

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

**Wirkung des extrazellulären Proteins Osteopontin auf die
osteogene Transformation von VIC in einem
dreidimensionalen Zellkulturmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von

Karina Baier

2023

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

gez.: Karina Baier

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Stephan Urs Sixt

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern und Stephan, für ihre grenzenlose
Motivation und Unterstützung.

I. Zusammenfassung

Die Aortenklappenstenose stellt bei der zunehmend alternden Bevölkerung ein hoch aktuelles klinisches Problem dar. Etwa 30% der westlichen Welt über 65 Jahre leiden an einer Aortenklappensklerose. Diese entsteht durch fibrosierende Prozesse, die nach aktuellem Stand der Forschung über eine chronische Inflammation zu einer Verdickung der Aortenklappe führen. Die klinisch manifeste Aortenklappenstenose entsteht im Spätstadium durch Biomineralisation der Klappenmatrix und führt zu einer Herzinsuffizienz. Unter einer manifesten Aortenklappenstenose leiden ca. 3% der über 75-Jährigen.

Die einzige kurative Therapie ist hierbei der Aortenklappenersatz. Jedoch ist auch die biologische Klappenprothese der Herzklappendegeneration ausgesetzt. Einen kausalen pharmakologischen Therapieansatz gibt es aktuell noch nicht. Umso wichtiger ist es den komplexen Pathomechanismus der Aortenklappendegeneration, näher zu verstehen, in welchem die extrazelluläre Matrix (ECM) und Valvuläre Interstitialzellen (VIC) eine wesentliche Rolle spielen. Eine weitere wesentliche Rolle wird dem multifunktionellen Phosphoprotein Osteopontin (OPN) zugesprochen.

Ziel der Arbeit war es die Rolle des extrazellulären Matrixproteins Osteopontin bei der Entstehung der Herzklappendegeneration zu untersuchen. Hierfür wurde die Wirkung des Osteopontins, abhängig von seinem Phosphorylierungszustand, auf valvuläre Interstitialzellen in einem zweidimensionalen und in einem dreidimensionalen Zellkulturmodell (mECM) untersucht. Das übergeordnete Ziel ist die Schaffung von experimentellen Bedingungen, unter denen eine Kalzifizierung der Herzklappe bzw. der Herzklappenprothese verhindert werden kann.

Als Grundlage für die Untersuchung der Wirkung des OPN auf Kalzifizierungsprozesse in VIC-Kulturen wurde ein matrigelbasiertes, dreidimensionales Zellkulturmodell (mECM) verwendet. Nach Etablierung der Kalzifizierung in diesem Modell und Nachweis mittels histologischer Färbung und Quantifizierung des Kalziumgehalts mittels Kalziumassay, wurden Versuche mit OPN in zweidimensionalen und dreidimensionalen VIC-Kulturen durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Etablierung der Phosphorylierung und Dephosphorylierung des OPN und der Nachweis dieser mittels Westernblot. Daraufhin wurde die Wirkung des OPN auf VIC in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungszustand untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Kostimulation der VIC mit OPN und dem vascular endothelial growth factor (VEGF) oder OPN und transforming growth factor β (TGF β) zu einer vermehrten alpha smooth muscle actin-Expression (α -SMA) und somit zu einer vermehrten VIC-Aktivierung führen. Die VIC-Aktivierung wird als Teil der Kalzifizierungsprozesse in Aortenklappen angesehen.

Zusätzlich konnte eine Veränderung der OPN-Wirkung auf Kalzifizierungsprozesse in VIC-Kulturen in Abhängigkeit von dem Phosphorylierungsstatus des OPN nachgewiesen werden. Durch die Stimulation von VIC im zweidimensionalen Modell mit phosphoryliertem OPN (pOPN) konnte ein dekalzifizierender Effekt erzielt werden. Eine Reproduktion des dekalzifizierenden Effekts auf VIC im mECM-Modell war nicht möglich, welches an einer verminderten Aktivierung der VIC in den mECM liegen könnte.

Schlussfolgernd ist OPN in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungszustand ein wesentlicher Regulator von Kalzifizierungsprozessen, die zu einer Aortenklappenstenose führen.

II. Summary

Calcific aortic valve disease (CAVD) is due to the aging population a highly topical clinical problem. Approximately 30% of the population of the developed world suffer from an aortic valve sclerosis. The disease arises from fibrosing processes which leads through a chronic inflammation to the thickening of the aortic valve. The clinic manifest aortic stenosis is the late manifestation of the disease through biomineralization of the valve matrix. It leads to heart failure. Around 3% of the people over 75 years suffer from a severe aortic stenosis. The only curative therapy to this point is the aortic valve replacement. However, the biological valve replacement is as well affected by degeneration. To this point no causal pharmacological therapy exists to treat patients with a severe aortic stenosis. Therefore, it is important to fully understand the complex pathomechanism of the CAVD, in which the extracellular matrix (ECM) and valvular interstitial cells (VIC) play a significant role. Furthermore, the phosphoprotein Osteopontin (OPN) might be an important regulator in the development of the CAVD.

The aim of the study was to examine the role of the extracellular matrix protein OPN in the progression of CAVD. A main aspect of the study was to investigate the effect of OPN on the VIC based on the phosphorylation status of OPN. Two cell culture models, a two-dimensional and a three-dimensional (mECM) VIC model, has been used to examine the effect of the OPN. The main goal was to create conditions to stop the degeneration of aortic valves and biological aortic valve replacements.

The foundation of the study was a three-dimensional Matrigel-based cell culture model with VIC (mECM), which was calcified. After verifying the calcification in the mECM with histological treatments and Calcium assays, the examination of the effect of OPN und the mECM model started. Additionally, an experiment for the phosphorylation and dephosphorylation of the OPN (pOPN and dOPN) was established. So furthermore, the effect of the OPN on the calcification processes around VIC could be investigated depending on its phosphorylation status.

The analyses have shown that a costimulation of the mECM with transforming growth factor ($TGF\beta$) and OPN as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) and OPN leads to an activation of the VIC, which was measured by the expression of alpha smooth muscle actin (α -SMA) expression in the histological examination. The activation of the VIC is known to be a part of the progression of the CAVD. Furthermore, it was shown that the effect of the OPN is phosphorylationstatus-dependent. A regress of calcification was achieved after stimulating the two-dimensional VIC cultures with phosphorylates OPN (pOPN). This result could not be transferred to the mECM model.

This study confirmed that the effect of the OPN is dependent on the phosphorylation status of the phosphoprotein. Still, it was revealed that the costimulation of OPN and $TGF\beta$ /VEGF leads to an increased activation of VIC in the mECM. And although the study has shown that OPN is an important regulator in the progression of CAVD further studies are needed to fully understand the signaling processes of the OPN.

III. Abkürzungsverzeichnis

2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
AKE	Aortenklappenersatz
Aqua _{dest}	Destiliertes Wasser
ASARM	aspartat and serin acid rich motive
ATP	Adenosin-5`-triphosphat Dinatri- umsalz Hydrat
aVIC	activated valvular interstitial cells
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAVD	calcific aortic valve disease
CD73	cluster of differentiation 73
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
dOPN	dephosphoryliertes OPN
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndMT	endothelial to mesenchymal Transi- tion
Eppi	Eppendorf Gefäß
GAG	Glykosaminoglykane
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazi- nyl)-ethansulfonsäure (Puffersub- stanz)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells

LDL	Low-Density-Lipoprotein
Lp (a)	Lipoprotein a
LSM	laser scanning microscope
mECM	matrigelbasierte Extrazellulärmatrix
MMP	matrix metalloproteinase
NaOH	Natriumhydroxid
OPN	Osteopontin
oVIC	osteoblastic valvular interstitial cells
oxHDL	oxidiertes High-density lipoprotein
oxLDL	oxidiertes Low-density lipoprotein
P	Passage
PBS	phosphate buffered saline
pOPN	phosphoryliertes OPN
qVIC	quiescent (ruhende) valvular interstitial cells
ROS	reactive oxygen species
Runx2	Runt-related Transkriptionsfaktor 2
SDS Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIBLING	small integrine-binding ligand N-linked glycoprotein
TAVI	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TGF β	transforming growth factor β
TNAP	tissue non-specific alkaline phosphatase
VEC	Valvular endothelial cell
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIC	valvular interstitial cell
z.B.	zum Beispiel
α -SMA	α -smooth muscle actin
β GP	β -Glycerolphosphat

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DEFINITION UND KLINISCHE RELEVANZ DER AORTENKLAPPENDEGENERATION	1
1.2	RISIKOFAKTOREN DER KALZIFIZIERENDEN AORTENKLAPPENSTENOSE	3
1.3	THERAPIE DER AORTENKLAPPENSTENOSE	3
1.4	KONGENITALE UND ERWORBENE FORMEN DER AORTENKLAPPENSTENOSE	4
1.5	PATHOPHYSIOLOGIE DER AORTENKLAPPENDEGENERATION	5
1.5.1	AUFBAU DER AORTENKLAPPE.....	5
1.5.2	EXTRAZELLULÄRMATRIX	7
1.5.3	VALVULÄRE INTERSTITIALZELLEN.....	10
1.5.4	VALVULÄRE ENDOTHELZELLEN	11
1.5.5	WIRKUNG VON ZYTOKINEN AUF DIE ZELLEN DER HERZKLAPPE- TGF β UND VEGF.....	11
1.5.6	OSTEOPONTIN.....	13
1.6	DREIDIMENSIONALE ZELLKULTURMODELLE	15
1.6.1	MATRIGEL ALS IMITATION DER EXTRAZELLULÄRMATRIX	16
2	<u>ZIELE DER ARBEIT</u>	17
3	<u>MATERIALIEN</u>	19
3.1	VERBRAUCHSMATERIALIEN	19
3.2	CHEMIKALIEN.....	21
3.3	LABORGERÄTE	25
3.4	KITS	27
3.5	ZELLKULTURMEDIEN UND -ZUBEHÖR	27
3.6	ZUSAMMENSETZUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN ZELLMEDIEN	28
3.7	ANTIKÖRPER.....	29
3.7.1	PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	29
3.7.2	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER.....	29
3.8	PUFFER UND LÖSUNGEN	30
4	<u>METHODEN</u>	32

4.1	ZELLGewinnung, Zellkultivierung und Lagerung	32
4.2	ZellZählung mittels Neubauer Zählkammer	33
4.3	Versuche im zweidimensionalen Modell	33
4.4	Das Zellkulturmodell MECM	34
4.5	Stimulation der MECM in verschiedenen Versuchsmodellen	36
4.6	Histologie und Immunhistochemie	37
4.6.1	Kryoschnitte	37
4.6.2	Hämatoxylin/Eosin Färbung	38
4.6.3	Von Kossa Färbung	38
4.6.4	Immunhistochemische Färbungen	39
4.7	In situ Zymographie	40
4.8	Modifikation Osteopontin	40
4.8.1	Phosphorylierung von Osteopontin	41
4.8.2	Dephosphorylierung von Osteopontin	41
4.8.3	Probenaufbereitung und Aufreinigung POPN und DOPN	42
4.9	Proteinanalyse mittels Westernblot	43
4.9.1	Probenaufarbeitung	43
4.9.2	Gelherstellung	43
4.9.3	Gelelektrophorese/SDS-PAGE	44
4.9.4	Western-blotting und Antikörperbindung	44
4.9.5	Entwicklung des Westernblots und Auswertung	45
4.10	Kalziumassay	46
4.11	Software und statistische Auswertung	46
5	<u>Ergebnisse</u>	<u>47</u>
5.1	Histologische Charakterisierung des MECM-Modells	47
5.2	Untersuchungen zur Matrixkalzifizierung im MECM-Modell	49
5.2.1	Von Kossa Färbung	49
5.2.2	Kalziumassay	51
5.3	Bestimmung der Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9 mittels in situ Zymographie	52
5.4	Versuche zu der Wirkung von nicht modifiziertem Osteopontin auf die osteogene Transformation von VIC und MECM	54
5.4.1	Kalziumkonzentration in der zweidimensionalen Zellkultur nach Stimulation mit OPN.	54

5.4.2	DURCHLICHTAUFNAHMEN VON VIC IN DER 2D ZELLKULTUR.....	55
	56
5.4.3	WIRKUNG VON NICHT MODIFIZIERTEM OSTEOPONTIN AUF DIE OSTEOGENE TRANSFORMATION VON VIC IM DREIDIMENSIONALEN ZELLKULTURMODELL	56
5.4.4	KALZIUMKONZENTRATION IN MECM NACH OPN-STIMULATION IM MEDIUM	57
5.4.5	HISTOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON MECM NACH STIMULATION MIT OPN, TGF β UND VEGF	59
5.4.6	CHARAKTERISIERUNG DES NICHT MODIFIZIERTEM OPN IM WESTERNBLOT	62
5.5	VERSUCHE ZU DER WIRKUNG VON MODIFIZIERTEM OPN AUF DIE OSTEOGENE TRANSFORMATION VON VIC IN DEM MECM-MODELL	63
5.5.1	CHARAKTERISIERUNG DES MODIFIZIERTEM OPN IM WESTERNBLOT	63
5.5.2	VERSUCHE ZU DER WIRKUNG VON MODIFIZIERTEM OPN AUF VIC IM 2D MODELL	64
5.5.3	WIRKUNG VON MODIFIZIERTEM OPN AUF VIC IN MECM-KULTUREN.....	67
6	<u>DISKUSSION.....</u>	71
6.1	KALZIFIZIERUNG UND OSTEOGENE TRANSFORMATION DER VIC IM MECM-MODELL	71
6.2	WIRKUNG VON NICHT MODIFIZIERTEM OPN AUF VIC UND MECM	75
6.3	WIRKUNG VON POPN UND DOPN AUF VIC UND MECM	78
7	<u>SCHLUSSFOLGERUNGEN</u>	83
8	<u>LITERATUR-UND QUELLENVERZEICHNIS.....</u>	86
9	<u>DANKSAGUNG.....</u>	98

1 Einleitung

1.1 Definition und klinische Relevanz der Aortenklappendegeneration

Bei der Aortenklappenstenose handelt es sich um den am weitesten verbreiteten Herzklappenfehler weltweit^{1,2}. Hierbei kommt es zu einer Verengung der Aortenklappe unterschiedlicher Genese. Es wird zwischen der senilen kalzifizierten, der kongenitalen und der rheumatischen Aortenklappenstenose unterschieden.

Aufgrund des demographischen Wandels gewinnt die häufigste Form, die senile kalzifizierte Aortenklappenstenose weiter an Bedeutung. Aktuell liegt die Prävalenz der Aortenklappenstenose bei 2-7% bei über 65-Jährigen³. Aufgrund einer zunehmend alternden Bevölkerung wird ein starker Anstieg der Prävalenz in den nächsten Jahrzehnten erwartet. Auf der Grundlage von aktuellen demographischen Vorhersagen wird angenommen, dass sich die Zahl der Patienten in einem Alter von über 70 Jahren, die unter einer Aortenklappenstenose leiden, in den nächsten 50 Jahren mehr als verdoppeln wird^{2,4,5}.

Während die Aortenklappenstenose initial oft asymptomatisch verläuft, ist die Sterblichkeit nach Auftreten der typischen Symptomatik mit Dyspnoe, Angina pectoris und Synkopen stark erhöht.

Daher beträgt die 2-Jahres-Mortalität bei Patienten mit einer symptomatischen Aortenklappenstenose etwa 50%⁶. Beispielsweise ist die Aortenklappenstenose in Nordamerika für 85.000 Klappenersatzoperationen und 15.000 Tote im Jahr verantwortlich⁷.

Folglich handelt es sich bei der Aortenklappenstenose um eine Erkrankung mit höchster klinischer Relevanz.

Die Aortenklappensklerose stellt die erste Phase der Erkrankung dar. Hierbei entstehen erste makroskopische Veränderungen der Taschenklappen in Form einer Verdickung der einzelnen Klappensegel. Im weiteren Krankheitsprozess

zeigt sich über eine osteoblastische und fibroblastische Differenzierung der VIC eine Kalzifikation der Aortenklappe⁸. Durch die kalkhaltigen Ablagerungen in den Klappensegeln mit begleitender Inflammation kommt es zu einer progredienten Einengung des Lumens und zu einer eingeschränkten Beweglichkeit der Taschenklappen mit Erhöhung der Blutströmungsgeschwindigkeit⁷.

Dies führt bei einer klinisch manifesten Aortenklappenstenose zu einer erhöhten Druckbelastung des linken Ventrikels und somit zu einem progredienten Funktionsverlust der Aortenklappe mit einer konsekutiven Herzinsuffizienz.

Eine spezifische medikamentöse Therapie der Aortenklappenstenose existiert aktuell nicht. Symptomatische Patienten können nach dem derzeitigen Therapiestandard einer operativen oder interventionellen Therapie zugeführt werden. Die operative Therapie kann als chirurgischer Aortenklappenersatz sowie als perkutaner Klappenersatz (TAVI) erfolgen. Der chirurgische Aortenklappenersatz kann in Form einer biologischen als auch einer mechanischen Herzklappe erfolgen⁹, hierbei ist zu beachten, dass biologische Herzklappenprothesen ebenfalls von einer kalzifizierenden Klappendegeneration betroffen sind. Dies stellt die häufigste Ursache für ein Versagen der biologischen Herzklappenprothesen¹⁰.

Das Fehlen der pharmakotherapeutischen Ansätze ist darauf zurückzuführen, dass der Pathomechanismus der Aortenklappendegeneration nicht vollständig aufgeklärt ist. Für Jahrzehnte wurde die Erkrankung als passiver Prozess verstanden, in dem es in Abhängigkeit vom fortschreitenden Alter zu degenerativen Calciumablagerungen kommt. Die aktuelle Datenlage zeigt jedoch, dass es sich bei der Aortenklappenstenose um einen aktiven Krankheitsprozess handelt, der nicht unwiderruflich mit fortschreitendem Alter einhergeht¹¹.

Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Aortenklappenstenose spielen die VIC, die ECM sowie einige spezielle Moleküle der ECM, insbesondere Wachstumsfaktoren und das Glykophosphoprotein Osteopontin^{12,13}.

Ein besseres Verständnis des Pathomechanismus der Aortenklappenstenose könnte somit zu neuen Erkenntnissen in Form von präventiven Maßnahmen und pharmakotherapeutischen Therapieoptionen führen.

1.2 Risikofaktoren der kalzifizierenden Aortenklappenstenose

Die Aortenklappenstenose ist nach aktueller Studienlage keine unabwendbare Folge des Alters und scheint mit spezifischen Risikofaktoren assoziiert zu sein¹⁴. Neben den bekannten Risikofaktoren der Atherosklerose bestehen auch charakteristische Risikofaktoren der Aortenklappenstenose. Das Auftreten der Aortenklappenstenose korreliert am stärksten mit einem hohen Lebensalter. Darüber hinaus zeigt sich eine starke Korrelation zwischen der Prävalenz der Aortenklappenstenose und dem männlichen Geschlecht der Patienten. Ein Risikofaktor, welcher auch als Biomarker für die kalzifizierende Aortenklappenstenose zunehmend an Bedeutung gewinnen könnte, ist der Anstieg des Apolipoproteins im Serum. Hierfür scheint ein Polymorphismus im Lipoprotein (a) Gen verantwortlich zu sein, welcher sich als wesentlicher Bestandteil in der Pathogenese der Aortenklappen Degeneration herausgestellt hat⁸.

Weitere Risikofaktoren mit einer schwächeren Korrelation sind die arterielle Hypertonie als Begleiterkrankung, der Nikotinabusus und eine erhöhte Serumkonzentrationen des Low Density Lipoproteins (LDL)¹⁵.

Die Erforschung von Risikofaktoren und Biomarkern zur Etablierung von präventiven Maßnahmen unterliegt aktuellen Studien, sodass diese noch nicht vollständig offengelegt sind.

1.3 Therapie der Aortenklappenstenose

Der chirurgische Aortenklappen-Ersatz (AKE) und die Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) sind aktuell die etablierten Therapieoption der schweren Aortenklappenstenose.

Gemäß der aktuellen Leitlinie der Fachgesellschaften Europäische Gesellschaft für Kardiologie und Europäische Vereinigung für Herz-Thorax-Chirurgie besteht nicht nur bei Patienten mit einer symptomatischen Aortenklappenstenose eine Indikation zur Intervention.

Auch bei asymptomatischen Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose und deutlich eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion oder auffälligen Belastungstests (Anstieg des Druckgradienten $>20\text{mmHg}$) wird ein Klappenersatz empfohlen.

Vereinfacht dargestellt wird die Altersgrenze für die Wahl der Methode des Klappenersatzes bei einer Altersgrenze von 75 Jahren gezogen. Jüngere Patienten mit einem geringen perioperativen Risiko sollten einen chirurgischen Aortenklappen-Ersatz erhalten¹⁶. Hierbei können mechanische oder biologische Klappenprothesen verwendet werden. Mechanische Herzklappenprothesen bieten den Vorteil einer langen Haltbarkeit, bei jedoch hohem thrombogenem Risiko. Somit bedürfen sie einer lebenslangen Antikoagulation. Aufgrund der langen Haltbarkeit werden sie bei einem jüngeren Patientenklintel implantiert. Die biologischen Klappenprothesen haben den Vorteil, dass keine lebenslange Antikoagulation notwendig ist. Jedoch sind sie auch von degenerativen und kalzifizierenden Prozessen betroffen und zeigen eine kürzere Haltbarkeit. Sie werden daher bei älteren Patienten verwendet. Bei hohem perioperativem Risiko wäre bei dieser Patientengruppe auch ein Klappenersatz mittels TAVI möglich.

Zum aktuellen Zeitpunkt existiert keine medikamentöse Behandlung, die den Kalziumablagerungen in den Klappensegeln der Aortenklappe vorbeugen kann. Die Erkrankung schädigt die Herzklappe somit irreversibel. Ein Effekt auf den Krankheitsprogress der Aortenklappenstenose durch die Therapie mit gängigen kardiovaskulären Medikamenten konnte in klinischen Studien nicht gezeigt werden¹⁷. Daher sind weitere Forschungsprojekte notwendig, um die Abläufe des Krankheitsgeschehens zu verstehen und neue therapeutische Angriffspunkte ausfindig zu machen.

1.4 Kongenitale und erworbene Formen der Aortenklappenstenose

Die kongenitale Aortenklappenstenose entsteht meist aufgrund einer angeborenen bikuspiden Aortenklappe. Die biskuspidale Aortenklappe stellt den häufigsten angeborenen Herzklappenfehler dar, von dem ca. 0,6-1% der adulten Bevölkerung betroffen sind. Sie hat eine hohe klinische Relevanz und ist der Auslöser von ca. 50% der behandlungsbedürftigen Aortenklappenstenosen¹⁸. Darüber

hinaus erkranken diese Patienten in einem früheren Lebensabschnitt an einer symptomatischen Aortenklappenstenose als Patienten mit einer trikuspiden Klappe^{19,20}. Eine Hypothese für die höhere Inzidenz der Aortenklappenstenose bei Patienten mit einer bikuspiden Klappe könnte die erhöhte mechanische Beanspruchung und die Veränderung des Strömungsverhaltens an der Klappe sein. Neue Studien zeigen zusätzlich zu dieser Hypothese genetische Varianten bei Patienten mit bikuspider Aortenklappe. Diese Varianten zeigen unter anderem Mutationen im NOTCH1-Gen und führen über eine Veränderung der Zusammensetzung der ECM zu einer beschleunigten Kalzifikation der Aortenklappe^{21,22}.

Die rheumatische Aortenklappenstenose kann Folge eines rheumatischen Fiebers sein und gehört somit zu den erworbenen Formen der Aortenklappenstenose. In Deutschland ist sie durch die antibiotische Behandlung von Streptokokken Infekten selten geworden. In den Entwicklungsländern ist das rheumatische Fieber jedoch weiterhin die häufigste Ursache von Herzerkrankungen bei Kindern. Das rheumatische Fieber wird durch eine Infektion mit β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe A verursacht. Im weiteren Verlauf kann es zu einer infektassoziierten Autoimmunreaktion kommen. Hierbei werden Antikörper gegen kardiale Strukturen gebildet, die über eine Endokarditis zu einer Vernarbung der Herzklappen führen können. Auch hier entsteht eine rigide Klappe mit verkleinerter Klappenöffnungsfläche, die zu einer erhöhten Druckbelastung des linken Ventrikels führt.

1.5 Pathophysiologie der Aortenklappendegeneration

1.5.1 Aufbau der Aortenklappe

Bei der Aortenklappe handelt es sich um eine Taschenklappe, die in der Regel aus drei Semilunarklappen (trikuspid) besteht. Die Anomalie der bikuspiden Aortenklappe wurde in dem vorangegangenen Abschnitt bereits erläutert.

Die Aortenklappe reguliert den Blutfluss vom linken Ventrikel in die Aorta. Die Oberfläche der einzelnen Klappensegel ist vollständig von valvulären Endothelzellen (VEC) überzogen.

Jedes Klappensegel besteht aus einer trilamellären Struktur. Histologisch werden die drei Schichten der ECM als Lamina fibrosa, spongiosa und ventrikularis bezeichnet. Jede dieser Schichten hat eine spezifische Funktion und ist mit VIC durchsetzt. Die äußeren Schichten sind die Lamina fibrosa und ventrikularis,

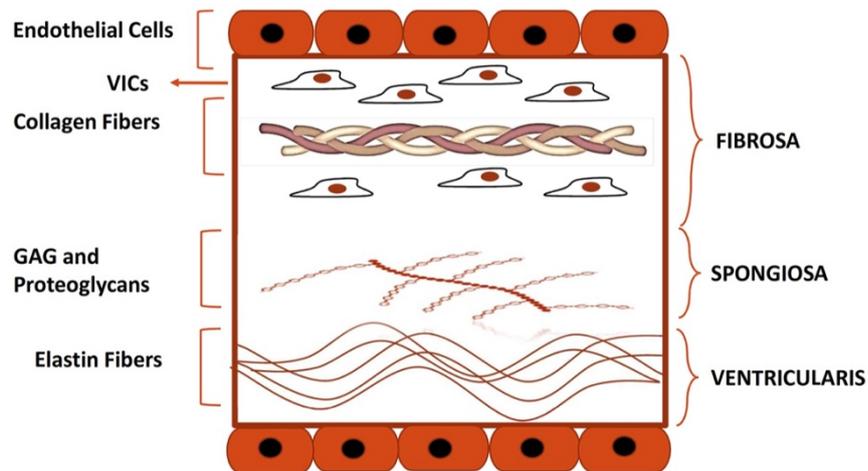


Abbildung 1: Histologischer Aufbau eines Klappensegels einer Aortenklappe. Die äußere Schicht des Segels ist durch eine Endothelzellschicht ummantelt. Die Struktur des Klappensegels wird von drei Schichten gebildet, der Lamina fibrosa, spongiosa und ventrikularis. Die Lamina fibrosa besteht aus Kollagenfasern und VIC. Die Lamina spongiosa ist reich an Glykosaminoglykanen (GAG). Die Lamina ventrikularis formt sich vor allem aus Elastinfasern (modifiziert nach Alushi et al. *Frontiers in Pharmacology* 2020¹⁷)

welche zum einen der Aorta und zum anderen dem linken Ventrikel zugewandt sind.

Die Lamina fibrosa besteht aus Kollagen mit vereinzelt VIC und ist maßgeblich an der Verstärkung der Klappenstruktur beteiligt²³. Die Lamina spongiosa ist reich an Glykosaminoglykanen und reduziert damit den mechanischen Stress, dem die Klappe ausgesetzt ist¹⁷. Die Hauptbestandteile der Lamina ventrikularis sind Kollagen Typ I und Elastin, welche für einen vollständigen Klappenschluss in der diastolischen Phase verantwortlich sind^{24,25}.

Die Semilunarklappen sind nicht vaskularisiert und sind im gesunden Zustand frei von Lymphozyten und Monozyten.

1.5.2 Extrazellulärmatrix

Die kalzifizierenden Umbauprozesse der Extrazellulärmatrix, die zu einer Aortenklappenstenose führen, sind multifaktoriell bedingt und involvieren eine genetische Prädisposition, Endothelläsionen durch mechanischen Stress, chronische Entzündungsprozesse, Lipidablagerungen sowie die Kalzifikation der Klappensegel^{26,27}.

