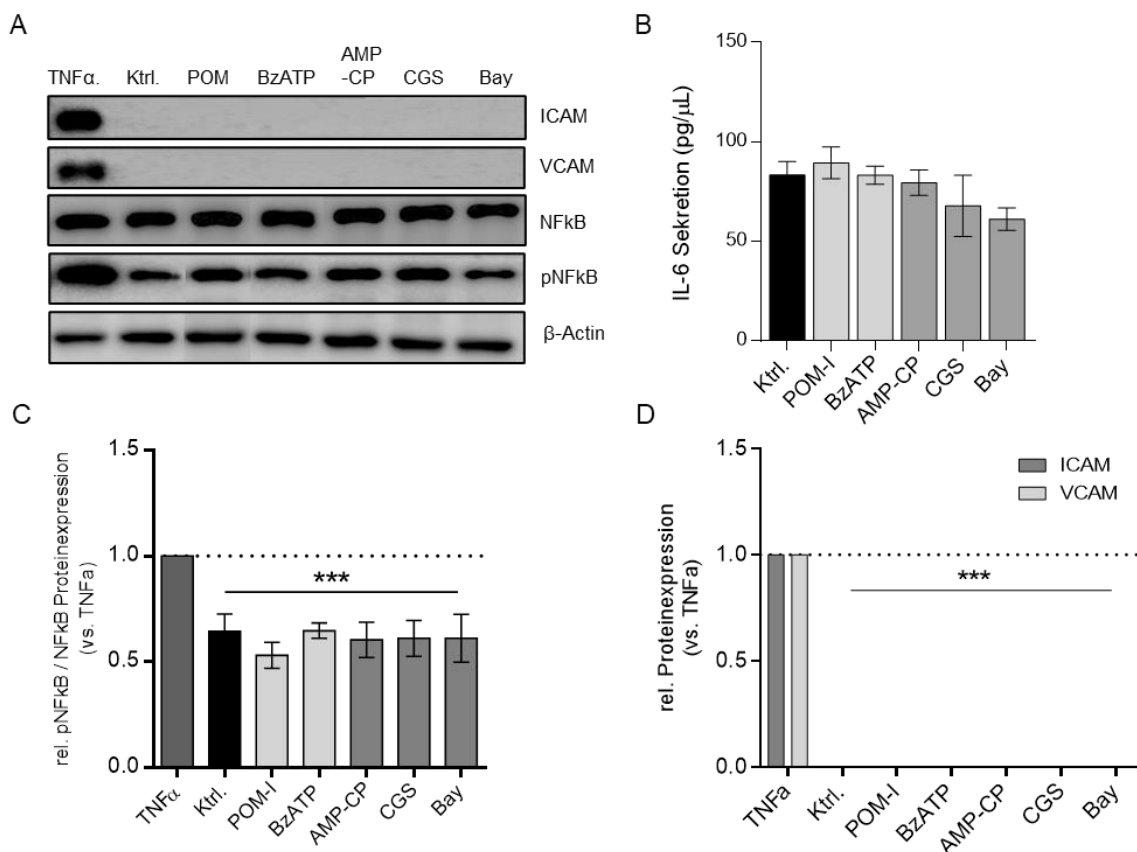


**Abbildung 12: Morphologie primärer humaner VEC nach Manipulation der purinergen Signalkaskade.**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 24 h mit Inhibitoren der Schlüsselenzyme der purinergen Signalkaskade (10  $\mu\text{M}$  POM-I: CD39 Inhibitor; 10  $\mu\text{M}$  AMP-CP: CD73 Inhibitor), oder mit Agonisten der P2 (25  $\mu\text{M}$  BzATP) und A<sub>2</sub>-Rezeptoren (A<sub>2A</sub>: 10  $\mu\text{M}$  CGS; A<sub>2B</sub>: 10  $\mu\text{M}$  Bay) behandelt. Die Morphologie der Zellen wurde durchlichtmikroskopisch festgehalten. Dargestellt sind repräsentative Bilder. Maßstab 400  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2.1 Keine inflammatorische Aktivierung von VEC durch Manipulation der purinergen Signalkaskade

Die Proteinexpression der etablierten Inflammationsmarker interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), vaskuläres Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) und dessen phosphorylierte Form (pNF $\kappa$ B) wurden mittels Western-Blot analysiert. ICAM-1 und VCAM-1 sind Adhäsionsmoleküle, die von aktiviertem Endothel exprimiert werden und die Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen der Inflammationsantwort vermitteln [64, 65]. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wird durch Phosphorylierung (pNF $\kappa$ B) aktiviert und reguliert in Folge zahlreiche Gene, die im Zusammenhang mit einer Inflammationsantwort stehen [66].



**Abbildung 13: Keine inflammatorische Aktivierung von VEC durch Manipulation der purinergen Signalkaskade.**

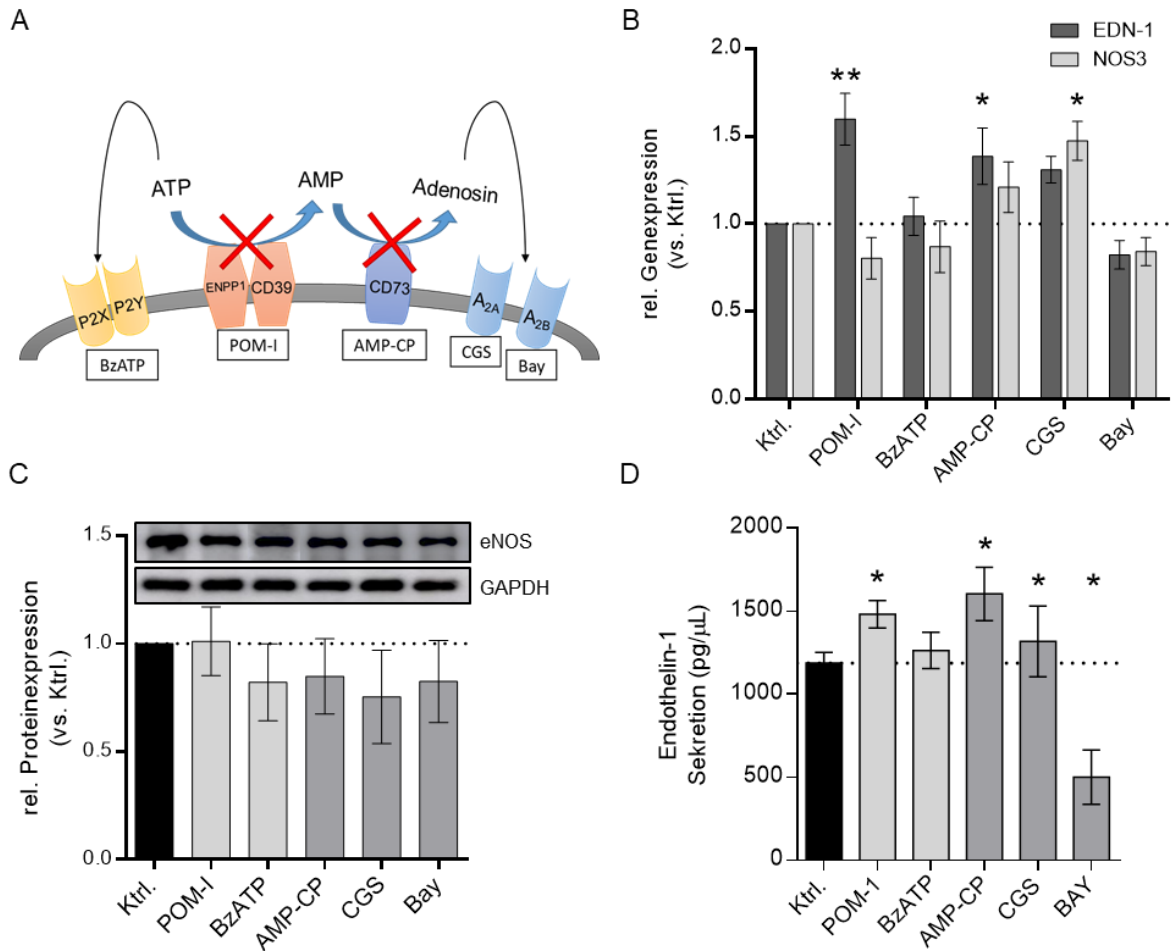
Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 24 h mit Inhibitoren der Schlüsselenzyme der purinergen Signalkaskade (10  $\mu$ M POM-I: CD39 Inhibitor; 10  $\mu$ M AMP-CP: CD73 Inhibitor), oder mit Agonisten der P2 (25  $\mu$ M BzATP) und A2-Rezeptoren (A<sub>2A</sub>: 10  $\mu$ M CGS; A<sub>2B</sub>: 10  $\mu$ M Bay) behandelt. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Western-Blot Analyse (A), sowie die relative Proteinexpression im Vergleich zur inflammatorisch aktivierten Kontrolle (TNF $\alpha$ , C/D). Zusätzlich wurde die Interleukin-6 (IL-6) Sekretion der Zellen in das Medium mittels ELISA bestimmt (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n $\geq$ 8 pro Behandlung). \*\*\*p<0,001 vs. TNF $\alpha$  (C/D). Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

In den behandelten Zellen war die Proteinexpression von keinem der Adhäsionsmoleküle im Vergleich zur TNF $\alpha$  stimulierten Kontrolle nachweisbar (Abbildung 13 A/D). Das Verhältnis von pNF $\kappa$ B zu NF $\kappa$ B war ebenfalls nicht erhöht (Abbildung 13 A/C). Zusätzlich zur Proteinexpression wurde die Interleukin 6 (IL-6) Sekretion der behandelten VEC mittels ELISA bestimmt. IL-6 ist ein bekanntes pro-inflammatorisches Zytokin, welches zahlreiche Effekte innerhalb von Entzündungs- und Immunreaktionen hat [67, 68]. Die behandelten VEC zeigten keine erhöhte IL-6 Sekretion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13 B).

### 3.2.2.2 Dysregulation der purinergen Signalkaskade begünstigt endotheliale Dysfunktion in VEC

Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion kann die Beteiligung des Endothels an der Regulation der Hämostase und des Gefäßtonus gestört sein. Das wichtigste, von Endothelzellen freigesetzte, Vasorelaxans, ist Stickstoffmonoxid (NO), dessen Synthese durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) katalysiert wird. Einer der potentesten Vasokonstriktoren hingegen ist Endothelin-1, welches ebenfalls von Endothelzellen freigesetzt wird und dessen Synthese hauptsächlich auf Genebene reguliert wird [69]. Die Balance zwischen relaxierenden und kontrahierenden Faktoren ist unter physiologischen Bedingungen die Voraussetzung für die kardiovaskuläre Homeostase [14, 15].

Die mRNA Expression von *NOS3* (eNOS) und *EDN-1* (Endothelin-1) wurde in den behandelten VEC nach 24 h mittels qRT-PCR untersucht. Bei Inhibition von CD39 und ENPP1 durch POM-I konnte eine signifikant erhöhte Expression von *EDN-1* ( $p < 0,01$ , Abbildung 14 B) gemessen werden. Die Inhibition von CD73 durch AMP-CP führte ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der *EDN-1* Expression ( $p < 0,05$ , Abbildung 14 B). Im Gegensatz dazu führte keine der Behandlungen mit Rezeptor-Agonisten zu Veränderungen der *EDN-1* Genexpression. Die Expression von *NOS3* wurde nur durch den  $A_{2A}$  Rezeptor-Agonisten CGS signifikant erhöht ( $p < 0,05$ , Abbildung 14 B). Auf Proteinebene wurde die eNOS Expression mittels Western-Blot und die EDN-1 Sekretion per ELISA analysiert. Die eNOS Expression war durch keine Behandlung signifikant verändert (Abbildung 14 C) während die EDN-1 Sekretion, wie auch auf Genexpressionsebene, unter Inhibition der Schlüsselenzyme mit POM-I oder AMP-CP signifikant erhöht war ( $p < 0,05$ , Abbildung 14 D). Zusätzlich führte hier auch die Behandlung mit dem  $A_{2A}$  Rezeptor-Agonisten CGS zu einer erhöhten Sekretion ( $p < 0,05$ , Abbildung 14 D). Im Gegensatz dazu war die EDN-1 Sekretion unter Behandlung mit dem  $A_{2B}$  Agonisten Bay signifikant reduziert ( $p < 0,05$  Abbildung 14 D).



**Abbildung 14: Erhöhte Endothelin-1 Expression durch Dysregulation der purinergen Signalkaskade in VEC**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 24 h mit Inhibitoren der Schlüsselenzyme der purinergen Signalkaskade (10  $\mu$ M POM-I: CD39 Inhibitor; 10  $\mu$ M AMP-CP: CD73 Inhibitor), oder mit Agonisten der P2 (25  $\mu$ M BzATP) und A<sub>2</sub>-Rezeptoren (A<sub>2A</sub>: 10  $\mu$ M CGS; A<sub>2B</sub>: 10  $\mu$ M Bay) behandelt (A). Dargestellt sind die mRNA Expression von Endothelin-1 (EDN-1) und eNOS (NOS3) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl) (B). Die Proteinexpression von eNOS wurde mittels Western-Blot analysiert. Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl) dargestellt. Zur Normierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen (C). Die Sekretion von EDN-1 in den Zellkulturüberstand der VEC wurde mittels ELISA untersucht (D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n $\geq$ 5 pro Behandlung). \*p<0,05 \*\*p<0,01 vs. Ktrl. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

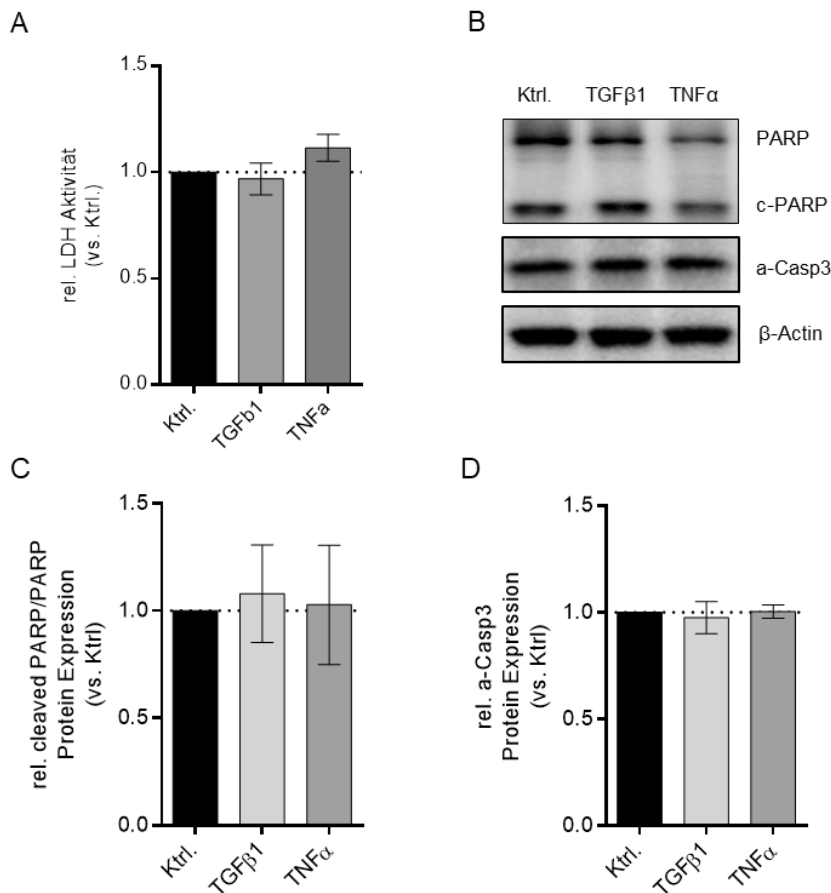
### **3.3 Untersuchung von EndMT Potential und Induktion in primären humanen VEC**

Einer der wohl bekanntesten und am besten untersuchten Induktoren von EndMT ist TGF $\beta$ 1 und findet entsprechend in vielen Studien Anwendung [49, 50]. Ein weiterer bekannter Stimulus, der nachweislich zu EndMT führt, ist TNF $\alpha$  [32]. Diese beiden Induktoren wurden gemäß der Literatur eingesetzt [51] und zunächst die Effekte der Behandlung im Hinblick auf Toxizität und EndMT analysiert.

