

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

**Die Degeneration primärer humaner
valvulärer Interstitialzellen unter dem Einfluss
aktivierter endothelialer *small extracellular
vesicles***

Dissertation

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

vorgelegt von
Katharina Daus
2023

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

gez.:

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ. Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Univ. Prof. Dr. med. Timm Filler

Meinen Eltern gewidmet.

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Dabei ist in Industrienationen die Aortenklappenstenose (AKS) die häufigste Herzklappenerkrankung der älteren Bevölkerung. Der AKS liegt neben kardiovaskulären Risikofaktoren ein progredienter Pathomechanismus, die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD), zugrunde. Auslösende endotheliale Dysfunktion und Inflammation sowie pathologische Differenzierung beteiligter valvulärer Endothel- (VEC) und Interstitialzellen (VIC) resultiert in Fibrose und Kalzifizierung der Aortenklappe (AK). Ist die Öffnungsfläche der AK einmal kalzifizierend eingeschränkt und für die entsprechenden Patienten symptomatisch, bleibt trotz intensiver Forschungsanstrengungen derzeit nur der operative Aortenklappenersatz. Daher gilt es den Pathomechanismus der CAVD weiter aufzuklären und effektive, anderweitige Therapieoptionen voranzutreiben.

(Small) Extrazelluläre Vesikel (SEV/EV), welche der physiologischen Zell-Zell-Kommunikation dienen, könnten sich diesbezüglich als vielversprechende Zielstruktur abzeichnen. EV können unter pathologischen Bedingungen an Initiierung und Aufrechterhaltung der CAVD beteiligt sein. Inwieweit endotheliale EV die pathologische Differenzierung der VIC vor dem Hintergrund der CAVD fördern können, ist jedoch derzeit ungeklärt.

Innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit wurden primäre VEC und VIC mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* aus humanen AK isoliert. Initial wurden VEC unter degenerativen bzw. inflammatorisch aktivierenden Bedingungen (*Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) bzw. *Tumor nekrosis factor alpha* (TNF- α)) kultiviert. Auf Proteinebene wurde eine *Endothelial to mesenchymal