Die drei Schichten der Extrazellulärmatrix sind mit VIC durchsetzt und von einer äußeren Schicht Endothelzellen ummantelt. In degenerativ veränderten Aortenklappen kommt es zu einer abnormen Verteilung der ECM-Bestandteile. Im nachfolgenden wird die Pathophysiologie der Aortenklappenstenose dem aktuellen Forschungsstand entsprechend in die Teilschritte der Aortenklappensklerose, der Inflammation und der anschließenden Aortenklappenkalzifizierung unterteilt²⁵(Siehe Abbildung 2).

Es wird angenommen, dass der Prozess der Aortenklappensklerose mit Endothelläsionen beginnt, die durch mechanischen Stress und veränderte Scherkräfte verursacht werden. Durch diese kommt es zu einer Infiltration von Lipiden, vor allem LDL und Lipoprotein a (Lp(a)), in die ECM der Klappensegel. Dies führt zu einer Aktivierung und Einwanderung von Immunzellen in das Klappensegel¹⁷. Im Rahmen des weiteren Krankheitsprogresses bilden sich subendotheliale Ablagerungen in der ECM, welche aus LDL, Lp(a) und Immunzellen bestehen. Es werden verschiedene Moleküle in Folge der Lipidablagerung in der ECM gebildet, welche eine Rolle bei der nachfolgenden Kalzifizierung spielen könnten. Im vorausgegangenen Jahrzehnt wurde dem oxidierten *Low-Density* Lipoprotein (oxLDL) eine Rolle in der Pathogenese zugeschrieben, wohingegen wir in aktuellen Forschungsprojekten eine Zunahme des oxidierten *High-Density* Lipoproteins (oxHDL) im Serum der Patienten mit einer Aortenklappenstenose sehen können^{28,29}. Die genauen Prozesse, die zu der nachfolgenden Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zu der Aktivierung der Inflammationsreaktion führen, sind noch nicht vollständig geklärt und unterliegen der aktuellen Forschung^{7,30}.

Im Rahmen der Inflammationsreaktion werden zahlreiche proinflammatorische Botenstoffe freigesetzt. Diese interagieren wiederum mit den VIC, welche dadurch zu einer Differenzierung angeregt werden³¹. Viele Immunzellen

scheinen eine Rolle bei der präsymptomatischen Mikrokalzifizierung der Aortenklappe zu spielen, indem sie die Kalzifizierung fördern. Dabei zeigen Leukozyten und Makrophagen ein besonders häufiges Vorkommen in der sklerotisch veränderten Aortenklappe³².

Vor allem die Makrophagen, aber auch andere Zellen der Immunabwehr, produzieren Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteine, die die Kalzifizierung beeinflussen. Hierbei sind beispielsweise TGF β und Interleukin-6 (IL-6) zu nennen. Darüber hinaus werden proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen 1,19 und 9 (MMP-1, MMP-19, MMP-9) ausgeschüttet.

Diese veränderte ECM-Zusammensetzung und die ausgeschütteten Signalmoleküle sind für einen Umbau der ECM und für die Differenzierung der VIC verantwortlich³³.

Die letzte Phase der Pathogenese, die Kalzifizierung, ist durch eine knotenförmige Makrokalzifizierung der Klappensegel charakterisiert. Diese wird durch die ECM-Umbauprozesse gefördert. In einer gesunden Herzklappe wird die ECM-Zusammensetzung durch Interaktionen der VIC und VEC reguliert und zeigt deutliche Unterschiede zu der ECM einer pathologisch veränderten Herzklappe²⁵.

Zwei Hauptmechanismen sollen zu der manifesten Aortenklappenstenose führen, zum einen die dystrophe Kalzifizierung und zum anderen die Biomineralisation.

Die dystrophe Kalzifizierung, welche keiner Regulation durch VIC unterliegt, beginnt mit einer zusätzlichen Kollagenablagerung und Ausbreitung der Proteoglykane in der Lamina spongiosa³⁴. Dadurch kommt es zu einer reduzierten Beweglichkeit der Aortenklappe, welche durch eine zusätzliche Ablagerung von Hydroxyapatit gefördert wird. Es bilden sich kalzifizierte Knoten, die mutmaßlich aus Zellen und weiteren Bestandteilen der ECM bestehen. Diese bilden die Basis für die weitere Ablagerung von Kalzium und Phosphaten³⁵. Hierdurch breiten sich die knotenförmigen Kalziumablagerungen über das Klappensegel aus mit zunehmender Bewegungseinschränkung der Klappensegel³⁴.

Diese Bewegungseinschränkung führt zu einer erhöhten mechanischen Belastung der Herzklappe und dadurch zu einer Vermehrung der Endothelläsionen. Hierrüber kommt es zu einer Aktivierung der VIC und einer Differenzierung dieser in Osteoblasten-ähnlichen VIC (oVIC) welche in der Phase der

Biominalisation über eine aktive Sekretion von knochenähnlicher Substanz die Kalzifizierung der Aortenklappe vorantreiben²⁵. Hiermit assoziiert wird unter anderem die Expression der Marker Runx2m, Osteopontin, Osteocalcin und bone sialoprotein beobachtet³⁶.

Am Schluss steht die manifeste Aortenklappenstenose mit verkleinerter Klappenöffnungsfläche und Mehrbelastung des linken Ventrikels.

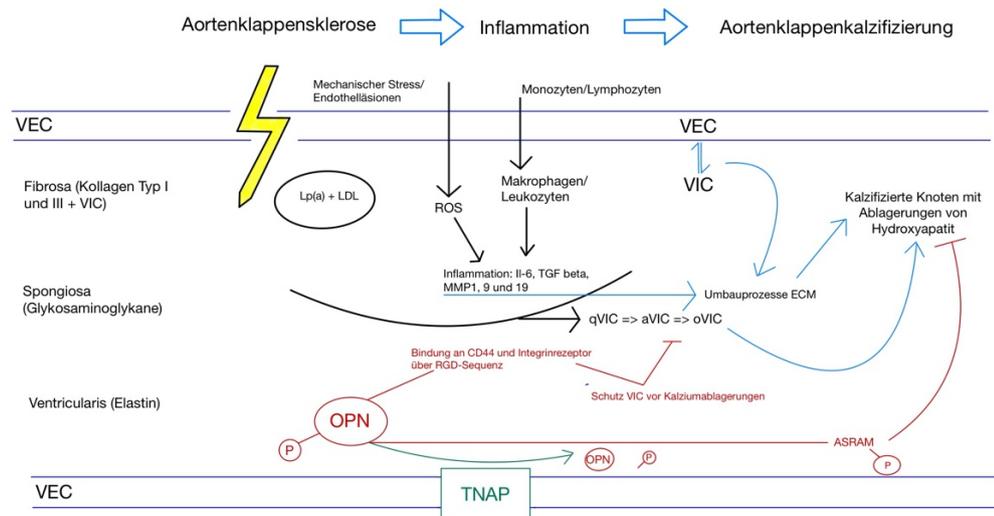


Abbildung 2: Grafik zur hypothetischen Pathogenese der Aortenklappendegeneration und möglichen Wirkmechanismen des OPN. Dargestellt sind die Teilschritte Aortenklappensklerose, Inflammation und Kalzifizierung. Im Rahmen der Aortenklappensklerose kommt es durch mechanischen Stress zu Endothelläsionen. Durch diese kommt es zu der Infiltration von Lipiden in das Innere der Klappensegel. Den Lipiden folgt die Infiltration von Immunzellen. Gemeinsam bilden diese subendotheliale Ablagerungen. Durch die Freisetzung von ROS (bisher ungeklärte Ursache) kommt es zu einer Inflamationsreaktion mit der Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen. Im nachfolgenden Schritt werden über verschiedene Signalwege pathologische Umbauprozesse der ECM ausgelöst. Diese Umbauprozesse werden beispielsweise durch die VEC/VIC Interaktion initiiert. Diese Prozesse leiten den letzten Schritt, die Aortenklappenkalzifizierung, ein. Durch die ECM-Umbauprozesse kommt es zu der Ablagerung von Hydroxyapatit und hierüber zu der Bildung von kalzifizierten Knoten. Zusätzlich werden, durch die fortschreitende Rigidität der Klappe, die VIC zu einer Differenzierung in oVIC angeregt, die zusätzlich über eine aktive Sekretion die Kalzifizierung fördern. Abschließend dargestellt sind die möglichen dekalzifizierenden Wirkmechanismen des OPN. Phosphoryliertes OPN soll über die Bindung an den CD44 und den Integrinrezeptor zu einem vermehrten Zellüberleben der VIC führen und diese vor Kalziumablagerungen schützen. Weiterhin soll OPN über eine Phosphorylierung an der ASRAM-Region an Hydroxyapatit binden und somit Ablagerungen entgegenwirken. Die TNAP dephosphoryliert das OPN und mindert somit die dekalzifizierende Wirkung des OPN^{26-36;57-73}.

1.5.3 Valvuläre Interstitialzellen

Die VIC sind in allen ECM-Schichten lokalisiert und sowohl auf der Aorta zugewandten Seite als auch auf der Ventrikel zugewandten Seite von einer schützenden Endothelschicht aus VEC ummantelt.

Die hämodynamischen Kräfte, die während der Herzaktion auf die Aortenklappe einwirken, regulieren mit Hilfe von mechanischen Signalen die Funktion der VEC und der VIC³⁷. In einer gesunden Aortenklappe kommen die VIC als ruhende Fibroblasten vor, welche als quiescent VIC (qVIC) bezeichnet werden und für die Regulation des Auf- und Abbaus von ECM-Bestandteilen verantwortlich sind³⁸.

Eine Veränderung der Hämodynamik wird von der schützenden Endothelschicht (VEC) registriert und bewirkt eine Aktivierung der qVIC. Diese differenzieren nach Aktivierung zu Myofibroblasten-ähnlichen VIC (aVIC), welche α -SMA exprimieren und für die Regulation der Zusammensetzung der ECM zuständig sind³⁹. Die Differenzierungsprozesse zwischen den Fibroblasten und Myofibroblasten sind reversibel, sodass ein Gleichgewicht zwischen ruhenden und aktivierten VIC besteht⁴⁰.

Bei pathologischer Stimulation der aVIC können diese zu oVIC differenzieren³⁹. Diese sind für Knochen-ähnliche Ablagerungen in der Aortenklappe verantwortlich, welche 15% der kalzifizierten Substanz in der Klappe darstellen. Zusätzlich tragen die aVIC und oVIC zu den Mikrokalzifizierungen bei, welche für 85% der kalzifizierten Masse in der Aortenklappe verantwortlich sind⁴¹.

Weiterhin erhöhen oVIC die Expression von Metalloproteinasen und proinflammatorischen Zytokinen und wirken somit begünstigend auf kalzifizierende Prozesse^{38,42}. Wie zuvor erwähnt zeigen aktuelle Forschungsergebnisse eine Interaktion zwischen VEC und VIC, die eine Aktivierung und Differenzierung der VIC zu aVIC und oVIC auslöst, weshalb der folgende Abschnitt den VEC gewidmet ist.

1.5.4 Valvuläre Endothelzellen

Die VEC bilden die Oberfläche der Klappensegel. Diese intakte Schutzschicht ist wesentlich für die Physiologie und den Erhalt der Klappenfunktion. Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im Zellzusammenhalt der VEC sowie die Aktivierung und Transformation der Endothelzellen, mitverantwortlich sind für das Fortschreiten der kalzifizierenden Aortenklappenstenose⁴³.

Die Prozesse, die mit der Funktionsstörung der VEC in Zusammenhang stehen, sind die verminderte Freisetzung von NO, erhöhter oxidativer Stress, die Vermehrung von proinflammatorischen Prozessen und der Prozess der endothelial-mesenchymalen Transition (EndMT)⁴⁴. Über den Prozess der EndMT, bei welchem es sich um einen zellulären Reprogrammierungsprozess handelt, können VEC, ähnlich wie bei der Aktivierung der VIC, in einen Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp transdifferenzieren⁴⁵. Der Auslöser dieser Transdifferenzierung können pathologische Signale wie eine Veränderung des Strömungsverhaltens an der Klappe oder inflammatorische Zytokine sein. Dadurch verlieren die VEC ihren Endothelzell-Phänotyp und differenzieren in einen mesenchymalen, myofibroblasten oder auch Osteoblasten-Phänotyp³⁹. Somit sind beide Zelltypen aktiv an den kalzifizierenden Prozessen, welche zur Aortenklappenstenose führen, beteiligt.

1.5.5 Wirkung von Zytokinen auf die Zellen der Herzklappe- TGF β und VEGF

1.5.5.1 Transforming growth factor β

TGF β ist ein Wachstumsfaktor, dem eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Aortenklappenstenose zugesprochen wird. Er aktiviert über die Bindung an eine der beiden TGF β -Rezeptor-Subtypen die SMAD-Signalkaskade⁴⁶. TGF β scheint an vielen Teilschritten der kalzifizierenden Aortenklappenstenose beteiligt zu sein.

Wie zuvor beschrieben, beginnt die Erkrankungen mit einer Verdickung und Fibrose der Klappensegel, welche durch eine Ablagerung von ECM Bestandteilen wie Kollagen verursacht werden⁴⁷. Ein möglicher Mechanismus, der an der

vermehrten Produktion von Kollagen im Rahmen des Progresses der Aortenklappenstenose beteiligt ist, beinhaltet TGF β . Der Wachstumsfaktor kann von allen Zelltypen ausgeschüttet werden und stimuliert über den SMAD-Signalweg die Bildung und Ablagerung von ECM-Bestandteilen. Somit zeigten sich die TGF β -Spiegel in kalzifizierten Aortenklappen erhöht⁴⁸.

Darüber hinaus kann TGF β sowohl auf die VIC als auch auf die VEC wirken und eine Transdifferenzierung der Zellen initiieren.

Es konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass TGF β den EndMT Prozess stimuliert und so zu einer Transdifferenzierung von VEC in einen Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp führt⁴⁹. Diese transdifferenzierten VEC zeigen eine Co-Expression des endothelialen Markers CD31 und mesenchymalen Markers α -SMA³⁹.

In ähnlicher Weise kann TGF β die ruhenden qVIC aktivieren und diese ebenfalls zu einer myofibroblastischen Transdifferenzierung anregen, welche mit einer vermehrten α -SMA-Expression und einer vermehrten Synthese von MMPs einhergeht^{50,51}.

Zudem kann TGF β über den bereits erwähnten SMAD-Signalweg den Runx-related Transkriptionsfaktor 2 (Runx2) induzieren und somit die osteogene Transdifferenzierung von qVIC in den Osteoblasten-Phänotyp oVIC fördern⁴⁶.

Abschließend ist zu erwähnen, dass *in vitro* Experimente zeigen konnten, dass VIC durch die Inkubation in TGF β -haltigem Medium zu einer Bildung von kalzifizierenden Knoten angeregt wurden⁵². Diese bereits in dem dritten Abschnitt der zellmatrix- assoziierten Pathogenese beschriebenen Knoten, markieren den Abschnitt der kalzifizierenden Aortenklappenstenose.

Die zuvor beschriebenen Faktoren implizieren somit eine multifaktorielle Beteiligung des Wachstumsfaktors TGF β an dem Progress der kalzifizierenden Aortenklappenstenose.

1.5.5.2 Vascular endothelial growth factor

Der vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein dimeres Glykoprotein, welches sich in mehrere Subtypen unterteilen lässt. Die Proteine dieser Gruppe wirken als Wachstumsfaktor auf das Gefäßsystem und sind ein wichtiger Aktivator

der Neovaskularisation⁵³. Die Expression von VEGF wird bei Hypoxie gesteigert. Wie zuvor beschrieben ist ein wichtiger Schritt der Pathogenese der Aortenklappendegeneration die Verletzung des Endothels. Als Resultat werden die Endothelzellen aktiviert und es kommt zu einer Neovaskularisation und vermehrter Expression von VEGF. In Versuchen mit Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) konnte gezeigt werden, dass eine VEGF-Ausschüttung die Expression von dem Integrinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ und seinem Liganden Osteopontin steigert⁵⁴. Über diesen Mechanismus wird eine antikalzifizierende Wirkung des VEGF vermittelt und es trägt darüber hinaus zu der Zellmigration von Makrophagen und Endothelzellen bei^{55,56}. Die Angiogenese der Klappensegel ist somit eng mit dem Fortschreiten der Aortenklappendegeneration verbunden. In vitro Versuche zeigten weiterhin einen protektiven Effekt des VEGF auf das Zellüberleben von VIC-Kulturen und eine reduzierte Bildung von kalzifizierenden Zellnoduli, wie sie unter dem Einfluss von TGF β vermehrt vorzufinden sind. Zusammenfassend wird im Gegensatz zu der Wirkung von TGF β ein kardioprotektiver Einfluss des VEGF auf das kardiovaskuläre System angenommen⁵⁶.

1.5.6 Osteopontin

Osteopontin ist ein Protein der Extrazellulärmatrix, welches in zahlreichen Geweben und Flüssigkeiten wie Speichel, Milch, Nieren, Gehirn, Knochenmark, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und vielen mehr vorkommt⁵⁷. Das multifunktionelle Protein spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus, der Nephrolithiasis und kardiovaskulären Erkrankungen⁵⁸.

Zahlreiche Herzkreislauferkrankungen zeigen erhöhte OPN Level im Plasma der Patienten sowie im Gewebe⁵⁹.

OPN ist das einzige Molekül, welches sowohl bei den inflammatorischen Prozessen der Klappendegeneration als auch bei den kalzifizierenden Prozessen eine Rolle spielt⁶⁰. Dabei kann es seine Wirkung als Protein der ECM über intrazelluläre Signalkaskaden und als Zytokin entfalten^{61,62}. Es konnte gezeigt werden, dass bereits bei leichter Klappenkalzifizierung erhöhte OPN-Konzentrationen zu messen sind⁶³.

OPN wurde erstmals 1979 als Glycophosphoprotein im Zusammenhang mit der Transformation in malignen Zellreihen beschrieben⁶⁴. Anschließend wurde es 1985 als physiologischer Weise im Knochengewebe vorkommendes *sialoprotein* erkannt, welches von Osteoblasten produziert wird⁵⁵. Im weiteren Verlauf konnte auch ein Vorkommen in ekto kalzifiziertem Gewebe wie in kalzifizierten Herzklappen nachgewiesen werden⁶⁵. Auch andere Zellreihen wie Makrophagen und Fibroblasten zeigen eine OPN Expression⁶⁶.

Das humane OPN ist ein elektronegatives Phosphoprotein, welches aus 314 Aminosäuren besteht und eine Molekülmasse zwischen 44 und 75 kDa aufweist⁶⁷. OPN ist Teil der Glycophosphoproteinfamilie der *small integrine-binding ligand N-linked glycoproteins* (SIBLINGs)⁶⁸. Aufgrund der zahlreichen biologischen Funktionen weist es verschiedenste funktionelle Domänen auf. Eine Gemeinsamkeit aller SIBLINGs ist die sogenannte ASARM-Region (acidic serine- and aspartate-rich motif), hierbei handelt es sich um eine serine- und aspartatreiche Region, welche an insgesamt 36 (in humanem OPN) sogenannter *phosphorylation sites* phosphoryliert werden kann. Im phosphorylierten Zustand können SIBLINGs über die ASARM-Region Hydroxyapatit-Kristalle binden und ektope Kalzifizierungsprozessen entgegenwirken⁶⁹. Hierfür werden über diese Brücken im Knochengewebe Osteoklasten am Hydroxyapatit gebunden, wodurch sich der Name „osteo-pontin“ erklärt⁷⁰.

Als weitere, wichtige funktionelle Region enthält das OPN eine RGD-Sequenz, hierbei handelt es sich um eine Aminosäuresequenz aus den drei L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Über die RGD-Sequenz kann OPN an CD44 Varianten und Integrinrezeptoren binden.

Die OPN- $\alpha_v\beta_3$ Interaktion ist ein wichtiger Bestandteil für die Osteoklastenmigration und -resorption⁵⁴

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der biologische Effekt auf smooth muscle cells (SMCs) in Aortenklappen abhängig ist vom Phosphorylierungszustand des OPN und über die OPN-CD44 Kaskade übermittelt wird.

Hierbei scheint die Interaktion zwischen phosphoryliertem OPN (pOPN) und CD44 zu einer reduzierten Kalziumablagerung in der Matrix der Aortenklappen zu führen. Genauer gesagt kommt es über die Phosphorylierung der

Proteinkinase B, welche auch als Akt Signalweg bezeichnet wird, zum Schutz der VIC vor Kalziumablagerungen⁷¹.

Es konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus des OPN funktionell wichtig für den inhibitorischen Effekt des OPN auf die Kalzifizierung ist, sodass dephosphoryliertes OPN keinen hemmenden Effekt auf Kalziumablagerung in Knochengewebe und in ektop kalzifiziertem Gewebe zeigte⁷⁰.

Für die Regulierung des Phosphorylierungsstatus des OPN scheint die *tissue-nonspecific alkaline phosphatase* (TNAP) verantwortlich zu sein. Die TNAP ist eine gewebeunspezifische Phosphatase und katalysiert hydrolytische Phosphatabspaltreaktionen, wie beispielsweise den Abbau von protektiv wirkendem PP_i , worüber sie einen begünstigenden Faktor einer ektopen Gewebekalzifizierung darstellt⁷². Einen ähnlichen Effekt erzielt die TNAP über die direkte Modulation des OPN. Zahlreiche Versuche zeigten, dass es bei Überexpression von TNAP zu einer verminderten Phosphorylierung des OPN kommt. Im Umkehrschluss lässt sich schlussfolgern, dass OPN ein Substrat der TNAP ist und die Phosphatase somit dephosphorylierend auf das OPN wirkt⁷³.

1.6 Dreidimensionale Zellkulturmodelle

Aktuellen Erkenntnissen zur Folge handelt es sich bei der Aortenklappendegeneration um einen aktiv regulierten Krankheitsprozess, der in seiner Pathophysiologie noch nicht vollständig offengelegt werden konnte⁸. Dies liegt vor allem an einem Mangel an in vitro Modellen, die die physiologische Aortenklappe in ihrer ganzen Struktur abbilden können, da aktuell weitestgehend zweidimensionale Zellkulturmodelle für in vitro Untersuchungen an VIC genutzt werden.

Der Krankheitsprogress der Aortenklappendegeneration wird insbesondere durch die Signaltransduktion zwischen VIC und der ECM reguliert.

Um demnach die physiologischen Bedingungen einer Aortenklappe in einem in vitro Modell abbilden zu können, ist es wichtig oben genannte Komponenten in das Modell zu integrieren. Die mECM gibt der Aortenklappe nicht nur ihre Struktur, sondern beeinflusst Zellprozesse über Signalübertragung via Rezeptoren. Zusätzlich reguliert die ECM die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren

und Zytokinen und überträgt mechanische Signale auf die Zellen der Aortenklappe⁷⁴.

Weiterhin wichtig ist es, dass die verschiedenen Phänotypen der VIC in einem Modell dargestellt werden können. Es konnte gezeigt werden, dass VIC in 2D Kulturbedingungen, durch die Platten, auf denen sie kultiviert werden, zu einer Differenzierung den aktiven Myofibroblasten-ähnlichen aVIC-Typ angeregt werden⁷⁵.

Somit fehlen in 2D Zellkulturbedingungen VIC-Phänotypen wie qVIC. Dreidimensionale Zellkulturmodelle sollen es ermöglichen Herzklappen-ähnlichere Bedingungen zu schaffen, um weitere Erkenntnisse über valvuläre Zellinteraktionen zu gewinnen.

1.6.1 Matrigel als Imitation der Extrazellulärmatrix

Die ECM spielt in vitro und in vivo eine wichtige Rolle. Eine veränderte ECM-Zusammensetzung zeigt sich in einer pathologisch veränderten Herzklappe und wird durch die Interaktionen der VIC und VEC reguliert. Typische ECM-Proteine sind Laminin, Kollagen, Glykoproteine und Proteoglykane⁷⁶. Um die ECM in vitro realitätsnah zu imitieren, hat sich Matrigel etabliert. Bei Matrigel handelt es sich um eine Mischung aus ECM-Proteinen, welche aus murinen Englebreth-Holm-Swarm Tumoren gewonnen werden⁷⁷. Über die oben genannten Bausteine hinaus enthält Matrigel Wachstumsfaktoren wie *basic fibroblast growth factor*, *epidermal growth factor*, *insulin-like growth factor 1*, *TGF β* . Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Zelltypen, wie beispielsweise primäre Zellen und Stammzellen, in der Zellkultur durch das spezielle Matrigelgerüst in einer ruhenden Form verbleiben⁷⁸. Wie bereits erwähnt ist es für die Versuche an einem Herzklappenmodell wesentlich verschiedene Phänotypen der VIC zu erhalten. Durch die ECM-Imitation mit Matrigel, lässt sich somit sowohl eine den physiologischen Bedingungen ähnliche Umgebung für die VIC schaffen als auch eine Untersuchung der VIC in einem matrigelbasierten 3D-Gerüst (mECM) durchführen.

2 Ziele der Arbeit

Im vorliegenden Projekt soll die Rolle von dem extrazellulärem Matrixprotein OPN bei der Entstehung der Herzklappendegeneration untersucht werden.

Um die Rolle des OPN bei den kalzifizierenden Prozessen in der Aortenklappe und bei der osteogenen Transformation der VIC näher zu untersuchen, soll ein bereits in Vorarbeiten etabliertes Zellkulturmodell modifiziert werden. Modifiziert wird das dreidimensionale matrigelbasierte mECM-Modell zur Kultivierung von ovinen VIC durch die Erhöhung der Zellzahl sowie des Kollagengehalts.

In einem weiteren Schritt wird das mECM-Modell mit kalzifizierenden Faktoren wie β -Glycerolphosphat (β -GP) und Calciumchlorid (CaCl_2) im Medium kultiviert und somit einer Kalzifizierung unterzogen. Zusätzlich wird im Rahmen der Kalzifizierungsversuche die Wirkung der Zytokine $\text{TGF}\beta$ und VEGF auf die Kalzifizierung der VIC im mECM-Modell untersucht werden. Um die Kalzifizierung nachzuweisen und Veränderungen im Kalziumgehalt zu quantifizieren wird der Kalziumgehalt der VIC im mECM-Modell nach 15-tägiger Kultivierung mittels eines Kalzium-Assays gemessen werden. Zusätzlich werden mittels der histologischen Färbung von Kossa, Kalzium- und Phosphatablagerungen in den Kulturen sichtbar gemacht werden.

Ziel ist es experimentelle Bedingungen zu schaffen, die eine kalzifizierte Aortenklappe imitieren, um unter diesen Bedingungen die Auswirkungen durch die Hinzugabe von OPN auf die Kalzifizierungsprozesse zu untersuchen. Im Rahmen der Kultivierung wird hierzu, zusätzlich zu den kalzifizierungsfördernden Faktoren, OPN zu dem Kulturmedium hinzugegeben. Die Auswertung der Kalzifizierungsprozesse erfolgt ebenfalls über ein Kalziumassay und histologische Färbungen.

Da aus der Literatur eine Veränderung der OPN-Wirkung durch die Phosphorylierung des Glykophosphoproteins bekannt ist, wird in dieser Arbeit die

Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Proteins etabliert werden. Hierfür werden die Enzyme Casein Kinase II und alkaline Phosphatase zum Einsatz kommen. Nachdem erfolgreichen Nachweis der Phosphorylierung und Dephosphorylierung des OPN mittels Westernblot, wird eine Kultivierung der VIC im zweidimensionalen Modell und dreidimensionalen mECM-Modell mit dem pOPN und dOPN erfolgen.

Anschließend werden die Veränderungen des Kalziumgehalts mittels Kalziummassay und histologischen Färbungen untersucht.

Ziel ist es die Wirkung des OPN in Abhängigkeit zu seinem Phosphorylierungszustand auf die Kalzifizierungsprozesse in Aortenklappen zu verstehen, um möglicherweise neue Angriffspunkte in der kausalen, pharmakologischen Therapie der kalzifizierenden Aortenklappenstenose offen zu legen.