#### **3.3.1 Überprüfung auf Zytotoxische Effekte**

Die eingesetzten Konzentrationen von TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  wurden anhand von Literaturrecherchen gewählt und daher zunächst mittels LDH Assay und Western-Blots hinsichtlich möglicher zytotoxischer Wirkung auf die VEC Kultur untersucht. Die LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen war, im Vergleich zur Kontrolle, weder durch 10 ng/ml TGF $\beta$ 1, noch durch 5 ng/ml TNF $\alpha$  signifikant erhöht (Abbildung 15 A). Die Expression Apoptose-assoziiertes Proteine wurde in Zelllysaten der behandelten VEC untersucht. Das Verhältnis von gespaltenen PARP zur nicht-gespaltenen Form war unter keiner der beiden Behandlungen signifikant erhöht. Die Proteinexpression der aktivierten Caspase 3 zeigte ebenfalls keine Unterschiede (Abbildung 15 B-D).





**Abbildung 15: Effekte von TGFβ1 und TNFα Behandlung auf Laktat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität und Apoptosemarker in VEC**

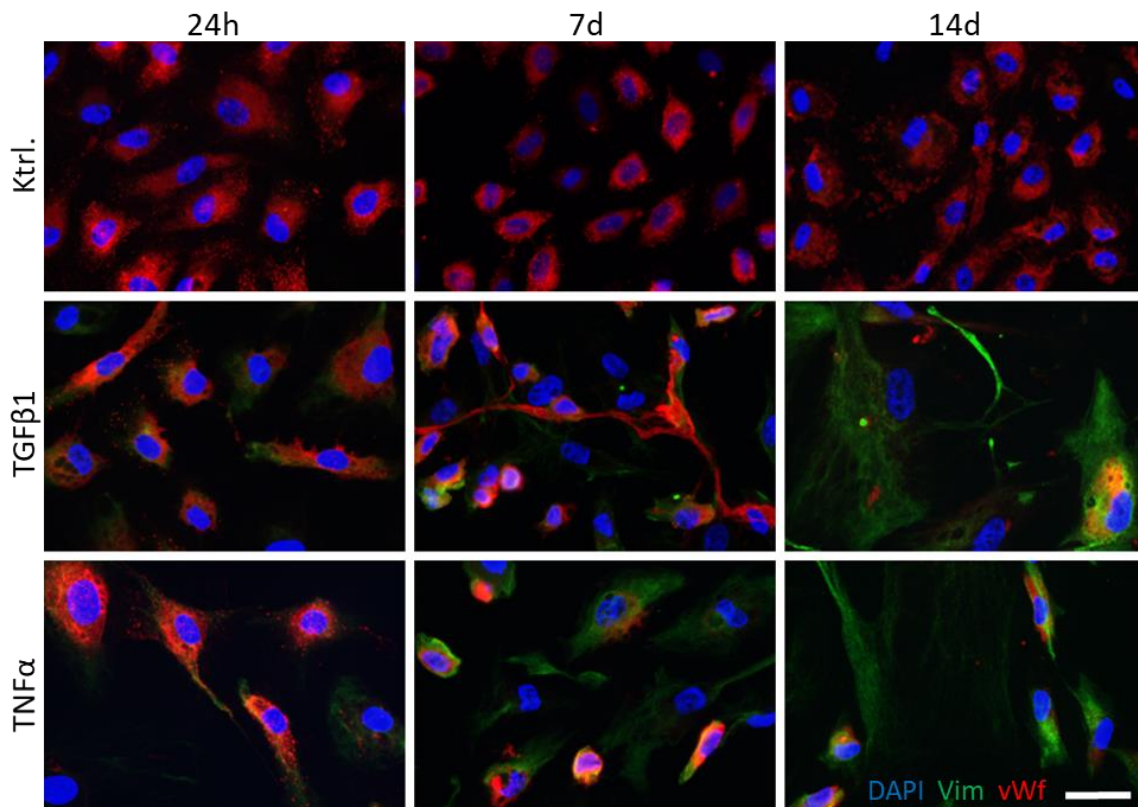
Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 24 h mit TGFβ1 (10 ng/ml) oder TNFα (5 ng/ml) behandelt. Dargestellt ist die relative LDH Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) (n=10 pro Behandlung) (A). Die Apoptosemarker Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), gesplante PARP (*cleaved PARP*; c-PARP) und aktivierte Caspase 3 (a-Casp3) wurden mittel Western-Blot bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Analysen. Zur Normierung wurde die Expression von β-Actin herangezogen (B). Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt (C/D). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM abgebildet (n≥5 pro Behandlung).

### 3.3.2 Bestimmung der EndMT Dauer

Die Endotheliale zu Mesenchymale Transition ist ein gradueller Prozess und kann je nach Zellursprung und Stimulus innerhalb weniger Tage bis hin zu mehreren Wochen verlaufen. In der Literatur finden sich für *in vitro* Versuche Zeitspannen von 24 h bis 21 Tagen, sodass zunächst ein geeigneter Zeitpunkt für die EndMT Induktion bestimmt wurde.

Die Immunfluoreszenzfärbung der mit TGFβ1 oder TNFα behandelten VEC zeigte nach 24 h eine gleichmäßige vWf Expression bei leichtem Vimentinsignal in den Behandlungen im

Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Nach 7 Tagen nahm das Vimentinsignal zu und die Zellmorphologie zeigte unter beiden Behandlungen eine stärkere Spindelform. Gleichzeitig war das vWf Signal in den mit TNF $\alpha$  behandelten Zellen stark reduziert. Die 14 tägige Inkubationsdauer zeigte schließlich sowohl morphologisch als auch in der Signalverteilung alle Charakteristika einer EndMT bei regelrechter Kontrolle. Unter beiden Behandlungen war zu diesem Zeitpunkt ein prominentes Vimentinsignal sichtbar und gleichzeitig nur noch stellenweise vWf nachweisbar. Die Form der Zellen war vollständig elongiert und spindelförmig auslaufend (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Komplette EndMT in primären humanen VEC nach 14 Tagen**

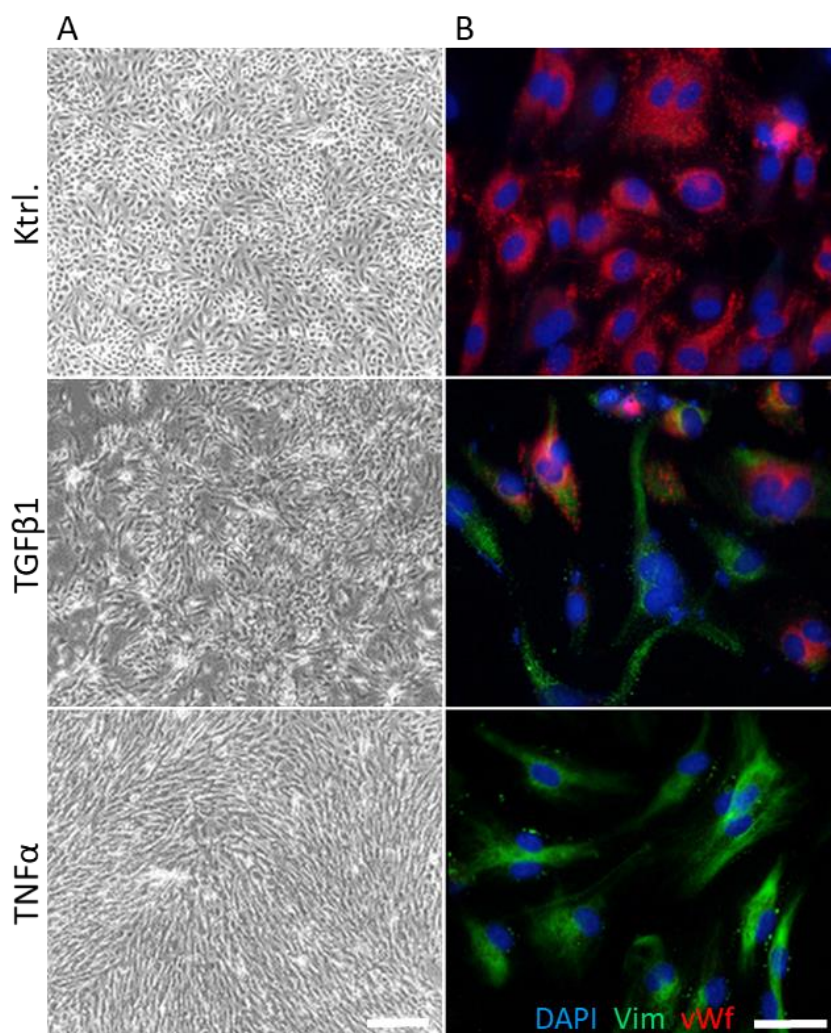
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer humaner VEC nach EndMT Induktion mit TGF $\beta$ 1 (10 ng/ml) oder TNF $\alpha$  (5 ng/ml) nach 24 Stunden (24h), 7 Tagen (7d) und 14 Tagen (14d). Immunfluoreszenzfärbung gegen von Willebrand Faktor (vWf, rot) und Vimentin (Vim, grün). Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) blau gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bilder. Maßstab 50  $\mu$ m.

### 3.3.3 TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$ induzieren EndMT in VEC nach 14 Tagen

Als Referenz wurde zunächst eine EndMT mittels der bekannten Induktoren TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  über 14 Tage induziert und die Zellmorphologie und Proteinexpression der endothelialen

Marker vWf, CD31 und VE-cadherin, sowie die mesenchymalen Marker Vimentin und  $\alpha$ SMA analysiert.

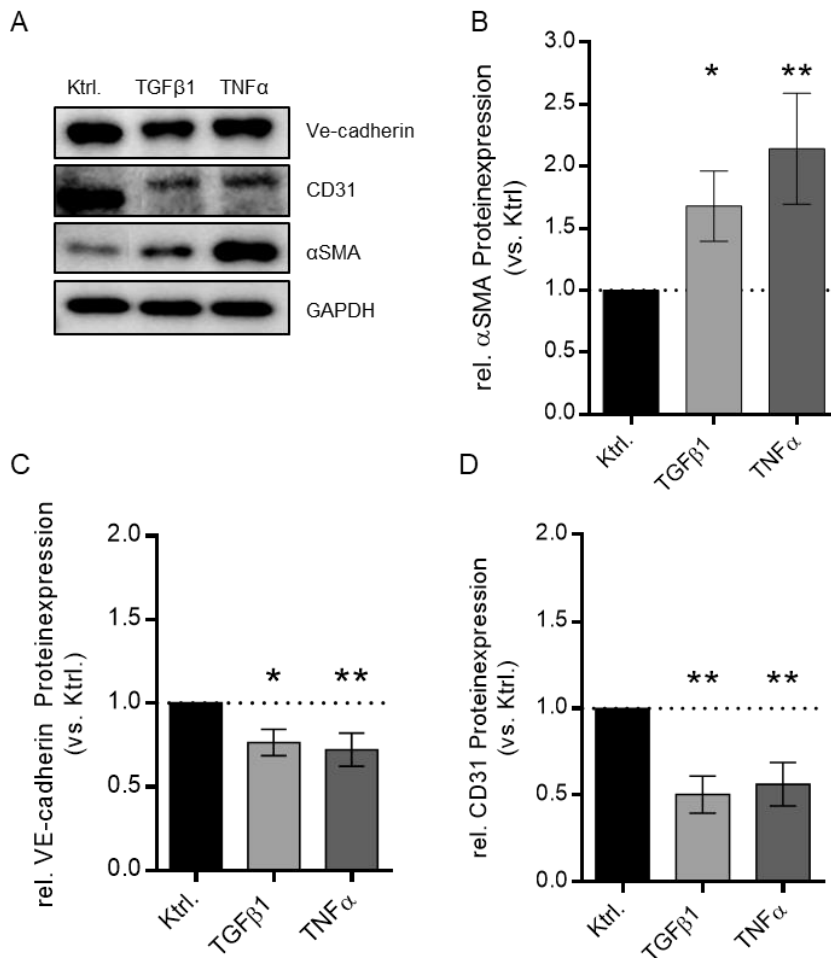
Die unbehandelten Zellen zeigten nach 14 Tagen weiterhin eine regelrechte Morphologie mit Kopfsteinpflaster-artiger Anordnung und Form (Ktrl., Abbildung 17 A), sowie eine gleichmäßige vWf Expression ohne nachweisbares Vimentinsignal (Ktrl., Abbildung 17 B). Eine Behandlung mit TGF $\beta$ 1 führte zu einer inhomogenen Morphologie mit zahlreichen spindelförmig gestreckten Zellen (TGF $\beta$ 1, Abbildung 17 A) und reduzierter vWf Expression bei deutlichem Vimentinsignal (TGF $\beta$ 1, Abbildung 17 B). Die Stimulation mit TNF $\alpha$  führte zu einer homogenen, spindelförmigen Morphologie (TNF $\alpha$ , Abbildung 17 A) bei ausbleibender vWf Expression und gleichmäßigem Vimentinsignal (TNF $\alpha$ , Abbildung 17 B).



**Abbildung 17: TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  induzieren EndMT in primären humanen VEC nach 14 Tagen**

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen primärer humaner VEC (A) sowie Immunfluoreszenzfärbung gegen von Willebrand Faktor (vWf, rot) und Vimentin (Vim, grün) nach EndMT Induktion mit TGF $\beta$ 1 (10 ng/ml) oder TNF $\alpha$  (5 ng/ml) für 14 Tage. Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid blau gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bilder. Maßstab 100  $\mu$ m (Durchlicht) bzw. 50  $\mu$ m (Fluoreszenz).

Die Western-Blot Analyse der behandelten VEC zeigte eine signifikant erhöhte Expression des mesenchymalen Markers  $\alpha$ SMA unter beiden Behandlungen (TGF $\beta$ 1  $p < 0,05$ , TNF $\alpha$   $p < 0,01$ ; Abbildung 18 A/B) bei gleichzeitig signifikant reduzierter Expression der endothelialen Marker VE-cadherin (TGF $\beta$ 1  $p < 0,05$ , TNF $\alpha$   $p < 0,01$ ; Abbildung 18 A/C) und CD31 (TGF $\beta$ 1  $p < 0,01$  Abbildung 18 A/D).



**Abbildung 18: EndMT Induktion mit TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  in primären humanen VEC**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 24 h mit TGF $\beta$ 1 (10 ng/ml) oder TNF $\alpha$  (5 ng/ml) behandelt und mittels Western-Blot hinsichtlich *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA, B), VE-cadherin (C) und CD31 Expression (D) untersucht. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Analysen. Zur Normierung wurde die Expression von  $\beta$ -Actin herangezogen (A). Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt (B-D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n=11 pro Behandlung). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

### **3.4 Einfluss der purinergen Signalkaskade auf die EndMT in primären humanen VEC**

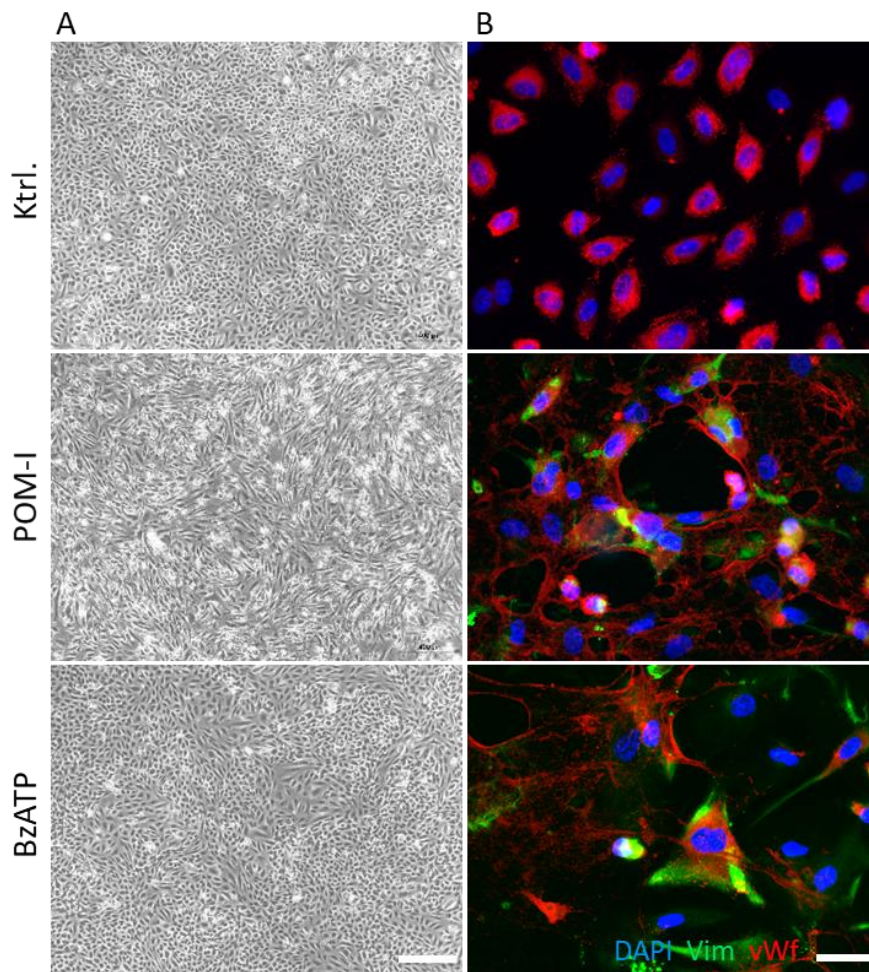
Der Einfluss der purinergen Signalkaskade auf die EndMT in primären humanen VEC wurde mithilfe der in 3.2 etablierten Behandlungen untersucht. Als Referenz wurde eine EndMT mittels der bekannten Induktoren TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  in den gewonnenen Zellen etabliert und analysiert (siehe 3.3.3). Anschließend wurden die Marker dieser Versuche auch in den Proben der mit den Inhibitoren und Agonisten der purinergen Signalkaskade behandelten Zellen untersucht.