transition* untersuchter VEC anhand signifikant gesteigerter Expression gängiger Marker nachgewiesen (ICAM: Ktrl.: 1,0 vs. TNF- α : 54,0 \pm 16,93, p=0,0005 und VCAM: Ktrl.: 1,0 vs. TNF- α : 81,05 \pm 35,52, p=0,0001 und α -SMA: Ktrl.: 1,0 vs. TGF- β 1: 1,597 \pm 0,181). Im Anschluss erfolgte die Isolation von SEV aus den endothelialen Kulturüberständen mittels *ExoQuick - TC Precipitation Solution* sowie die Quantifizierung der SEV durch die Nanopartikel-Tracking-Analyse. Bei zunehmender, aktivierender Kultivierungsdauer der VEC zeigte sich nach 7 Tagen eine signifikant gesteigerte Freisetzung von SEV (Ktrl.: 1,00 vs. TNF- α : 1,297 \pm 0,097, p=0,0235). Die Degeneration der VIC durch β -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat, Calcium-Chlorid sowie den endothelial aktivierten SEV, wurde auf Proteinebene mittels *Western-blot-Analysen* und Alizarinrot-Färbung zum Nachweis von Kalziumkomplexen erfasst. Hierbei zeigte sich die Degeneration der VIC unbeeinflusst von SEV einer unbehandelten, endothelialen Kontrollkultur (Alizarinrot-Färbung: Ktrl.: 1,0 vs. DEG: 3,098 \pm 0,926 p=0,0064; Ktrl.: 1,0 vs. Ktrl.-SEV: 2,298 \pm 0,995; Ktrl.: 1,0 vs. Ktrl. konditioniertes Medium (KM): 1,071 \pm 0,107; α SMA/Vimentin-Proteinratio: Ktrl.: 1,0 vs. DEG: 1,134 \pm 0,236; Ktrl.: 1,0 vs. Ktrl.-SEV: 1,165 \pm 0,339; Ktrl.: 1,0 vs. Ktrl.-KM: 1,246 \pm 0,197). Unter Addition aktivierter, endothelialer SEV erwies sich die Degeneration der VIC teilweise jedoch als statistisch signifikant gesteigert (Alizarinrot-Färbung: DEG: 1,0 vs. DEG+TGF- β 1-SEV: 2,109 \pm 0,733; DEG: 1,0 vs. DEG+TNF α -SEV: 2,633 \pm 0,687, p=0,0252; α SMA/Vimentin- Proteinratio: DEG: 1,0 vs. DEG+ TGF- β 1-SEV: 1,336 \pm 0,251; DEG: 1,0 vs. DEG+ TNF α - SEV: 1,786 \pm 0,44). Unter pathologischer Inflammation fördern endotheliale SEV vor dem Hintergrund der CAVD also die *in-vitro* Degeneration von VIC. Dieser Effekt lässt sich nicht auf die bloße Anwesenheit der SEV zurückführen. Vielmehr scheint eine pathologisch induzierte Veränderung der SEV durch Schädigung der Ursprungszellen ursächlich zu sein. Weitere *in-vitro* Analysen, auch hinsichtlich der Zusammensetzung von SEV, könnten angeschlossen werden, um perspektivisch SEV in Diagnostik und Therapie der AKS zu etablieren.