3 Materialien

Zur Versuchsdurchführung wurden die im Folgenden aufgelisteten Materialien und Laborgeräte verwendet:

3.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
12-Well Inserts	Greiner Bio One, Kremsmünster	665641
12-Well Plate	Greiner Bio One, Kremsmünster	665180
24-Well Inserts	Becton Dickinson, Franklin Lakes	353095
24-Well Plate	Greiner Bio One, Kremsmünster	662160
Amersham Membran	GE Healthcare, Chalfont St. Giles	10600023
Blottingpapiere 1,5mm	Carl Roth, Karlsruhe	CL75.1
Centrifugal Filter Amicon Ultra 0,5ml	MERCK, Darmstadt	UFC510024
Cryovials	VWR Chemicals, Radnor	479-1262
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde	k12450
Einbettschalen	Medite, Burgdorf	48-6302-00
Einschweiß-Folie	Carl Roth, Karlsruhe	E706.1
Falcon 15 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster	188271
Falcon 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.559.001
Falcon 50 ml, konvex	Greiner Bio One, Kremsmünster	227261

Gelkämme 1,5 mm	Life Technologies, Kalifornien	NC3510
Gelkassette 1,5 mm	Life Technologies, Kalifornien	NC2015
KP-CryoCompound	VWR Chemicals, Radnor	1620C
MicroAmp 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Kalifornien	4346906
MicroAmp Optical Adhesive Film Kit	Life Technologies, Kalifornien	4313663
Microcentrifuge Tubes 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf	711080
Microcentrifuge Tubes 0,5 ml	Sorenson BioScience, Salt Lake City	16890
Microcentrifuge Tubes 1,5 ml	Kisker, Steinfurt	G052BP
Microcentrifuge Tubes 2,0 ml	Kisker, Steinfurt	G053BP
Nitrocellulose Membran	BIO RAD, Kalifornien	162-0115
OP-Abdecktuch	L&R, Rengsdorf	
Skalpelle	VWR Chemicals, Radnor	02.001.30.010
Soft tissues	Tapira, Heidenheim	07730012
Sterile Handschuhe	Semperit, Wien	822751721
Sterile Pipettenspitzen 200 µl	STARLAB, Hamburg	S1120-8810
Sterile Pipettenspitzen 1000 µl	STARLAB, Hamburg	S1122-1830
Sterile Pipettenspitzen 10 µl kurz	STARLAB, Hamburg	S1121-3810

Sterile Pipettenspitzen 10 µl lang	STARLAB, Hamburg	S1120-3810
Sterile Pipettenspitzen 20 µl	STARLAB, Hamburg	S1120-1810
Sterilfilter	MERCK, Darmstadt	SCGPU05RE
Stripetten 10 ml	Corning, New York	4488
Stripetten 25 ml	Corning, New York	4489
Stripetten 5 ml	Corning, New York	4487
SuperFrost Plus Ob- jektträger	R. Langenbrinck, Em- mendingen	03-0060
Zellkulturflasche T225	Corning, New York	353138
Zellkulturflasche T25	Greiner Bio One, Krems- münster	690175
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio One, Krems- münster	690175

3.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
3,3'-Diaminobenzidin	ZytomedSystems, Ber- lin	DAB5000plus
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	5025.5
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe	A515.1
Adenosin-5`-triphos- phat Dinatriumsalz Hy- drat	Sigma Aldrich, St.Louis	A2383
Alcianblau	Sigma Aldrich, St. Louis	A5268

Alkaline Phosphatase (Shrimp)	New England Biolabs, Frankfurt	M0371S
Ammoniumhydroxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe	CP17.1
Ammoniumperoxosulfat	Sigma Aldrich, St. Louis	A3678-25G
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe	8076.3
Brillant Crocein R	Waldeck GmbH, Münster	1B-109
Brillant Crocein R	Waldeck GmbH, Münster	1B-109
Calciumchlorid-Dihydrat	MERCK, Darmstadt	1.02382.1000
Calciumchlorid-Dihydrat	MERCK, Darmstadt	1065040250
Casein Kinase II Protein	MERCK, Darmstadt	14-197
Chloroform	VWR Chemicals, Radnor	22711
Chloroform	VWR Chemicals, Radnor	22711
Desoxycholsäure	MERCK, Darmstadt	1065040250
Desoxycholsäure	MERCK, Darmstadt	1065040250
Diamidin-2-phenylindol	Carl Roth, Karlsruhe	6335.1
Diamidin-2-phenylindol	Carl Roth, Karlsruhe	6335.1
Direct Red 80	Sigma Aldrich, St. Louis	365548
DNase	QIAgen, Hilden	79254
DNase	QIAgen, Hilden	79254
EDTA Titriplex III	MERCK, Darmstadt	1.08418.100
EDTA Titriplex III	MERCK, Darmstadt	1.08418.100

Eisenchlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich, St. Louis	236489
Eisenchlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich, St. Louis	236489
Eosin B	Sigma Aldrich, St. Louis	861006
Eosin B	Sigma Aldrich, St. Louis	861006
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe	6755.2
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, St. Louis	34852
Fetales Kälberserum	Biochrom	S 0615
Fluoresceint gelatin	Life Technologies, Kalifornien	D12054 4979.1
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe	4979.1
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis	G-9012
Glycin	MERCK, Darmstadt	1041691000
Hämatoxylin	ThermoScientific, Waltham	6765009
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe	HN77.5
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis	I9516
Kaliumiodid	Carl Roth, Karlsruhe	8491.1
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe	N069.1
M-PER-Puffer	ThermoScientific, Waltham	78501
Methanol	MERCK, Darmstadt	1060092511
Meyer's Hämalan	MERCK, Darmstadt	1092490500
Natriumazid (NaN₃)	Carl Roth, Karlsruhe	K305.2
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK, Darmstadt	1064041000
Natriumhydroxid (NaOH)	MERCK, Darmstadt	106498
Natriumkarbonat	MERCK, Darmstadt	1063931000
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich, St. Louis	72049
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	ThermoScientific, Waltham	26619

Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis	P4417
Phosphotungstic Acid	Sigma Aldrich, St. Louis	P4006
PhosStop	Roche Diagnostics, Rotkreuz	04906837001
Picrinsäure	VWR Chemicals, Radnor	84512.260
Propanol	MERCK, Darmstadt	1096342511
Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Rotkreuz	04693124001
Restore™-Western-blot- Stripping-Buffer	ThermoScientific, Waltham	21059
Roti HistoClear	Carl Roth, Karlsruhe	A538.1
Roti HistoKit II	Carl Roth, Karlsruhe	T160.1
Runningbuffer	ThermoScientific, Waltham	28362
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe	2607.1
Säurefuchsin	Carl Roth, Karlsruhe	T128.1
Shandon Gill 3 Hematoxylin	ThermoScientific, Waltham	6765009
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe	9370.1
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich, St. Louis	70166-500G
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe	CN30.4
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis	M7154
SuperSignal Protein Ladder	ThermoScientific, Waltham	84785
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoScientific, Waltham	34095
TEMED	BIO RAD, Kalifornien	161-0801
Tris Base	Sigma Aldrich, St. Louis	T1503-1KG
Tris HCl	Carl Roth, Karlsruhe	9090.3

Triton X	Sigma Aldrich, St. Louis	T9284
TRIZOL	Life Technologies, Kalifornien	15596026
Tween	MERCK, Darmstadt	655205
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe	9681.1
Western Blot Stripping Buffer	ThermoScientific, Waltham	21059
WesternBright Quantum	Advansta, Kalifornien	K-12042-D20
Xylol	VWR Chemicals, Radnor	28975

3.3 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Abzug maXXima	WRT Laborbau, Stadtlohn
Autoklav VX-95	Systec, Wettenberg
Biophotometer plus	Eppendorf, Hamburg
CO2-Inkubator HERACell 240i	ThermoScientific, Waltham
Cryostat CM 1950	LEICA, Wetzlar
Einschweißgerät Folio	Severin, Sundern
Eismaschine AF80	Scotsman, Illinois
EpiChemie-II-Darkroom	UVP Laboratory Products, Kalifornien
Fluoreszenzlampe	LEICA, Wetzlar
Gefriertruhen und Kühlschränke/ 4°C (NUNC)	ThermoScientific, Waltham
Gefriertruhen und Kühlschränke/ 4°C	Lovibond, Dortmund
Gefriertruhen und Kühlschränke/ -20°C	BOSCH, Stuttgart

Gefriertruhen und Kühlschränke/ -20°C (GS54NAW30)	SIEMENS, München
Gefriertruhen und Kühlschränke/ -20°C (Premium NoFrost)	LIEBHERR, Bulle
Gefriertruhen und Kühlschränke/ -80°C (REVCO)	ThermoScientific, Waltham
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen
Homogenisator BRAUN-SONIC 125	Quigley-Rochester Inc.
Kamera	LEICA, Wetzlar
Microplate-Reader	ThermoScientific, Waltham
Mikroskop DM2000	LEICA, Wetzlar
Mikroskop DMIL LED	LEICA, Wetzlar
Mini-Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe
NanoDrop 1000	ThermoScientific, Waltham
Netzgerät PowerPac 200	BIO RAD, Kalifornien
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipettierhelfer accu-jet pro	BRAND, Wertheim
Schüttler KS-15 Control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schüttler Vibrax-VXR	IKA, Staufen
Semidry Trans-Blot SD Cell	BIO RAD, Kalifornien
Sterilbank HERASafe KS	ThermoScientific, Waltham
Stickstofftank 35VHC	Taylor Wharton, Minnesota
Waage BP 110 S	GFL, Hannover
Wärmeschrank Function line	ThermoScientific, Waltham
Zentrifugen Universal 16	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Labofuge 300	ThermoScientific, Waltham
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

3.4 Kits

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
BCIP/NBT Liquid Substrate	Sigma Aldrich, St. Louis	B1911
Kalziumassay	Cayman, Michigan	700550
Live/Dead Kit	Life Technologies, Kalifornien	L3224
QuantiTect Kit	QIAGEN, Hilden	205313

3.5 Zellkulturmedien und -zubehör

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
0,25% Trypsin-EDTA	Life Technologies, Kalifornien	25200-114
10xDMEM	Sigma Aldrich, St. Louis	D2429
Amphotericin B	Gilead Sciences, Kalifornien	4684857
BD Matrigel™	Becton Dickinson, Franklin Lakes	356237
Collagen Typ I	Becton Dickinson, Franklin Lakes	354236
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich, St. Louis	D6546
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Kalifornien	14190-169
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin	S0615
Gelatine	Sigma Aldrich, St. Louis	G9391
Incidur-Spray	ECOLAB, Minnesota	YD12/P301137
Kalziumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis	C4901

L-Glutamine 200 mM	Life Technologies, Kalifornien	25030-024
Nicht essentielle Aminosäuren	Sigma Aldrich, St. Louis	M7145
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Kalifornien	15140-163
Recombinant Human TGFβ	R&D Systems, Minnesota	240-B-0027CF
Recombinant Human VEGF	R&D Systems, Minnesota	293-VE
β-Glycerolphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis	G9422

3.6 Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellmedien

	Basalmedium	Vollmedium	CaCl₂-Medium
DMEM	500ml	500ml	500ml
FCS	0,5%	10%	0,5%
Nicht essentielle Aminosäuren	1%	1%	1%
L-Glutamin	1%	1%	1%
Penicillin/Streptomycin	1%	1%	1%
Amphotericin	1%	1%	1%
β-Glycerolphosphat			1mM
Kalziumchlorid			1mM

3.7 Antikörper

Angegeben sind die für die immunhistochemischen Färbungen und die Western-blot-Untersuchung verwendeten Antikörper:

3.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
anti-OPN	mouse	1:100 (BSA)	Novus Biologicals (1B20) NB110-89062 monoklonal
anti-α-SMA	mouse	1:100 (PBS)	Sigma A5228 monoklonal
anti-phospho-ty-rosine	mouse	1:1000 (BSA)	Cell Signaling #9411 monoklonal

Die primären Antikörper wurden für immunhistochemische Färbungen in PBS, für Westernblots in 5% BSA/TBST.

3.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
anti-mouse	goat	1:5000	Jackson Immuno- research 115-035-044 HRP-gekoppelt

Anti-mouse	goat	1:200 (IH)	Santa Cruz Biotechnology sc-2005 HRP-gekoppelt
-------------------	------	------------	---

Sekundärantikörper wurden für die Westernblot-Verfahren in 5% Milchpulver/TBST oder BSA, für die Immunhistochemie mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Fluoreszenzfärbungen in PBS verdünnt.

3.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Zusammensetzung der Anoden-, Kathoden- und Runningbuffer für die Gelelektrophorese sowie die Westernblot-Analyse

	Anodenpuffer 1	Anodenpuffer 2	Kathodenpuffer	Runningbuffer
Tris Base	-	25mM	25mM	25mM
Methanol	10%	10%	10%	-
Glycin	-	-	40mM	192 mM
SDS	-	-	-	3,5 mM
pH	10,4	10,4	9,4	-

Tabelle 2: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers und der MPER-Lösung zur Probenaufbereitung für die Westernblot-Analyse.

Lämmli-Puffer	MPER-Lösung
9 ml H ₂ O	10 ml-MPER-Puffer
18,2 ml 1,5M Tris	1 Tablette PhosStop
9ml 20% SDS	1 Tablette Phosphatase- Inhibitor
36,8ml Glycerol	-
27ml β -Mercaptoethanol	-

Tabelle 3: Lösungsansätze für 10xTBS und 10xTBST für die Westernblot-Analyse sowie für die Blockierlösung zur immunhistologischen Färbung.

	10x TBS	10xTBST	Blockierlösung
Tris Base	0,5 M	0,5 M	0,05 M
NaCl	1,5 M	1,5 M	0,15 M
Tween 20	-	0,1%	-
FCS	-	-	10%
BSA	-	-	0,15 mM
pH	7,5	7,5	7,6

Tabelle 4: Zusammensetzung der Eosinlösung für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie der Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung zur Von Kossa Färbung.

Eosin-Lösung	Natriumkarbonat-Formaldehyd
1,5 g Eosinpulver	10 g Natriumkarbonat
150 ml Aqua _{dest}	50ml Formaldehyd
150 ml 100% Ethanol	150 ml Aqua _{dest}
300 µl pure Essigsäure	

Tabelle 5: Zusammensetzung des in situ Zymographie-Puffers

In Situ Zymographie Puffer
7,6 mM Tris-HCL
2,5 mM Kalziumchlorid-Dihydrat
30,8 mM NaCl
5% Triton X

4 Methoden

4.1 Zellgewinnung, Zellkultivierung und Lagerung

Einer der Hauptbestandteile einer natürlichen Aortenklappe sowie demnach auch unseres Zellkulturmodells sind VIC. Diese gewannen wir aus ovinen Aortenklappen. Die ovinen Herzen wurden am Schlachttag von einem örtlichen Schlachthof bezogen. Alle nachfolgenden Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zunächst wurden die Segel der Aortenklappe steril herauspräpariert. Diese wurden anschließend in 3ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) in einer Petrischale gewaschen. Die einzelnen Segel wurden anschließend in 3ml Vollmedium gelegt und in kleinste Teile zerteilt. Im Vorfeld wurden bereits t25 Zellkulturflaschen mit Gelatine vorbeschichtet und im Inkubator bei 37°C bereitgestellt. Die zerkleinerten Herzklappen sowie das Vollmedium werden anschließend mit einer Pipette in die Zellkulturflaschen gegeben. Die gewonnenen Zellen werden für eine Woche im Inkubator kultiviert.

Bei einer 90% Besiedlung der Zellkulturflaschen werden die ovinen VIC passagiert. Hierfür erfolgt zunächst die zweimalige Säuberung des entstandenen Zellrasens mit PBS. Alle verwendeten Materialien wurden im Wärmebad auf 37°C erhitzt. Zur Zellablösung wurde Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche gegeben. Die Trypsin-/EDTA-Menge wurden nach der Größe der Zellkulturflaschen angepasst. Die Zellablösung durch die Trypsinreaktion erfolgte für drei Minuten im Inkubator bei 37°C. Diese stoppten wir durch Hinzugabe von mindestens der doppelten Menge des Vollmediums. Die abgelösten Zellen werden anschließend in ein Falcon überführt und zentrifugiert. Der Überstand des entstandenen Zellpellets wurde verworfen und die Zellen mit Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird nun in ca. 4 t75 Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die t75 Zellkulturflaschen wurden im Vorfeld mit Gelatine und Vollmedium benetzt. Daraufhin, nach vorsichtigem Schwenken, weitere Inkubation bei 37°C bis erneut eine Besiedlung von 90% der Zellkulturflasche gegeben ist. Die Zellen durchlaufen bei jeder Aufteilung eine Passage. Von Passage 0 (P 0) auf P1 sowie von P1 auf P2 wurden die Zellen in größere Zellkulturflaschen überführt. Ab P2 kultivieren die

Zellen in t225 Zellkulturflaschen. Für unsere Versuche verwendeten wir Zellen in den Passagen P3 bis P6.

Zellen, welche zu einem späteren Zeitpunkt erst benötigt wurden, froren wir bei -80°C ein. Hierbei wurde das oben beschriebene Zellpellet anstelle in Vollmedium resuspendiert zu werden, in Einfriermedium (FCS, 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in kältebeständige Vials gegeben, anschließend kamen diese zunächst in Flüssigstickstoff und wurden daraufhin bei -80°C gelagert. Das Auftauen erfolgte über rasche Zugabe von vorgewärmten Vollmedium und Zentrifugation. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Vollmedium resuspendiert. Die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben.

4.2 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Um eine definierte Zellzahl im unserem 3D Modell kultivieren zu können, wurde die in der Zellsuspension enthaltene Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zellkammer ermittelt. Das nach der Zentrifugation entstandenen Zellpellet wurde in 10ml Vollmedium gelöst. Es wurden anschließend $50\mu\text{l}$ der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau- einem dunkelblauen Farbstoff, welcher die Zellmembran abgestorbener Zellen passieren kann und diese so gegenüber den vitalen Zellen mikroskopisch abgrenzbar macht- vermischt. Die vitalen Zellen werden anschließend ausgezählt und hieraus die Gesamtzellzahl errechnet.

4.3 Versuche im zweidimensionalen Modell

Zur besseren Einordnung der Versuchsergebnisse sowie zur besseren Vergleichbarkeit mit aktuellen Forschungsergebnissen erfolgten auch Zellkulturversuche im zweidimensionalen Modell. Bislang wurden die meisten Untersuchungen an OPN in Bezug auf die Aortenklappendegeneration in zweidimensionalen Modellen vorgenommen. Darüberhinaus wurden viele Untersuchungen nicht an VIC, sondern an *smooth muscle cells* durchgeführt. Um die Wirkung von

Osteopontin auf VIC auch in Bezug auf die Kultivierungsmethode beschreiben zu können, wurden diese zusätzlich auf einer 6-Well-Platte kultiviert.

Zu Beginn wurden die 6 Well-Platte mit Gelatine vorbeschichtet und bei 37°C bereitgestellt. Die Zellen in der Zellsuspension wurden wie in Abschnitt 4.2 beschrieben gezählt und anschließend 100000 Zellen (VIC) pro Well ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml Basalmedium pro Well benetzt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 15 Tage kultiviert. Der Mediumwechsel mit verschiedenen Komponenten erfolgte am d1, d4, d7, d9, d11, d13. Am Tag 15 wurden die VIC geerntet und für weitere Versuche aufgearbeitet.

Beispielsweise erfolgte die Stimulation im zweidimensionalen Modell mit Basalmedium und CaCl₂-Medium, welches die Konzentrationen von 50ng/ml Osteopontin und 500ng/ml Osteopontin im Medium enthielt. Aufgrund der verschiedenen Stimulationsbedingungen in den Versuchen, werden diese im Ergebnisteil nochmals veranschaulicht.

Die Versuche in der zweidimensionalen Zellkultur wurden zum einen über Übersichtsaufnahmen ausgewertet. Dafür wurden Aufnahmen in 5facher Vergrößerung am Durchlichtmikroskop durchgeführt.

Zum anderen wurde die Kalzifizierung mittels Kalziumassay untersucht. Zur Probenvorbereitung wurde zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt. Diese wurden daraufhin zweimal mit 1ml PBS gewaschen. Nachdem vollständigen Absaugen des PBS wurden die VIC mit 200µl Tris-Puffer aus dem Kalzium-Assay-Kit benetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem sterilen Schaber von dem Wellboden abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend mittels Ultraschalls zerkleinert. Die übrigen Teilschritte der Kalziumquantifizierung werden in dem Abschnitt Kalziumassay beschrieben.

4.4 Das Zellkulturmodell mECM

Im vorliegenden Projekt soll die Herzklappendegeneration an einem möglichst realistischen Modell in vitro untersucht werden. Hierbei modifizierten wir ein bereits in unserer Forschungsgruppe etabliertes Modell. Das verwendete Modell

der extrazellulären Matrix (mECM) wurde 1997 von Eschenhagen et al. als dreidimensionales Modell eingeführt und ist seitdem durch seine physiologischere Kulturmgebung beliebt in der kardiovaskulären Forschung⁷⁹. Für das dreidimensionale Zellkulturmodell wurden die Komponenten Kollagen Typ I, BD Matrigel™ und eine Zellsuspension mit eigens isolierten VIC aus ovinen Aortenklappen unter sterilen Bedingungen kultiviert und zusammengeführt.

Da es in vorherigen Versuchen zu einer starken Kontraktion der mECM im Verlauf der Kultivierung kam, entschieden wir uns für eine Kultivierung mit einem äußeren Ring Velcrow im Insert (Siehe Abbildung 2).

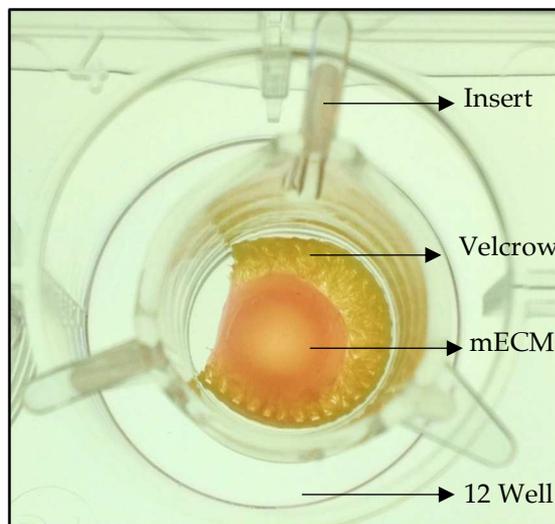


Abbildung 3: mECM mit einem Initialvolumen von 1000µl und einer Kultivierungsdauer von 15 Tagen. Die Abbildung zeigt das mECM am 15 Tag nach dem Absaugen des Mediums. Das mECM konnte nun weiteren Versuchen zugeführt werden. Dargestellt und beschriftet sind die einzelnen Bestandteile des mECM-Modells: Insert mit einem permeablen Boden, das Velcrow, das mECM und das 12 Well.

Für die Kultivierung wurde das in die transwell-inserts eingebrachte Velcrow autoklaviert.

Es wird zunächst ein Kollagen(C)Mix hergestellt. Die Mengenangaben beziehen sich im Folgenden auf 1 Well (= 1x12er transwell-insert).

Hierfür werden mit vorgekühlten Pipettenspitzen 250µl Kollagen Typ I mit 100µl 10xDMEM vermischt und anschließend mit 150µl NaOH (0,1 M) neutralisiert. Der C Mix wird auf Eis gestellt. Anschließend wird der Matrigel(M)Mix aus 500µl BD Matrigel™ und 100µl Zellsuspension hergestellt.

Die VIC wurden im Vorfeld mittels Trypsins aus der 2D-Zellkultur geerntet und mit Hilfe der Neubauerkammer ausgezählt. Zur weiteren mECM-Kultivierung wurden die VIC auf purem DMEM in einer Konzentration von 40×10^6 resuspendiert. Hieraus wurden die oben erwähnten 100µl Zellsuspension entnommen.

Der C Mix wurde anschließend zügig zum M Mix pipettiert. Anschließend wurde der neu entstandene Mix blasenfrei in die transwell-inserts pipettiert. Das entstandene mECM polymerisierte nun 45 Minuten bei 37°C. Abschließend wurden 1500µl Vollmedium unter das Insert und 750µl Vollmedium auf das Insert gegeben. Der Tag der Matrixbesiedlung wird im Folgenden als Tag 0 bezeichnet (d0).

4.5 Stimulation der mECM in verschiedenen Versuchsmodellen

Zu Beginn unserer Versuchsreihe erfolgte die Stimulation der Kulturen mit Basalmedium, CaCl₂-Medium sowie Wachstumsfaktoren.

Ab Kulturtag 1 (d1) wurden die mECM unter vier Konditionen: Basalmedium, CaCl₂-Medium sowie CaCl₂-Medium mit TGFβ (2,5 ng/ml) bzw. CaCl₂-Medium mit VEGF (5 ng/ml) über 15 Tage kultiviert. Der Wechsel des Mediums mit den zuvor genannten Komponenten erfolgte an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11, d13. Am Tag 15 wurden die mECM geerntet und für weitere Versuche aufgearbeitet.

Im weiteren Forschungsverlauf erfolgte die Stimulation der mECM mit Osteopontin.

Wir lösten dabei 50µg Osteopontin in 250µl in 0,1 % Bovine Serum Albumin (BSA) in *phosphate-buffered saline* (PBS). Anschließend wurden dem Basalmedium sowie dem CaCl₂-Medium unterschiedliche Konzentrationen von Osteopontin

hinzugegeben. Wir arbeiteten hierbei mit den Konzentrationen 50ng/ml und 500ng/ml Osteopontin im Medium.

In einem weiteren Versuch wurde das Osteopontin einmalig im Rahmen der mECM-Kultivierung dem C Mix hinzugefügt, sodass wir anschließend Konzentrationen von 50ng/ml, 500ng/ml und 1µg Osteopontin in den mECM am Kultivierungstag erreichten.

Die Kulturen wurden ebenfalls über 15 Tage kultiviert und am 15 Tag geerntet.



*Abbildung 4: mECM im Verlauf der Kultivierung an den Tagen d1, d7, d15 (von links nach rechts).
Die Bilder wurden im Rahmen des Wechsels des Stimulationsmediums aufgenommen.*

4.6 Histologie und Immunhistochemie

4.6.1 Kryoschnitte

Für die histologischen Färbungen und immunhistologischen Versuche wurden die mECM-Kulturen in KP-CryoCompound eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die eingebetteten mECM wurden an dem Kryostat in einer Schnittdicke von 10µm geschnitten und auf Objektträger gezogen. Die Schnittdicke für die in situ Zymographie betrug 15µm. Anschließend wurden die Objektträger bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

4.6.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Zur histologischen Übersichtsdarstellung der dreidimensionalen mECM führten wir Hämatoxylin/Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) durch.

Hierfür wurden die Kryoschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden sie für jeweils eine Minute in folgende Lösungen getaucht: Hämatoxylin, frisches destilliertes Wasser (Aqua_{dest}), 5%-ige Essigsäure und erneut frisches Aqua_{dest}. Hierbei wurde die Reihenfolge, in der die Lösungen genannt wurden, eingehalten. Anschließend wurden die Präparate unter fließendes Leitungswasser gehalten. Hierdurch wurde der pH-Wert aufgehoben und die basophilen Zellkomponenten „gebläut“. Nachfolgend wurden die Kryoschnitte in 70%-iges Ethanol getaucht und für 15 Minuten in Eosin gegengefärbt. Abschließend erfolgte das Entwässern in einer Alkoholreihe mit 70%igem Ethanol, 96%-igem Ethanol, 100%igem Ethanol und. Die fertig eingefärbten Schnitte wurden getrocknet und mit *Roti HistoKit II* eingedeckt.

4.6.3 Von Kossa Färbung

Die Von Kossa Färbung wird verwendet, um Mineralisierung und Kalziumablagerungen in Gewebe auf der Basis einer Ersatzreaktion zu erkennen. Bei dieser Färbung reagieren Silberionen der Silbernitrat-Lösung mit den Carbonat- und Phosphationen in den Kalziumablagerungen des jeweiligen Gewebes und verdrängen die Kalziumionen. Anschließend werden die Silberionen durch starke Lichteinwirkung zu metallischem Silber reduziert, welches man unter dem Mikroskop erkennen kann.