#### **3.4.1 Gesteigerte ATP-Wirkung induziert EndMT in primären humanen VEC**

Um die Rolle von extrazellulärem ATP bei der EndMT in VEC zu untersuchen, wurden die Zellen für 14 Tage mit dem CD39 Inhibitor POM-I oder mit dem P2 Rezeptor Agonisten BzATP, einem synthetischen ATP Analogon, behandelt und hinsichtlich der Proteinexpression der etablierten EndMT Marker (siehe 3.3.3) analysiert.

Die unbehandelten Zellen zeigten nach 14 Tagen auch hier weiterhin eine regelrechte Morphologie mit kopfsteinpflasterartiger Anordnung und Form (Ktrl., Abbildung 19 A), sowie eine gleichmäßige vWf Expression ohne nachweisbares Vimentinsignal (Ktrl., Abbildung 19 B). Eine Behandlung mit POM-I führte zu einer homogenen, spindelförmigen Morphologie (POM-I, Abbildung 19 A) und netzartiger Ausbreitung der Zellkörper bei leicht reduzierter vWf Expression und positivem Vimentinsignal (POM-I, Abbildung 19 B). Die Stimulation mit BzATP führte zu einer inhomogenen Zellmorphologie mit Ansammlungen spindelförmig gestreckter Zellen (BzATP, Abbildung 19 A) und vereinzelt netzartiger Ausbreitung der Zellkörper bei leicht reduzierter vWf Expression und positivem Vimentinsignal (BzATP, Abbildung 19 B).

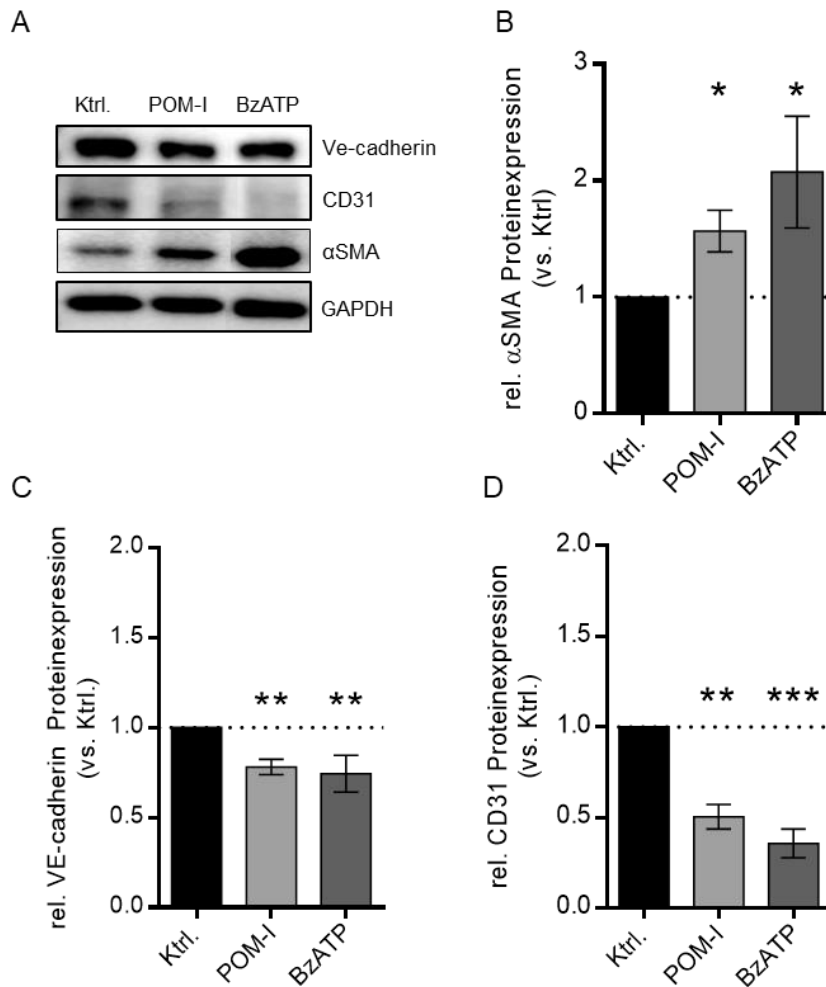




**Abbildung 19: Gesteigerte ATP-Wirkung induziert EndMT Phänotyp in primären humanen VEC**

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen primärer humaner VEC (A) sowie Immunfluoreszenzfärbung gegen von Willebrand Faktor (vWf, rot) und Vimentin (Vim, grün) nach Behandlung mit dem CD39 Inhibitor POM-I (10 µM) oder dem P2 Rezeptor Agonist BzATP (25 µM) für 14 Tage. Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid blau gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bilder. Maßstab 100 µm (Durchlicht) bzw. 50 µm (Fluoreszenz).

Die Western-Blot Analyse dieser behandelten VEC zeigte eine signifikant erhöhte Expression des mesenchymalen Markers  $\alpha$ SMA, sowohl unter POM-I Behandlung als auch unter BzATP Behandlung ( $p < 0,05$ , Abbildung 20 A/B), bei gleichzeitig signifikant reduzierter Expression der endothelialen Marker VE-Cadherin ( $p < 0,01$ , Abbildung 20 A/C) und CD31 (POM-I  $p < 0,01$ , BzATP  $p < 0,00$ ; Abbildung 20 A/D).



**Abbildung 20: Gesteigerte ATP-Wirkung induziert EndMT in primären humanen VEC**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 14 Tage mit dem CD39 Inhibitor POM-I (10  $\mu$ M) oder dem P2 Rezeptor Agonist BzATP (25  $\mu$ M) behandelt und mittels Western-Blot hinsichtlich *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA, B), VE-cadherin (C) und CD31 Expression (D) untersucht. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Analysen. Zur Normierung wurde die Expression von  $\beta$ -Actin herangezogen (A). Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt (B-D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n=11 pro Behandlung). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

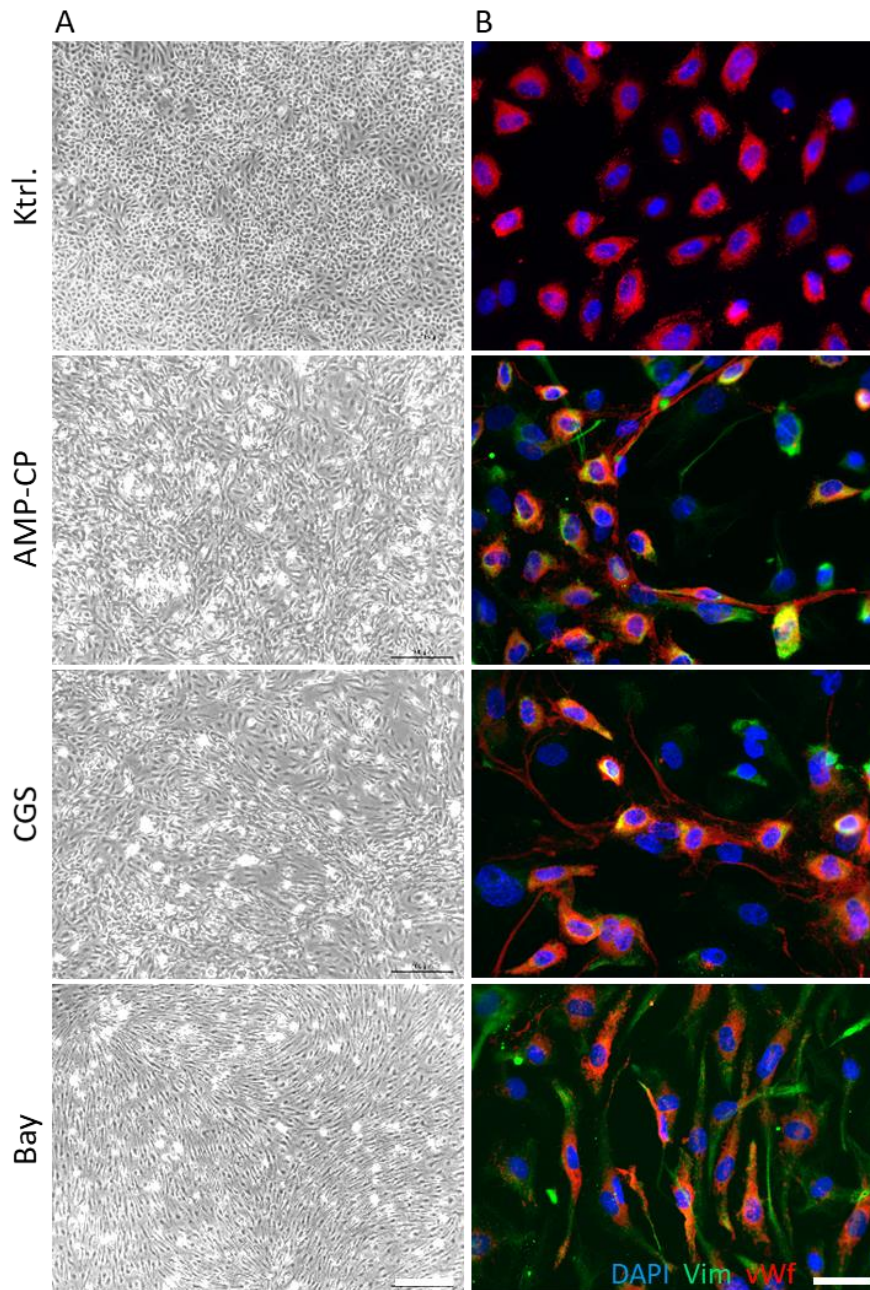
---

### **3.4.2 Inhibition von CD73 sowie gesteigerte Wirkung von Adenosin induzieren EndMT in primären humanen VEC**

Um eine mögliche Auswirkung von Adenosin und AMP auf EndMT in VEC zu untersuchen, wurden die Zellen für 14 Tage mit dem CD73 Inhibitor AMP-CP oder mit den A2 Rezeptor Agonisten, CGS und Bay, behandelt und hinsichtlich der Proteinexpression der etablierten EndMT Marker (siehe 3.3.3) analysiert.

Die unbehandelten Zellen zeigten nach 14 Tagen weiterhin eine regelrechte Morphologie mit Kopfsteinpflaster artiger Anordnung und Form (Ktrl., Abbildung 21 A), sowie eine gleichmäßige vWf Expression ohne nachweisbares Vimentinsignal (Ktrl., Abbildung 21 B). Eine Behandlung mit AMP-CP führte hier zu einer inhomogenen Morphologie mit zahlreichen spindelförmigen Zellen (AMP-CP, Abbildung 21 A) bei leicht reduzierter vWf Expression und positivem Vimentinsignal (AMP-CP, Abbildung 21 B). Die Stimulation mit CGS führte im Vergleich zu einer ähnlichen Zellmorphologie (CGS, Abbildung 21 A) bei gleichmäßiger vWf Expression, jedoch nur vereinzelt positivem Vimentinsignal (CGS, Abbildung 21 B). Die mit Bay behandelten Zellen zeigten eine homogenen Morphologie mit stark spindelförmigen Zellen (Bay, Abbildung 21 A) bei reduzierter vWf Expression und gleichmäßig positivem Vimentinsignal (Bay, Abbildung 21 B).

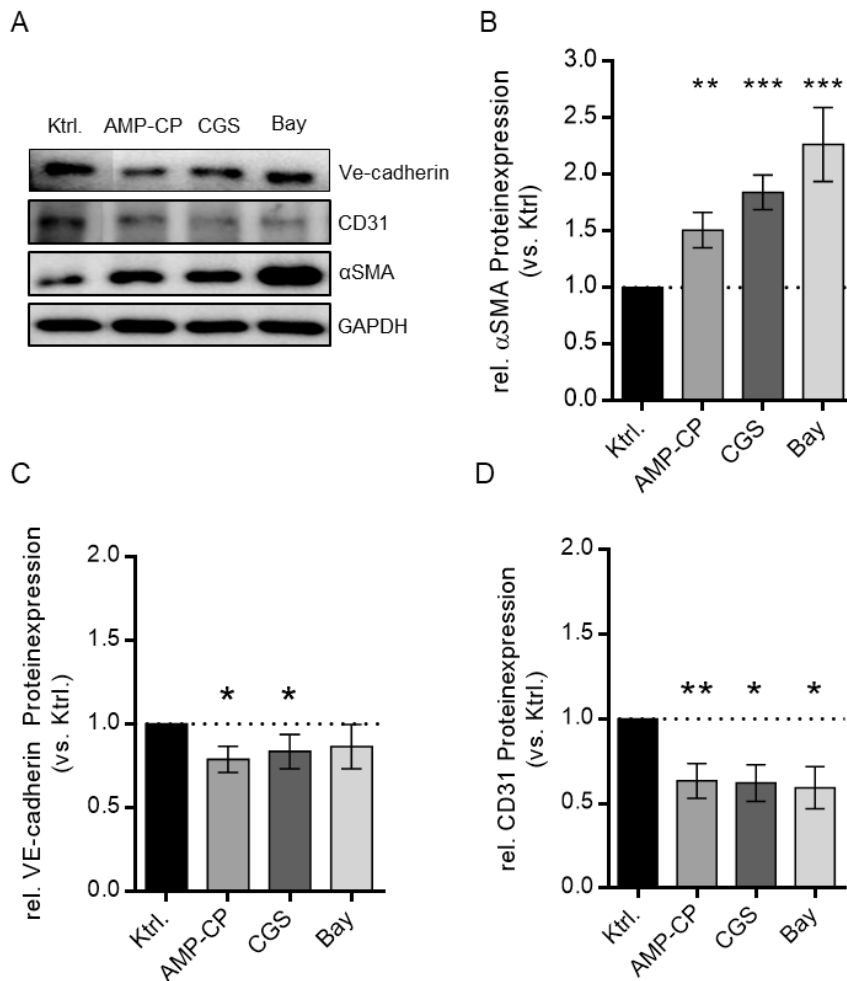




**Abbildung 21: Inhibition von CD73 sowie gesteigerte Wirkung von Adenosin induzierten EndMT Phänotyp in primären humanen VEC**

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen primärer humaner VEC (A) sowie Immunfluoreszenzfärbung gegen von Willebrand Faktor (vWf, rot) und Vimentin (Vim, grün) nach Behandlung mit dem CD73 Inhibitor AMP-CP (10  $\mu$ M) oder den A<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten CGS und Bay (A<sub>2A</sub>: 10  $\mu$ M CGS; A<sub>2B</sub>: 10  $\mu$ M Bay) für 14 Tage. Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid blau gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bilder. Maßstab 100  $\mu$ m (Durchlicht) bzw. 50  $\mu$ m (Fluoreszenz).