Abstract

Cardiovascular diseases rank among the most prevalent causes of mortality worldwide. In industrialized countries, aortic valve stenosis (AVS) is the most common heart valve disease in the elderly population. In addition to cardiovascular risk factors, AVS is based on a progressive pathomechanism, namely calcific aortic valve disease (CAVD). Triggering endothelial dysfunction and inflammation as well as pathological differentiation of involved valvular endothelial (VEC) and interstitial cells (VIC) results in fibrosis and calcification of the aortic valve (AV). Once the orifice area of the AV is restricted by calcification and symptomatic for the respective patients, the only option currently available despite intensive research efforts is surgical aortic valve replacement. Therefore, it is important to further elucidate the pathomechanism of CAVD and to advance effective, alternative therapy options.

(Small) Extracellular vesicles (SEV/EV), which serve physiological cell-cell communication, could emerge as a promising target structure in this regard. EVs may be involved in the initiation and maintenance of CAVD under pathological conditions. However, the extent to which endothelial EVs can promote pathological differentiation of VIC against the background of CAVD is currently unclear.

In this doctoral thesis, primary VEC and VIC were isolated from human AV using Magnetic Activated Cell Sorting. Initially, VEC were cultured under degenerative or inflammatory activating conditions (transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) or tumour necrosis factor alpha (TNF- α), respectively). At the protein level, an endothelial to mesenchymal transition of investigated VEC was detected by significantly increased expression of common markers (ICAM: Ctrl.: 1,0 vs. TNF- α : 54,0 \pm 16,93, $p=0,0005$) and VCAM: Ctrl.: 1,0 vs. TNF- α : 81,05 \pm 35,52, $p=0,0001$ and α SMA: Ctrl.: 1,0 vs. TGF- β 1: 1,597 \pm 0,181). Subsequently, SEVs were isolated from the endothelial culture supernatants using ExoQuick - TC Precipitation Solution and quantified by nanoparticle-tracking-analysis. With increasing, activating cultivation time of the VEC, a significantly increased release of SEV was shown after 7 days (Ctrl.: 1,00 vs. TNF- α : 1,297 \pm 0,097, $p=0,0235$). Degeneration of VIC by β -glycerol phosphate disodium salt pentahydrate, calcium chloride as well as the endothelially activated SEV, was assessed at the protein level by Western-blot-analyses and alizarin-red-staining to detect calcium complexes. Here, the degeneration of VIC was shown to be unaffected by SEVs of an untreated, endothelial control culture (alizarin-red-staining: Ctrl.: 1,0 vs. DEG: 3,098 \pm 0,926 $p=0,0064$; Ctrl.: 1,0 vs. Ctrl.-SEV: 2,298 \pm 0,995; Ctrl.: 1,0 vs. Ctrl. conditioned medium (CM): 1,071 \pm 0,107; α SMA/Vimentin-proteinratio: Ctrl.: 1,0 vs. DEG: 1,134 \pm 0,236; Ctrl.: 1,0 vs. Ctrl.-SEV: 1,165 \pm 0,339; Ctrl.: 1,0 vs. Ctrl.-CM: 1,246 \pm 0,197). However, with the addition of activated endothelial SEVs, the degeneration of VIC proved to be statistically significantly increased (alizarin-red-staining: DEG: 1,0 vs. DEG+TGF- β 1-SEV: 2,109 \pm 0,733; DEG: 1,0 vs. DEG+TNF- α -SEV: 2,633 \pm 0,687, $p=0,0252$; α SMA/Vimentin-proteinratio: DEG: 1,0 vs. DEG+TGF- β 1-SEV: 1,336 \pm 0,251; DEG: 1,0 vs. DEG+ TNF α -SEV =1,786 \pm 0,44). Thus, under pathological inflammation, endothelial SEVs promote the in vitro degeneration of VIC against the background of CAVD. This effect cannot be attributed to the mere presence of the SEV. Rather, a pathologically induced change in the SEVs through damage to the cells of origin appears to be causative. Further in-vitro analyses, also with regard to the composition of SEVs, could be carried out in order to establish SEV in the diagnostics and therapy of AVS.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AK	Aortenklappe
AKS	Aortenklappenstenose
αSMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
AVS	engl.: <i>aortic valve stenosis</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
β-GP	beta-Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calcium-Chlorid
CAVD	engl.: <i>calcific aortic valve disease</i>
CD(31)	<i>Cluster of Differentiation (31)</i>
CM	engl.: <i>conditioned medium</i>
d	engl.: <i>days</i>
DEG	degenerative Bedingungen
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndMT	<i>Endothelial to mesenchymal transition</i>
EV	Extrazelluläre Vesikel
evtl.	eventuell
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
GAG	Glykosaminoglykan
h	<i>hours</i>
HSP	Hitzeschock-Protein
HTX	Herztransplantation
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>

ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
KM	konditioniertes Medium
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
LV	linker Ventrikel
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
miR	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MVB	multivesikulären <i>bodies</i>
NFkb	<i>nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analyse
o.g.	oben genannt
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SEV	<i>small extracellular vesicles</i>
sog.	sogenannt
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
TBST	Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween- 20
TGF-β1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TNAP	engl.: <i>Tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEC	engl.: <i>valvular endothelial cells</i>
VE-cadherin	<i>Vascular endothelial cadherin</i>