Als Positivkontrolle wurden Präparate kalzifizierter Mäuseaorten verwendet. Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Kryoschnitte aufgetaut und mit Aceton für 8 Minuten bei -20°C fixiert. Als nächstes wurden die Kryoschnitte an der Luft getrocknet und in Aqua_{dest} getaucht. Darauffolgend wurden sie 15 Minuten in eine 5%-ige Silbernitratlösung getaucht. Aufgrund der Lichtabhängigkeit der Reaktion, erfolgte dieser Schritt unter direkter Lichteinstrahlung unter einer Neonröhre.

Im Anschluss wurden die Kryoschnitte mit Aqua_{dest} gewaschen und mit Natriumkarbonat-Formaldehydlösung reduziert. Hierdurch entstand ein schwarzer Niederschlag. Die Schnitte wurden mit fließendem Leitungswasser gewaschen, dann in 5%ige Natriumthiosulfatlösung getaucht und anschließend erneut gewaschen. Abschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit Aluminiumsulfat-Kern-echtrot und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Kryoschnitte wurden mit *Roti-HistoKit II* eingedeckt.

4.6.4 Immunhistochemische Färbungen

Durch eine immunhistochemische Färbung können bestimmte Antigenstrukturen in einem histologischen Präparat sichtbar gemacht werden. Zunächst muss hierfür ein Antikörper, welcher gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist, auf das Präparat gegeben werden. Bindet dieser Antikörper an dem Antigen, kann in einem Folgeschritt der gebundene Antikörper durch einen Zweitantikörper sichtbar gemacht werden. Der F_{ab}-Teil des Zweitantiköpers bindet hierfür an den F_c-Teil des Erstantiköpers. Der Zweitantikörper wurde mittels 3,3'-Diaminobenzidin nachgewiesen.

Der Nachweis des Zweitantiköpers bei der 3,3'-Diaminobenzidin-Färbung (DAB-Färbung) erfolgt über eine enzymatische Reaktion. Die „Horseradish“-Peroxidase“ ist als Enzym an den Zweitantikörper gekoppelt. Dieses kann DAB als Substrat zu einem unlöslichen, farbigen Niederschlag umsetzen. Das DAB präzipitiert braun und wird somit als Chromogen bezeichnet.

Im ersten Schritt erfolgte das Auftauen der histologischen Schnitte und die Fixierung der Schnitte bei -20°C in Aceton. Die Positivkontrolle stellte ovines Myokard dar, welches wir im Rahmen der VIC-Isolierung einbetteten.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate in PBS gewaschen und für eine Stunde in Blockierlösung gestellt. Durch die Blockierlösung wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen im Präparat blockiert, damit es zu einer möglichst spezifischen Erstantikörperbindung an das Antigen kommt.

Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem Erstantikörper für 60 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Daraufhin wurden sie erneut in PBS gewaschen

und in H_2O_2 (3%) blockiert. Es erfolgt im nächsten Schritt die Inkubation mit dem Zweitantikörper für ebenfalls 60 Minuten. Abschließend erfolgt das erneute Waschen mit PBS.

Wie zuvor beschrieben wurde nun mithilfe der DAB-Reaktion der Zweitantikörper sichtbar gemacht. Hierfür wurden die Präparate zunächst in Tris Base Puffer getaucht und anschließend ca. 4 Minuten mit dem Substrat-Chromogen-Gemisch (20:1) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Präparate erneut in Tris Base Puffer getaucht und in $\text{Aqua}_{\text{dest}}$ gewaschen. Zum Abschluss erfolgt die Kernfärbung, wofür die Präparate für 1 Minute in Hämalaun gegeben werden. Um die Blaufärbung zu erhalten, erfolgt das Eintauchen in Leitungswasser, 1% HCl, Leitungswasser (5min) und $\text{Aqua}_{\text{dest}}$.

4.7 In Situ Zymographie

Mittels in situ Zymographie kann die enzymatische Aktivität der Matrix-Metalloproteasen (MMP) 2 und 9 lokalisiert werden. Hierfür verwendet wurden frische Kryoschnitte in einer Schnittdicke von $15\mu\text{m}$. Die Kryoschnitte wurden mit 1%-iger, fluoreszenzmarkierter Gelatine in ISZ-Puffer (Tabelle 5) über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Alle Schritte erfolgten zur Erhaltung der Fluoreszenz ohne Lichteinstrahlung. Die Negativkontrolle stellten Proben mit reinem ISZ-Puffer und Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-haltiger Arbeitslösung dar. Das EDTA inhibiert die Aktivität der MMP2 und MMP 9. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit PBS gewaschen, luftgetrocknet und mit DAPI eingedeckt. Anschließend wurde die MMP2 und MMP9 Aktivität, welche sich als grüne Fluoreszenz darstellte, unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4.8 Modifikation Osteopontin

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann OPN an seiner ASARM-Region phosphoryliert werden und darüber kalzifizierenden Prozessen entgegenwirken.

4.8.1 Phosphorylierung von Osteopontin

Für die Phosphorylierung des OPN mittels Casein Kinase II wurde ein Phosphorylierungsansatz hergestellt. Die Zusammensetzung ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 6: Phosphorylierungsansatz für OPN

OPN	10 μ g
ATP	0,3 mM
Casein Kinase II	100ng
HEPES (pH 7,5, 15mM NaCl₂, 12mM MgCl₂)	(20mM) 100 μ l

Nach dem Herstellen des Ansatzes unter sterilen Bedingungen, wurde dieser für 90 Minuten bei 37°C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit dem phosphorylierten OPN (pOPN) in einen Amicon Ultra- 0,5 Centrifugal Filter gegeben. Dieser Schritt diente unter anderem dem Herausfiltrieren des hinzugegebenen ATP, welches ansonsten bei der weiteren Verwendung des pOPN in der Zellkultur durch das Phosphat ein Substrat für die Kalzifizierung dargestellt hätte. Die Amicon Filter wurden im Vorfeld in einem Autoklav sterilisiert, um eine Kontamination bei anschließender Hinzugabe bei der mECM-Kultivierung zu vermeiden. Anschließend wurde das pOPN in dem Amicon Röhrchen für 10 Minuten bei 11000rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte das Halbieren der Probe im Amicon Röhrchen. Die eine Hälfte wurde im Amicon Röhrchen belassen und kühl gestellt. Die andere Hälfte, welche die Hälfte des pOPN beinhaltet, wurde in ein Eppendorfgefäß überführt.

4.8.2 Dephosphorylierung von Osteopontin

Für die Dephosphorylierung mittels alkaliner Phosphatase wurde das pOPN verwendet, welches nach der erfolgten Phosphorylierung in ein Eppendorfgefäß

überführt wurde (siehe Abschnitt 4.8.1). Da die Probe nach der Phosphorylierung halbiert wurde, handelte es sich um 5 μ g pOPN.

Die genaue Zusammensetzung des Dephosphorylierungsansatzes ist der folgenden Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 7: Dephosphorylierungsansatz für pOPN

pOPN	5 μ g
Alkaline Phosphatase	2U
HEPES (pH 10, 1mM MgCl₂)	50mM

Das Herstellen des Dephosphorylierungsansatzes erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen. Nach erfolgter Herstellung wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 37°C auf der Schüttelplatte inkubiert. Die alkaline Phosphatase spaltete die Phosphatgruppen von dem pOPN ab, sodass dephosphoryliertes OPN (dOPN) entstand.

4.8.3 Probenaufbereitung und Aufreinigung pOPN und dOPN

Nachdem Osteopontin mithilfe der Casein Kinase II phosphoryliert wurde und mit der alkalinen Phosphatase dephosphoryliert wurde, erfolgte die Enzyminaktivierung in den Proben. Die Proben wurden hierfür bei 65°C für 5 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Hitzeinaktivierung erfolgt für das dOPN ebenfalls ein Abfiltrieren des noch vorhandenen ATP in der Probe. Hierfür wird das dOPN in den Amicon Filter überführt und für 10 Minuten bei 11000rpm zentrifugiert. Durch den Amicon Filter verblieben das pOPN bzw. dOPN im oberen Filter und das ATP setzte sich im darunterliegenden Röhrchen ab. Die herausfiltrierte Lösung wurde verworfen. Die Aufreinigung wurde in Form einer Entsalzung und eines Pufferaustauschs fortgeführt. Hierfür wurden den Proben mit pOPN bzw. dOPN jeweils 500 μ l 100mM NaCl zugeführt. Im Anschluss erfolgte das erneute Zentrifugieren bei 1000rpm für 10 Minuten. Die hinausfiltrierte Lösung wurde erneut verworfen. Im Folgeschritt wurden den Proben 450 μ l 10mM NaCl

Eine Lagerung des Gels für maximal drei Tage in Zellstoff bei 4°C war ebenfalls möglich.

Tabelle 8: Zusammensetzung von 10%-igem Trenn- und 5%-igem Sammelgel für die Gelelektrophorese.

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Bisacrylamide 40%	2,5 ml	720 μ l
H ₂ O	4,8 ml	3,5 ml
Tris Base 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	650 μ l
20% SDS	50 μ l	25 μ l
10% Ammoniumperoxosulfat	100 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

4.9.3 Gelelektrophorese/SDS-PAGE

Die gemäß Abschnitt 4.9.2 vorbereitete Gelkassette wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer befüllt. Es erfolgte die Befüllung der Geltaschen mit den mit Lämmli Puffer versetzten Proben, einem Proteingrößenmarker sowie einer Positivkontrolle (nicht modifiziertes OPN mit 4xLämmli Puffer). Anschließend wurde die Elektrophoresekammer an den *BIO-RAD PowerPac 200* angeschlossen und so ein elektrisches Feld angelegt. Ihrer Größe und Ladung entsprechend durchwanderten die Proteine das Gel in unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Eine schnellere Geschwindigkeit zeigte sich bei kleineren und stärker negativ geladenen Proteinen.

Ca. 40 Minuten dauerte die Durchwanderung der Proteinbanden durch das Gel, sodass die Gelelektrophorese gestoppt werden konnte.

4.9.4 Western-Blotting und Antikörperbindung

Die im Rahmen der Gelelektrophorese entstandenen Proteinbanden wurden durch den Westernblot auf eine Membran übertragen. Dies ist die Voraussetzung, um anschließend, die auf die Membran übertragenen Proteinbanden, sichtbar zu machen. Ein Stück *Whatman-Paper* wurde in Anodenpuffer 1, ein anderes

Stück des Papiers in Anodenpuffer 2 (Tabelle 1) und zwei weitere Whatman-Paper und das Polyacrylamidgel in Kathodenpuffer getaucht. Das Gel wurde hierfür zuvor aus der Gelkassette gelöst und das Sammelgel entfernt. Nun werden die vorbereiteten *Paper* sowie das Gel in folgender Reihenfolge auf die *Semidry transfer cell* (Anode) gelegt: *Whatman-Paper* Anoden Puffer 1, *Whatman-Paper* Anoden Puffer 2, Amersham-bzw Nitrozellulosemembran, Gel und das *Whatman-Paper* aus Kathodenpuffer 3. Für die nächsten 90 Minuten wurde ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 250mA pro Gel angelegt. Hierdurch wandern die Proteinbanden in Richtung Anode und werden auf die verwendete Membran übertragen. Anschließend wird die Membran in *Tris-buffered saline with Tween 20* (TBST) gewaschen und anschließend abhängig von dem im Anschluss verwendeten Antikörper mit 5% Milch bzw. 5% BSA in TBST für 60 Minuten inkubiert. Hierdurch erfolgt eine Blockade der unspezifischen Epitope. Daraufhin erfolgt die Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C unter durchgehender Bewegung. Im direkten Anschluss erfolgt das Waschen der Membran für 3x15 Minuten in TBST bei Raumtemperatur ebenfalls unter durchgängiger Bewegung. Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation (90 Minuten) mit dem jeweiligen Zweitantikörper, welcher durch die Bindung an den F_c-Teil des Erstantikörpers den indirekten Nachweis einer Proteinbande auf der Membran ermöglicht. Abschließend wird die Membran erneut für 3x15 Minuten mit TBST gewaschen und entwickelt.

4.9.5 Entwicklung des Westernblots und Auswertung

Um den Westernblot auswerten zu können wurden 500µl *WesternBright* Chemilumineszenz Substrat Quantum auf die Membran pipettiert und diese in Folie eingeschweißt. Die Bandendarstellung erfolgte mit EpiChemie-II-Darkroom. Zur Signalverstärkung wurden 250µl *Super Signal West Femto* auf die Membran gegeben.

Nach der Aufnahme wurde die Membran in TBST gewaschen und in TBST-benetzte *Whatman-Paper* gelegt. Anschließend erfolgte das Einschweißen und die Aufbewahrung bei 4°C zur erneuten Inkubation oder zur Ladungskontrolle. Für die weiteren Auswertungen des Westernblots wurde Image J verwendet.

4.10 Kalziumassay

Mit Hilfe des *Cayman Kalzium-Assays* wurde die Kalziumkonzentration in unseren Proben bestimmt. Dabei macht sich das Assay die *o-Cresolphthalein-Kalzium-Reaktion* zunutze. Bei dieser Reaktion reagiert Kalzium in einer alkalinen Umgebung mit *o-Cresolphthalein* und formt dabei einen lila Komplex, welcher Licht zwischen 570nm und 590nm Wellenlänge absorbiert. Die Intensität der Farbe ist proportional zum Kalziumgehalt in der Probe und kann mit Hilfe eines Microplate-Readers bestimmt werden.

Zu Beginn des Kalziumassays werden die Proben vorbereitet. Dafür wird zunächst das Medium der mECM entfernt. Die mECM werden anschließend mit PBS gewaschen. Anschließend wird das Gewicht der mECM bestimmt. Anhand des Gewichts wird die Menge des Tris-HCl-Puffers bestimmt, welche zu den Proben pipettiert wird. Hierfür wird das mECM-Gewicht in g multipliziert mit 5000 μ l. Die errechnete Menge wird zu den Proben pipettiert und diese auf Eis gestellt. Anschließend erfolgt die Zerkleinerung der Proben mittels Ultraschalles und das erneute auf Eis stellen der Proben. Im nächsten Schritt wurden die Proben 15min bei 4°C und 11000rpm zentrifugiert. Der Überstand der Proben wird in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Es erfolgt das Pipettieren von 10 μ l jeder Probe sowie einer Kalzium Standard-Konzentrationsreihe in eine 96-well-Platte, welche auf Eis steht.

Unter Lichtausschluss wurde, dass zuvor nach Herstellerangaben vorbereitete *Working Detector Reagent*, zu den Proben pipettiert. Hierfür wurden jeweils 100 μ l verwendet.

Anschließend wurde die Platte für 30 Sekunden gleichmäßig geschwenkt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (weiterhin unter Lichtausschluss). Abschließend erfolgte die Messung der Absorption im Microplate-Reader, um daraus den Kalziumgehalt in den Proben zu erhalten.

4.11 Software und statistische Auswertung

Mit Hilfe der ImageJ 1.48v Software erfolgten die Photointensitätsmessungen zur Westernblot-Signalauswertung. Die Aufnahmen der histologischen Schnitte und

die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten mit dem *Leica DM2000* und der zugehörigen Leica Application Software *LAS v3.1*. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPAD Prism Version 6 vorgenommen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aufgeführt. Die Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) wurde mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Eine Signifikanz wurde ab einem p-Wert von $\leq 0,05$ beschrieben.

5 Ergebnisse

5.1 Histologische Charakterisierung des mECM-Modells

Um das Modell für unsere Versuche zu charakterisieren, führten wir eine HE-Färbung an unseren histologischen Schnitten der mECM durch. Diese wurden zuvor

15 Tage kultiviert und erhielten an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11 und d13 einen Wechsel des Mediums mit zugesetzten Stimulantien. Die Konditionen können der Beschriftung in Abbildung 5 entnommen werden.

Insgesamt zeigen sich in der HE-Färbung eine kompakte mECM und eine vollständige Besiedlung der mECM mit VIC. Es fällt auf, dass die VIC an der Oberfläche der mECM einen Epithel-ähnlichen Saum bilden (Abbildung 5). Dieses Zellverhalten zeigt sich für alle Kulturen ohne Unterschiede zwischen den Konditionen.

Zusätzlich erscheinen die Randbereiche der Kulturen stärker besiedelt als die zentralen Bereiche unserer Kulturen (Abbildung 5: 5-6).

Insgesamt zeigt sich für alle Konditionen eine kompakte, vollständig besiedelte Matrix, die in ihrer Kompaktheit der Extrazellulärmatrix der natürlichen Aortenklappe nicht vollständig entspricht, jedoch vergleichbar erscheint.

Das inhomogene Verteilungsmuster zwischen peripheren und zentralen Anteilen der mECM zeigt sich ebenfalls für alle Konditionen. Es bestehen demnach keine größeren Unterschiede bezüglich der Morphologie in der HE-Färbung zwischen den mit verschiedenen Medien kultivierten mECM.

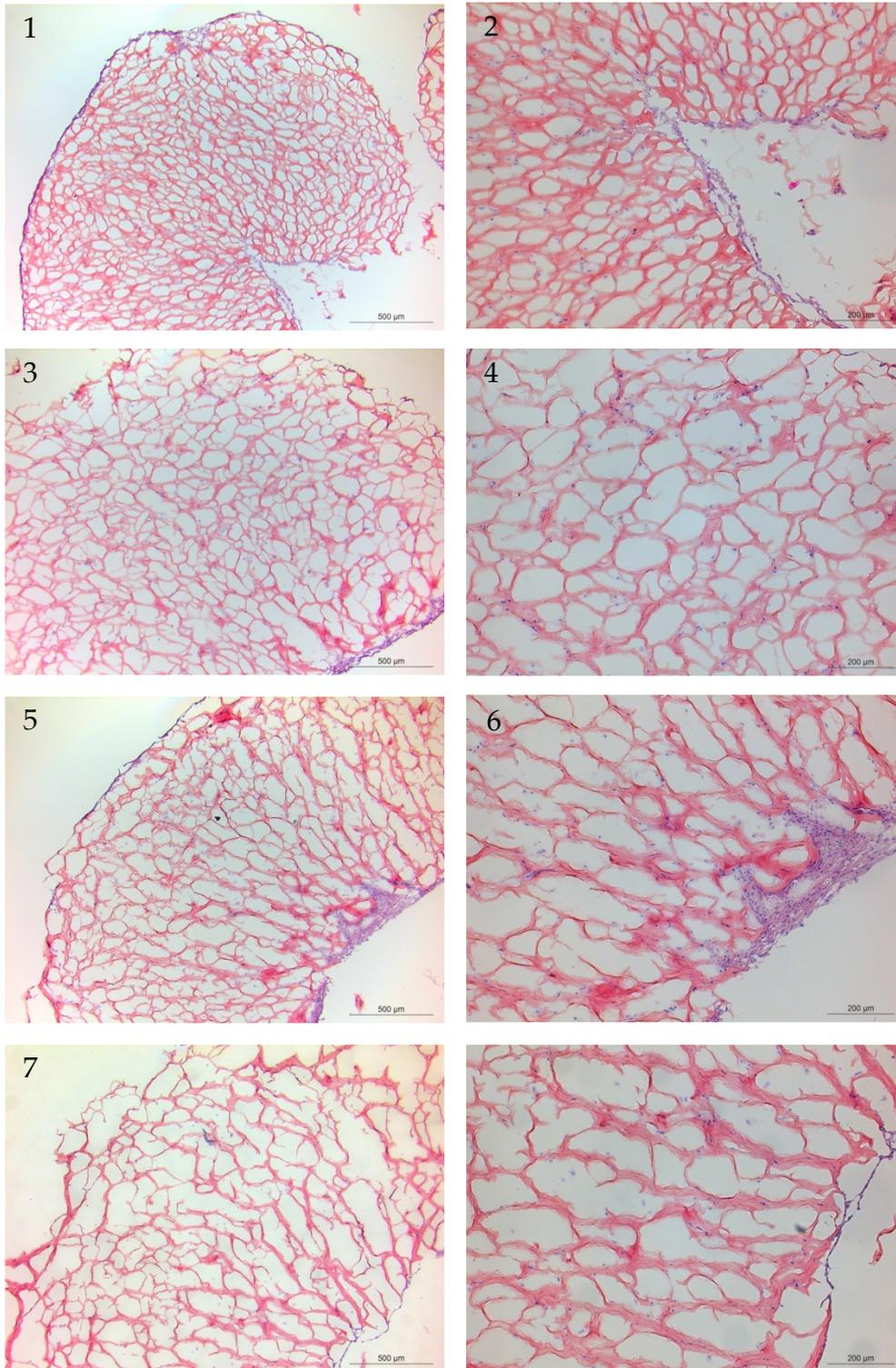


Abbildung 5: Darstellung von mECM-Kulturen mit 1000µl Initialvolumen in der HE-Färbung mit verschiedenen Stimulationsmedien und 15 Tagen Kultivierungsdauer. 1-2: Basalmittel, 3-4: CaCl₂-Medium, 5-6: TGFβ-Medium und 7-8: VEGF-Medium. Es handelt sich um Übersichtsaufnahmen mit den Maßstäben= 500 µm und 200µm. Rosa= Kollagen, Blau=Zellkerne

5.2 Untersuchungen zur Matrixkalzifizierung im mECM-Modell

5.2.1 Von Kossa Färbung

Die von Kossa Färbung diente zum Nachweis von Kalziumablagerungen in den histologischen Präparaten der mECM. Dabei konnten vor allem phosphatbasierte Mineralisierungsprozesse, aber auch Mikrokalzifizierungen nachgewiesen werden. Die Phosphatanreicherungen zeigten eine beige-bräunliche Färbung im histologischen Bild. Seltener zeigten sich braun-schwarze Areale, die entsprechend der mitgefärbten Positivkontrolle, als Mikrokalzifizierungen zu werten waren.

Schwarz-bräunliche Areale waren bei der basalen Kondition nicht zu beobachten und somit zeigten sich bei dieser Kondition keine Kalifizierungszeichen. Bei den Konditionen mit CaCl_2 -Medium, TGF β -Medium und VEGF-Medium fanden sich in einem ungleichmäßigem Verteilungsmuster Bereiche der Mikrokalzifizierung (Abbildung 6). Zwischen den drei genannten Konditionen zeigten sich keine Unterschiede in der Menge der detektierten Mikrokalzifizierung.

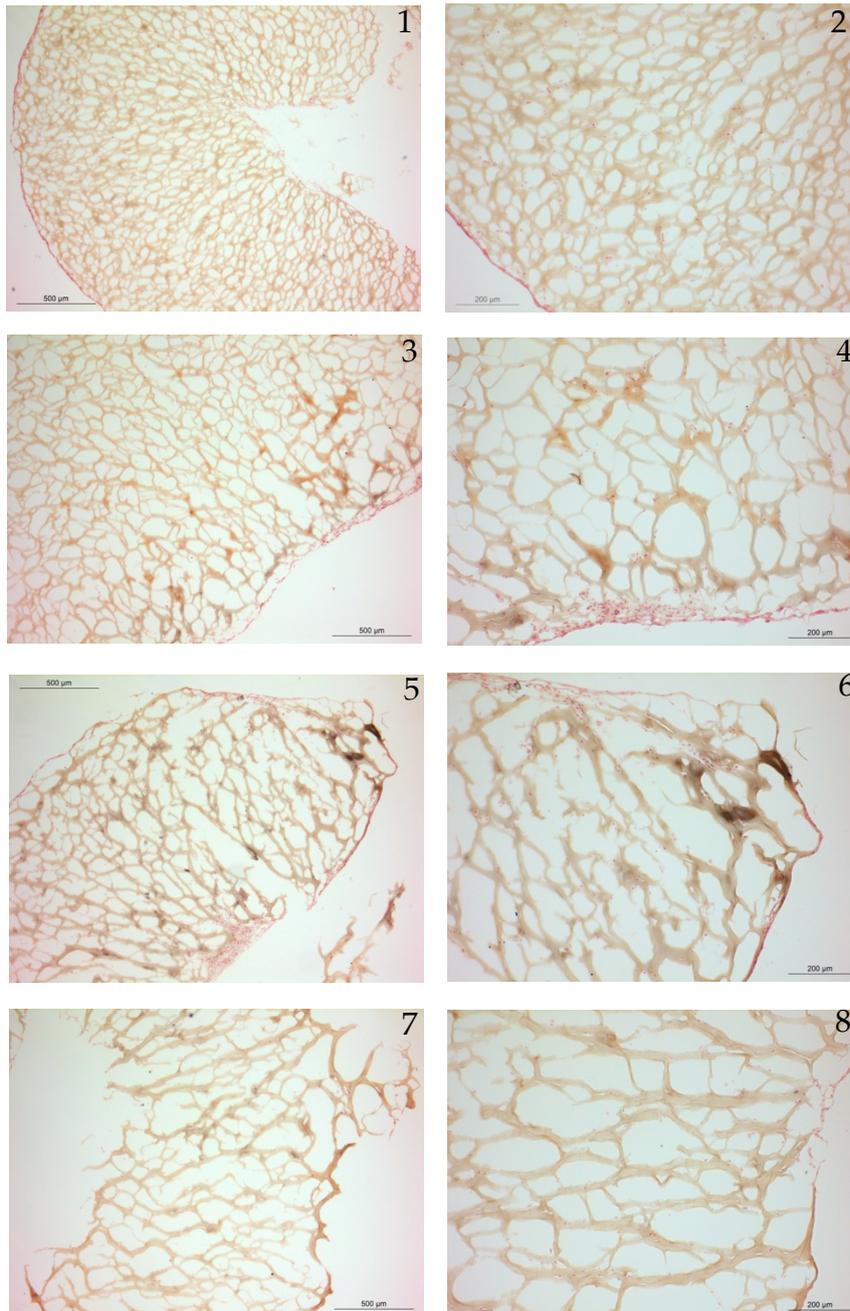


Abbildung 6: Darstellung von mECM-Kulturen mit 1000 μ l Initialvolumen in der Von Kossa-Färbung mit verschiedenen Stimulationsmedien und 15 Tagen Kultivierungsdauer. 1-2: Basalmedium, 3-4: CaCl₂-Medium, 5-6: TGF β -Medium und 7-8: VEGF-Medium. Es handelt sich um Übersichtsaufnahmen mit den Maßstäben= 500 μ m und 200 μ m. Beige-braun= Phosphatanreicherungen, schwarz= Kalzifizierungsherde, rot= Zellkerne

5.2.2 Kalziumassay

Um die Mineralisierungs- und Kalzifizierungsprozesse in den mECM-Kulturen zu quantifizieren, wurde der Kalziumgehalt in den Kulturen mittels eines Kalziumassays gemessen. Der Kalziumgehalt zeigte sich in den mit CaCl_2 -Medium stimulierten mECM-Kulturen (CaCl_2 , TGF β und VEGF) signifikant höher als in den Kulturen, welche mit Basalmedium stimuliert wurden.