Die Western-Blot Analyse dieser behandelten Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Expression des mesenchymalen Markers  $\alpha$ SMA, unter allen drei Behandlungen (AMP-CP  $p < 0,01$ , CGS/Bay  $p < 0,001$ ; Abbildung 22 A/B), bei gleichzeitig signifikant reduzierter Expression des endothelialen Markers CD31 (AMP-CP  $p < 0,01$ , CGS/Bay  $p < 0,05$ ; Abbildung 22 A/D). Die Proteinexpression von VE-cadherin wurde unter AMP-CP- und CGS-Behandlung signifikant reduziert ( $p < 0,05$  Abbildung 22 A/C), bei Inkubation mit Bay wurde dieser Effekt jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 22 A/C).



**Abbildung 22: Inhibition von CD73 sowie gesteigerte Wirkung von Adenosin induzierten EndMT in primären humanen VEC**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 14 Tage mit dem CD73 Inhibitor AMP-CP (10  $\mu$ M) oder den A<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten CGS und Bay (A<sub>2A</sub>: 10  $\mu$ M CGS; A<sub>2B</sub>: 10  $\mu$ M Bay) behandelt und mittels Western-Blot hinsichtlich *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA, B), VE-cadherin (C) und CD31 Expression (D) untersucht. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Analysen. Zur Normierung wurde die Expression von  $\beta$ -Actin herangezogen (A). Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt (B-D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n=11 pro Behandlung). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

### **3.5 Erste mechanistische Untersuchungen**

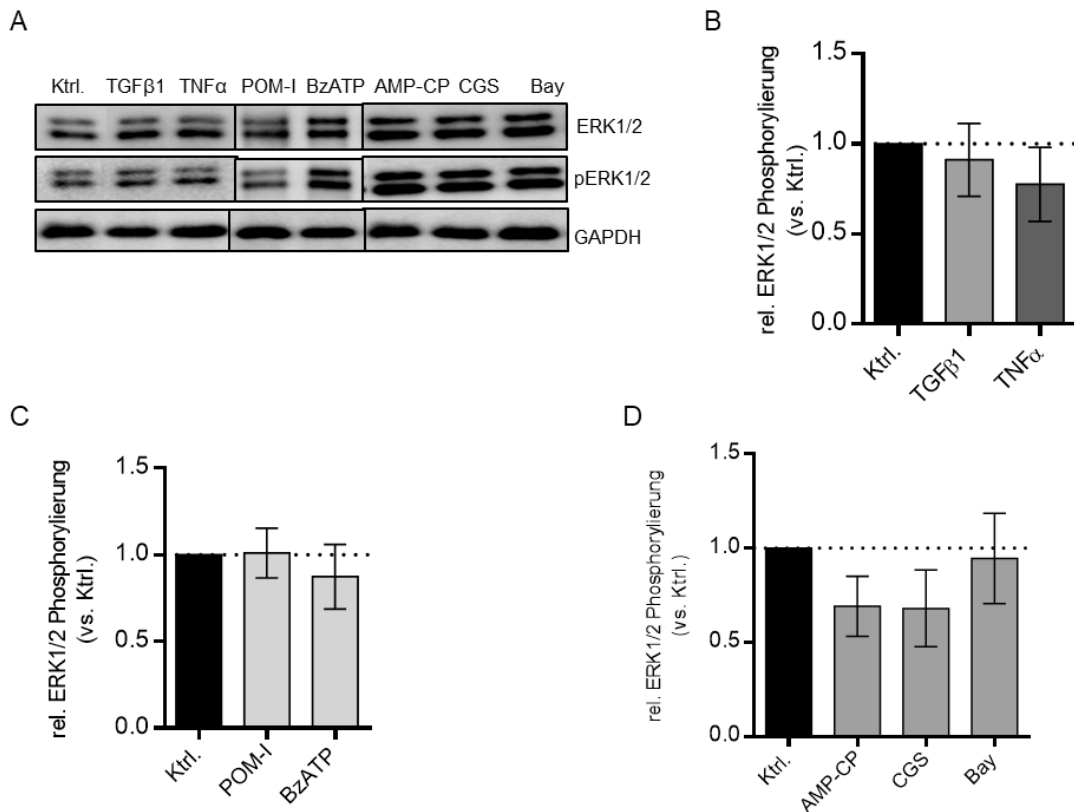
Der gezeigte Zusammenhang zwischen purinerger Signalkaskade und dem Auftreten von EndMT in VEC war bisher unbekannt, sodass erste Einblicke in die mechanistischen Hintergründe mittels der Analyse bekannter Mediatoren und Transkriptionsfaktoren angestrebt wurden. Hierzu wurden sowohl zentrale Mediatoren des TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  Signalweges mittels Western-Blot, als auch EndMT-assoziierte Transkriptionsfaktoren mittels qPCR untersucht.

#### **3.5.1 Untersuchung EndMT assoziierter Mediatoren**

Es gibt zahlreiche Mediatoren der bekannten EndMT-induzierenden Signalwege, die zum Teil auch synergistisch wirken können. Bekannte *downstream Targets* sind unter anderem ERK1/2 und p38 (siehe Abbildung 3). Die Aktivierung dieser Mediatoren durch Phosphorylierung wurde in VEC, die verschieden induzierte EndMT durchlaufen haben, mittels Western-Blot untersucht.

##### **3.5.1.1 Keine Beeinflussung der ERK1/2 Phosphorylierung**

Nach dem Durchlaufen einer EndMT zeigte sich in VEC keine signifikante Regulation der ERK1/2 Proteinexpression. Die Stimulation mit TGF $\beta$  oder TNF $\alpha$ , sowie die Inhibition der Schlüsselenzyme CD73 und CD39 oder die Aktivierung purinerger Rezeptoren führten nicht zu einer veränderten Aktivierung der ERK1/2 im Sinne einer Phosphorylierung (Abbildung 23).



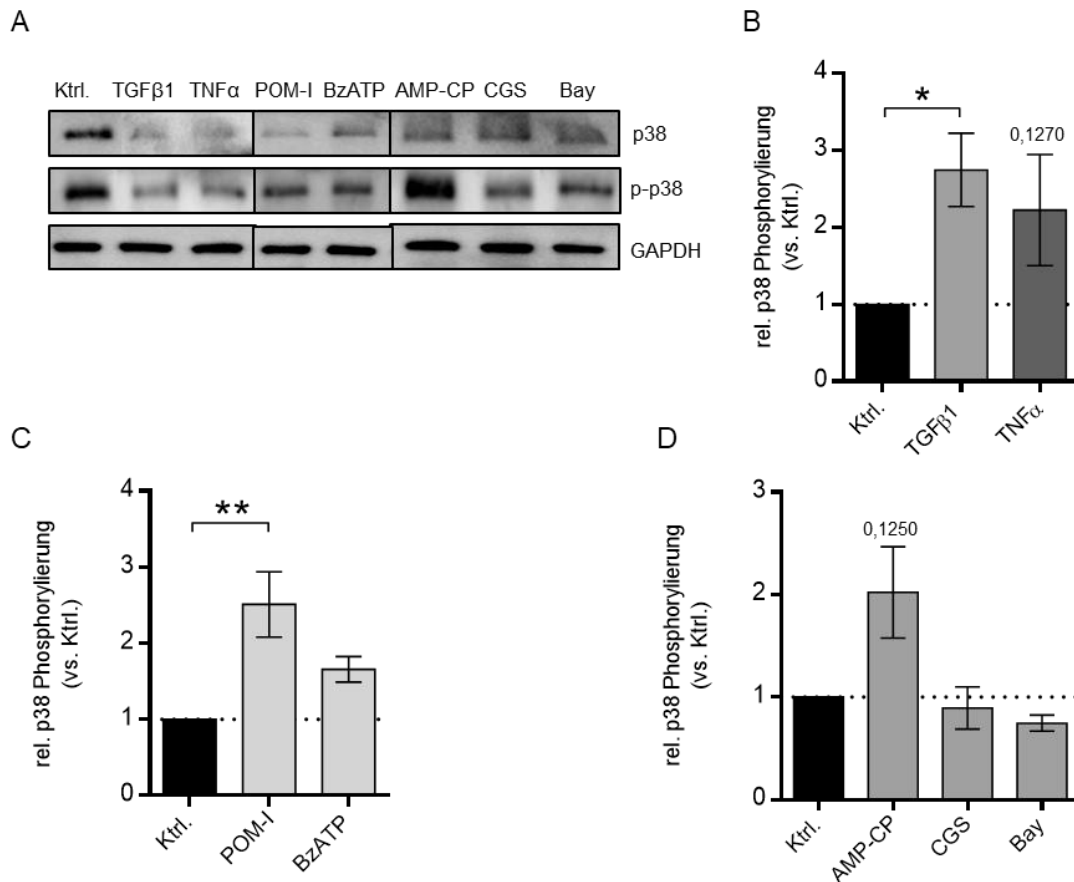
**Abbildung 23: Keine Beeinflussung der ERK1/2 Aktivierung bei EndMT in VEC**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 14 Tage mit dem CD39 Inhibitor POM-I (10  $\mu$ M), dem P2 Rezeptor Agonist BzATP (25  $\mu$ M), dem CD73 Inhibitor AMP-CP (10  $\mu$ M), den A2-Rezeptor Agonisten CGS und Bay ( $A_{2A}$ : 10  $\mu$ M CGS;  $A_{2B}$ : 10  $\mu$ M Bay), TGFβ1 (10 ng/ml) oder TNFα (5 ng/ml) behandelt und mittels Western-Blot hinsichtlich *extracellular-signal regulated kinases 1/2* (ERK1/2) Expression untersucht. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Analysen. Zur Normierung wurde die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) herangezogen (A). Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt (B-D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n=7 pro Behandlung). Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

### 3.5.1.2 Erhöhte p38 Phosphorylierung unter TGFβ1 Stimulation und Inhibition von CD39 oder CD73

Bei einer TGFβ-induzierten EndMT zeigte sich eine signifikant erhöhte Phosphorylierung der p38 ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine TNFα-Behandlung führte jedoch zu keiner signifikanten Regulation ( $p = 0,1270$ ; Abbildung 24, B). Die Inhibition von CD39 mittels POM-I führte in VEC ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der p38-Phosphorylierung ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle, wobei eine Behandlung mit BzATP keinen Effekt zeigte (Abbildung 24, C). VEC in denen CD73 mittels AMP-CP inhibiert wurde zeigten in der Tendenz eine erhöhte p38 Phosphorylierung, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz

( $p=0,1250$ ). Aktivierung von Adenosinrezeptoren mittels CGS oder Bay führte zu keinem Effekt (Abbildung 24, D).



**Abbildung 24: Erhöhte p38 Aktivierung durch TGFβ1 oder Inhibition der Schlüsselenzyme**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 14 Tage mit dem CD39-Inhibitor POM-I (10  $\mu$ M), dem P2 Rezeptor-Agonist BzATP (25  $\mu$ M), dem CD73-Inhibitor AMP-CP (10  $\mu$ M), den A<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten CGS und Bay (A<sub>2A</sub>: 10  $\mu$ M CGS; A<sub>2B</sub>: 10  $\mu$ M Bay), TGFβ1 (10 ng/ml) oder TNFα (5 ng/ml) behandelt und mittels Western-Blot hinsichtlich Expression von p38-mitogenaktivierte Proteininasen (p38) untersucht. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Analysen. Zur Normierung wurde die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) herangezogen (A). Die Daten sind als relative Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt (B-D). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n=5 pro Behandlung). \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

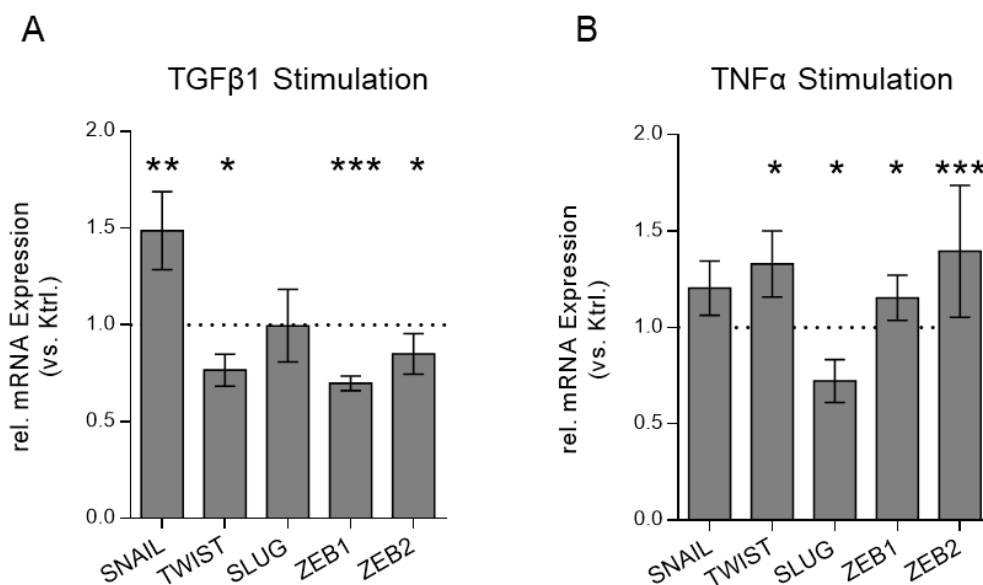
### 3.5.2 Untersuchung EndMT assoziierter Transkriptionsfaktoren

Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wurde bereits mit EndMT in Verbindung gebracht. Zu den bekanntesten identifizierten Induktoren zählen SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB1 und ZEB2 [33, 34]. Die Transkriptionsfaktoren der Snail Familie (SNAIL, *SNAI1*; SLUG, *SNAI2*) sind hierbei die am häufigsten untersuchten Kandidaten und werden mit dem TGFβ1 Signalweg in

Zusammenhang gebracht [35, 36]. TWIST, ZEB1 und ZEB2 wurden hingegen häufiger mit dem TNF $\alpha$  Signalweg assoziiert [37]. Die Genexpression dieser zentralen Transkriptionsfaktoren wurde nach 14-tägiger EndMT Induktion in VEC untersucht, um erste Einblicke in die mechanistischen Hintergründe zu erhalten.

### 3.5.2.1 TGF $\beta$ 1 induzierte EndMT führt zu Hochregulation von SNAIL während TNF $\alpha$ induzierte EndMT TWIST und ZEB1/2 reguliert

VEC, die eine TGF $\beta$ 1-induzierte EndMT durchlaufen haben, zeigten eine signifikant erhöhte *SNAI1*-Genexpression ( $p < 0,01$ ) bei gleichzeitig signifikant reduzierter Expression von *TWIST1* ( $p < 0,05$ ), *ZEB1* ( $p < 0,001$ ) und *ZEB2* ( $p < 0,05$ ). Die Expression von *SNAI2* war nicht reguliert (Abbildung 25 A). Nach Induktion der EndMT mittels TNF $\alpha$  Stimulation zeigten die VEC hingegen eine signifikante Hochregulation der Genexpression von *TWIST1* ( $p < 0,05$ ), *ZEB1* ( $p < 0,05$ ) und *ZEB2* ( $p < 0,001$ ). Die Expression von *SNAI1* war hier nicht reguliert (Abbildung 25 B).