VIC engl.: *valvular interstitial cells*
V Volt
z.B. zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung.....	1
1.1.1	Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.2	Pathogenese.....	2
1.2	Extrazelluläre Vesikel.....	5
1.3	Extrazelluläre Vesikel in kardiovaskulären Erkrankungen.....	7
1.4	Ziele der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Zellisolationen.....	11
2.1.1	Ethikvotum.....	11
2.1.2	Isolation und Kultivierung primärer humaner VEC und VIC.....	11
2.1.3	Passagieren der primären humanen VEC und VIC.....	16
2.2	<i>In-vitro</i> Versuche mit primären humanen VEC und VIC.....	17
2.2.1	Zellzahlbestimmung.....	17
2.2.2	Aussaat und Behandlung.....	17
2.2.3	Durchlichtmikroskopie.....	21
2.2.4	Zellyse.....	21
2.3	Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA).....	22
2.3.1	Isolation von <i>small extracellular vesicles</i> (SEV).....	24
2.3.2	Bestimmung der SEV-Anzahl.....	26
2.4	Histologische Färbung.....	27
2.4.1	Alizarinrot-Färbung.....	27
2.4.2	Alizarinrot-Quantifizierung.....	27
2.5	Proteinbiochemie.....	28
2.5.1	Proteinbestimmung mittels <i>Bicinchoninic acid assay</i>	28
2.5.2	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese.....	28
2.5.3	Western-Blot-Analyse.....	30
2.5.4	Immundetektion.....	32
2.6	Statistische Auswertung.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	NTA der freigesetzten SEV primärer humaner VEC.....	34
3.2	Effektivität der SEV-Isolation mittels <i>ExoQuick-TC Precipitation Solution</i>	36
3.3	Degeneration und inflammatorische Aktivierung primärer humaner VEC.....	38
3.3.1	Morphologie der VEC.....	38
3.3.2	Western-Blot-Analysen der VEC.....	40
3.4	Degeneration primärer humaner VIC.....	43
3.4.1	Morphologie der VIC.....	43

3.4.2	Alizarinrot-Färbung der VIC.....	45
3.4.3	Western-Blot-Analysen der VIC.....	47
3.5	Untersuchung einer VEC-SEV vermittelten Degeneration primärer humaner VIC.....	49
3.5.1	Degeneration und inflammatorische Aktivierung von VEC.....	49
3.5.2	Einfluss von SEV einer VEC-Kontrollkultur auf die Degeneration von VIC	51
3.5.3	Einfluss von SEV einer degenerativen/aktivierten VEC-Kultur auf die Degeneration von VIC	53
3.5.4	Degeneration von VIC in einer endothelialen Ko-Kultur.....	55
4	Diskussion	57
4.1	Versuchsaufbau und Protokolletablierung	57
4.1.1	TGF- β 1 induziert EndMT der VEC im Progress der CAVD.....	57
4.1.2	TNF- α induziert inflammatorische Aktivierung der VEC	59
4.1.3	Osteogene Differenzierung primärer humaner VIC	60
4.1.4	<i>ExoQuick-TC Precipitation Solution</i> gesteuerte Isolation von EV	62
4.2	Inflammatorische Aktivierung und Degeneration der VEC beeinflusst die Freisetzung endothelialer SEV	65
4.3	SEV einer degenerativen/aktivierenden VEC-Kultur fördern die Degeneration von VIC.....	68
4.4	Aussagekraft und Limitationen.....	71
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	73
5	Literatur-und Quellenverzeichnis	74

Danksagung

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Aortenklappe auf Zellebene	4
Abb. 2: Subtypen der extrazellulären Vesikel (EV)	6
Abb. 3: Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (CAVD)	9
Abb. 4: Selektion primärer humaner VEC mittels <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> (MACS).....	14
Abb. 5: Versuchsaufbau der <i>in-vitro</i> Experimente mit primären humanen VEC ...	19
Abb. 6: Versuchsaufbau der <i>in-vitro</i> Experimente mit primären humanen VIC.....	19
Abb. 7: Versuchsaufbau der <i>in-vitro</i> Experimente einer VEC-SEV vermittelten Degeneration primärer humaner VIC	20
Abb. 8: Aufbau und Funktionsweise des ZetaView	23
Abb. 9: Schematische Darstellung der SEV-Isolation	25
Abb. 10: Endotheliale SEV-Sekretion.....	35
Abb. 11: Isolat und Restüberstände nach SEV-Isolation	37
Abb. 12: Mikroskopaufnahmen degenerativ veränderter und aktivierter VEC	39
Abb. 13: Western-Blot-Analysen der VEC-Vorversuche	42
Abb. 14: Mikroskopaufnahmen von VIC unter degenerativen Bedingungen	44
Abb. 15: Alizarinrot-Färbung der VIC-Vorversuche.....	46
Abb. 16: Western-Blot-Analysen der degenerativen VIC-Kultur	48
Abb. 17: Western-blot-Analysen der VEC-Hauptversuche.....	50
Abb. 18: Einfluss von SEV einer VEC-Kontrollkultur auf die Degeneration von VIC	52
Abb. 19: Einfluss von SEV einer degenerativen VEC-Kultur auf die Degeneration von VIC.....	54
Abb. 20: Einfluss einer endothelialen Ko-Kultur auf die Degeneration von VIC....	56