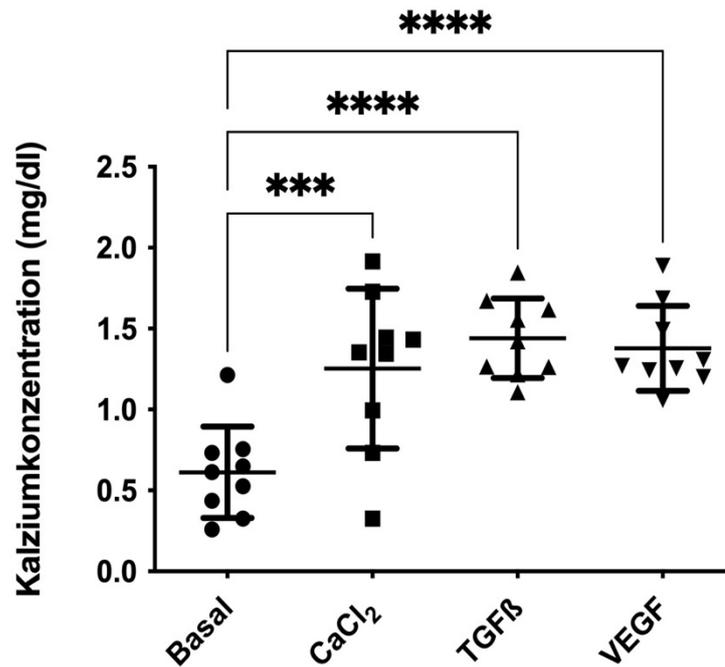


Abbildung 7: Kalziumgehalt gemessen in mg/dl in mECM-Kulturen mit einem Initialvolumen von $1000\mu\text{l}$. Dargestellt ist der Kalziumgehalt für 9 mECM Kulturen in 4 Stimulationskonditionen: Basal, CaCl_2 , TGF β , VEGF. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung des Kalziumgehalts für die mit CaCl_2 , TGF β und VEGF stimulierten mECM gegenüber den mit Basalmedium stimulierten mECM. Dabei liegt die Kalziumkonzentration in den Kulturen mit Basalmedium bei durchschnittlich $0,61\pm 0,28$ mg/dl und steigt bei den Kulturen mit CaCl_2 -Medium auf $1,25\pm 0,49$ mg/dl. Die Mittelwerte mit Standardabweichung liegen bei TGF β $1,44\pm 0,25$ mg/dl und VEGF bei $1,38\pm 0,26$ mg/dl. $n=9$; $*p\leq 0,05$, $***p\leq 0,001$, $****p\leq 0,0001$, dargestellt sich die Mittelwerte mit Standardabweichung

5.3 Bestimmung der Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9 mittels in situ Zymographie

Es erfolgte eine Untersuchung der mECM mittels in situ Zymographie. Hiermit konnte die enzymatische Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9 lokalisiert werden. Auffällig war, dass diese erhöhte Aktivität, welche in der Abbildung 7 grün dargestellt ist, nur in der Umgebung von Zellansammlungen detektierbar war. Ein MMP-Signal um einzelne Zellen zeigte sich kaum. Somit steigt das MMP-Signal in Abhängigkeit zu einer Erhöhung der Zelldichte an.

Das Verteilungsmuster der MMP-Aktivität zeigt ein erhöhtes Signal in der Peripherie der mECM (Abbildung 7). Wie bereits in dem Abschnitt zu der HE-Färbung der mECM beschrieben wurde, konnte in der Peripherie eine höhere Zelldichte detektiert werden.

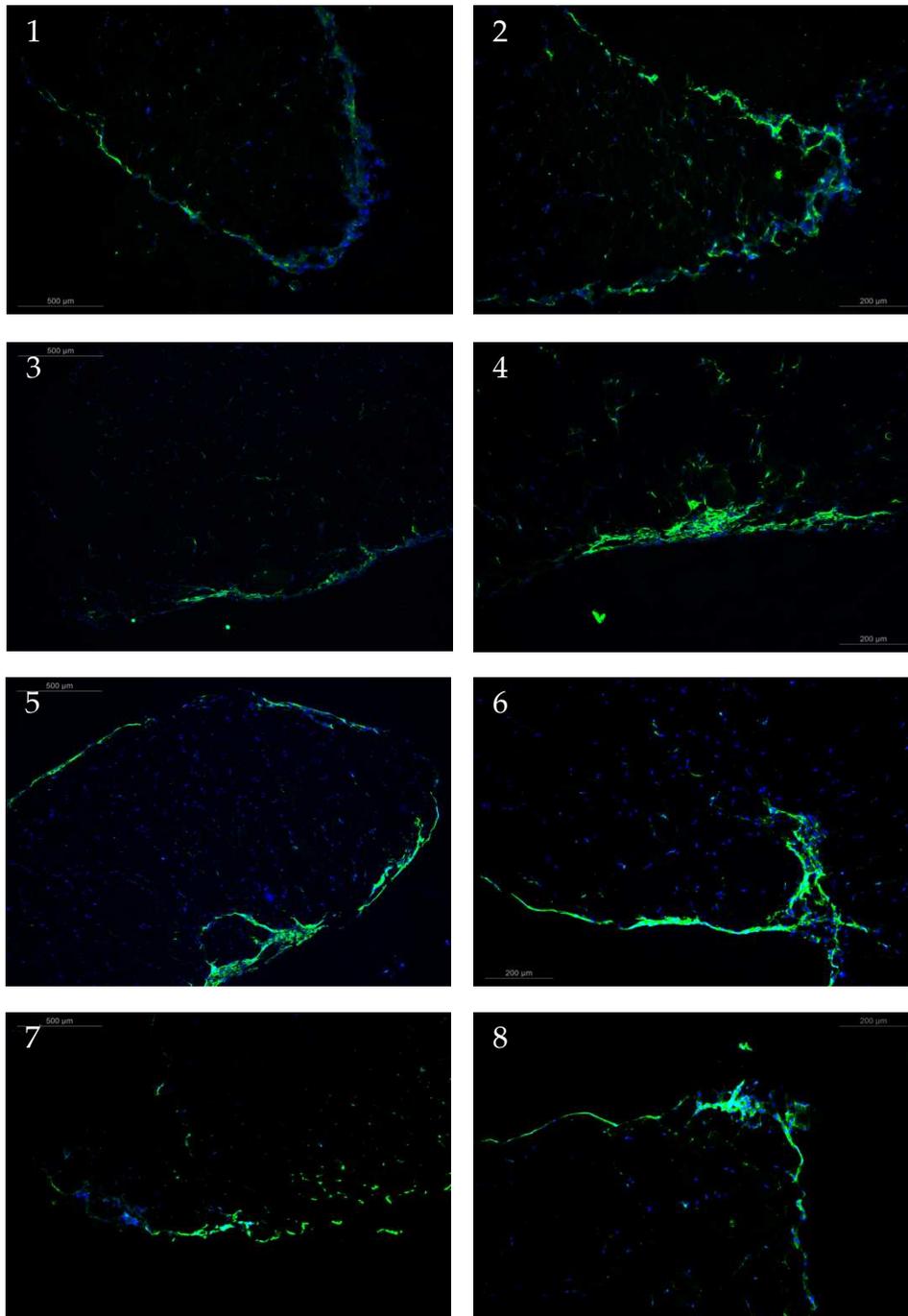


Abbildung 7: In situ Zymographie von mECM-Kulturen mit 1000µl Initialvolumen, verschiedenen Stimulationsmedien und 15 Tagen Kultivierungsdauer. 1-2: Basalmedium, 3-4: CaCl₂-Medium, 5-6: TGFβ-Medium und 7-8: VEGF-Medium. Es handelt sich um Übersichtsaufnahmen mit den Maßstäben= 500 µm und 200µm. Grün: enzymatische Aktivität der Gelatinasen MMP2 und MMP9, blau:

5.4 Versuche zu der Wirkung von nicht modifiziertem Osteopontin auf die osteogene Transformation von VIC und mECM

5.4.1 Kalziumkonzentration in der zweidimensionalen Zellkultur nach Stimulation mit OPN

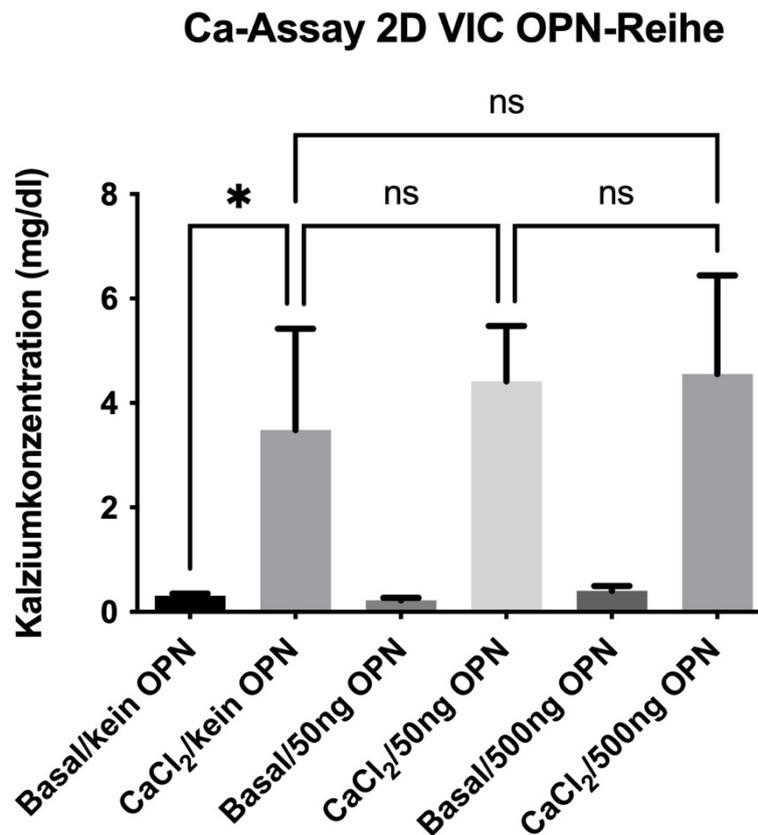


Abbildung 8: Kalziumkonzentration gemessen in mg/dl von VIC, welche über 15 Tage in einer zweidimensionalen Zellkultur kultiviert wurden. Dargestellt ist der Kalziumgehalt für 6 Stimulationskonditionen. Hierbei ist der Anstieg der Kalziumkonzentration signifikant zwischen den Basal-Konditionen gegenüber den CaCl₂-Konditionen. Beispielsweise ist die Signifikanz zwischen der Kondition Basal/kein OPN (0,31±0,04) und der Kondition CaCl₂/kein OPN (3,48±1,93) dargestellt. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Kalziumkonzentration durch Hinzugabe von OPN in den Konzentrationen von 50ng/ml und 500ng/ml zum CaCl₂-Medium. Die Mittelwerte mit Standardabweichung betragen für CaCl₂/50ng OPN (4,42±1,06) und für CaCl₂/500ng OPN (4,56±1,89). n=3; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung; *p<0,05

Zur Untersuchung der Kalzifizierungsvorgänge in der zweidimensionalen Zellkultur mit VIC, welche an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11 und d13 mit unterschiedlichen OPN-Konzentrationen stimuliert wurden, führten wir ein Kalziumassay durch.

Hierbei zeigte sich, entsprechend den oben genannten Vorversuchen, ein signifikanter Anstieg der Kalziumkonzentration von den mit Basalmedium stimulierten VIC zu den mit CaCl_2 -Medium stimulierten VIC. Es zeigte sich keine Veränderung der Kalziumkonzentration durch die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des nicht modifizierten Osteopontin.

5.4.2 Durchlichtaufnahmen von VIC in der 2D Zellkultur

Um die morphologischen Veränderungen von VIC im Rahmen der Kalzifizierung in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen zu untersuchen, wurden Durchlichtaufnahmen der Kulturen am 14ten Tag der Stimulation aufgenommen. Die unten in Abbildung 9 dargestellten Aufnahmen zeigen zweidimensionale Kulturen mit den folgenden Stimulationsbedingungen: (1) Basalmedium und 50ng/ml OPN, (2) Basalmedium und 500ng/ml OPN, (3) CaCl_2 -Medium und 50ng/ml OPN und (4) CaCl_2 -Medium und 500ng/ml OPN. In den mit CaCl_2 -Medium stimulierten Kulturen bildeten sich kalzifizierte Knoten. Entgegen dem vermuteten Eindruck in den Aufnahmen (3) und (4) zeigte sich in Zusammenschau aller Durchlichtaufnahmen keine vermehrte oder verringerte Bildung von Kalzifizierungsherden in Abhängigkeit zu der OPN-Konzentration im Stimulationsmedium. Die kalzifizierten Knoten sind in den Abbildungen mit Pfeilen markiert und bestehen vermutlich aus VIC und ECM Bestandteilen³⁵.

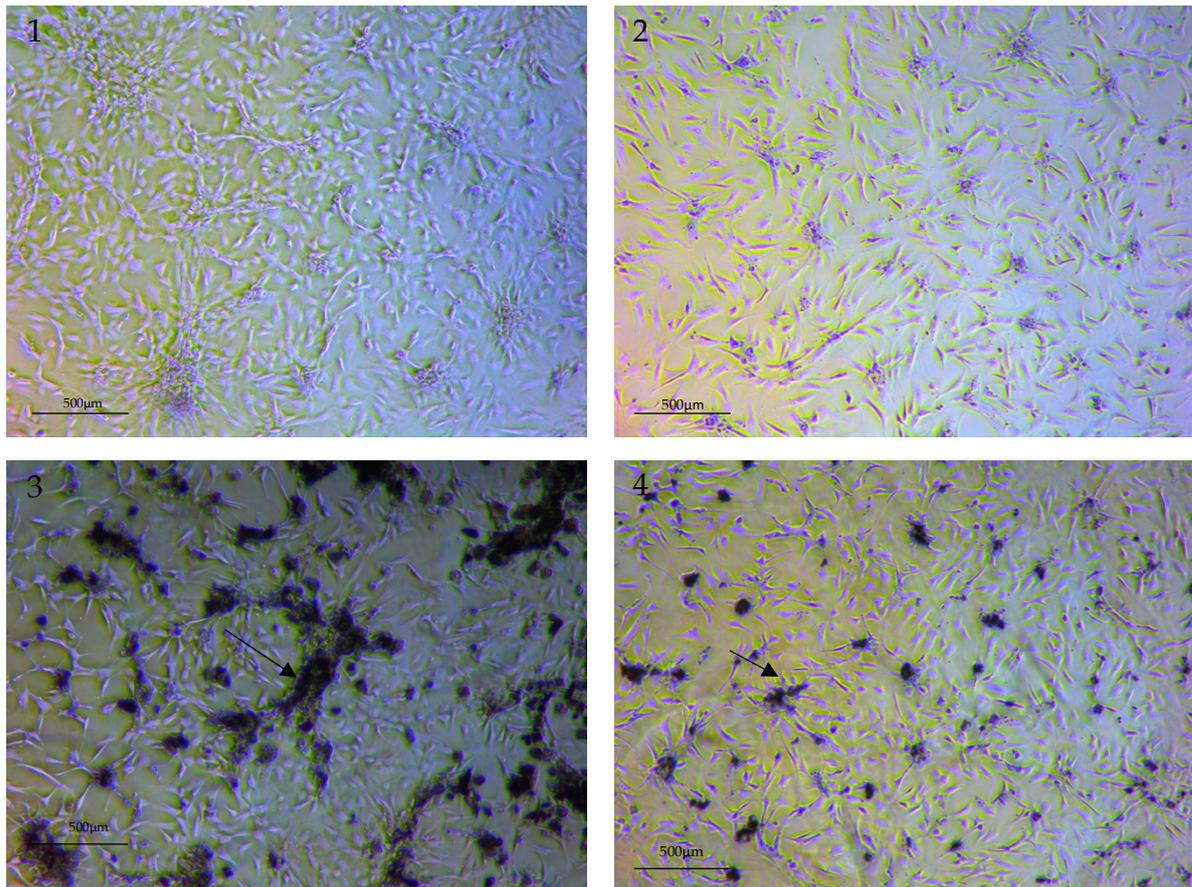


Abbildung 9: 2D VIC-Kulturen mit den Stimulationsbedingungen (1) Basalmedium und 50ng/ml OPN, (2) Basalmedium und 500ng/ml OPN, (3) CaCl_2 -Medium und 50ng/ml OPN und (4) CaCl_2 -Medium und 500ng/ml OPN. Es handelt sich um Durchlichtaufnahmen der VIC-Kulturen an dem 14ten Tag der Kultivierung. Die VIC-Kulturen wurden über 15 Tage kultiviert. In den mit CaCl_2 -Medium stimulierten Kulturen (3) und (4) zeigt sich die Bildung von kalzifizierten Knoten (Pfeil). In den dargestellten Bildern zeigt sich eine vermehrte Knotenbildung für die Kondition (3) CaCl_2 -Medium und 50ng/ml OPN. Diese Beobachtung wiederholte sich jedoch nicht für die weiteren Versuche mit diesem Versuchsaufbau. Maßstab 500µm.

5.4.3 Wirkung von nicht modifiziertem Osteopontin auf die osteogene Transformation von VIC im dreidimensionalen Zellkulturmodell

Um die Wirkung von verschiedenen OPN-Konzentrationen auf die Kalzifizierungsprozesse in dreidimensionalen Kulturen zu untersuchen, wurden mECM über 15 Tage mit in Abbildung 10 dargestellten Stimulationsmedien kultiviert. Das verwendete OPN wurde hinsichtlich seiner Phosphorylierung nicht

modifiziert. Der Wechsel des Stimulationsmediums fand an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11 und d13 statt.

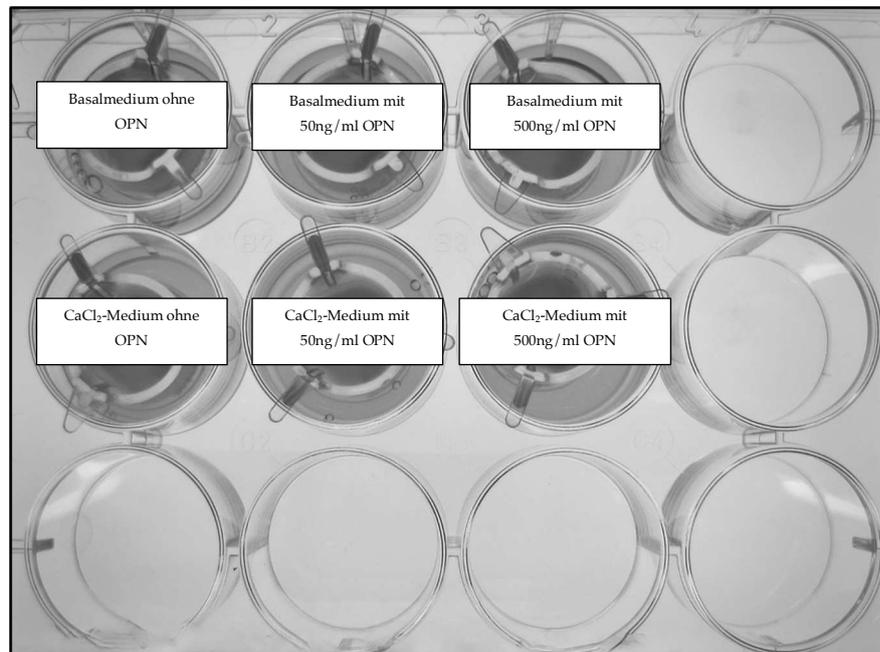


Abbildung 10: Versuchsaufbau zu der Untersuchung der Wirkung verschiedener OPN-Konzentrationen auf VIC im mECM-Modell. Es handelt sich um Kulturen mit einem Initialvolumen von 1000µl. Der Wechsel des Mediums erfolgte an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11, d13. Dem Basal- bzw. dem CaCl₂-Medium wurden wie im Bild gezeigt 50ng/ml bzw. 500ng/ml OPN zugesetzt, sodass die Kulturen an den Stimulationstagen zusätzlich mit verschiedenen

5.4.4 Kalziumkonzentration in mECM nach OPN-Stimulation im Medium

Nach der abgeschlossenen Kultivierung, der in Abbildung 10 dargestellten Kulturen, wurde der Kalziumgehalt der Kulturen mittels eines Kalziumassays bestimmt. In Abbildung 11 ist der Kalziumgehalt zu der jeweiligen Kondition aufgetragen. Es zeigt sich eine Erhöhung des Kalziumgehaltes bei den Konditionen mit CaCl₂-Medium gegenüber den Konditionen mit Basalmedium, wie bereits im Abschnitt 5.2.2 beschrieben. Die Abbildung 11 zeigt weiterhin keine signifikante Änderung des Kalziumgehalts in den Kulturen in Abhängigkeit mit der Hinzugabe von OPN in unterschiedlichen Konzentrationen zu dem Stimulationsmedium. Somit veranschaulicht die Abbildung 11, dass der Kalziumgehalt der

mECM mit dem Versuchsaufbau aus Abbildung 10, nicht durch die Hinzugabe von OPN beeinflusst werden kann.

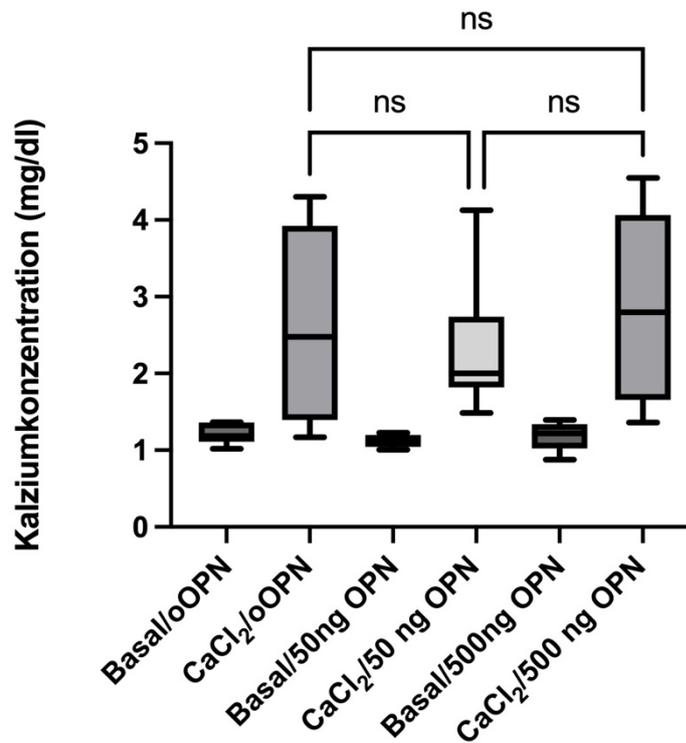


Abbildung 11: Kalziumgehalt gemessen in mg/dl in mECM-Kulturen mit einem Initialvolumen von 1000 μ l. Dargestellt ist der Kalziumgehalt für mECM-Kulturen in 6 verschiedenen Stimulationsbedingungen: Basal/ohne OPN, CaCl₂/ohne OPN, Basal/50ng/ml OPN, CaCl₂/50ng/ml OPN, Basal/500ng/ml OPN, CaCl₂/500ng/ml OPN. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung des Kalziumgehalts durch Hinzugabe der verschiedenen Konzentrationen OPN zum Medium. Dabei liegt die Kalziumkonzentration in den Kulturen mit CaCl₂/ohne OPN bei einem Mittelwert von $2,63 \pm 1,24$ mg/dl und sinkt nicht signifikant bei den Kulturen mit CaCl₂-Medium/ 50ng/ml OPN auf $2,30 \pm 0,85$ mg/dl. Der Mittelwert mit Standardabweichung liegt bei CaCl₂-Medium/ 500ng/ml OPN bei $2,85 \pm 1,22$ mg/dl, n=7 (8 für CaCl₂ Konditionen; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung)

5.4.5 Histologische Charakterisierung von mECM nach Stimulation mit OPN, TGF β und VEGF

In dem folgenden Versuchsaufbau wurden die mECM simultan mit VEGF, TGF β und OPN stimuliert (Versuchsaufbau in Abbildung 12). Die übrigen Kultivierungsbedingungen blieben gleich. Die Kultivierungsdauer betrug wie bei allen übrigen Versuchen 15 Tage. Das Medium mit den jeweiligen Zusätzen von TGF β , VEGF und OPN wurde an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11, d13 gewechselt. Anschließend wurden an den Kulturen histologische beziehungsweise immunhistochemische Färbungen durchgeführt.



Abbildung 12: Versuchsaufbau zur morphologischen Untersuchung der mECM nach Stimulation mit den oben dargestellten Konditionen über 14 Tage Kultivierungsdauer. OPN (nicht modifiziert) wurde den Kulturen in einer Konzentration von 500ng/ml hinzugefügt. VEGF und TGF β waren im Medium in einer Konzentration von 5ng/ml enthalten. Die Wachstumsfaktoren TGF β und VEGF sowie das Glykophosphoprotein wurden dem Medium im Rahmen des Mediumwechsels an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11 und d13 hinzugefügt.

5.4.5.1 Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA in mECM mit VEGF, TGF β und OPN-Stimulation

Als charakteristischer Marker für die myofibroblastische Transdifferenzierung von VIC ist α -SMA bekannt. Dieser wird vor allem von aVIC exprimiert. Um die Expression des Markers in den mECM in Abhängigkeit von der Stimulation mit OPN, TGF β und VEGF zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen α -SMA durchgeführt. In allen Kulturen ließ sich α -SMA nachweisen. In den mECM, welche kein OPN im Stimulationsmedium enthielten, zeigte sich für alle Konditionen (Basal-, CaCl₂-, TGF β - und VEGF-Medium) ein Nachweis von α -SMA an der Kulturoberfläche sowie in Bereich von VIC-Ansammlungen (Siehe Abbildung 13). Eine identische Verteilung des nachgewiesenen Markers zeigten die Konditionen Basalmedium mit Osteopontin und CaCl₂-Medium mit OPN (Abbildung 14: 1-2). Die Verteilung von α -SMA verändert sich durch die Kombination von TGF β mit Osteopontin und VEGF mit OPN im Medium. Bei diesen Konditionen konnte der Marker für die myofibroblastische Transdifferenzierung disseminiert in den mECM-Kulturen nachgewiesen werden (Abbildung 14: 3-4)

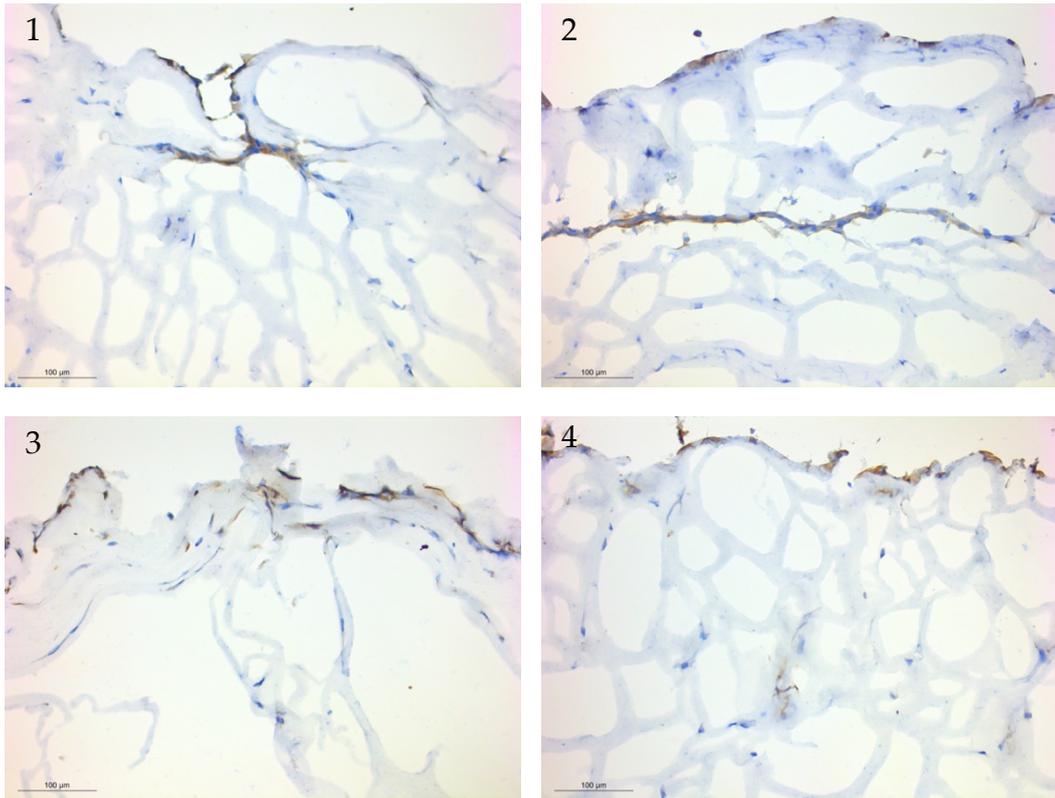


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA von mECM-Kulturen mit 1000 μ l Initialvolumen. Die Abbildung zeigt folgende Stimulationsbedingungen: 1. Basalmedium ohne OPN, 2. CaCl_2 -Medium ohne OPN, 3. $\text{TGF}\beta$ -Medium ohne Osteopontin und 4. VEGF-Medium ohne OPN. Es handelt sich um Aufnahmen mit dem Maßstab 100 μ m. Es zeigt sich ein schwaches α -SMA Signal im peripheren Bereich der Kulturen. Die dargestellten mECM sind Teil eines Versuchs mit vier weiteren Stimulationsbedingungen. Hierbei sind den o.g. Stimulationsbedingungen zusätzlich 500ng/ml OPN zugesetzt. Die histologischen Bilder des zweiten Versuchsteils mit OPN sind der Abbildung 14 zu entnehmen. Braun= α -SMA, blau= Zellkerne; Maßstab 100 μ m.