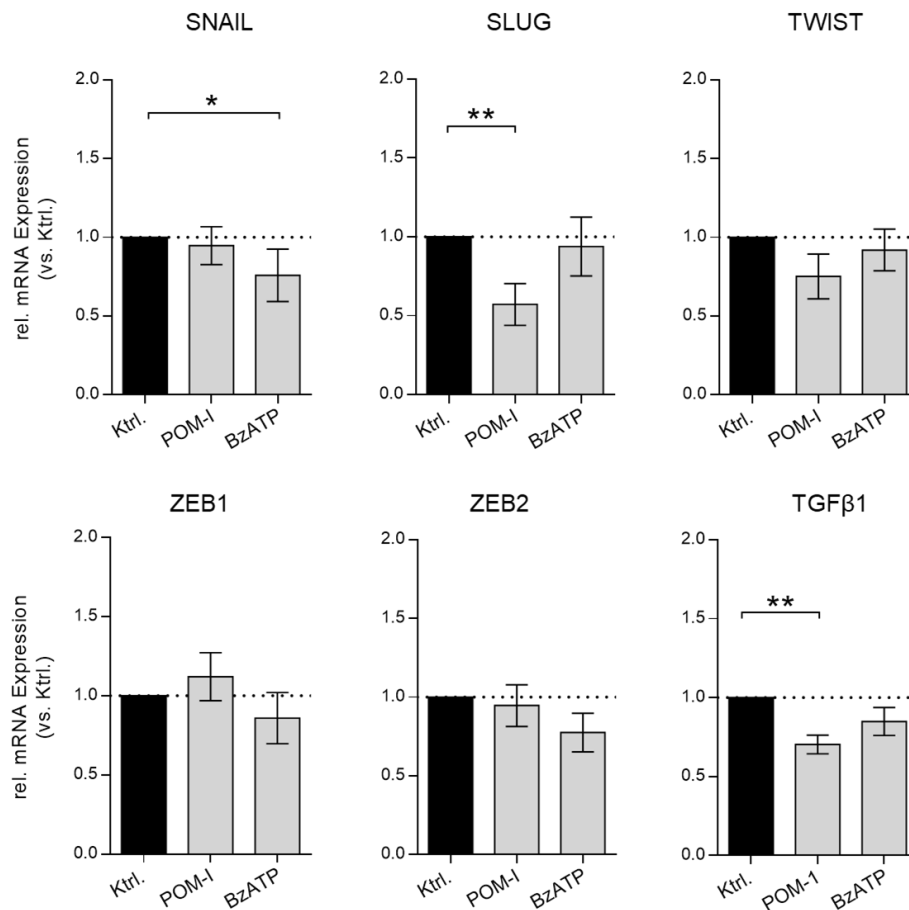


**Abbildung 25: Regulation EndMT assoziierter Transkriptionsfaktoren in TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  stimulierten VEC**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 14 Tage mit TGF $\beta$ 1 (10 ng/ml; A) oder TNF $\alpha$  (5 ng/ml; B) behandelt und mittels *real time* PCR hinsichtlich mRNA Expression der EndMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren *SNAI1* (SNAIL), *SNAI2* (SLUG), *TWIST1* (TWIST), *ZEB1* und *ZEB2* untersucht. Die Daten sind als relative mRNA Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie) dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n=9 pro Behandlung). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

### 3.5.2.2 Inhibition von CD39 führt zu Herunterregulation von SLUG und TGFβ1 während BzATP SNAIL reguliert

Die durch Inhibition von CD39 induzierte EndMT (POM-I) führte in VEC zu einer signifikanten Reduktion der *TGFβ1* ( $p < 0,01$ ) und *SNAI2* ( $p < 0,01$ ) Genexpression. Die Expression von *SNAI1*, *TWIST1*, *ZEB1* und *ZEB2* war hier nicht reguliert. Die Behandlung mit BzATP zeigte eine signifikante Reduktion der *SNAI1* (POM-I,  $p < 0,05$ ) Expression, jedoch keine Regulation der untersuchten Transkriptionsfaktoren (Abbildung 26).

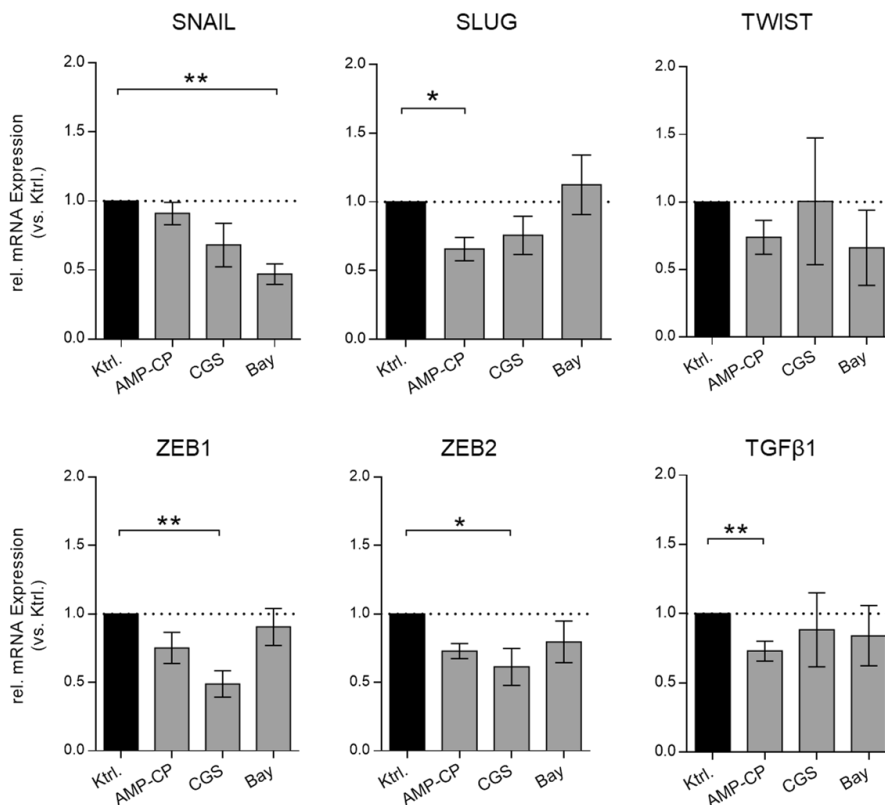


**Abbildung 26: Regulation EndMT-assoziiierter Transkriptionsfaktoren in VEC unter Manipulation der extrazellulären ATP Wirksamkeit**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 14 Tage mit dem CD39-Inhibitor POM-I (10  $\mu\text{M}$ ) oder dem P2-Rezeptor-Agonist BzATP (25  $\mu\text{M}$ ) behandelt und mittels *real time* PCR hinsichtlich mRNA Expression der EndMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren *SNAI1* (SNAIL), *SNAI2* (SLUG), *TWIST1* (TWIST), *ZEB1* und *ZEB2* untersucht. Die Daten sind als relative mRNA Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet ( $n=9$  pro Behandlung). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.

### 3.5.3 Inhibition von CD73 führt zu Herunterregulation von SLUG und TGFβ1 während die Aktivierung von Adenosinrezeptoren SNAIL und ZEB1/2 reguliert

VEC, die eine durch CD73-Inhibition (AMP-CP Behandlung) induzierte EndMT durchlaufen haben, zeigten eine signifikante Reduktion der *TGFβ1* ( $p < 0,01$ ) und *SNAI2* ( $p < 0,05$ ) Genexpression, wobei die Expression von *SNAI1*, *TWIST1*, *ZEB1* und *ZEB2* nicht signifikant reguliert war. Die Behandlung mit dem  $A_{2A}$ -Rezeptor-Agonisten CGS führte in VEC zu einer signifikant reduzierten *SNAI1* ( $p < 0,01$ ), *ZEB1* ( $p < 0,01$ ) und *ZEB2* ( $p < 0,05$ ) Genexpression ohne signifikante Regulation von *SNAI2*, *TWIST1* oder *TGFβ1*. Die Aktivierung des  $A_{2B}$  Rezeptors mittels Bay führte in VEC zu einer signifikant reduzierten *SNAI1* Genexpression ( $p < 0,01$ ), ohne die weiteren untersuchten Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Regulation EndMT-assoziiierter Transkriptionsfaktoren in VEC unter Manipulation des extrazellulären Adenosinstoffwechsels**

Primäre humane Endothelzellen der Aortenklappe wurden für 14 Tage mit dem CD73-Inhibitor AMP-CP (10  $\mu$ M) oder den  $A_2$ -Rezeptor-Agonisten CGS und Bay ( $A_{2A}$ : 10  $\mu$ M CGS;  $A_{2B}$ : 10  $\mu$ M Bay) behandelt und mittels *real time* PCR hinsichtlich mRNA Expression der EndMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren *SNAI1* (SNAIL), *SNAI2* (SLUG), *TWIST1* (TWIST), *ZEB1* und *ZEB2* untersucht. Die Daten sind als relative mRNA Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl.) dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet (n=9 pro Behandlung). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis* und *Dunn's multiple comparisons test*.



## 4 Diskussion

Die purinerge Signalkaskade und der Prozess der Endothelialen zu Mesenchymalen Transition sind hochrelevant in der Physiologie und Pathophysiologie von Endothelzellen. Eine Dysregulation der purinergen Signaltransduktion steht hierbei nachweislich mit kardiovaskulären Erkrankungen wie CAVD oder Atherosklerose in Zusammenhang [46]. EndMT ist in der Entwicklungsphysiologie unerlässlich für eine regelrechte Herzentwicklung, findet sich im adulten Organismus jedoch im Zusammenhang mit diversen Herzkreislaufpathologien wieder. Bis heute gibt es keine Erkenntnisse über den möglichen Zusammenhang zwischen einer dysregulierten purinergen Signalkaskade und dem Auftreten von EndMT in valvulären Endothelzellen, da diese Prozesse bisher ausschließlich getrennt voneinander untersucht wurden. Ziel dieser Arbeit war es daher, erstmals diesen potenziellen Zusammenhang zu adressieren.

Die Ergebnisse des vorliegenden Forschungsprojektes zeigen, dass eine Dysregulation der purinergen Signalkaskade auf vielfältige Weise die Funktionalität von VEC beeinflusst und zu EndMT führt.

### 4.1 Aspekte der Isolation und Verwendung primärer humaner Zellen

Im Bereich der kardiovaskulären Forschung kann der Zugang zu humanem Probenmaterial herausfordernd und von finanziellen Hürden geprägt sein. Zusätzlich ist die Gewinnung von physiologisch intaktem Referenzmaterial direkt aus dem Herzen aus naheliegenden Gründen generell nur sehr limitiert möglich. Patienten, die sich einer Herztransplantation unterziehen müssen, leiden in 90% der Fälle unter einer schwerwiegenden Herzmuskelerkrankung, die dazu führt, dass die Pumpleistung des Herzens nicht mehr ausreicht. Im Gegensatz dazu ist nur bei 3% der Transplantationspatienten eine Erkrankung der Herzklappen für die eingeschränkte Pumpfunktion ursächlich [70]. Klappenmaterial, welches aus Herzen von Transplantationsempfängern gewonnen wurde, kann daher als annähernd physiologisch angesehen werden und findet in der Forschung entsprechend Verwendung. Im vorliegenden Forschungsprojekt wurden Aortenklappen von Patienten, die am Universitätsklinikum Düsseldorf Empfänger einer Herztransplantation wurden, verwendet. In einzelnen Fällen wurden darüber hinaus auch Klappen verwendet, die bei Herzklappenersatz-Operationen intraoperativ durch den Chirurgen als makroskopisch regelrecht beurteilt wurden. Das Material wurde unmittelbar nach Organentnahme der Zellisolation zugeführt, um eine höchstmögliche Vitalität sicherzustellen, was bei einer Entnahme aus *post mortem* Spendern nicht möglich ist. Dieser Aspekt birgt auch im weiteren Verlauf der Isolation einen Vorteil, da das Endothel, als äußerste Schicht der Herzklappe, direkten Stress durch Transport, mechanische und

enzymatische Ablösung erfährt und somit ein initial höherer Anteil vitaler Zellen den Erfolg der Isolation sicherstellt. Verunreinigungen der Kultur mit Zellen aus den tieferen Schichten der Klappe oder auch Erythrozyten müssen außerdem immer bedacht werden und durch sorgfältige Aufreinigung und Charakterisierung ausgeschlossen bzw. beseitigt werden. Die Dauer der enzymatischen Ablösung sollte hierbei so kurz wie möglich gehalten werden, um nur die Endothelschicht zu lösen. Die Reinheit der angelegten Kulturen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Sortierung nach CD31 positiven Zellen, sowie makroskopische Beurteilung und Immunfluoreszenzfärbungen gegen vWf bestätigt. CD31 gilt als der sensitivste Endothelmarker [71] und wird in hoher Konzentration nur an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert, in sehr viel geringerer Intensität jedoch auch von Immunzellen [72, 73]. Als Marker in der Immunfluoreszenz eignet sich vWf, da dieser außer auf Endothelzellen nur auf Megakaryozyten vorkommt, und diese aufgrund des Ausgangsgewebes und ihrer auffälligen Morphologie ausgeschlossen werden können [72, 74].  $\alpha$ SMA kann nur auf Endothelzellen nachgewiesen werden, wenn bereits eine EndMT begonnen hat [72] und wurde daher als Kontrollfärbung eingesetzt, um bereits transformierte Zellen auszuschließen. Aufgrund der homogenen und charakteristischen Morphologie der verwendeten Zellen nach Aufreinigung, sowie der positiven vWf Färbung bei gleichzeitig negativer  $\alpha$ SMA Färbung kann von einer regelrechten Endothelzellkultur ausgegangen werden.

Die Arbeit mit primären Zellen ist aufwändig, da sie spezialisiertes Medium benötigen, weniger robust sind und nur eine limitierte Lebensspanne haben. Zeitlich muss die Arbeit mit primären Zellen ebenfalls sorgfältig koordiniert werden, da mehrere Wochen von Isolation über Aufreinigung und Charakterisierung bis zu einer ausreichenden Expansion der Kultur vergehen. Trotz dieser Herausforderungen birgt die Forschung an primären Zellen im Vergleich zur Arbeit mit Zelllinien vielerlei Vorteile. Zelllinien wurden genetisch verändert, um eine Immortalisierung herbeizuführen und können sich daher in einigen Aspekten von Zellen ihres Ursprungsgewebes unterscheiden. Die meisten Zelllinien werden außerdem seit mehreren Jahrzehnten kultiviert, haben sich diesen artifiziellen Bedingungen angepasst und können zusätzlich durch Effekte wie genetischen Drift beeinflusst sein [75]. Die Verwendung von primären Zellen bietet dagegen ein direkteres Abbild der *in vivo* Situation und besonders für Endothelzellen wurde bereits gezeigt, dass Zelllinien verschiedenen funktionelle Marker wie VCAM1 oder sogar CD31 nicht oder nur unzureichend exprimieren [76]. Besonders auch nach bekannt werden zahlreicher kreuzkontaminierter oder missidentifizierter Zelllinien [77] steigt das Interesse an der Arbeit mit Primärzellen, besonders im Zusammenhang mit biomedizinischen Fragestellungen, wie die des vorliegenden Forschungsprojektes, welche Rückschlüsse auf zukünftige Anwendungen im Patienten zulassen sollen.

## 4.2 Die purinerge Signalkaskade beeinflusst die Morphologie von VEC

Endothelzellen haben unter physiologischen Bedingungen eine charakteristische Kopfsteinpflastermorphologie, die durch homoge rundliche Zellform und enge Zell-Zell Kontakte gekennzeichnet ist [3]. Darüber hinaus haben jedoch verschiedene Studien bereits gezeigt, dass das Endothel über eine erstaunliche Plastizität verfügt [78, 79]. Die Endotheliale zu Mesenchymale Transition kann als Teil der Fähigkeit zu dieser Plastizität angesehen werden und umfasst sowohl morphologische als auch funktionale Änderungen des Endothels. Die Zellform erscheint hierbei schließlich spindelförmig elongiert und die Zellen verlieren ihren engen Kontakt [80]. Wie einleitend beschrieben, ist ein potenzieller Zusammenhang zwischen EndMT und purinenger Signaltransduktion bisher gänzlich unerforscht und somit liegen ebenfalls keine Daten über den Einfluss einer dysregulierten purinergen Signaltransduktion auf die Morphologie von EC vor.

Im vorliegenden Forschungsprojekt wurden humane Endothelzellen der Aortenklappe nach 24-stündiger Behandlung mit Inhibitoren und Agonisten der purinergen Signalkaskade durchlichtmikroskopisch beurteilt, um mögliche Auswirkungen auf die Morphologie zu untersuchen. Der Zeitpunkt 24 Stunden stellte hierbei sicher, dass noch keine komplette EndMT stattgefunden hat und lediglich kurzfristig durch den Eingriff in die Signaltransduktion hervorgerufene Effekte erfasst wurden. Die erhobenen Daten zeigen einen deutlichen Einfluss auf die Zellmorphologie, der in der Ausprägung unter den eingesetzten Behandlungen variiert. Während die Inhibition der Schlüsselenzyme CD39 und CD73, sowie die Stimulation mit BzATP nur zu einem geringen Anteil elongierter Zellen führte, zeigten sich unter A<sub>2</sub>-Rezeptor Aktivierung zahlreiche, stark elongierte Zellen. Dies wurde besonders für A<sub>2B</sub>-Rezeptor Aktivierung beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen somit erstmals einen Einfluss der purinergen Signaltransduktion auf die Morphologie von humanen Endothelzellen der Aortenklappe *in vitro*. Die unterschiedliche Ausprägung der gezeigten Effekte lässt hierbei vermuten, dass sich die zugrunde liegenden Mechanismen unterscheiden und eine Dysregulation im Bereich der A<sub>2</sub>-Adenosinrezeptoren bereits kurz nach dem Auftreten einen distinkten Effekt auf valvuläres Endothel hat. Der purinerge Stoffwechsel scheint somit ein wichtiger Modulator der Morphologie valvulärer Endothelzellen zu sein.