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Kulturmedium zur Kultivierung der VEC	15
Tabelle 2: Kulturmedium zur Kultivierung der VIC	15
Tabelle 3: 1%ige Gelantine	15
Tabelle 4: Einfriermedium	15
Tabelle 5: Agenzien zur Behandlung der VEC.....	18
Tabelle 6: Agenzien zur Behandlung der VIC	18
Tabelle 7: Puffer zur Zelllysierung.....	21
Tabelle 8: Grundeinstellungen der NTA.....	26
Tabelle 9: 2%ige Alizarinrot-Lösung.....	27
Tabelle 10: Ladepuffer SDS-PAGE.....	29
Tabelle 11: Laufpuffer SDS-PAGE.....	29
Tabelle 12: Gelzusammensetzung SDS-PAGE	30
Tabelle 13: Transferpuffer Western-Blot-Analysen	31
Tabelle 14: Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween- 20 (TBST) Puffer.....	31
Tabelle 15: 5%ige bovine Serumalbumin (BSA) – Blockierlösung.....	31
Tabelle 16: Primärantikörper für Western-Blot-Analysen	32
Tabelle 17: Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen	33

1 Einleitung

1.1 Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung

Die *World Health Organization* betitelt kardiovaskuläre Erkrankungen als die weltweitführende Todesursache [1]. Zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählen neben der koronaren Herzkrankheit (KHK), Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen, auch Herzklappenerkrankungen [2]. Aufgrund ihrer Lage im Hochdrucksystem des Kreislaufs zwischen dem Ausflusstrakt des linken Ventrikels (LV) und der Aorta ascendens ist die aus drei Taschen zusammengesetzte Aortenklappe (AK) hierbei am häufigsten betroffen [3, 4]. Es wird zwischen Aortenklappenstenosen (AKS) und Aortenklappeninsuffizienzen differenziert. Stenosen beschreiben eine reduzierte Beweglichkeit der Klappensegel bzw. -taschen, woraus eine hämodynamisch unzureichende Klappenöffnung mit reduzierter Ejektionsfraktion resultiert. Insuffizienzen wiederum beruhen auf einer Schlussunfähigkeit der Herzklappe, einhergehend mit einer diastolischen Regurgitation [5].

Dabei stellt die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (engl.: *calcific aortic valve disease*; CAVD) das häufigste Herzklappenvitium der alternden Bevölkerung dar [3, 6, 7]. Die CAVD wird auch als linksventrikuläre Ausflusstraktobstruktion aufgefasst. Trotz rasanter Weiterentwicklung der medizinischen Interventionsmöglichkeiten ist in den letzten 30 Jahren eine zunehmende Prävalenz und Inzidenz der CAVD zu beobachten [8]. In der Altersgruppe der über 65-jährigen leiden 2-9 % an einer manifesten AKS. Aufgrund der demographischen Entwicklungen ist hier zukünftig eine Zunahme zu erwarten [9]. Die sogenannte Aortensklerose, als Vorstufe der AKS, ist in der Bevölkerungsgruppe der über 65-jährigen bei bis zu 30 % zu diagnostizieren [10]. Die CAVD zeigt einen progredienten Krankheitsverlauf und kann aufgrund von Anpassungsmechanismen, wie einer konzentrischen Hypertrophie, jedoch lange Zeit asymptomatisch bleiben [11]. Bei weiter fortschreitender Erkrankung sind führende klinische Symptome belastungsabhängige Dyspnoe, Angina Pectoris, Schwindel und Synkopen [11, 12]. Unbehandelt resultiert auf mechanischer Ebene eine chronische Herzinsuffizienz, welche in diesem Erkrankungsstadium mit einer schlechten Prognose der kardiovaskulären Mortalität einhergeht [13].