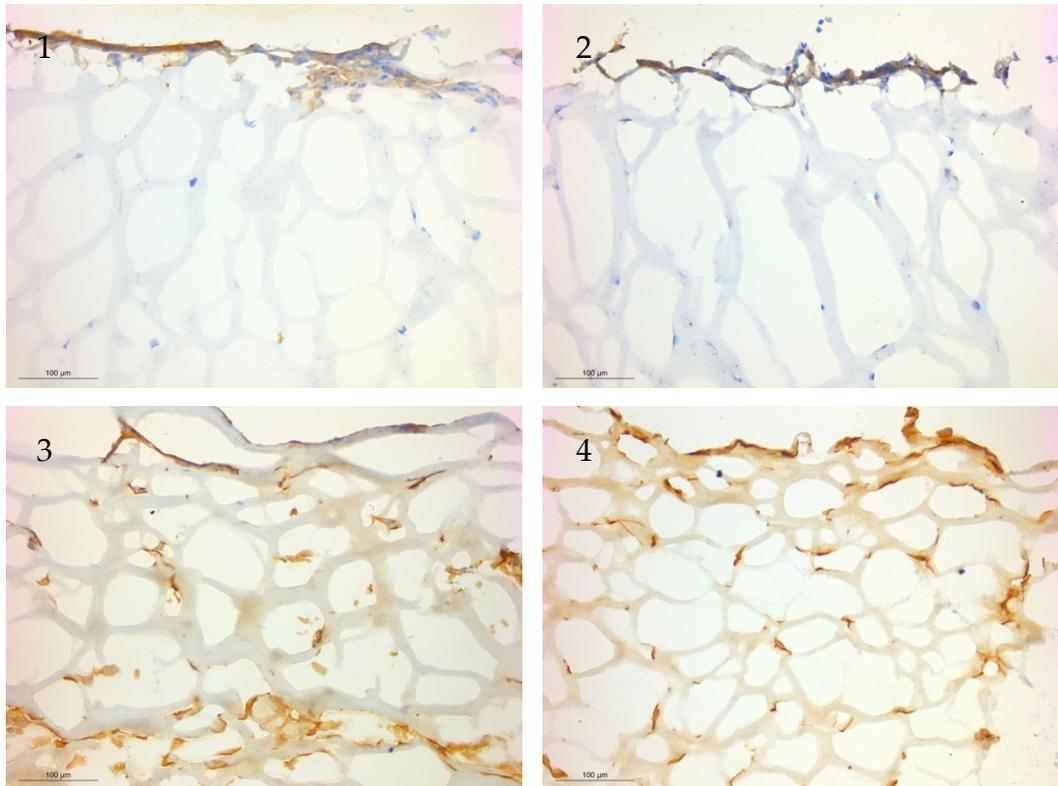


Abbildung 14: Versuchsteil 2: Immunhistochemische Färbung gegen α -SMA von mECM-Kulturen mit 1000 μ l Initialvolumen. Die Abbildung zeigt folgende Stimulationskonditionen: 1. Basalmedium mit 500ng/ml OPN, 2. CaCl_2 -Medium mit 500ng/ml OPN, 3. TGF β -Medium mit 500ng/ml Osteopontin und 4. VEGF-Medium mit 500ng/ml OPN. Es zeigt sich im Vergleich zu dem Versuchsteil 1 in der Abbildung 13 ein stark erhöhtes α -SMA im Zentrum der mECM sowie in der Peripherie für die in 3 und 4 dargestellten Konditionen. Die histologischen Bilder des ersten Versuchsteils ohne OPN sind der Abbildung 13 zu entnehmen. Braun= α -SMA, blau= Zellkerne; Maßstab 100 μ m.

5.4.6 Charakterisierung des nicht modifiziertem OPN im Westernblot

Mittels Westernblot erfolgte der Nachweis des industriell hergestellten, bovines OPN in unterschiedlichen Mengen. Das bovine OPN wurde für alle Versuche des Abschnitts 5.4 verwendet. Die Banden für das OPN befinden sich im Bereich von 60kDA. Dieser Bereich repräsentiert phosphoryliertes OPN. Die Proteinbanden für 1 μ l und 2 μ l zeigen sich im Westernblot nicht nachweisbar.

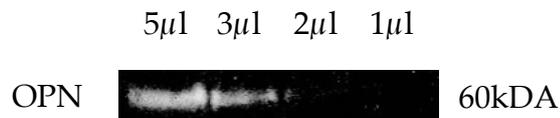


Abbildung 15: Nachweis von verschiedenen Mengen eines industriell hergestellten, bovinen OPN im Westernblot. Abbildung eines Bandenmusters für verschiedene OPN Mengen. Dabei entsprechen 5µl $\hat{=}$ 1 µg OPN. Eine Menge von unter 0,4 µg ließ sich nicht im Westernblot nachweisen. 2µl $\hat{=}$ 0,4 µg OPN: Hier zeigt sich andeutungsweise eine Bande.

5.5 Versuche zu der Wirkung von modifiziertem OPN auf die osteogene Transformation von VIC in dem mECM-Modell

Da aus der Literatur eine Abhängigkeit der Wirkungsweise des OPN von seinem Phosphorylierungszustand beschrieben wird, erfolgte für den folgenden Abschnitt die Etablierung der Phosphorylierung und Dephosphorylierung des OPN. Zusätzlich erfolgte der Nachweis dieser Modifikation des OPN, welchem sich der folgende Abschnitt widmet.

5.5.1 Charakterisierung des modifiziertem OPN im Westernblot

Die Wirkung des OPN ist abhängig von dem Phosphorylierungsstatus des Proteins, sodass dieser mittels Westernblot untersucht wurde. OPN beinhaltet verschiedene Phosphatbindungsstellen, unter anderem an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus wurde im unten dargestellten Westernblot am ersten Tag als Erstantikörper *Phospho-Tyrosine Mouse mAb* verwendet. Am Folgetag erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper α -goat anti mouse.

Die unten dargestellten Proben wurden im Vorfeld zum Teil phosphoryliert und dephosphoryliert. Die Tasche 2 enthält kommerziell erworbenes OPN, welches keiner weiteren chemische Modifikation unterlag. Das OPN in den Taschen 3 und 4 wurde nach den Protokollen in den Abschnitten 4.8.1 und 4.8.2 phosphoryliert und anschließend dephosphoryliert. Im Anschluss wurde es 4 Wochen bei -20°C gelagert (g). In den Taschen 5 und 6 befand sich das am Tag des Westernblots phosphorylierte und dephosphorylierte OPN.

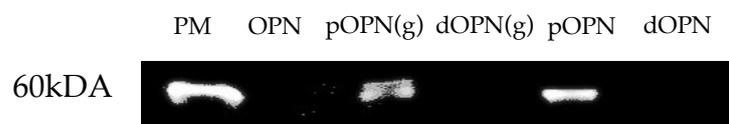


Abbildung 16: Repräsentatives Bandenmuster eines Westernblot zur Untersuchung der Phosphorylierung des OPN am Tyrosin. Die Taschen enthalten folgende Proben (von links nach rechts): Tasche 1: Proteingrößenmarker; Tasche 2: phosphoryliertes OPN (4 Wochen bei -20°C gelagert); Tasche 3: dephosphoryliertes OPN (4 Wochen bei -20°C gelagert); Tasche 4: phosphoryliertes OPN; Tasche 5: dephosphoryliertes OPN.

Es zeigte sich eine abgeschwächte Phosphorylierung am Tyrosin in Abhängigkeit zu der Lagerung. Die Bande des gelagerten, phosphorylierten OPN (pOPN(g)) erschien schwächer im Vergleich zu der Bande des frisch phosphorylierten OPN (pOPN). An dem kommerziell erworbenen OPN ließ sich keine Phosphorylierung am Tyrosin nachweisen. Ebenfalls zeigte sich kein Nachweis von Phospho-Tyrosin an dem dephosphorylierten OPN (dOPN(g) und dOPN).

5.5.2 Versuche zu der Wirkung von modifiziertem OPN auf VIC im 2D Modell

Für die folgenden Versuche wurden pOPN und dOPN verwendet, um die Wirkung von OPN abhängig vom Phosphorylierungszustand auf die Kalzifizierungsprozesse in zweidimensionalen VIC-Kulturen zu untersuchen. Es wurden

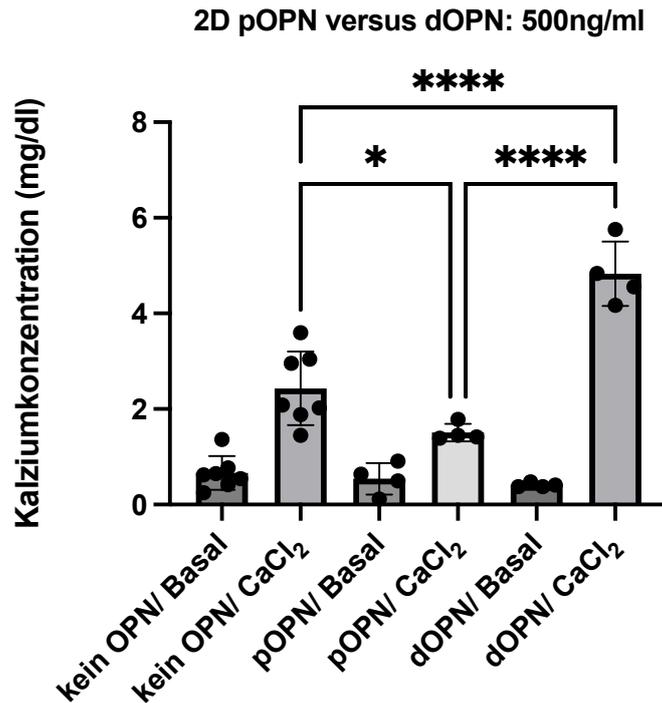


Abbildung 17: Kalziumgehalt gemessen in mg/dl in 2D Kulturen mit VIC. Dargestellt ist der Kalziumgehalt für VIC-Kulturen in 6 verschiedenen Stimulationskonditionen: Basal/ohne OPN, CaCl₂/ohne OPN, Basal/500ng/ml pOPN, CaCl₂/500ng/ml pOPN, Basal/500ng/ml dOPN, CaCl₂/500ng/ml dOPN. Die Kultivierungsdauer betrug 15 Tage. Es zeigten sich signifikante Veränderung des Kalziumgehalts durch Hinzugabe von pOPN und dOPN zu den 2D Kulturen mit CaCl₂-Medium. Dabei liegt die Kalziumkonzentration in den Kulturen mit CaCl₂/ohne OPN bei einem Mittelwert von $2,43 \pm 0,77$ mg/dl und sinkt signifikant bei Hinzugabe von 500ng/ml pOPN zum CaCl₂-Medium auf $1,51 \pm 0,18$ mg/dl. Ebenfalls signifikant ist der Anstieg der Kalziumkonzentration durch Hinzugabe von 500ng/ml dOPN gegenüber den Konditionen CaCl₂/kein OPN und CaCl₂/pOPN. Der Mittelwert mit Standardabweichung liegt bei CaCl₂-Medium/ 500ng/ml dOPN bei $4,83 \pm 0,68$ mg/dl, $n=4$ ($n=7$ für Konditionen ohne OPN; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung).

6 Stimulationskonditionen untersucht: 1. Kein OPN und Basalmedium; 2. Kein OPN und CaCl₂-Medium; 3. pOPN und Basalmedium; 4. pOPN und CaCl₂-Medium; 5. dOPN und Basalmedium; 6. dOPN und CaCl₂-Medium. Verwendet wurden zwei OPN-Konzentrationen für die Versuche, 50ng/ml OPN und 500ng/ml OPN. In Abbildung 17 dargestellt sind die VIC-Kulturen, welche mit 500ng/ml OPN kultiviert wurden. Anschließend wurden die Kulturen einem

Kalziumassay zugeführt, um den Kalziumgehalt der Kulturen zu bestimmen. Die Aussage der Abbildung ist ebenfalls repräsentativ für die Kulturen, die mit 50ng/ml OPN inkubiert wurden.

Der Versuch zeigte, dass die Kulturen, welche mit Basalmedium stimuliert wurden, ähnliche Kalziumkonzentrationen (meist unter 1mg/dl) zeigten. In der Gruppe, der mit CaCl₂-Medium stimulierten Kulturen, zeigte sich eine signifikante Veränderung der Kalziumkonzentration in den VIC-Kulturen in Abhängigkeit zu dem Phosphorylierungsstatus des OPN. So zeigten die zweidimensionalen VIC-Kulturen, die mit pOPN stimuliert wurden, eine signifikant geringere Kalziumkonzentration gegenüber den Kulturen, die mit nicht modifiziertem OPN und mit dOPN stimuliert werden. Die höchste Kalziumkonzentration konnte bei den mit dOPN kultivierten Kulturen gemessen werden, hier lag der Mittelwert bei 4,83 mg/dl (Abbildung 17). Der Anstieg der Kalziumkonzentration zeigte sich signifikant zu der Höhe der Kalziumkonzentration der VIC-Kulturen, welche mit kommerziell erworbenem OPN stimuliert wurden.

Zur weiteren Untersuchung der Kalzifizierungsprozesse in zweidimensionalen VIC-Kulturen, wurden Durchlichtaufnahmen der Kulturen am 14 Tag der Kultivierung durchgeführt (Abbildung 18). Ziel war die Untersuchung der Kulturen auf kalzifizierte Knoten sowie einen erhöhten Zelluntergang. In Abbildung 14 dargestellt sind zwei unterschiedliche VIC-Chargen mit den Stimulationskonditionen: (1/3) pOPN und CaCl₂-Medium; (2/4) dOPN und CaCl₂-Medium. Bei den Stimulationskonditionen dOPN und CaCl₂-Medium zeigten sich eine beginnende Bildung von kalzifizierten Knoten (Pfeil) und erhöhter Zelldetritus als Zeichen des Zelluntergangs in den VIC-Kulturen.

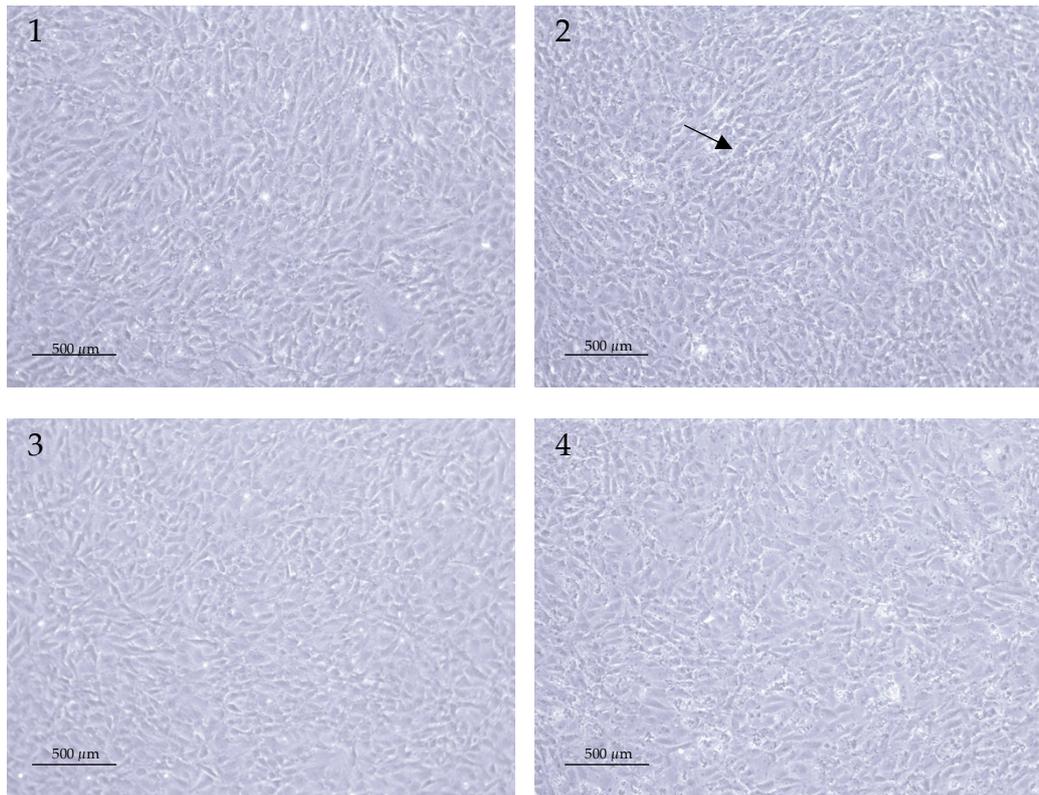


Abbildung 18: Repräsentative Durchlichtaufnahmen von VIC-Kulturen in 2D an dem 14ten Tag der Kultivierung. Die Kulturen wurden mit 500mg/ml pOPN und dOPN stimuliert. Die Stimulationstage waren d1, d4, d7, d9, d11 und d13. In der Grafik dargestellt sich die Konditionen pOPN mit CaCl_2 -Medium (1,3) und dOPN und CaCl_2 -Medium (2,4) für zwei unterschiedliche VIC-Chargen. Der Versuch wurde für 5 verschiedene Chargen durchgeführt. Für die Kondition dOPN und CaCl_2 -Medium zeigt sich eine vermehrte Bildung von Knoten (Pfeil) und ein vermehrte Zelluntergang. In den Kulturen zeigt sich vermehrt Zelldetritus. Maßstab 500µm.

5.5.3 Wirkung von modifiziertem OPN auf VIC in mECM-Kulturen

5.5.3.1 Histologische Untersuchung vom mECM-Kulturen nach Inkubation mit modifiziertem OPN

Zur histologischen Untersuchung der mit modifiziertem OPN stimulierten mECM-Kulturen wurden histologische Schnitte angefertigt. Zur morphologischen Beurteilung erfolgte eine HE-Färbung der Schnitte. In den Abbildungen 19 und 20 sind die Stimulationskonditionen CaCl_2 -Medium ohne OPN, CaCl_2 -Medium mit OPN, CaCl_2 -Medium mit 500ng pOPN und CaCl_2 -Medium mit 500ng dOPN dargestellt. In den HE-Färbungen der verschiedenen Konditionen zeigen

sich keine morphologischen Unterschiede. Die mECM-Kulturen entsprechen einander in Hinblick auf die Zellzahl und Zellverteilung.

Zur histologischen Untersuchung der Mineralisierungs- und Kalzifizierungsprozesse in den mit modifiziertem OPN stimulierten mECM wurden von Kossa Färbungen angefertigt. Eine braune Verfärbung im Sinne einer Phosphatanreicherung ließ sich in schwacher Ausprägung nur für die Konditionen CaCl_2 ohne OPN und CaCl_2 mit dOPN beobachten. Die von Kossa Färbungen zeigten keine schwarzen Bereiche im Sinne von Kalzifizierungsherden. Es zeigten sich keine weiteren Unterschiede bezüglich der Stimulationskonditionen in den mit von Kossa gefärbten Schnitten.

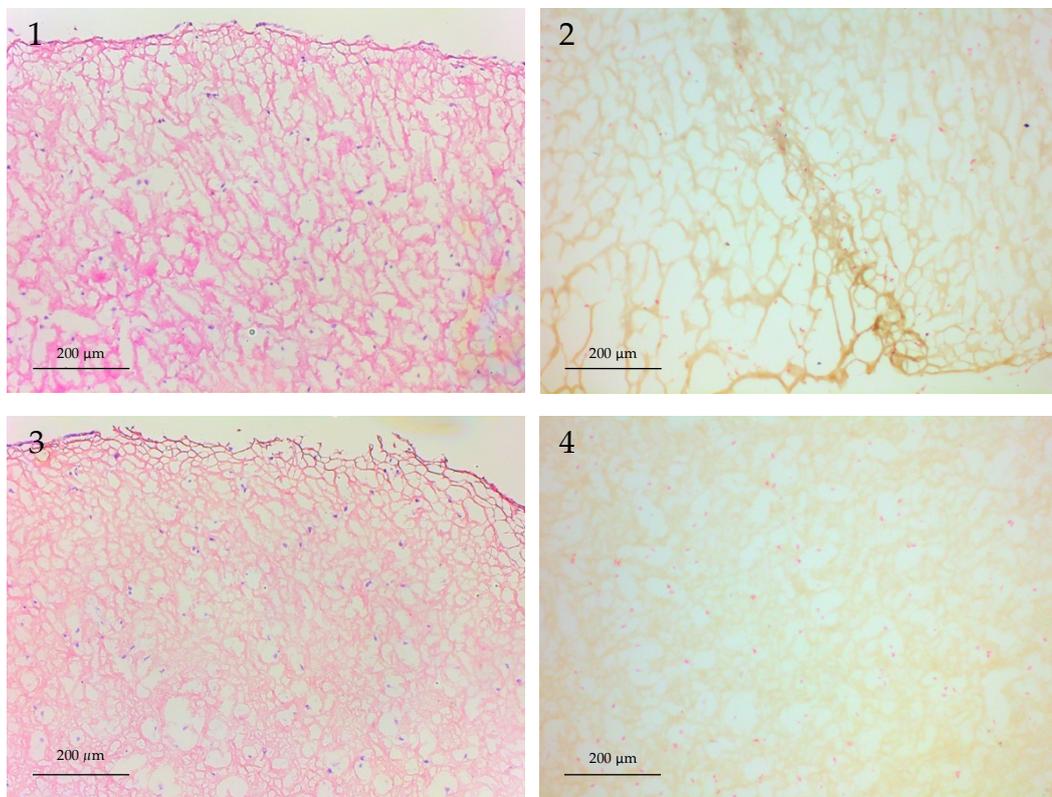


Abbildung 19: Darstellung von mECM-Kulturen mit 1000 µl Initialvolumen in der HE-Färbung und Von Kossa-Färbung mit verschiedenen Stimulationsmedien und 15 Tagen Kultivierungsdauer. 1-2: CaCl_2 -Medium ohne OPN, 3-4: CaCl_2 -Medium mit OPN. Es handelt sich um Übersichtsaufnahmen mit dem Maßstab 200 µm. HE-Färbung: Rosa= Kollagen, Blau=Zellkerne. Von Kossa Färbung: Beige-braun= Phosphatanreicherungen, schwarz= Kalzifizierungsherde, rot= Zellkerne.

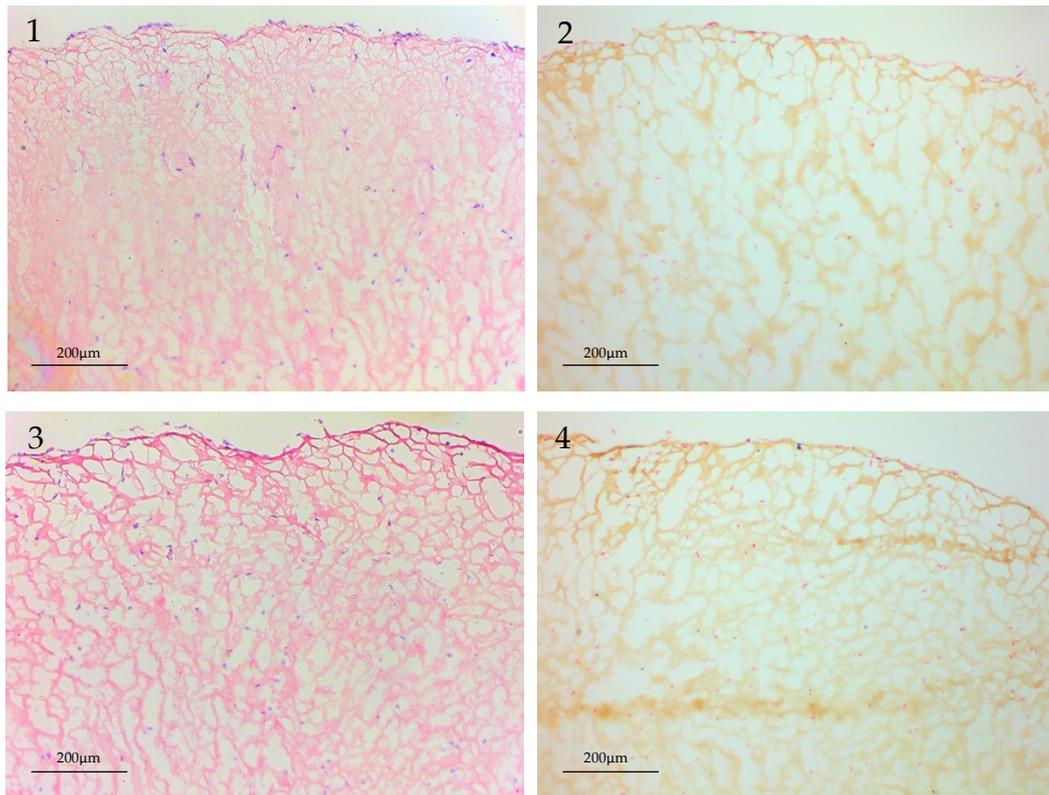


Abbildung 20: Darstellung von mECM-Kulturen mit 1000µl Initialvolumen in der HE-Färbung und Von Kossa-Färbung mit verschiedenen Stimulationsmedien und 15 Tagen Kultivierungsdauer. 1-2: CaCl₂-Medium mit 500ng/ml pOPN, 3-4: CaCl₂-Medium mit 500ng/ml dOPN. Es handelt sich um Übersichtsaufnahmen mit dem Maßstab 200µm. HE-Färbung: Rosa= Kollagen, Blau=Zellkerne. Von Kossa Färbung: Beige-braun= Phosphatanreicherungen, schwarz= Kalzifizierungsherde, rot= Zellkerne.

5.5.3.2 Wirkung von modifiziertem OPN auf den Kalziumgehalt in mECM-Kulturen

Zur Beurteilung der Kalziumkonzentration in den mECM-Kulturen, in Abhängigkeit von der Kultivierung mit pOPN und dOPN und somit von dem Phosphorylierungszustand des OPN, erfolgte ein Kalziumassay nach 15-tägiger Kultivierung. Die Abbildung 21 zeigt die Stimulationsbedingungen des Versuchs. Es wurden ebenfalls die zwei OPN-Konzentrationen 50ng/ml und 500ng/ml verwendet. In Abbildung 15 sind zur Vereinfachung der Abbildung lediglich die Kulturen des Versuchs mit 500ng/ml OPN dargestellt. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen des Kalziumgehalts in Abhängigkeit zu der Stimulation der Kulturen mit OPN, pOPN oder dOPN.

mECM pOPN versus dOPN: 500ng/ml

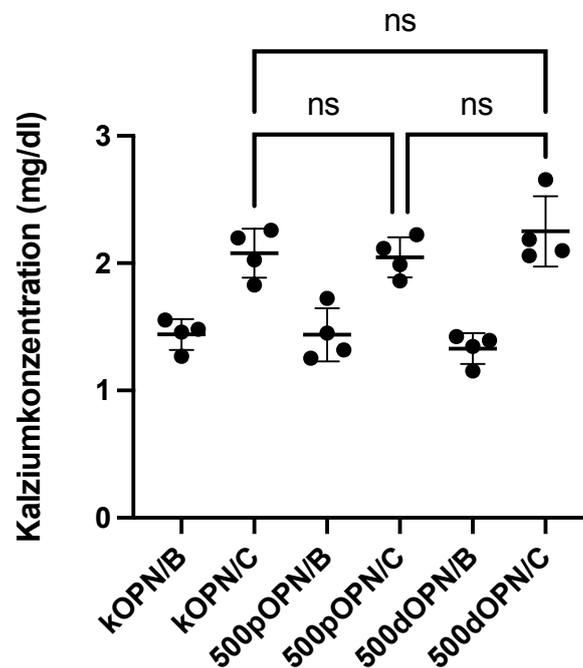


Abbildung 21: Kalziumgehalt gemessen in mg/dl in mECM Kulturen mit einem Initialvolumen von 1000 μ l. Dargestellt ist der Kalziumgehalt für mECM Kulturen in 6 verschiedenen Stimulationskonditionen: Basal/kein OPN, CaCl₂/kein OPN, Basal/500ng/ml pOPN, CaCl₂/500ng/ml pOPN, Basal/500ng/ml dOPN, CaCl₂/500ng/ml dOPN. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung des Kalziumgehalts durch Hinzugabe der verschiedenen Konzentrationen OPN zum Medium. Dabei liegt die Kalziumkonzentration in den Kulturen mit CaCl₂/kein OPN bei einem Mittelwert von 2,08±0,19 mg/dl und zeigt bei den Kulturen mit CaCl₂-Medium/500ng/ml pOPN eine nahezu identische Kalziumkonzentration von 2,05±0,16mg/dl. Der Mittelwert mit Standardabweichung liegt bei CaCl₂-Medium/500ng/ml dOPN bei 2,25±0,28 mg/dl, n=4; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung

6 Diskussion

6.1 Kalzifizierung und osteogene Transformation der VIC im mECM-Modell

Um im weiteren Verlauf die Wirkung von OPN auf die mit VIC assoziierten Kalzifizierungsprozesse in dem mECM-Modell untersuchen zu können, war es zunächst notwendig eine Kalzifizierung in dem mECM-Modell herbeizuführen.