### 4.3 Die purinerge Signalkaskade beeinflusst die Funktionalität von VEC

Endothelzellen sind unter physiologischen Bedingungen dynamisch aktivierbar, das heißt dass EC auf verschiedenste Stimuli mit Sekretion oder Expression entsprechender Zytokine oder Proteine reagieren. Diese Plastizität der Zellen spielt eine wichtige Rolle in zentralen biologischen Vorgängen wie Inflammationsantwort oder Fibrinolyse [11]. Eine nicht-adaptive Aktivierung bezeichnet man als endotheliale Dysfunktion [15], die bereits als frühes Stadium zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit oder Atherosklerose identifiziert ist [17, 18]. Merkmale dysregulierter Endothelzellen sind, unter anderem, eine verminderte NO Freisetzung durch reduzierte eNOS Produktion, erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Sekretion vasokonstriktorischer Substanzen.

Die Effekte einer dysregulierten purinergen Signaltransduktion auf die Funktionalität von VEC wurden im vorliegenden Forschungsprojekt nach 24-stündiger Behandlung untersucht, um sicherzustellen, dass die Zellen noch keine Transition durchlaufen haben. Die Proteinexpressionsanalysen der Inflammationsmarker ICAM1, VCAM1 und NFκB Phosphorylierung, sowie ELISA Messungen der IL-6-Sekretion zeigten zwar durch TNFα Stimulation, jedoch durch keine Behandlung Effekte. Aufgrund dieser Datenlagen kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten VEC zwar in der Lage sind inflammatorisch aktiviert zu werden, dass eine Dysregulation der purinergen Signaltransduktion hierbei jedoch primär kein Auslöser ist.

Weiterführend wurden eNOS als Bereitsteller des wichtigsten antithrombotischen Vasodilatators und EDN-1 als potentester prothrombotischer Vasokonstriktor des Endothels [14] untersucht. Die Inhibition der Schlüsselenzyme CD39 und CD73 führte hierbei zu einer signifikant erhöhten Genexpression und Sekretion von EDN-1 bei gleichzeitig tendenzieller Reduktion der eNOS Expression. Auch die Aktivierung des A<sub>2A</sub> Rezeptors führte zu einer signifikant erhöhten EDN-1 Sekretion, jedoch gleichzeitig zu einer ebenfalls signifikant erhöhten NOS3 Genexpression. Interessanterweise führte eine A<sub>2B</sub> Rezeptor Aktivierung zu einer signifikanten Reduktion der EDN-1-Sekretion ohne die eNOS Expression zu beeinflussen. Die vorliegenden Daten weisen somit vorrangig auf eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer prothrombotischen Aktivierung durch Inhibition der Schlüsselenzyme der purinergen Signalkaskade hin. Die mechanistischen Hintergründe sind unklar, es wurde jedoch bereits in CD73-knockout-Mäusen ein systemischer Anstieg des EDN-1-Spiegels beobachtet, der möglicherweise auf eine inhibitorische Wirkung von Adenosin auf die EDN-1 Produktion hindeutet [81]. Die entgegengesetzten Effekte der Aktivierung von A<sub>2</sub>

Rezeptoren in Bezug auf die EDN-1 Sekretion entsprechen den Beobachtungen aus Studien an porcinem Trachealepithel und kardialen Fibroblasten der Ratte, in denen ebenfalls eine Inhibition der Sekretion via  $A_{2B}$  jedoch nicht via  $A_{2A}$  Rezeptoren gezeigt werden konnte [82, 83]. Diese Daten lassen vermuten, dass diese Effekte nicht ausschließlich auf eine veränderte extrazelluläre Adenosinverfügbarkeit, sondern auch auf davon unabhängigen Signalprozessen basieren. Über mögliche Zusammenhänge zwischen der Aktivität von CD39 und einer gesteigerten Endothelinsekretion liegen bis heute keine Studien vor. Unabhängig von den zugrundeliegenden Mechanismen zeigen diese Daten eindeutige Effekte einer dysregulierten purinergen Signaltransduktion auf die Funktionalität von VEC im Sinne einer Störung der Homöostase von anti- und pro-thrombotischen beziehungsweise vasodilatatorischen Faktoren.

#### 4.4 TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$ als EndMT Induktoren in VEC

Die Endotheliale zu Mesenchymale Transition wurde bisher nicht im Zusammenhang mit der purinergen Signaltransduktion untersucht, somit sind keine Referenzen bezüglich eines methodisch adäquaten Aufbaus, insbesondere der damit einhergehenden zeitlichen Achse verfügbar. Da es sich bei der EndMT um einen graduellen Prozess handelt, der je nach Zellursprung und Stimulus innerhalb weniger Tage bis hin zu mehreren Wochen verlaufen kann, musste im vorliegenden Projekt zunächst ein geeigneter Referenzzeitpunkt für die EndMT Induktion bestimmt werden. In der Literatur finden sich für *in-vitro*-Versuche sehr variable Zeitspannen von ca. 24 h bis 21 Tagen unter Verwendung verschiedener Induktoren. Eine der wohl bekanntesten und am besten untersuchten Substanzen zur Induktion von EndMT ist hierbei TGF $\beta$ 1 und findet entsprechend in zahlreichen Studien Anwendung [49, 50, 84]. Als weiterer bekannter Stimulus, der ebenfalls in diversen EC Typen zu EndMT führt, wird TNF $\alpha$  eingesetzt [32]. Eine maßgebliche Herausforderung bei der Untersuchung von EndMT ist außerdem die große Heterogenität der Endothelzellen und ihre daraus resultierende unterschiedliche Reaktion auf die genannten Stimuli [50, 85]. Des Weiteren gibt es bis heute keine konkreten Leitlinien, die ein bestimmtes Marker-Set festlegen, um eindeutig eine EndMT zu beschreiben [33]. Die meisten Studien verwenden jedoch die unter 1.2 aufgeführten Marker in Kombination mit morphologischer Bewertung der Zellen, um eine Transition zu identifizieren. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die beiden Induktoren TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  gemäß der Literatur eingesetzt [51] und zunächst zur Bestimmung der Inkubationsdauer herangezogen. Zur Identifizierung einer EndMT wurden die einleitend beschriebenen Marker, sowie die morphologische Beurteilung verwendet. Im zeitlichen Verlauf wurden 14 Tage als geeigneter Zeitpunkt festgelegt, da sich hier in der Immunfluoreszenz ein nahezu kompletter

Rückgang der vWf Expression bei gleichzeitig positivem Vimentinsignal zeigte. Die Zellmorphologie war ebenfalls vollständig elongiert und spindelförmig im Vergleich zu unbehandelten VEC. Um den so ausgewählten Zeitpunkt zu bestätigen, wurden zusätzlich Western-Blot Analysen durchgeführt, die eine signifikante Reduktion der endothelialen Marker CD31 und VE-cadherin, sowie eine signifikante Zunahme der Expression des mesenchymalen Markers  $\alpha$ SMA zeigten. Anhand dieser Daten konnte von einer validierten EndMT zum Zeitpunkt 14 Tage ausgegangen werden, sodass dieser für alle folgenden Experimente verwendet wurde.

## **4.5 Die purinerge Signalkaskade beeinflusst EndMT in VEC**

Zahlreiche Studien haben bisher die Vorgänge der purinergen Signaltransduktion und der EndMT unabhängig voneinander untersucht. Beide Prozesse stellen nachweislich wichtige Faktoren in der Physiologie und Pathophysiologie von Endothelzellen dar, es gibt jedoch bis heute keine Erkenntnisse über den möglichen Zusammenhang zwischen einer dysregulierten purinergen Signalkaskade und dem Auftreten von EndMT in valvulären Endothelzellen. Um einen möglichen Zusammenhang zu untersuchen, wurden VEC mit denen unter 4.2 bereits evaluierten Behandlungen für den mittels TGF $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  bestimmten Zeitraum von 14 Tagen (siehe 4.3) stimuliert und dann hinsichtlich der etablierten EndMT Marker auf Proteinebene untersucht.

### **4.5.1 Gesteigerte ATP-Wirkung führt zu EndMT in VEC**

Inhibition des Schlüsselenzyms CD39 in VEC zeigte morphologisch, sowie in der Proteinexpressionsanalyse deutliche Anzeichen einer EndMT. Auffällig war hier die netzartige Ausbreitung der Zellkörper, die sich vereinzelt auch bei BzATP-Behandlung zeigte, jedoch unter keiner der anderen Behandlungen auftrat. Mit BzATP behandelte VEC zeigten ein ähnliches EndMT Expressionsmuster wie unter CD39-Inhibition, jedoch mit weniger prominentem Vimentinsignal. Auch morphologisch waren die Zellen hier heterogener mit deutlichen Anteilen regelrecht rundlicher Zellen. Insgesamt war die Expression vom endothelialen Marker vWf in der Immunfluoreszenz im Vergleich zur TGF $\beta$  oder TNF $\alpha$  Behandlung prominenter, bei jedoch ähnlichem Expressionsmuster der übrigen Marker in der Western-Blotanalyse. Aufgrund dieses Verhältnisses von deutlicher Expression endothelialer Marker bei gleichzeitig zunehmender Expression mesenchymaler Marker kann man unter gesteigerter ATP-Wirkung von einer partiellen EndMT in VEC sprechen. Diese Effekte stehen im Einklang mit den bereits aus der Forschungsgruppe publizierten Daten zur pro-

degenerativen Wirkung auf valvuläre Interstitialzellen im ovinen *in vitro* Modell [52]. Darüber hinaus wurde bereits in einer Studie an Aortenklappen von CAVD Patienten ein verringerter extrazellulärer ATP Abbau festgestellt, der mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert [86]. Zusammen betrachtet verdeutlicht diese Datenlage nun die Bedeutung eines dysregulierten extrazellulären ATP-Katabolismus für das Auftreten degenerativer Erkrankungen der Aortenklappe. Eine erhöhte ATP-Wirksamkeit scheint hier sowohl in VIC als auch in VEC pathologische Effekte zu haben.

#### **4.5.2 Inhibition von CD73 aber auch gesteigerte Wirkung von Adenosin führt zu EndMT in VEC**

Die Inhibition des Schlüsselenzyms CD73 führte in VEC ebenfalls morphologisch, sowie in der Proteinexpressionsanalyse zu deutlichen Anzeichen einer EndMT. Die Behandlung mit dem  $A_{2A}$ -Rezeptorantagonisten CGS verursachte in den Zellen ein ähnliches Bild wie unter CD73 Inhibition. Unter Aktivierung des  $A_{2B}$  Rezeptors mittels Bay zeigten die VEC eine auffällig ausgeprägte Spindelform mit starker Expression mesenchymaler Marker. Insgesamt war auch hier bei Behandlung mit AMP-CP oder CGS die Expression vom endothelialen Marker vWf in der Immunfluoreszenz im Vergleich zur TGF $\beta$  oder TNF $\alpha$  Behandlung prominenter, bei ähnlichem Expressionsmuster der übrigen Marker in der Western-Blotanalyse. Man kann somit, wie schon unter 4.5.1 erläutert, auch unter CD73-Inhibition und  $A_{2A}$ -Aktivierung von einer partiellen EndMT in VEC sprechen. Im Vergleich weist das distinkte morphologische Bild, sowie das reduziertere vWf Signal unter Bay-Behandlung eher auf eine komplette EndMT hin.

Die Inhibition von CD73 verhindert die Dephosphorylierung von AMP zu Adenosin auf der Zelloberfläche, sodass der extrazelluläre Adenosinspiegel verringert wird. In Folge wird auch die Aktivierung der Adenosinrezeptoren ( $A_{2A}$  /  $A_{2B}$ ) reduziert. Interessanterweise zeigen die erhobenen Daten jedoch, dass sowohl die Inhibition von CD73 als auch die Aktivierung der Adenosinrezeptoren, in unterschiedlichem Ausmaß, zu EndMT in VEC führt. Im ovinen VIC *in vitro* Modell der Arbeitsgruppe wurde bereits ein pro-degenerativer Effekt durch Aktivierung der Adenosinrezeptoren publiziert, wobei die Inhibition von CD73 entsprechend anti-degenerative Wirkung hatte [52]. Die Effekte der  $A_2$ -Rezeptor Stimulation decken sich hier mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen in VEC und sprechen für einen pathologischen Einfluss. Die in diesem Kontext zunächst kontrovers erscheinende Wirkung einer CD73 Inhibition in VEC könnte durch eine alternative Adenosin Produktion über Alkaline Phosphatase bedingt sein. In Patienten mit genetischer CD73 Defizienz (*arterial calcification due to deficiency of CD73*; ACDC) ist entsprechend bereits eine erhöhte Aktivität der Gewebeunspezifischen Alkalinen Phosphatase (*Tissue-nonspecific alkaline phosphatase*; TNAP) und

somit ein gesteigerter Dephosphorylierung von AMP zu Adenosin bekannt, die zu erhöhter Kalzifizierung führt [87]. Darüber hinaus lässt der in dieser Arbeit gezeigte, distinkte morphologische Unterschied durch A<sub>2B</sub> Rezeptor Aktivierung im Vergleich zu A<sub>2A</sub> Aktivierung oder CD73 Inhibition vermuten, dass es nochmals zwischen den Adenosinrezeptoren verschiedene Mechanismen geben muss, die schließlich zur EndMT führen.

## 4.6 Erste mechanistische Hypothesen

Der in dieser Arbeit eindeutig gezeigte Einfluss der purinerger Signalkaskade auf die EndMT in humanen VEC der Aortenklappe wirft weiterführende Fragen zu den molekularen Mechanismen auf. Das Auftreten von EndMT sowohl unter Inhibition der Schlüsselenzyme, als auch bei Aktivierung purinerger Rezeptoren lässt darauf schließen, dass Mechanismen zugrunde liegen, die sich nochmal untereinander unterscheiden. Um erste Einblicke zu erhalten, wurden daher bekannte Mediatoren und Transkriptionsfaktoren der in EndMT beteiligten Signalwege untersucht.

Die Expression von ERK1/2 war nach 14 Tagen in den untersuchten VEC unter keiner Behandlung reguliert. Auch die TGF $\beta$  oder TNF $\alpha$  Stimulation hatte keinen nachweisbaren Effekt. Der ERK1/2 Signalweg wurde zwar bereits vielfach mit TGF $\beta$  induzierter EMT und EndMT in Zusammenhang gebracht [88-90], scheint im untersuchten Modell aber eine untergeordnete Rolle einzunehmen.

Die Aktivierung der p38 im Sinne einer Phosphorylierung war im Gegensatz zu ERK1/2 bei TGF $\beta$  Stimulation, sowie Inhibition von CD39 signifikant erhöht. Eine deutliche Tendenz zeigte sich ebenfalls bei CD73 Inhibition. Stimulation mit TNF $\alpha$  oder Aktivierung purinerger Rezeptoren hatten hier keinen Effekt. Ein Teil der bei den Schlüsselenzymen relevanten Signalkaskade scheint also die Phosphorylierung von p38 zu beinhalten, wie es auch bei TGF $\beta$  Induktion der Fall ist. Diese p38 vermittelte EndMT Induktion durch TGF $\beta$  ist bereits aus endothelialen Vorläuferzellen und humanen mikrovaskulären Zellen der Haut bekannt [36, 91]. Darüber hinaus scheint diese Kaskade auch durch Scherstress in humanen Endothelzellen der Koronararterien aktiviert zu werden [92]. Bisher gibt es zu einem potenziellen Zusammenhang zwischen CD73 oder CD39 Aktivität und p38 Phosphorylierung keine Erkenntnisse.