Nachdem die VIC-Kultivierung in dem dreidimensionalen mECM-Modell in unserer Arbeitsgruppe in einer vorausgegangenen Arbeit etabliert werden konnte⁸¹, beschäftigte sich diese Arbeit in ihrem ersten Abschnitt zunächst mit der Kalzifizierung des mECM-Modells unter einer verlängerten Kultivierungsdauer von 15 Tagen und mit einer zu unserem Vorgängermodell erhöhten Zellzahl von 3636,36 Zellen/ μ l.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Kalzifizierung des mECM-Modells, sowohl in der histologischen Färbung von Kossa als auch durch die Quantifizierung des Kalziumgehalts in den mECM mittels eines Kalziumassays nachgewiesen werden.

Die histologische Untersuchung mittels von Kossa Färbung zeigte für alle mit CaCl_2 -Medium stimulierten Konditionen (untersucht wurden die Konditionen (1) CaCl_2 -Medium, (2) CaCl_2 -Medium+ $\text{TGF}\beta$, (3) CaCl_2 -Medium+ VEGF) Mikrokalzifizierungen in einem disseminierten Verteilungsmuster. Eine Veränderung der Menge und des Verteilungsmusters der Mikrokalzifizierungen konnte nicht durch Hinzugabe von $\text{TGF}\beta$ und VEGF herbeigeführt werden, obwohl $\text{TGF}\beta$ als prokalzifizierender Faktor und VEGF als kardioprotektiver Faktor bekannt ist³⁶.

Walker et al. konnten zeigen, dass $\text{TGF}\beta$ die ruhenden qVIC aktiviert und diese zu einer myofibroblastischen Transdifferenzierung anregt, welche mit einer vermehrten α -SMA-Expression und einer vermehrten Synthese von MMPs

einhergeht. Diese Signalkaskaden werden als Teil der kalzifizierenden Prozesse im Rahmen der Progression der Aortenklappenstenose angesehen⁵⁰. Weiterhin zeigten *in vitro* Experimente die vermehrte Bildung von kalzifizierten Knoten unter der Kultivierung von VIC mit TGF β ⁵².

Im Gegensatz zu diesen Daten konnte in dieser Arbeit kein prokalzifizierender Effekt durch die Hinzugabe von TGF β in das Stimulationsmedium der mECM-Kulturen gezeigt werden. Zusammenfassend zeigte sich im Rahmen der Quantifizierung des Kalziumgehalts in den mECM-Kulturen mittels Kalziumassay eine Erhöhung des Kalziumgehalts in den Kulturen durch Stimulation mit CaCl₂-Medium auf 1,25±0,49 mg/dl. Die Werte für die mit Basalmedium stimulierten Kulturen lagen bei 0,61±0,28 mg/dl. Der Anstieg war somit hoch signifikant und es konnte ein kalzifizierender Effekt auf die mECM-Kulturen erzielt werden. Darüber hinaus stieg der Kalziumgehalt im Vergleich zwischen den Stimulationsgruppen für Kondition CaCl₂-Medium und TGF β auf den höchsten Wert von 1,44± 0,25 mg/dl (Siehe Abbildung 7). Dieser Anstieg war im Vergleich zu den Übrigen mit CaCl₂-Medium stimulierten Gruppen nicht signifikant, was im Umkehrschluss auf keinen eindeutigen prokalzifizierenden Effekt durch die Hinzugabe von TGF β zu den Kulturen schließen ließ.

Es ist möglich, dass die abweichenden Ergebnisse unter anderem mit der dreidimensionalen Kultivierungsmethode zusammenhängen. Die Versuchsmodelle, die TGF β als prokalzifizierend wirkenden Wachstumsfaktor beschreiben, basieren meist auf zweidimensionalen VIC-Kulturen. Hierbei konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass VIC bereits durch die Kultivierung auf einem festen Untergrund in ihre aktivierte Form aVIC überführt werden, wodurch TGF β lediglich einen Cofaktor für die Aktivierung der VIC in den Myofibroblasten-ähnlichen Typ darstellen würde⁸².

Folglich ist es möglich, dass die alleinige Hinzugabe von TGF β in das Medium unserer dreidimensionalen mECM-Kulturen nicht für einen messbaren prokalzifizierenden Effekt im Vergleich zu der Stimulationskondition mit CaCl₂-Medium ausreicht.

Weitere Hinweise für diese These bieten Merryman et al., welche einen synergistischen Effekt von zyklischer Spannung und TGF β auf VIC zeigen konnten. In diesem Beispiel war die Expression von α -SMA als Marker für eine VIC-Aktivierung deutlich erhöht, wenn VIC zyklischer Spannung und TGF β ausgesetzt waren, gegenüber einer alleinigen Stimulation mit TGF β ⁸³.

Möglicherweise könnte diese Beobachtung die Erhöhung der prokalzifizierenden Effekte an der Oberfläche der mECM erklären. Diese war bei dem Wechsel des Kultivierungsmediums einer erhöhten Spannung ausgesetzt, indem neues Medium an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11 und d13 auf die mECM-Oberfläche pipettiert wurde. Als mögliche Folge zeigte sich eine erhöhte Aktivität der Gelatinasen MMP 2 und MMP 9 an der Oberfläche der mECM (Abbildung 7). Als Teil der kalzifizierenden Kaskade werden die Gelatinasen durch aktivierte VIC exprimiert und mit Umbauprozessen der mECM assoziiert, hierbei sorgen sie insbesondere für den Matrixabbau⁸⁴.

Weiterhin war der aus der Literatur bekannte, kardioprotektive Effekt des VEGF in den dargestellten Versuchen nicht eindeutig detektierbar⁸⁵. Die Hinzugabe von VEGF in das Stimulationsmedium der mECM zeigte keinen Effekt auf den, mittels Kalziumassay, detektierten Kalziumgehalt in den mECM. Darüber hinaus ließ sich auch keine eindeutige Verminderung der Mikrokalzifizierungen in der von Kossa Färbung durch die Hinzugabe von VEGF ermitteln.

Diese Beobachtung könnte zwei Ursachen haben. Die erste Ursache könnte in den Mechanismen zugrunde liegen, die den kardioprotektiven Effekt durch VEGF auf VIC, der vorausgegangenen Studienlage entsprechend, vermitteln. Eine VEGF-Ausschüttung fördert die Expression des Integrinrezeptors $\alpha_v\beta_3$ über den der dekalzifizierende Effekt des OPN vermittelt wird^{55,86}. Ein weiterer untersuchter, kardioprotektiver Effekt durch VEGF ist die Förderung der Zellmigration von Makrophagen und Endothelzellen⁵⁶. Beide kardioprotektiven Effekte konnten im vorliegenden Versuchsaufbau durch das Fehlen von OPN, Endothelzellen und Makrophagen nicht vermittelt werden. Das Fehlen der genannten Zellen bzw. des genannten Proteins erklärt wahrscheinlich den ausbleibenden

kardioprotektiven Effekt, der in Form einer verminderten Kalzifizierung erwartet wurde.

Ein weiterer Grund für die nicht nachgewiesenen Effekte durch VEGF und TGF β auf die Kalzifizierungsprozesse im mECM-Modell könnte in der Zusammensetzung des Matrigels liegen.

Die Imitation der ECM, welche in der Veränderung ihrer Zusammensetzung einen wesentlichen Beitrag zu den Kalzifizierungsprozessen in der Aortenklappe leistet, erfolgte bei den *in vitro* Versuchen mit Matrigel⁸⁷. Bei Matrigel handelt es sich um eine Mischung von ECM-Proteinen, die bereits Wachstumsfaktoren, wie TGF β und VEGF, enthält⁷⁸. Somit enthielten, wenn auch in geringeren Konzentrationen alle mECM bei ihrer Herstellung bereits beide Wachstumsfaktoren, VEGF und TGF β . Bei der Hinzugabe in das Stimulationsmedium handelt es sich somit um eine Erhöhung der Konzentration der Wachstumsfaktoren im Verlauf der Kultivierung der mECM. Diese Tatsache könnte den ausbleibenden Unterschied zwischen den Konditionen in Hinblick auf die Kalzifizierung in den mECM erklären.

Ein weiterer wesentlicher Faktor für den ausbleibenden Effekt der Zytokine und für eine verminderte Kalzifizierung der mECM, könnte der hohe Kollagenanteil in dem Matrigel sein, dieser liegt bei ca. 30% Kollagen Typ IV. Zusätzlich erfolgte die Hinzugabe von Kollagen Typ I im Rahmen der mECM-Herstellung (Abschnitt 4.4). Obwohl Kollagen auch *in vivo* ein wesentlicher Bestandteil der Aortenklappen ECM ist, weisen Studien daraufhin, dass ein hoher Anteil von Kollagen Typ I und Fibronectin bei der *in vitro* Kultivierung von VIC zu einer Inhibition der Kalzifizierungsvorgänge führen kann. Ein gegenteiliger Effekt wird für die Kultivierung von SMC auf Kollagen Typ I und Fibronectin beschrieben, hier kommt es zu einer vermehrten Bildung von kalzifizierten Knoten⁸².

Zusammenfassend könnte für folgende Versuche eine Reduktion des Kollagen Typ I Gehalts in den mECM-Kulturen zu einer vermehrten Kalzifizierung führen. Weiterhin ist das Modell nur eingeschränkt geeignet, um die Auswirkung von einzelnen Wachstumsfaktoren auf Kalzifizierungsprozesse in dem mECM-Modell beziehungsweise die osteogene Transformation der VIC zu untersuchen.

Wesentlich ist jedoch, dass in diesem ersten Teil der Arbeit eine nachweisbare Kalzifizierung des mECM-Modells etabliert werden konnte. Dies stellte die Grundlage für die folgenden Versuche rund um das Glykophosphoprotein OPN dar.

6.2 Wirkung von nicht modifiziertem OPN auf VIC und mECM

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich der Untersuchung der Wirkung von nicht modifiziertem OPN auf die osteogene Transformation von VIC im mECM-Modell. Es konnte gezeigt werden, dass die Kostimulation der mECM mit OPN und TGF β sowie mit OPN und VEGF zu einer vermehrten Expression von α -SMA führt.

Zusammenfassend wurden 8 Stimulationskonditionen miteinander verglichen. Die ersten vier Konditionen umfassen die bereits aus dem ersten Abschnitt bekannten Konditionen Basal, CaCl₂, TGF β und VEGF. Den nächsten vier Konditionen wurde zusätzlich nicht modifiziertes OPN in einer Konzentration von 500ng/ml zugesetzt, sodass diese mECM mit Basal+OPN, CaCl₂+OPN, TGF β +OPN und VEGF+OPN im Medium kultiviert wurden. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Färbung gegen α -SMA. Hierbei änderte sich das Verteilungsmuster und die Menge des nachgewiesenen α -SMA bei den Konditionen TGF β +OPN und VEGF+OPN. Bei diesen Kulturen war α -SMA in der ganzen mECM-Kultur histologisch nachweisbar und zeigte ein stärkeres Signal als bei den Vergleichskonditionen ohne OPN (Abbildung 14).

Als Marker für die myofibroblastische Transdifferenzierung wird α -SMA vor allem von aVIC exprimiert⁸². Es wird angenommen, dass die Aktivierung der VIC zu aVIC aufgrund von pathologischen Stimuli im Rahmen des Fortschreitens der kalzifizierenden Aortenklappenstenose erfolgt³⁶. Somit zeigt das Ergebnis des zuvor beschriebenen Versuchs einen prokalzifizierenden Effekt durch die Kostimulation der mECM mit OPN und TGF β sowie OPN und VEGF.

Im Gegensatz hierzu steht, dass OPN, der Literatur entsprechend, Kalziumablagerungen entgegenwirken soll. Dies wird jedoch vor allem für phosphoryliertes OPN beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass OPN abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus der Ablagerung von Hydroxyapatit und somit Kalzifizierungsprozessen entgegen wirken kann⁸⁸. Weiterhin scheint nicht nur die Anzahl der Phosphorylierungen an der ASRAM-Region des OPN wesentlich zu sein, da Gericke et al. zeigen konnten, dass OPN, welches seinen Ursprung in der Knochensubstanz hatte und 13 gebundene Phosphate aufwies, in seiner Inhibition von Hydroxyapatitablagerungen, einem OPN, mit dem Ursprung aus Milch und 28 gebundenen Phosphaten, überlegen war⁸⁹. Der Phosphorylierung am Serin des OPN wird dabei eine Schlüsselrolle für die dekalzifizierende Wirkung des Proteins zugesprochen⁸⁸.

Folglich könnte es sich bei dem verwendeten, nicht modifiziertem OPN aus der vorliegenden Arbeit um ein nicht ausreichend bzw. an den unwesentlichen Aminosäuren phosphoryliertes OPN gehandelt haben. Wäre dies der Fall, würde sich hierdurch der ausgebliebene dekalzifizierende Effekt erklären.

Ergänzend hierzu wurde nachgewiesen, dass eine Erhöhung von dephosphoryliertem OPN im Serum von Patienten mit einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose mit schweren Kalzifizierungsprozessen und somit mit einem schweren Verlauf korreliert⁹⁰.

Diese Aussage stützt den in dieser Arbeit nachgewiesenen, prokalzifizierenden Effekt, der vermehrten α -SMA Expression durch die Kostimulation der mECM mit TGF β und OPN, unter der Annahme eines unzureichenden Phosphorylierungsstatus des verwendeten OPN.

Kombiniert man dieses Ergebnis mit dem Diskussionspunkt aus Abschnitt 6.1, dass Matrigel in seiner Zusammensetzung bereits TGF β enthält, so zeigt sich ein Effekt der vermehrten α -SMA Expression durch Kostimulation mit TGF β und OPN nur bei weitergeführter Stimulation der mECM mit TGF β im Medium. Ansonsten hätte der Effekt auch für die Kondition CaCl₂-Medium und OPN sichtbar gewesen sein müssen, da bereits TGF β durch die Herstellung der mECM mit Matrigel in einer geringen Menge in der mECM-Kultur vorhanden war. Die

Kostimulation ist somit abhängig von der fortgeführten Hinzugabe von TGF β in das Stimulationsmedium.

Interessanterweise zeigt VEGF in Kostimulation mit OPN anstelle eines kardioprotektiven Effektes auf die mECM, ebenfalls eine vermehrte Aktivierung der VIC und somit eine vermehrte α -SMA Expression. Der fehlende kardioprotektive bzw. dekalzifizierende Effekt wurde beginnend bereits in Abschnitt 6.1 erläutert. Ein beschriebener Wirkmechanismus des VEGF war die Hochregulierung des Integrinrezeptors $\alpha_v\beta_3$. Durch das Fehlen von OPN in den vorausgegangenen mECM-Versuchen, kam es nicht zu einer Fortleitung der dekalzifizierende Wirkung des OPN über den Integrinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ ^{91,92}. Zu ergänzen ist an dieser Stelle, dass die Bindung des OPN an den genannten Integrinrezeptor abhängig ist vom dem Phosphorylierungsstatus des OPN⁹³. Somit könnte auch hier der ausbleibende kardioprotektive Effekt des VEGF, trotz des im Versuch vorhandenen OPN, durch den unklaren Phosphorylierungsstatus des verwendeten OPN erklärt werden.

Neben der histologischen Untersuchung erfolgten die in Abschnitt 5.4.1 und 5.4.4 beschriebenen Stimulationsversuche von zweidimensionalen VIC-Kulturen und mECM mit nicht modifiziertem OPN. Sowohl die zweidimensionalen VIC-Kulturen als auch die dreidimensionalen Kulturen wurden anschließend zur Detektion des Kalziumgehalts in den Kulturen einem Kalziumassay zugeführt. Hierbei konnte kein Effekt auf die Kalzifizierung in zweidimensionalen und dreidimensionalen VIC-Kulturen bzw. mECM durch die OPN Hinzugabe in das Stimulationsmedium gezeigt werden. Genauer gesagt zeigte sich keine Veränderung der mittels Kalziumassay gemessenen Kalziumkonzentration in den Kulturen durch die Hinzugabe von nicht modifiziertem OPN in das Stimulationsmedium.

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, stellt dieses Ergebnis nicht zwangsläufig einen Widerspruch zu bisher publizierten Ergebnissen dar. Bereits angesprochen wurde die Abhängigkeit der Kalzifizierungshemmung des OPN von seinem Phosphorylierungsstatus und einem funktionsfähigen RGD-Motiv in seiner Struktur⁹⁴. Hierbei ist wieder die Annahme vorausgesetzt, dass die fehlende dekalzifizierende Wirkung des OPN durch den unzureichenden Phosphorylierungszustand des verwendeten OPN verursacht wird. Zusätzlich zeigen neuere

Studien, dass fünf humane Isoformen des OPN existieren. Die Isoformen unterscheiden sich beispielsweise in ihren *phosphorylation sites* und erfüllen unterschiedliche biologische Funktionen^{95,96}.

Die Untersuchung der OPN-Isoformen und ihren Eigenschaften ist Thema aktueller Studien und könnte ebenfalls Einfluss auf die oben aufgeführten Ergebnisse haben, da auch die verwendete Isoform des OPN bislang unklar blieb.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die vermehrte Aktivierung der VIC abhängig ist von einer Kostimulation mit TGF β + OPN und VEGF+OPN im Medium. Zusätzlich schien die Aktivierung der VIC abhängig zu sein, von einer vermehrten oder fortgeführten Zugabe der Wachstumsfaktoren zu dem Stimulationsmedium, da sich bereits geringe Mengen der Wachstumsfaktoren seit der Herstellung der mECM in den Kulturen befanden. Eine Wirkung durch die Wachstumsfaktoren zeigte sich jedoch erst durch die Hinzugabe der Wachstumsfaktoren+ OPN in das Medium an den Tagen d1, d4, d7, d9, d11, d13.

Weiterhin bestand eine Notwendigkeit der Untersuchung des bisher verwendeten OPN für die weiterführenden Versuche. Das Ziel war es in dem folgenden Abschnitt die Wirkung von nachgewiesenen phosphoryliertem und dephosphoryliertem OPN (pOPN und dOPN) auf VIC und VIC im mECM-Modell zu untersuchen.

6.3 Wirkung von pOPN und dOPN auf VIC und mECM

Im dritten Abschnitt der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst die Untersuchung des verwendeten OPN hinsichtlich seiner Phosphorylierung. Bei dem verwendeten OPN handelte es sich um kommerziell erworbenes OPN aus boviner Milch.

In der Literatur wird dieses OPN als nahezu vollständig phosphoryliert beschrieben⁹⁷. Im vorausgegangenen Abschnitt der Diskussion wurde bereits erwähnt das Versuchsergebnissen anderer Gruppen zu entnehmen ist, dass nicht nur die Anzahl der belegten *phosphorylation sites* für die dekalzifizierende Wirkung des OPN entscheidend ist. Es konnte gezeigt werden, dass kleine Modifikationen des Phosphorylierungsstatus des OPN zu einer veränderten Bindungsaffinität des

OPN an Hydroxyapatit führen^{98,99}. Als Beispiel zeigte sich OPN mit dem Ursprung aus Knochen, welches als nur partiell phosphoryliert beschrieben wird, dem fast vollständig phosphorylierten OPN aus Milch in seiner Bindung an Hydroxyapatit und somit in seiner dekalzifizierenden Wirkung überlegen. Genauer zeigten Gericke et al. eine Inhibition der Kalzifizierung durch partiell phosphoryliertes OPN aus Knochengewebe und eine Förderung der Kalzifizierung durch das fast vollständig phosphorylierte OPN aus boviner Milch in vitro⁸⁹.

Diese Beobachtung deckt sich insofern mit den Ergebnissen dieser Arbeit, als das keine Inhibition der Kalzifizierung durch die Hinzugabe des nicht modifizierten OPN aus boviner Milch erzielt werden konnte und dieses OPN gemäß dem Datasheet als phosphoryliert beschrieben wird. Die belegten *phosphorylation sites* werden in dem Datasheet jedoch nicht genauer deklariert.

Den Beobachtungen folgend, dass nicht die Anzahl der belegten *phosphorylation sites* entscheidend für die Inhibition der Kalzifizierung durch das OPN ist, untersuchte die vorliegende Arbeit die Phosphorylierung des OPN an der Aminosäure Tyrosin. Ein zusätzlicher Grund war, dass die Phosphorylierung am Tyrosin hinsichtlich ihres Effekts auf die Wirkung des OPN bislang noch kaum untersucht wurde.

Für die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus mittels Westernblot wurde in den zuvor beschriebenen Versuchen ein *Phospho-Tyrosine Mouse mAb* verwendet. Eine Phosphorylierung am Tyrosin für das OPN aus boviner Milch konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 16).

Daher erfolgten die Phosphorylierung und Dephosphorylierung des bis zu diesem Zeitpunkt für die Versuche verwendeten OPN in vitro mit Casein Kinase und alkaliner Phosphatase. Nach erfolgter Modifikation ließ sich für das phosphorylierte OPN (pOPN) eine Phosphorylierung am Tyrosin mittels Westernblot nachweisen. Für das modifizierte dephosphorylierte OPN (dOPN) zeigte sich kein positiver Nachweis für *Phospho-Tyrosin* im Westernblot (Abbildung 16).

Im nächsten Abschnitt erfolgte die Untersuchung der Wirkung des pOPN und dOPN auf die Kalzifizierungsprozesse in zweidimensionalen VIC-Kulturen.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Kalziumkonzentration durch die Hinzugabe von pOPN in das Stimulationsmedium über eine Kultivierungsdauer

von 15 Tagen. Die Kalziumkonzentration in den VIC-Kulturen lag bei Hinzugabe von 500ng/ml pOPN zum CaCl₂-Medium bei 1,51±0,18mg/dl. Ohne Hinzugabe von OPN zum CaCl₂-Medium lag die Kalziumkonzentration bei 2,43±0,77 mg/dl.

Zusammenfassend zeigte sich somit ein dekalzifizierender Effekt durch Hinzugabe von pOPN zu zweidimensionalen VIC-Kulturen in vitro.

Der aus vorausgegangenen in vitro Versuchen anderer Forschungsgruppen propagierte dekalzifizierende Effekt des OPN wurde in dieser Arbeit bereits mehrfach aufgegriffen und kann durch den zuvor beschriebenen Effekt des pOPN auf die VIC im Rahmen der Versuche dieser Arbeit gestützt werden. Ergänzend hierzu präsentierten Poggio et al. Daten, welche die dekalzifizierende Wirkung des OPN erklären sollen. Sie konnten zeigen, dass die Bindung von OPN an den CD44 Rezeptor zu einer Akt Phosphorylierung führt. Diese Reaktion schütze humane VIC aus sklerotischen Herzklappen vor Kalziumablagerungen und somit vor einer fortschreitenden Kalzifizierung und Stenose⁷¹.

Ebenfalls die potenzielle, dekalzifizierende Wirkung des OPN untermauern Studien, welche an Mäusen mit OPN-Mangel durchgeführt wurden. Der OPN-Mangel wurde durch gezielte Genmodifikation bei Mäusen erreicht. Hierbei zeigten die Mäuse mit OPN-Mangel eine größere Kalzifizierungsneigung nach Aortenklappenersatz als Wildtypmäuse. Zusätzlich werden im Rahmen dieser Versuche verschiedene Wirkungsmechanismen des OPN diskutiert. Beispielsweise wird eine OPN-assoziierte aktive Auflösung der ektopen Kalziumablagerungen durch Ansäuerungsprozesse diskutiert, da Mäuse mit OPN-Mangel ihre Fähigkeit zur Ansäuerung der ECM bzw. der Umgebung des Aortenklappenersatzes verloren. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass OPN an der Regulation des pH-Werts in der Umgebung der Aortenklappen bzw. des Aortenklappenersatzes beteiligt sein könnte. Eine Reduktion des pH-Werts auf unter 7 führt zu einer Instabilität der Hydroxyapatitbindungen bei Körpertemperatur und könnte hierüber zu einer aktiven Auflösung der Kalziumablagerungen durch den Einfluss des OPN führen^{10,94}.

Nachdem in den Versuchen dieser Arbeit die erfolgreiche Inhibition der Kalzifizierungsprozesse durch das pOPN in den zweidimensionalen VIC-Versuchen gelungen war, erfolgten Versuche mit dem pOPN und dOPN in dem mECM-Modell. In dem dreidimensionalen mECM-Modell konnte keine Veränderung der Kalziumkonzentration durch die Hinzugabe von pOPN und dOPN erreicht werden (Abbildung 21). Diese Arbeit konnte somit keine Inhibition der Kalzifizierungsprozesse in dem mECM-Modell durch pOPN nachweisen. Ein Grund der unterschiedlichen Wirkungsweise des pOPN in den zwei unterschiedlichen Versuchsmodellen könnte die unzureichende Aktivierung der qVIC zu aVIC sein. Wie bereits im Vorfeld beschrieben führte die Kultivierung in dem mECM-Modell zu dem Verbleib der VIC in ihrer ruhenden Form (qVIC)¹⁰⁰. Eine vermehrte Expression von α -SMA als Zeichen einer VIC-Aktivierung konnte in dem vorliegenden, dreidimensionalen Modell nur durch die Kostimulation der mECM mit OPN+ TGF β und OPN+ VEGF herbeigeführt werden (Abbildung 14). Dies stellt einen entscheidenden Unterschied zu den zweidimensionalen VIC Versuchen dar, da in dem zweidimensionalen Modell die VIC bereits durch die Kultivierungsoberfläche aktiviert wurden¹⁰¹. Dem mit pOPN und dOPN stimulierten mECM-Modell, wurde kein zusätzliches TGF β und VEGF hinzugegeben, wobei vor allem TGF β die α -SMA Expression von VIC fördern sollte^{102,103}. Anlehnend an die Ergebnisse dieser Arbeit (Abbildungen 13 und 14) ist somit für dieses Modell, durch die fehlende additive Hinzugabe von TGF β , nur von einer mäßigen Aktivierung der VIC auszugehen.