Weiterführend wurden Genexpressionsanalysen bekannter Transkriptionsfaktoren der EndMT durchgeführt, die, wie bereits aus Studien bekannt [35, 93], eine signifikant erhöhte Expression



von SNAIL nach TGF $\beta$  induzierter EndMT zeigten. Gleichzeitig waren TWIST, ZEB1 und ZEB2 signifikant reduziert. Die Inhibition der Schlüsselenzyme führte hier interessanterweise lediglich zu einer Reduktion der SLUG Expression, jedoch auch zu einer signifikant reduzierten TGF $\beta$  Genexpression. Weitere untersuchte Transkriptionsfaktoren waren nicht wesentlich reguliert. Da unter CD39 und CD73 Inhibition lediglich eine Reduktion der SLUG Expression nachzuweisen war, während zum selben Zeitpunkt unter TGF $\beta$  Induktion SNAIL erhöht war, verläuft die EndMT Induktion über die Schlüsselenzyme möglicherweise zeitlich anders. SLUG ist, wie SNAIL, ein Target der EndMT assoziierten TGF $\beta$  Kaskade und es könnte daher zum untersuchten Zeitpunkt von 14 Tagen bereits eine Art *feedback* Regulation eingesetzt haben, die zu einer Reduktion der SLUG Expression aufgrund einer vorherigen Überexpression geführt hat. Zur weiteren Aufklärung müssten hier in anschließenden Projekten verschiedene Zeitpunkte analysiert werden, um die ablaufende Kaskade weiterführend zu charakterisieren. Diese Daten unterstreichen zunächst lediglich eine mögliche Interaktion mit dem TGF $\beta$  Signalweg. Ein solcher Zusammenhang wurde bereits sowohl für CD73, als auch für CD39 in T-Zellen gezeigt, die bei defektem TGF $\beta$  Signaling eine reduzierte Expression der Enzyme zeigen [94, 95]. Interessanterweise wurde CD73 erst kürzlich als Target der TGF $\beta$  Signalkaskade in Epithelzellen der Nierentubuli identifiziert und mit progressiver diabetischer Nephropathie, sowie Nierenfibrose in Zusammenhang gebracht [96]. Da viele EndMT assoziierte Mechanismen auch bei der EMT in Epithelzellen vorkommen, ist es möglich, dass sich auch hier die Erkenntnisse aus Epithelzellen anteilig auf Endothel übertragen lassen. Somit wurde hier ein Ansatzpunkt identifiziert, der in zukünftigen Studien zur Regulation der EndMT durch die Schlüsselenzyme der purinerger Signalkaskade aufgegriffen werden kann.

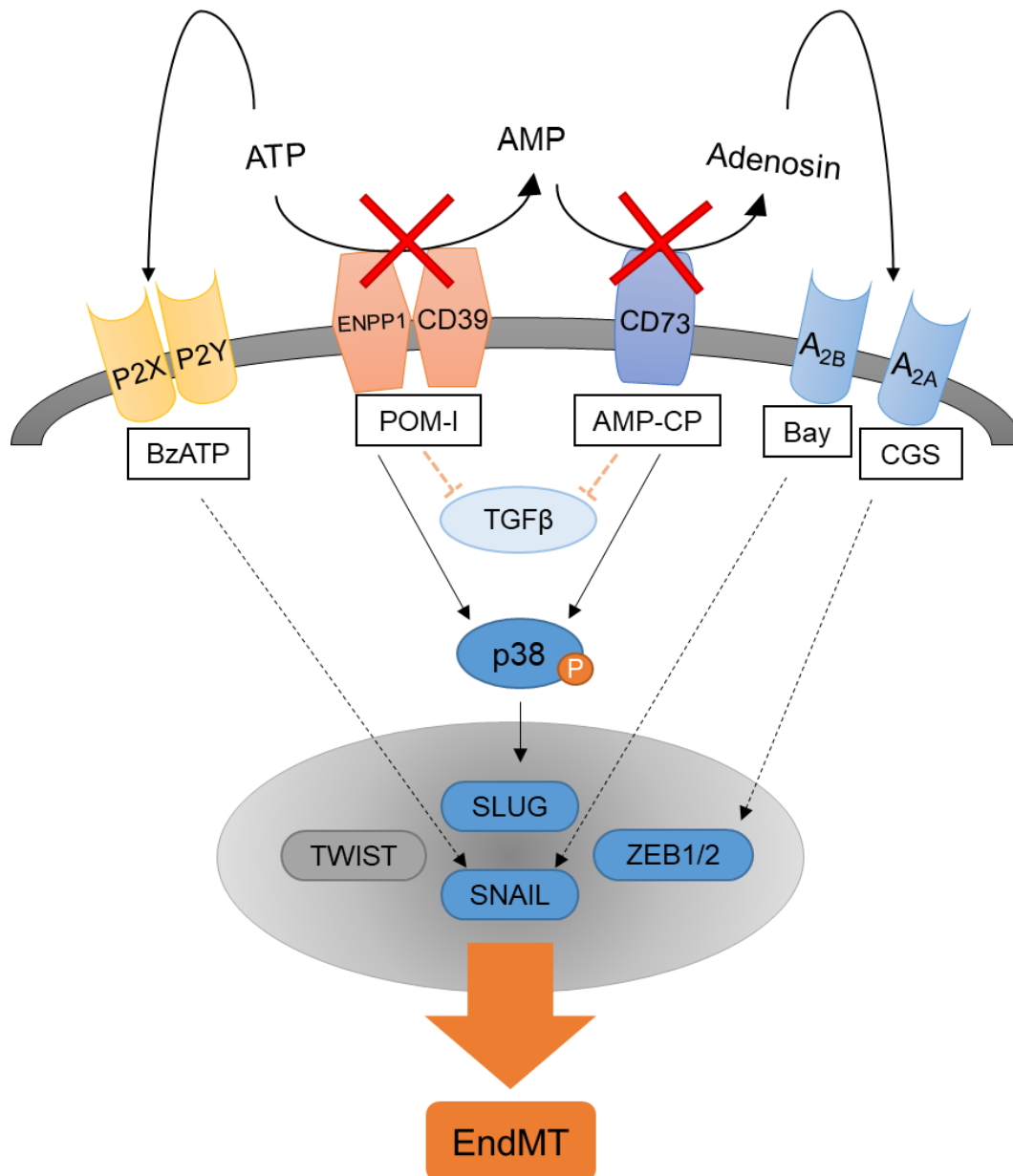
In VEC die eine TNF $\alpha$  induzierte EndMT durchlaufen haben waren, anders als unter TGF $\beta$  Stimulation, die TWIST, ZEB1 und ZEB2 Genexpression signifikant erhöht. Nach EndMT Induktion durch A<sub>2A</sub> Rezeptor Aktivierung mittels CGS zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion der Expression von ZEB1 und ZEB2. Da für diese Behandlungen außerdem keine p38 Aktivierung nachgewiesen werden konnte, handelt es sich hier, verglichen mit TGF $\beta$ , scheinbar um einen anderen Signalweg. Aufgrund der Effekte auf dieselben Transkriptionsfaktoren besteht die Möglichkeit, dass auch hier ein Zusammenhang zwischen A<sub>2A</sub> Rezeptor Aktivität und TNF $\alpha$  Signalweg besteht. Eine Regulation der A<sub>2A</sub> Rezeptor Expression durch TNF $\alpha$  ist bereits in Epithelzellen der Lunge gezeigt worden [97] und kürzlich auch mit inflammatorisch induzierter Nierenfibrose in Zusammenhang gebracht worden [98]. Auch in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit kongestivem Herzversagen wurde eine Regulation der A<sub>2A</sub> Rezeptor Expression durch TNF $\alpha$  unter Verwendung von CGS als Agonist nachgewiesen [99]. Es ist also wahrscheinlich, dass dieser

---

Zusammenhang auch in weiteren Zellarten eine Rolle spielt und in Verbindung mit kardiovaskulären Pathologien steht.

Die Aktivierung von P2 oder A<sub>2B</sub> Rezeptoren mittels BzATP oder Bay führte in VEC hingegen zu einer isolierten signifikanten Reduktion der Genexpression von SNAIL. Die p38 Phosphorylierung war hier ebenfalls nicht reguliert. Diese Beobachtungen stellen zwar eine Gemeinsamkeit dar, die stark unterschiedlichen Ergebnisse der morphologischen Analysen lassen jedoch vermuten, dass zwischen den EndMT Mechanismen dieser Rezeptoren an anderer Stelle Unterschiede bestehen.

Insgesamt veranschaulichen diese ersten Einblicke und Hypothesen zu möglichen mechanistischen Hintergründen die Komplexität der EndMT assoziierten Signalwege und das noch begrenzte Verständnis der Wissenschaft darüber. Nicht zuletzt aufgrund der Heterogenität verschiedener Endothelzellpopulationen ist es nach wie vor unsicher, wie sehr die Übertragbarkeit von Erkenntnissen hier limitiert ist. Die dargelegten Hypothesen sind also auch ganz eindeutig als solche zu interpretieren und sollen lediglich potentielle Ansätze für zukünftige Studien bieten. Die vorliegenden Daten legen nahe, dass sich der Effekt der Inhibition von CD73 und CD39 auf die Induktion von EndMT mechanistisch von denen einer Manipulation einzelner purinergere Rezeptoren unterscheidet, und dabei die Phosphorylierung von p38, sowie eine mögliche Interaktion mit dem TGF $\beta$  Signalweg eine Rolle spielt (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Einfluss der purinergen Signalkaskade auf die EndMT in VEC – Erste mechanistische Einblicke**

Erste Einblicke legen nahe, dass sich der Effekt der Inhibition von CD73 und CD39 auf die Induktion von EndMT mechanistisch von denen der purinergen Rezeptoren unterscheidet und dabei die Phosphorylierung von p38, sowie eine mögliche Interaktion mit dem TGFβ Signalweg eine Rolle spielt.

## 4.7 Limitationen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen insgesamt erstmals, dass die purinerge Signalkaskade Einfluss auf Funktionalität und Induktion von EndMT in humanen VEC der Aortenklappe hat. Im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen wie der CAVD war bisher nur bekannt, dass sowohl EndMT als auch eine Dysregulation der purinergen Signaltransduktion eine Rolle spielen, potenzielle Zusammenhänge wurden nicht untersucht. Vor diesem Hintergrund stellen die Ergebnisse der vorliegenden Forschungsarbeit eine wichtige neue Erkenntnis dar, die die purinerge Signaltransduktion als Modulator von EndMT in VEC identifiziert. Dies lässt, zusammen mit den in der Forschungsgruppe bereits publizierten Daten zur prodegenerativen Wirkung auf VIC den Schluss zu, dass sich eine Dysregulation der purinergen Signalkaskade maßgeblich auf die Physiologie der Aortenklappe auswirkt. Natürlich stellt die Degeneration von Herzklappen ein komplexes Zusammenwirken verschiedener Prozesse und Zellarten dar, sodass die isolierte Betrachtung einer Zellart hier als Limitation genannt werden muss. Auch die Herkunft der Zellen und die Reinheit der Ausgangskultur können limitierende Faktoren darstellen. Da die Zellen aus vorerkrankten Patienten stammen, die sich einer Herztransplantation unterzogen haben, könnten sie bereits eine gesteigerte Sensibilität gegenüber diversen Stimuli haben oder grundsätzlich eine erhöhte Fähigkeit, EndMT zu durchlaufen besitzen.

Im Kontext der Entwicklung therapeutischer Ansätze und Nutzung im Bereich Tissue Engineering, rückt die purinerge Signaltransduktion nun also ebenfalls als vielversprechender Modulator von EndMT in VEC und degenerativen Veränderungen in VIC in den Fokus. Es ist entsprechend denkbar, dass zukünftige medikamentöse Therapien bei dieser Art der Signaltransduktion ansetzen können. Darüber hinaus könnten die gewonnenen Erkenntnisse auch im Tissue Engineering bioartifizieller Herzklappenprothesen eine maßgebliche Rolle spielen, um die frühzeitige Implantatdegeneration durch Manipulation der purinergen Signalkaskade zu verhindern.

Nach wie vor sind Fragen nach den genauen Mechanismen, sowie der Interaktion von VIC und VEC in diesem Zusammenhang offen. Zukünftige Studien sollten daher sowohl weiterführende mechanistische Untersuchungen als auch die Verwendung von Co-Kulturen oder sogar 3D Zellkulturmodellen enthalten, um ein umfassenderes Bild der Auswirkungen einer dysregulierten purinergen Signaltransduktion unter physiologischeren Bedingungen zu erlangen. Schließlich könnten so gezielte Targets für die oben genannten Interventionen identifiziert und genutzt werden.

## 4.8 Fazit

Die vorliegende Forschungsarbeit zeigt erstmals den Einfluss der purinergen Signalkaskade auf die Induktion einer EndMT in humanen Endothelzellen der Aortenklappe. Hierbei scheint eine Dysregulation der Schlüsselenzyme CD39 und CD73 kurzfristig zunächst zu einer endothelialen Dysfunktion und langfristig zu einer partiellen EndMT zu führen. Da ein genetisch bedingter Funktionsverlust dieser Enzyme bereits mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde, kann somit die Hypothese aufgestellt werden, dass hierbei die EndMT eine Rolle spielt. Die mechanistischen Hintergründe, die die purinerge Signalübertragung und das Entstehen einer EndMT in VEC verbinden, sind weiterhin unklar, erste Einblicke weisen aber auf eine Vermittlung über p38 Phosphorylierung und ein Zusammenspiel mit der TGF $\beta$  Signalkaskade hin.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Chester, A.H., et al., *The living aortic valve: From molecules to function*. Glob Cardiol Sci Pract, 2014. **2014**(1): p. 52-77.
2. El-Hamamsy, I., A.H. Chester, and M.H. Yacoub, *Cellular regulation of the structure and function of aortic valves*. Journal of Advanced Research, 2010. **1**(1): p. 5-12.
3. Johnson, C.M. and D.N. Fass, *Porcine cardiac valvular endothelial cells in culture. A relative deficiency of fibronectin synthesis in vitro*. Lab Invest, 1983. **49**(5): p. 589-98.
4. Farivar, R.S., et al., *Transcriptional profiling and growth kinetics of endothelium reveals differences between cells derived from porcine aorta versus aortic valve*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **24**(4): p. 527-34.
5. Yano, K., et al., *Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium*. Blood, 2007. **109**(2): p. 613-5.
6. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. Circulation, 1994. **90**(2): p. 844-53.
7. Butcher, J.T. and R.M. Nerem, *Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress*. Tissue Eng, 2006. **12**(4): p. 905-15.
8. Skowasch, D., et al., *Cells of primarily extra-valvular origin in degenerative aortic valves and bioprostheses*. Eur Heart J, 2005. **26**(23): p. 2576-80.
9. Bosse, K., et al., *Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **60**: p. 27-35.
10. Aird, W.C., *Endothelial cell heterogeneity*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(1): p. a006429.
11. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
12. Liu, V.W. and P.L. Huang, *Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(1): p. 19-29.

13. Taddei, S., et al., *Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies*. *Curr Pharm Des*, 2003. **9**(29): p. 2385-402.
14. Verma, S. and T.J. Anderson, *Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist*. *Circulation*, 2002. **105**(5): p. 546-9.
15. Waitkus, M.S., D.P. Harris, and P.E. DiCorleto, *Mechanisms of Endothelial Activation*, in *Encyclopedia of Medical Immunology: Autoimmune Diseases*, I.R. Mackay, et al., Editors. 2014, Springer New York: New York, NY. p. 715-724.
16. Hunt, B.J. and K.M. Jurd, *Endothelial cell activation*. *BMJ*, 1998. **316**(7141): p. 1328.
17. Gimbrone, M.A., Jr. and G. García-Cardena, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 620-36.
18. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. *Circulation*, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
19. Sanchez-Duffhues, G., V. Orlova, and P. Ten Dijke, *In Brief: Endothelial-to-mesenchymal transition*. *J Pathol*, 2016. **238**(3): p. 378-80.
20. Markwald, R.R., T.P. Fitzharris, and F.J. Manasek, *Structural development of endocardial cushions*. *Am J Anat*, 1977. **148**(1): p. 85-119.
21. Markwald, R.R., T.P. Fitzharris, and W.N. Smith, *Structural analysis of endocardial cytodifferentiation*. *Dev Biol*, 1975. **42**(1): p. 160-80.
22. Paranya, G., et al., *Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(4): p. 1335-43.
23. Chen, P.Y., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(12): p. 4514-28.
24. Zhong, A., Z. Mirzaei, and C.A. Simmons, *The Roles of Matrix Stiffness and  $\beta$ -Catenin Signaling in Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Aortic Valve Endothelial Cells*. *Cardiovasc Eng Technol*, 2018. **9**(2): p. 158-167.
25. Bischoff, J., et al., *CD45 Expression in Mitral Valve Endothelial Cells After Myocardial Infarction*. *Circ Res*, 2016. **119**(11): p. 1215-1225.