Die Aktivierung der VIC in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp scheint jedoch in einem wesentlichen Zusammenhang mit den Kalzifizierungsprozessen in Aortenklappen zu stehen. Darüber hinaus ist die Aktivierung auch ein wesentlicher Schritt in den natürlichen Reparationsvorgängen der ECM in Aortenklappen⁸². Dies stützt die Vermutung, dass eine verminderte VIC-Aktivierung zu einer Verminderung von aktiven Kalzifizierungsvorgängen im mECM-Modell führte, welches die fehlende Wirkung des pOPN auf die mECM erklären könnte. Beispielsweise erfolgt die Differenzierung der qVIC zu oVIC über den Zwischenschritt der aVIC, welcher durch eine vermehrte α -SMA Expression gekennzeichnet ist^{50,104}. Diese vermehrte α -SMA Expression konnte für das mECM-Modell,

welches für die Versuche in den Abbildungen 19-21 verwendet wurde, nicht gezeigt werden. Daraus schlussfolgernd kam es mutmaßlich zu einem verringerten Vorkommen der oVIC in dem mECM-Modell und dadurch zu einer verminderten Kalziumablagerung. Dies könnte die fehlende Inhibition der Kalzifizierungsprozesse durch das pOPN im Vergleich zu dem zweidimensionalen Modell erklären.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielt OPN auch eine Rolle bei den inflammatorischen Prozessen, die an der Aortenklappendegeneration beteiligt sind. OPN soll über den $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor eine Migration von Makrophagen und Endothelzellen in das betroffene Gewebe bewirken⁹². Generell ist OPN als proinflammatorischer Faktor bekannt und scheint unterschiedliche Rollen in der Pathogenese der Atherosklerose und Aortenklappenstenose zu spielen. Als proinflammatorischem Faktor wurde OPN bislang eine fördernde Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zugesprochen. Wobei aktuell kontrovers diskutiert wird, ob OPN die spätere Kalzifikation in den Gefäßplaques fördert oder nicht doch hemmt¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. An diesem Beispiel erkennt man die Komplexität der Beteiligung von OPN an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen. Hieran anlehnend ist die Annahme, dass der Anstieg der OPN-Konzentration unterschiedliche Auswirkungen in Abhängigkeit dazu hat, ob es sich um ein akutes oder chronisches Krankheitsgeschehen handelt. Der Literatur zufolge wirke ein akuter OPN-Anstieg protektiv gegen eine vaskuläre Kalzifikation, wohingegen eine chronische OPN-Erhöhung im Gewebe bzw. im Serum für ein erhöhtes Risiko einer schweren kardiovaskulären Erkrankung spricht¹⁰⁷. Die Wirkung von OPN auf das kardiovaskuläre System und somit auch auf die Aortenklappendegeneration ist zusätzlich beeinflusst durch inflammatorische und zeitliche Prozesse. Mögliche Zusammenhänge zwischen inflammatorischen und kalzifizierenden Prozessen konnten in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da die vorliegenden Modelle lediglich die kalzifizierenden Prozesse abbildeten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass pOPN, mit einer Phosphorylierung am Tyrosin, einen dekalzifizierenden Effekt auf VIC in zweidimensionalen Zellkulturen hat.

Dieser Effekt konnte nicht auf das dreidimensionale mECM-Modell übertragen werden, welches an einer zu geringen Aktivierung der VIC in den mECM liegen könnte.

Als Lösungsvorschlag wäre hier die zusätzliche Hinzugabe von $TGF\beta$ zu dem Medium denkbar.

Abschließend ist zu sagen, dass OPN eine wichtige und komplexe Rolle in der Pathogenese der Aortenklappendegeneration zu spielen scheint. Es ist sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen in der Aortenklappe beteiligt. Interessant wäre somit die Untersuchung des Zusammenspiels von inflammatorischen und kalzifizierenden Prozessen in der Pathogenese der Aortenklappendegeneration. Ergänzend hierzu würde die Untersuchung der OPN-Wirkung im Rahmen von akuten und chronischen Ereignissen weitere Erkenntnisse zur Pathogenese der Aortenklappendegeneration liefern können.

7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei OPN um einen wesentlichen Regulator der ektopen Kalzifizierung in Aortenklappen handelt.

Als Grundlage für die Untersuchung der OPN-Wirkung auf die osteogene Transformation von VIC gelang es eine Kalzifizierung in einem dreidimensionalen Modell zu etablieren. In diesem mECM-Modell konnten VIC realitätsnah kultiviert werden, da eine Aktivierung der VIC zu aVIC durch die Kultivierungsfläche ausblieb. Die VIC verblieben somit in ihrer ruhenden Form (qVIC), welches den wesentlichen Unterschied zu der zweidimensionalen VIC-Kultivierung darstellt.

Durch die kritische Betrachtung des mECM-Modells im Verlauf dieser Arbeit konnten Schwächen des Modells in Hinblick auf die schon vorhandenen Wachstumsfaktoren im Matrigel sowie den hohen Kollagengehalt im Modell detektiert werden.

So könnte der hohe Kollagengehalt beispielsweise einer Kalzifizierung entgegenwirken. Zusätzlich ist das Modell nicht geeignet für die Untersuchung von einzelnen Wachstumsfaktoren, da bereits zahlreiche Wachstumsfaktoren in der Grundsubstanz, dem Matrigel, vorhanden sind.

Durch den ersten Teil dieser Arbeit gelang es also bereits Fehlerquellen des mECM-Modells herauszuarbeiten und Verbesserungsmöglichkeiten für zukünftige Modelle zu detektieren.

Mit dieser Grundlage konnte in den folgenden Versuchen die Wirkung von nicht modifiziertem OPN auf VIC untersucht werden. Eine VIC-Aktivierung, welche durch eine vermehrte α -SMA Expression detektiert wurde, konnte durch eine Kostimulation der VIC im mECM-Modell mit TGF β + OPN und VEGF+OPN im Medium herbeigeführt werden.

Weiterhin fiel auf, dass die VIC-Aktivierung im dreidimensionalen mECM-Modell abhängig war von der fortgeleiteten Stimulation der mECM mit den oben genannten Faktoren. Eine solitäre Hinzugabe von TGF β , VEGF und OPN am Kultivierungstag d0 der Kulturen zeigte keine vermehrte Aktivierung der VIC bzw. keine vermehrte α -SMA Expression.

Die Aktivierung der qVIC zu aVIC wird als Teil der prokalzifizierenden Kaskade angesehen und somit zeigt dieser Versuch einen prokalzifizierenden Effekt durch OPN.

Dies leitet zu dem dritten Teil der Forschungsergebnisse über, welcher die Veränderung der OPN-Wirkung in Abhängigkeit zu dem Phosphorylierungszustand des OPN nachwies.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen eine Phosphorylierung und Dephosphorylierung des OPN zu etablieren und die Phosphorylierung und Dephosphorylierung mittels Westernblot am Tyrosin nachzuweisen.

Nachfolgend konnte im Rahmen von VIC-Kultivierungsversuchen im zweidimensionalen Modell ein dekalzifizierender Effekt durch die Hinzugabe von pOPN zu den Kulturen nachgewiesen werden. Die Versuche standen somit im Einklang mit dem aus der Literatur bekannten dekalzifizierenden Effekt durch phosphoryliertes OPN (pOPN) im Rahmen von Versuchen mit VIC und SMC. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die Wirkung des pOPN auf die VIC im mECM-Modell ausbleibend.

Ursache für den ausbleibenden Effekt könnte die unzureichende Kalzifizierung des mECM-Modells durch die verminderte Aktivierung der qVIC zu a VIC durch die Kultivierungsmethode sein.

Abschließend ist festzustellen, dass die dargelegten Versuchsergebnisse nur einen Ausschnitt der komplexen Pathogenese der Aortenklappendegeneration skizzieren. Der Krankheitsverlauf ist ein aktiver Prozess mit verschiedenen Etappen, die zu einem großen Teil noch nicht offengelegt wurden. Außergewöhnlich ist jedoch die Rolle des OPN, da es sowohl als Regulator in der inflammatorischen Phase der Aortenklappendegeneration eine Rolle zu spielen scheint, als auch durch zahlreiche Wirkmechanismen auf die Kalzifizierungsprozesse Einfluss nimmt.

8 Literatur-und Quellenverzeichnis

- 1 Nkomo, V. T. *et al.* Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* **368**, 1005-1011, doi:10.1016/s0140-6736(06)69208-8 (2006).
- 2 Osnabrugge, R. L. *et al.* Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol* **62**, 1002-1012, doi:10.1016/j.jacc.2013.05.015 (2013).
- 3 Nightingale, A. K. & Horowitz, J. D. Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk. *Heart* **91**, 1389-1393, doi:10.1136/hrt.2004.057117 (2005).
- 4 Danielsen, R., Aspelund, T., Harris, T. B. & Gudnason, V. The prevalence of aortic stenosis in the elderly in Iceland and predictions for the coming decades: the AGES-Reykjavík study. *Int J Cardiol* **176**, 916-922, doi:10.1016/j.ijcard.2014.08.053 (2014).
- 5 Lindroos, M., Kupari, M., Heikkilä, J. & Tilvis, R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol* **21**, 1220-1225, doi:10.1016/0735-1097(93)90249-z (1993).
- 6 Otto, C. M. & Prendergast, B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med* **371**, 744-756, doi:10.1056/NEJMr1313875 (2014).
- 7 Lindman, B. R. *et al.* Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16006, doi:10.1038/nrdp.2016.6 (2016).
- 8 Yutzey, K. E. *et al.* Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 2387-2393, doi:10.1161/atvbaha.114.302523 (2014).
- 9 Otto, C. M. *et al.* 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint

- Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* **143**, e35-e71, doi:10.1161/cir.0000000000000932 (2021).
- 10 Steitz, S. A. *et al.* Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* **161**, 2035-2046, doi:10.1016/s0002-9440(10)64482-3 (2002).
- 11 Rajamannan, N. M. *et al.* Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* **124**, 1783-1791, doi:10.1161/circulationaha.110.006767 (2011).
- 12 Fisher, C. I., Chen, J. & Merryman, W. D. Calcific nodule morphogenesis by heart valve interstitial cells is strain dependent. *Biomech Model Mechanobiol* **12**, 5-17, doi:10.1007/s10237-012-0377-8 (2013).
- 13 Yetkin, E. & Waltenberger, J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol* **135**, 4-13, doi:10.1016/j.ijcard.2009.03.108 (2009).
- 14 Stewart, B. F. *et al.* Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* **29**, 630-634, doi:10.1016/s0735-1097(96)00563-3 (1997).
- 15 Goody, P. R. *et al.* Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 885-900, doi:10.1161/atvbaha.119.313067 (2020).
- 16 Vahanian, A. *et al.* 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European Heart Journal*, doi:10.1093/eurheartj/ehab395 (2021).
- 17 Alushi, B. *et al.* Calcific Aortic Valve Disease-Natural History and Future Therapeutic Strategies. *Front Pharmacol* **11**, 685, doi:10.3389/fphar.2020.00685 (2020).
- 18 LeMaire, S. A. *et al.* Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections

- spanning FBN1 at 15q21.1. *Nat Genet* **43**, 996-1000, doi:10.1038/ng.934 (2011).
- 19 Yassine, N. M., Shahram, J. T. & Body, S. C. Pathogenic Mechanisms of Bicuspid Aortic Valve Aortopathy. *Front Physiol* **8**, 687, doi:10.3389/fphys.2017.00687 (2017).
- 20 Wirrig, E. E. & Yutzey, K. E. Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 737-741, doi:10.1161/atvbaha.113.302071 (2014).
- 21 Kerstjens-Frederikse, W. S. *et al.* Cardiovascular malformations caused by NOTCH1 mutations do not keep left: data on 428 probands with left-sided CHD and their families. *Genet Med* **18**, 914-923, doi:10.1038/gim.2015.193 (2016).
- 22 Liu, T. *et al.* Bicuspid Aortic Valve: An Update in Morphology, Genetics, Biomarker, Complications, Imaging Diagnosis and Treatment. *Front Physiol* **9**, 1921, doi:10.3389/fphys.2018.01921 (2018).
- 23 Dweck, M. R., Boon, N. A. & Newby, D. E. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* **60**, 1854-1863, doi:10.1016/j.jacc.2012.02.093 (2012).
- 24 Chen, W. L. & Simmons, C. A. Lessons from (patho)physiological tissue stiffness and their implications for drug screening, drug delivery and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* **63**, 269-276, doi:10.1016/j.addr.2011.01.004 (2011).
- 25 Di Vito, A. *et al.* Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22020913 (2021).
- 26 Perrot, N. *et al.* Genetic Variation in LPA, Calcific Aortic Valve Stenosis in Patients Undergoing Cardiac Surgery, and Familial Risk of Aortic Valve Microcalcification. *JAMA Cardiol* **4**, 620-627, doi:10.1001/jamacardio.2019.1581 (2019).

- 27 Freeman, R. V. & Otto, C. M. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* **111**, 3316-3326, doi:10.1161/circulationaha.104.486738 (2005).
- 28 Sun, J. T. *et al.* Oxidized HDL, as a Novel Biomarker for Calcific Aortic Valve Disease, Promotes the Calcification of Aortic Valve Interstitial Cells. *J Cardiovasc Transl Res* **12**, 560-568, doi:10.1007/s12265-019-09903-3 (2019).
- 29 Hofmanis, J. *et al.* HDL-C Role in Acquired Aortic Valve Stenosis Patients and Its Relationship with Oxidative Stress. *Medicina (Kaunas)* **55**, doi:10.3390/medicina55080416 (2019).
- 30 Pedriali, G. *et al.* Aortic Valve Stenosis and Mitochondrial Dysfunctions: Clinical and Molecular Perspectives. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21144899 (2020).
- 31 Pawade, T. A., Newby, D. E. & Dweck, M. R. Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J Am Coll Cardiol* **66**, 561-577, doi:10.1016/j.jacc.2015.05.066 (2015).
- 32 Donato, G. *et al.* The role of mast cell tryptases in cardiac myxoma: Histogenesis and development of a challenging tumor. *Oncol Lett* **8**, 379-383, doi:10.3892/ol.2014.2104 (2014).
- 33 Nsaibia, M. J. *et al.* OxLDL-derived lysophosphatidic acid promotes the progression of aortic valve stenosis through a LPAR1-RhoA-NF- κ B pathway. *Cardiovasc Res* **113**, 1351-1363, doi:10.1093/cvr/cvx089 (2017).
- 34 Gomez-Stallons, M. V. *et al.* Calcification and extracellular matrix dysregulation in human postmortem and surgical aortic valves. *Heart* **105**, 1616-1621, doi:10.1136/heartjnl-2019-314879 (2019).
- 35 Miller, J. D., Weiss, R. M. & Heistad, D. D. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res* **108**, 1392-1412, doi:10.1161/circresaha.110.234138 (2011).

- 36 Dutta, P. & Lincoln, J. Calcific Aortic Valve Disease: a Developmental Biology Perspective. *Curr Cardiol Rep* **20**, 21, doi:10.1007/s11886-018-0968-9 (2018).
- 37 Butcher, J. T., Simmons, C. A. & Warnock, J. N. Mechanobiology of the aortic heart valve. *J Heart Valve Dis* **17**, 62-73 (2008).
- 38 García-Rodríguez, C. *et al.* Toll-Like Receptors, Inflammation, and Calcific Aortic Valve Disease. *Front Physiol* **9**, 201, doi:10.3389/fphys.2018.00201 (2018).
- 39 Ma, X. *et al.* Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Calcific Aortic Valve Disease. *Acta Cardiol Sin* **36**, 183-194, doi:10.6515/acs.202005_36(3).20200213a (2020).
- 40 Aikawa, E. *et al.* Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation* **113**, 1344-1352, doi:10.1161/circulationaha.105.591768 (2006).
- 41 Nagy, E. *et al.* Valvular osteoclasts in calcification and aortic valve stenosis severity. *Int J Cardiol* **168**, 2264-2271, doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.207 (2013).
- 42 Venardos, N. *et al.* Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation. *J Surg Res* **190**, 1-8, doi:10.1016/j.jss.2014.03.051 (2014).
- 43 Wu, B. *et al.* Developmental Mechanisms of Aortic Valve Malformation and Disease. *Annu Rev Physiol* **79**, 21-41, doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034001 (2017).
- 44 Rattazzi, M. & Pauletto, P. Valvular endothelial cells: guardians or destroyers of aortic valve integrity? *Atherosclerosis* **242**, 396-398, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.034 (2015).
- 45 Xu, K. *et al.* Cell-Type Transcriptome Atlas of Human Aortic Valves Reveal Cell Heterogeneity and Endothelial to Mesenchymal Transition Involved in Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 2910-2921, doi:10.1161/atvbaha.120.314789 (2020).

- 46 Akat, K., Borggrefe, M. & Kaden, J. J. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart* **95**, 616-623, doi:10.1136/hrt.2007.134783 (2009).
- 47 Latif, N., Sarathchandra, P., Taylor, P. M., Antoniow, J. & Yacoub, M. H. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J Heart Valve Dis* **14**, 218-227 (2005).
- 48 Schoen, F. J. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation* **118**, 1864-1880, doi:10.1161/circulationaha.108.805911 (2008).
- 49 Pérez, L. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. *Cytokine Growth Factor Rev* **33**, 41-54, doi:10.1016/j.cytogfr.2016.09.002 (2017).
- 50 Walker, G. A., Masters, K. S., Shah, D. N., Anseth, K. S. & Leinwand, L. A. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* **95**, 253-260, doi:10.1161/01.RES.0000136520.07995.aa (2004).
- 51 Hakuno, D., Kimura, N., Yoshioka, M. & Fukuda, K. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease. *J Mol Med (Berl)* **87**, 17-24, doi:10.1007/s00109-008-0400-9 (2009).
- 52 Clark-Greuel, J. N. *et al.* Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. *Ann Thorac Surg* **83**, 946-953, doi:10.1016/j.athoracsur.2006.10.026 (2007).
- 53 Ylä-Herttuala, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I. & Hartikainen, J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1015-1026, doi:10.1016/j.jacc.2006.09.053 (2007).

- 54 Poggio, P. *et al.* Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls. *J Cell Physiol* **226**, 2139-2149, doi:10.1002/jcp.22549 (2011).
- 55 Waller, A. H., Sanchez-Ross, M., Kaluski, E. & Klapholz, M. Osteopontin in cardiovascular disease: a potential therapeutic target. *Cardiol Rev* **18**, 125-131, doi:10.1097/CRD.0b013e3181cfb646 (2010).
- 56 Gwanmesia, P. *et al.* Opposite effects of transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor on the degeneration of aortic valvular interstitial cell are modified by the extracellular matrix protein fibronectin: implications for heart valve engineering. *Tissue Eng Part A* **16**, 3737-3746, doi:10.1089/ten.TEA.2010.0304 (2010).
- 57 Mazzali, M. *et al.* Osteopontin--a molecule for all seasons. *Qjm* **95**, 3-13, doi:10.1093/qjmed/95.1.3 (2002).
- 58 Icer, M. A. & Gezmen-Karadag, M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem* **59**, 17-24, doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003 (2018).
- 59 Okamoto, H. Osteopontin and cardiovascular system. *Mol Cell Biochem* **300**, 1-7, doi:10.1007/s11010-006-9368-3 (2007).
- 60 Yu, P. J. *et al.* Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* **138**, 196-199, doi:10.1016/j.jtcvs.2008.10.045 (2009).
- 61 Kong, P., Christia, P. & Frangogiannis, N. G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* **71**, 549-574, doi:10.1007/s00018-013-1349-6 (2014).
- 62 Mohler, E. R., 3rd, Adam, L. P., McClelland, P., Graham, L. & Hathaway, D. R. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 547-552, doi:10.1161/01.atv.17.3.547 (1997).

- 63 Lenga, Y. *et al.* Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res* **102**, 319-327, doi:10.1161/circresaha.107.160408 (2008).
- 64 Senger, D. R., Wirth, D. F. & Hynes, R. O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* **16**, 885-893, doi:10.1016/0092-8674(79)90103-x (1979).
- 65 Pohjolainen, V. *et al.* Noncollagenous bone matrix proteins as a part of calcific aortic valve disease regulation. *Hum Pathol* **39**, 1695-1701, doi:10.1016/j.humpath.2008.04.015 (2008).
- 66 Sodek, J., Ganss, B. & McKee, M. D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**, 279-303, doi:10.1177/10454411000110030101 (2000).
- 67 Mohamed, I. A. & Mraiche, F. Targeting osteopontin, the silent partner of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 in cardiac remodeling. *J Cell Physiol* **230**, 2006-2018, doi:10.1002/jcp.24958 (2015).
- 68 Bellahcène, A., Castronovo, V., Ogbureke, K. U., Fisher, L. W. & Fedarko, N. S. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 212-226, doi:10.1038/nrc2345 (2008).
- 69 Addison, W. N., Nakano, Y., Loisel, T., Crine, P. & McKee, M. D. MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* **23**, 1638-1649, doi:10.1359/jbmr.080601 (2008).
- 70 Narisawa, S., Yadav, M. C. & Millán, J. L. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. *J Bone Miner Res* **28**, 1587-1598, doi:10.1002/jbmr.1901 (2013).
- 71 Poggio, P. *et al.* Osteopontin-CD44v6 interaction mediates calcium deposition via phospho-Akt in valve interstitial cells from patients with noncalcified aortic valve sclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 2086-2094, doi:10.1161/atvbaha.113.303017 (2014).

- 72 Ciancaglini, P. *et al.* Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. *J Bone Miner Res* **25**, 716-723, doi:10.1359/jbmr.091023 (2010).
- 73 Yadav, M. C. *et al.* Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification. *J Bone Miner Res* **26**, 286-297, doi:10.1002/jbmr.195 (2011).
- 74 Chen, J. H. & Simmons, C. A. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ Res* **108**, 1510-1524, doi:10.1161/circresaha.110.234237 (2011).
- 75 Yip, C. Y., Chen, J. H., Zhao, R. & Simmons, C. A. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 936-942, doi:10.1161/atvbaha.108.182394 (2009).
- 76 Erickson, A. C. & Couchman, J. R. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* **48**, 1291-1306, doi:10.1177/002215540004801001 (2000).
- 77 Orkin, R. W. *et al.* A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* **145**, 204-220, doi:10.1084/jem.145.1.204 (1977).
- 78 Hughes, C. S., Postovit, L. M. & Lajoie, G. A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **10**, 1886-1890, doi:10.1002/pmic.200900758 (2010).
- 79 Eschenhagen, T. *et al.* Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb j* **11**, 683-694, doi:10.1096/fasebj.11.8.9240969 (1997).
- 80 Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A. R. & Harford, J. A. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem* **593**, 113608, doi:10.1016/j.ab.2020.113608 (2020).

- 81 Hof, A. *et al.* Challenges in developing a reseeded, tissue-engineered aortic valve prosthesis. *Eur J Cardiothorac Surg* **50**, 446-455, doi:10.1093/ejcts/ezw057 (2016).
- 82 Rodriguez, K. J. & Masters, K. S. Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix. *J Biomed Mater Res A* **90**, 1043-1053, doi:10.1002/jbm.a.32187 (2009).
- 83 Merryman, W. D. *et al.* Synergistic effects of cyclic tension and transforming growth factor-beta1 on the aortic valve myofibroblast. *Cardiovasc Pathol* **16**, 268-276, doi:10.1016/j.carpath.2007.03.006 (2007).
- 84 Jung, J. J. *et al.* Multimodality and molecular imaging of matrix metalloproteinase activation in calcific aortic valve disease. *J Nucl Med* **56**, 933-938, doi:10.2967/jnumed.114.152355 (2015).
- 85 Qayyum, A. A., Joshi, F. R., Lund, L. D., Søndergaard, R. H. & Kastrup, J. [Vascular endothelial growth factor therapy in ischaemic heart disease]. *Ugeskr Laeger* **182** (2020).
- 86 Senger, D. R. *et al.* Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13612-13617, doi:10.1073/pnas.94.25.13612 (1997).
- 87 Dharmarajan, S. *et al.* Role of Runx2 in Calcific Aortic Valve Disease in Mouse Models. *Front Cardiovasc Med* **8**, 687210, doi:10.3389/fcvm.2021.687210 (2021).
- 88 Addison, W. N., Masica, D. L., Gray, J. J. & McKee, M. D. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J Bone Miner Res* **25**, 695-705, doi:10.1359/jbmr.090832 (2010).
- 89 Gericke, A. *et al.* Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* **77**, 45-54, doi:10.1007/s00223-004-1288-1 (2005).

- 90 Sainger, R. *et al.* Dephosphorylation of circulating human osteopontin correlates with severe valvular calcification in patients with calcific aortic valve disease. *Biomarkers* **17**, 111-118, doi:10.3109/1354750x.2011.642407 (2012).
- 91 Hynes, R. O., Bader, B. L. & Hodivala-Dilke, K. Integrins in vascular development. *Braz J Med Biol Res* **32**, 501-510, doi:10.1590/s0100-879x1999000500002 (1999).
- 92 Abdelaziz Mohamed, I., Gadeau, A. P., Hasan, A., Abdulrahman, N. & Mraiche, F. Osteopontin: A Promising Therapeutic Target in Cardiac Fibrosis. *Cells* **8**, doi:10.3390/cells8121558 (2019).
- 93 Weber, G. F. *et al.* Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol* **72**, 752-761 (2002).
- 94 Ohri, R., Tung, E., Rajachar, R. & Giachelli, C. M. Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin. *Calcif Tissue Int* **76**, 307-315, doi:10.1007/s00223-004-0071-7 (2005).
- 95 Lee, G. S. *et al.* Osteopontin isoforms differentially promote arteriogenesis in response to ischemia via macrophage accumulation and survival. *Lab Invest* **99**, 331-345, doi:10.1038/s41374-018-0094-8 (2019).
- 96 Gimba, E. R. & Tilli, T. M. Human osteopontin splicing isoforms: known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer Lett* **331**, 11-17, doi:10.1016/j.canlet.2012.12.003 (2013).
- 97 Sørensen, E. S., Højrup, P. & Petersen, T. E. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci* **4**, 2040-2049, doi:10.1002/pro.5560041009 (1995).
- 98 Goldberg, H. A., Warner, K. J., Li, M. C. & Hunter, G. K. Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect Tissue Res* **42**, 25-37, doi:10.3109/03008200109014246 (2001).

- 99 Boskey, A. L. *et al.* Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* **22**, 147-159, doi:10.1016/s0169-6009(08)80225-5 (1993).
- 100 Hjortnaes, J. *et al.* Simulation of early calcific aortic valve disease in a 3D platform: A role for myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol* **94**, 13-20, doi:10.1016/j.yjmcc.2016.03.004 (2016).
- 101 Williams, C., Johnson, S. L., Robinson, P. S. & Tranquillo, R. T. Cell sourcing and culture conditions for fibrin-based valve constructs. *Tissue Eng* **12**, 1489-1502, doi:10.1089/ten.2006.12.1489 (2006).
- 102 Quinlan, A. M. & Billiar, K. L. Investigating the role of substrate stiffness in the persistence of valvular interstitial cell activation. *J Biomed Mater Res A* **100**, 2474-2482, doi:10.1002/jbm.a.34162 (2012).
- 103 Bogdanova, M. *et al.* Models and Techniques to Study Aortic Valve Calcification in Vitro, ex Vivo and in Vivo. An Overview. *Front Pharmacol* **13**, 835825, doi:10.3389/fphar.2022.835825 (2022).
- 104 Hutcheson, J. D. *et al.* Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 114-120, doi:10.1161/atvbaha.112.300278 (2013).
- 105 Leali, D. *et al.* Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J Immunol* **171**, 1085-1093, doi:10.4049/jimmunol.171.2.1085 (2003).
- 106 Kim, K. & Choi, J. H. Response by Kim and Choi to Letter Regarding Article, "Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models". *Circ Res* **123**, e50, doi:10.1161/circresaha.118.314163 (2018).
- 107 Williams, J. W. *et al.* Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression. *Nat Immunol* **21**, 1194-1204, doi:10.1038/s41590-020-0768-4 (2020).

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Arthur Lichtenberg für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die Unterstützung im Rahmen meiner Promotion bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari für die Betreuung im Rahmen meiner Doktorarbeit. Durch sein Engagement und seine Motivation prägte er einen wesentlichen Teil meines Studiums, auf den ich weiterhin gerne zurückblicke. Und auch heute noch erfolgt seine Unterstützung über Raum und Zeit hinaus, wofür ich ihm zutiefst dankbar bin.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Mareike Barth und Frau Dr. Jessica Selig bedanken. Ich bedanke mich bei den beiden für eine geduldige Einarbeitung und großartigen Einsatz in Form von wissenschaftlichen Gesprächen und Ideen zur Realisierung der Doktorarbeit.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. Alexander Hof für die freundschaftliche Zusammenarbeit und grenzenlose Unterstützung im Labor bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den anderen ärztlichen und wissenschaftlichen Postdocs sowie anderen Doktoranden des Institutes für eine hervorragende Zusammenarbeit und eine schöne Zeit.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meinem Partner Dr. Stephan Klarner. Ohne die grenzenlose Unterstützung meiner Eltern wäre ich niemals an diesen Punkt meiner Ausbildung gelangt. Danke, dass ihr niemals aufhört an mich zu glauben.

Zum Abschluss danke ich Stephan für sein herausragendes Motivationstalent, das zeitintensive Korrekturlesen und den immensen Rückhalt, durch den er mir unentwegt hilft, meine Ziele zu erreichen.