26. Bischoff, J. and E. Aikawa, *Progenitor Cells Confer Plasticity to Cardiac Valve Endothelium*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2011. **4**(6): p. 710-719.
27. Mahler, G.J., E.J. Farrar, and J.T. Butcher, *Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(1): p. 121-30.
28. Evrard, S.M., et al., *Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11853.
29. Moonen, J.R., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress*. Cardiovasc Res, 2015. **108**(3): p. 377-86.
30. Dahal, S., et al., *Endothelial to mesenchymal transformation is induced by altered extracellular matrix in aortic valve endothelial cells*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(10): p. 2729-2741.
31. Hjortnaes, J., et al., *Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells*. Atherosclerosis, 2015. **242**(1): p. 251-260.
32. Cho, J.G., et al., *Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 294.
33. Kovacic, J.C., et al., *Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review*. Journal of the American College of Cardiology, 2019. **73**(2): p. 190-209.
34. Ma, J., et al., *TGF- $\beta$ -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020. **8**(260).
35. Kokudo, T., et al., *Snail is required for TGF $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 20): p. 3317-24.
36. Medici, D., S. Potenta, and R. Kalluri, *Transforming growth factor- $\beta$ 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling*. Biochem J, 2011. **437**(3): p. 515-20.



37. Adjuto-Saccone, M., et al., *TNF- $\alpha$  induces endothelial–mesenchymal transition promoting stromal development of pancreatic adenocarcinoma*. *Cell Death & Disease*, 2021. **12**(7): p. 649.
38. Burnstock, G., *Purinergic nerves*. *Pharmacol Rev*, 1972. **24**(3): p. 509-81.
39. Öhman, J. and D. Erlinge, *The touching story of purinergic signaling in epithelial and endothelial cells*. *Purinergic Signal*, 2012. **8**(3): p. 599-608.
40. Zimmermann, H., M. Zebisch, and N. Sträter, *Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases*. *Purinergic Signal*, 2012. **8**(3): p. 437-502.
41. Nishimura, A., et al., *Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases*. *Pharmacol Ther*, 2017. **180**: p. 113-128.
42. Burnstock, G., *Purine and pyrimidine receptors*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(12): p. 1471-83.
43. Burnstock, G., *Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential*. *Keio J Med*, 2013. **62**(3): p. 63-73.
44. Rutsch, F., et al., *Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification*. *Nat Genet*, 2003. **34**(4): p. 379-81.
45. St Hilaire, C., et al., *NT5E mutations and arterial calcifications*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(5): p. 432-42.
46. Kaniewska, E., et al., *Immunohistochemical and functional analysis of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) in pig aortic valves*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2014. **33**(4-6): p. 305-12.
47. Mahmut, A., et al., *Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor*. *Cardiovascular Research*, 2015. **106**(1): p. 109-120.
48. Association, W.M., *World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*. *JAMA*, 2013. **310**(20): p. 2191-2194.
49. Cooley, B.C., et al., *TGF- $\beta$  signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(227): p. 227ra34.

50. Islam, S., et al., *The Mechanobiology of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease*. *Frontiers in Physiology*, 2021. **12**(1409).
51. Ciavarella, C., et al., *Involvement of miR-30a-5p and miR-30d in Endothelial to Mesenchymal Transition and Early Osteogenic Commitment under Inflammatory Stress in HUVEC*. *Biomolecules*, 2021. **11**(2).
52. Weber, 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): p. 4356-4369.
53. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
54. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
55. Shapiro, A.L., E. Viñuela, and J.V. Maizel, Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967. **28**(5): p. 815-20.
56. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
57. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Anal Biochem*, 1981. **112**(2): p. 195-203.
58. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
59. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
60. Kumar, P., A. Nagarajan, and P.D. Uchil, *Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018. **2018**(6).
61. *Deutsche Adipositas Gesellschaft e.V.* [cited 2021 13.10.]; Available from: <https://adipositas-gesellschaft.de/ueber-adipositas/definition-von-adipositas/>.

62. Chaitanya, G.V., A.J. Steven, and P.P. Babu, *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration*. Cell communication and signaling : CCS, 2010. **8**: p. 31-31.
63. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase Functions in Cell Death and Disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(4).
64. Lawson, C. and S. Wolf, *ICAM-1 signaling in endothelial cells*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 22-32.
65. Andresen, T.K., J.L. Svennevig, and V. Videm, *Soluble VCAM-1 is a very early marker of endothelial cell activation in cardiopulmonary bypass*. Perfusion, 2002. **17**(1): p. 15-21.
66. Liu, T., et al., *NF- $\kappa$ B signaling in inflammation*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**: p. 17023-.
67. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(10): p. a016295.
68. Kishimoto, T., *IL-6: from its discovery to clinical applications*. Int Immunol, 2010. **22**(5): p. 347-52.
69. Houde, M., L. Desbiens, and P. D'Orléans-Juste, *Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity*. Adv Pharmacol, 2016. **77**: p. 143-75.
70. *Internationale Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation 2020*.
71. Ribatti, D., et al., *Surface markers: An identity card of endothelial cells*. Microcirculation, 2020. **27**(1): p. e12587.
72. Goncharov, N.V., et al., *Markers of Endothelial Cells in Normal and Pathological Conditions*. Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2020. **14**(3): p. 167-183.
73. Nourshargh, S., F. Krombach, and E. Dejana, *The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **80**(4): p. 714-718.
74. Sadler, J.E., *Biochemistry and genetics of von Willebrand factor*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 395-424.
75. Kaur, G. and J.M. Dufour, *Cell lines: Valuable tools or useless artifacts*. Spermatogenesis, 2012. **2**(1): p. 1-5.

76. Lidington, E.A., et al., *A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions*. *Transplant Immunology*, 1999. **7**(4): p. 239-246.
77. Capes-Davis, A., et al., *Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(1): p. 1-8.
78. Dejana, E., K.K. Hirschi, and M. Simons, *The molecular basis of endothelial cell plasticity*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14361.
79. Cooley, L.S. and D.R. Edwards, *New insights into the plasticity of the endothelial phenotype*. *Biochem Soc Trans*, 2011. **39**(6): p. 1639-43.
80. Piera-Velazquez, S. and S.A. Jimenez, *Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(2): p. 1281-1324.
81. Buchheiser, A., et al., *Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Cardiovascular Research*, 2011. **92**(2): p. 338-347.
82. Pelletier, S., et al., *Adenosine induces cyclic-AMP formation and inhibits endothelin-1 production/secretion in guinea-pig tracheal epithelial cells through A2B adenosine receptors*. *British Journal of Pharmacology*, 2000. **129**(2): p. 243-250.
83. Phosri, S., et al., *Stimulation of Adenosine A2B Receptor Inhibits Endothelin-1-Induced Cardiac Fibroblast Proliferation and  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Synthesis Through the cAMP/Epac/PI3K/Akt-Signaling Pathway*. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. **8**(428).
84. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. *Nat Med*, 2007. **13**(8): p. 952-61.
85. Pinto, M.T., et al., *Endothelial Mesenchymal Transition: Comparative Analysis of Different Induction Methods*. *Biological Procedures Online*, 2016. **18**(1): p. 10.
86. Kutryb-Zajac, B., 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): p. 137-160.

87. Jin, H., et al., *Increased activity of TNAP compensates for reduced adenosine production and promotes ectopic calcification in the genetic disease ACDC*. *Sci Signal*, 2016. **9**(458): p. ra121.
88. Buonato, J.M. and M.J. Lazzara, *ERK1/2 blockade prevents epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells and promotes their sensitivity to EGFR inhibition*. *Cancer research*, 2014. **74**(1): p. 309-319.
89. Xie, L., et al., *Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro*. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2004. **6**(5): p. 603-610.
90. Ricard, N., et al., *Endothelial ERK1/2 signaling maintains integrity of the quiescent endothelium*. *J Exp Med*, 2019. **216**(8): p. 1874-1890.
91. Yoshida, M., et al., *TGF- $\beta$ -operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals*. *International journal of biological sciences*, 2012. **8**(7): p. 1062-1074.
92. Zhao, P., et al., *Single-cell RNA-seq reveals a critical role of novel pro-inflammatory EndMT in mediating adverse remodeling in coronary artery-on-a-chip*. *Sci Adv*, 2021. **7**(34).
93. Cheng, J.C., H.M. Chang, and P.C. Leung, *Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits trophoblast cell invasion by inducing Snail-mediated down-regulation of vascular endothelial-cadherin protein*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(46): p. 33181-92.
94. Chen, S., et al., *CD73 expression on effector T cells sustained by TGF- $\beta$  facilitates tumor resistance to anti-4-1BB/CD137 therapy*. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 150.
95. Peres, R.S., et al., *TGF- $\beta$  signalling defect is linked to low CD39 expression on regulatory T cells and methotrexate resistance in rheumatoid arthritis*. *J Autoimmun*, 2018. **90**: p. 49-58.
96. Cappelli, C., et al., *The TGF- $\beta$  profibrotic cascade targets ecto-5'-nucleotidase gene in proximal tubule epithelial cells and is a traceable marker of progressive diabetic kidney disease*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2020. **1866**(7): p. 165796.
97. Morello, S., et al., *IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  Regulation of the Adenosine Receptor (A<sub>2A</sub>) Expression: Differential Requirement for NF- $\kappa$ B*

- Binding to the Proximal Promoter*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(10): p. 7173.
98. Guillén-Gómez, E., et al., *From Inflammation to the Onset of Fibrosis through A2A Receptors in Kidneys from Deceased Donors*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(22): p. 8826.
99. Capecchi, P.L., et al., *Upregulation of A2A adenosine receptor expression by TNF-alpha in PBMC of patients with CHF: a regulatory mechanism of inflammation*. Journal of cardiac failure, 2005. **11**(1): p. 67-73.

## Veröffentlichungen und Projektförderungen

### Publikationen

In der Zeit des Promotionsprojektes wurde an den unten aufgeführten Originalarbeiten mitgewirkt.

Assmann A, Schmidt V, Lepke C, Sugimura Y, Assmann AK, Barth M, Lichtenberg A, Akhyari P. (2022) *Degeneration of biological heart valve grafts in a rat model of superoxide dismutase-3 deficiency*. FASEB J. 36(11):e22591.

Aubin H, Rath L, Vey A, Schmidt V, Barth M, Weber E, Lichtenberg A, Akhyari P. (2022) *Ventricular stabilization with a customized decellularized cardiac ECM-based scaffold after myocardial infarction alters gene expression in a rodent LAD-ligation model*. Front Bioeng Biotechnol. 10:896269.

Weber A, Lageveen LG, Lee YM, Schmidt V, Rellecke P, Sixt SU, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) *The course of blood cell-derived extracellular vesicles in patients undergoing surgical aortic valve replacement*. BioMed Research International. 6381396.

Weber A, Pfaff M, Schöttler F, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) *Reproducible in-vitro tissue culture model to study basic mechanisms of calcific aortic valve disease: comparative analysis to valvular interstitial cells*. Biomedicines. 9(5):474

Toshmatova M, Nakanishi S, Sugimura Y, Schmidt V, Lichtenberg A, Assmann A, Akhyari P. (2019) *Influence of Laminin Coating on the Autologous In Vivo Recellularization of Decellularized Vascular Protheses*. Materials (Basel). 12(20):3351.

Weber A, Wehmeyer JC, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P (2019) *Rapid Fluorescence-based Characterization of Single Extracellular Vesicles in Human Blood with Nanoparticle-tracking Analysis*. J. Vis. Exp. (143), e58731.

## Kongressbeiträge

In der Zeit des Promotionsprojektes wurde an den unten aufgeführten Beiträgen zu Fachtagungen mitgewirkt.

Weber A, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) *The purinergic signaling system modulates the inflammatory response of human valvular endothelial cells*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon. 69(S 01): S1-S85 – Vortrag bei der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)

Weber A, Schöttler F, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) *Metformin protects against the Degeneration of Aortic Valves*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon. 69(S 01): S1-S85 – Vortrag bei der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)

Weber A, Lageveen LG, Lee YM, Schmidt V, Rellecke P, Sixt SU, Lichtenberg A, Akhyari P (2021) *The course of blood cell-derived extracellular vesicles in patients undergoing surgical aortic valve replacement*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon. 69(S 01): S1-S85 – Vortrag bei der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)

Weber A, Schmidt V, Leuders P, Pfaff M, Hesse J, Schrader J, Lichtenberg A, Akhyari P (2020) *Dysregulation of ATPases Promotes the Degeneration of Aortic Valves*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 68 ( S01), S1-72.– Vortrag bei der 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)

Weber A, Schöttler F, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P (2020) *Metformin Exerts Protective Effects against the Degeneration of Aortic Valves*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 68 ( S01), S1-72.– Vortrag bei der 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)

## Projektförderungen

Das Forschungsprojekt wurde durch folgende Institutionen gefördert.

Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2018) *The role of the purinergic signaling system in endothelial to mesenchymal transition of valvular endothelial cells*. Weber A.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die hier vorliegende Dissertation „Die Rolle der purinergen Signalkaskade in der Endothelialen zu Mesenchymalen Transition humaner Endothelzellen der Aortenklappe“ von mir selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Arbeit wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form keiner anderen als der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg, der mir die Möglichkeit gab, meine Promotion an der Klinik für Herzchirurgie anzufertigen. Die stabilen Arbeitsbedingungen und die stetige Unterstützung bei der Umsetzung des Projektes waren unverzichtbar für den erfolgreichen Abschluss meiner Promotionsarbeit.

Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari, für die Begutachtung der Arbeit und Ihren stetigen Einsatz an der Schnittstelle von Klinik und Forschung. Sie wussten mich stets zu fordern und haben maßgeblich an meinem fachlichen und persönlichen Wachstum in diesen Jahren teilgehabt.

Herrn Prof. Dr. Matias Zurbriggen für die Übernahme des Zweitgutachtens und das damit gezeigte Interesse an meiner Arbeit. Ich danke Ihnen, dass ich Sie stets als Teil des Fachbereichs Biologie an meiner Seite wusste.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Weber, dessen Engagement bei der Verwirklichung dieses Forschungsvorhabens unerlässlich war. Vielen Dank für das große Vertrauen und deinen Glauben an meine Fähigkeiten, unseren stetigen Austausch offener und direkter Worte und dass ich dich immer hinter mir wusste.

Großer Dank gilt an dieser Stelle natürlich dem ganzen Laborteam, gleichermaßen Ehemaligen wie neu hinzugekommen Menschen, für die lockere Atmosphäre, die lustigen Gespräche und die gegenseitige Unterstützung.

Danke ganz besonders an Elvira und Hug für eure Wertschätzung, euer Vertrauen und die große Unterstützung im letzten Jahr (Alle für einen, einer für alle 😊)! Danke auch an Igor dafür, dass du es in der Schreibphase mit mir in einem Büro ausgehalten hast und mich einfach immer zum Lachen bringen kannst. Ebenfalls danke an Melanie, für die großartige Büro-Dekoration und Unterhaltung in den letzten Monaten.

Vor Allem und ganz besonders danke ich aber meinen Eltern, Klaus und Karin Schmidt, ohne deren bedingungslose Liebe und Unterstützung ich ganz sicher, in jeglicher Hinsicht, nicht dort wäre, wo ich nun stehe. Euer liebevolles zu Hause war und ist mir die kraftvollste Wurzel meiner Zuversicht.

Danke an Lea-Aylin, Lara, Ksenia, Melissa, Robin, Fred und Annalena, die alle in den Jahren dieses Weges in mein Leben getreten sind, um zu bleiben <3

Und schließlich danke Günti, dass du es nun schon mehr als ein Jahrzehnt mit meiner sonderbaren Person aushältst. Du bist mein Fels und mein Beschützer, wenn ich es brauche, mein Partner in Crime, mein größter Fan und mein härtester Kritiker. Diese Arbeit war Nichts im Vergleich zu den Dingen, durch die wir schon gemeinsam gegangen sind. Zuhause ist kein Ort, das bist du.