Effektive pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten einer bestehenden AKS sind stark limitiert. Beispielsweise stellten sich die im kardiologischen Alltag vielseitig angewendeten Statine zur Cholesterinsenkung bei einer manifesten AKS als ineffektiv bezüglich der weiteren Krankheitsprogression heraus [14]. Aufgrund dessen ist der chirurgische oder interventionelle Klappenersatz im fortgeschrittenen Krankheitsstadium derzeit therapeutisches Mittel der Wahl. Diese Eingriffe stellen jedoch nicht zu vernachlässigende physiologische, aber auch psychologische Belastungen für die betroffenen Patienten dar [15-17]. Abschließend sollten auch die immensen Kosten für entsprechende Gesundheitssysteme, resultierend aus Herzklappenerkrankungen, Beachtung finden [18, 19].

1.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren

In Industrienationen ist die AKS am häufigsten auf einen kalzifizierenden Prozess zurückzuführen [20]. Hierbei spielen sog. kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie höheres Lebensalter, männliches Geschlecht, Nikotinabusus, erhöhtes *low-density* Lipoprotein (LDL)-Cholesterin, arterielle Hypertension, Diabetes Mellitus und metabolisches Syndrom im progredienten Entstehungsprozess eine Rolle [14, 21-25]. Die Genese der AKS bei jüngeren Patienten ist am häufigsten auf eine kongenital bikuspid angelegte AK zurückzuführen [26]. Narbige Umbauprozesse nach vorausgegangenen Inflammationen, z.B. nach rheumatischem Fieber, sind führender ätiologischer Faktor in Entwicklungsländern [5]. Die CAVD stellt demzufolge eine multifaktorielle Erkrankung dar.

1.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese der CAVD ist ein genetisch mitbestimmter, aktiver Prozess, der in Grundzügen dem der Arteriosklerose ähnelt [27, 28]. Zusammenfassend kommt es durch eine initiale Inflammation zu einer progredienten Schädigung der AK [29]. Makroskopisch imponieren fibrotische Verdickungen, die im Krankheitsverlauf eine immobilisierende Wirkung auf die AK haben [30-32]. Schon deutlich vorher kommt es jedoch zu pathologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene [33, 34].

Histologisch besteht die humane AK aus drei Schichten: Lamina fibrosa, spongiosa und ventricularis [35], begrenzt durch valvuläre Endothelzellen (engl.: *valvular endothelial cells*, VEC) auf aortaler sowie ventrikulärer Seite. Valvuläre

Interstitialzellen (engl.: *valvular interstitial cells*, VIC) sind in jeder Schicht vertreten [33, 36]. Der histologische Aufbau der AK ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. VEC begrenzen die Dreischichtigkeit der AK und haben demnach eine Barrierefunktion. Durch chronische Mehrbelastung und erhöhten Scherstress, u.a. ausgelöst durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, kann die Endothelzellschicht beschädigt werden. Auf Basis dieser gestörten Barrierefunktion können Lipide und Entzündungszellen in innere Schichten der AK einwandern [36]. Ein erhöhtes LDL-Cholesterin führt beispielsweise zur inflammatorischen Zelleinwanderung von Makrophagen und Expression von *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) [37, 38]. Eine verminderte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) bei gleichzeitig erhöhter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, sind weitere Beispiele der pathologischen Zellveränderungen, die inflammatorische Signalwege aktivieren [39]. Durch Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), kommt es zur Aktivierung der VIC und damit Aufrechterhaltung des Prozesses [33].

TNF- α und vor allem TGF- β 1 sind als Induktoren der *Endothelial to mesenchymal transition* (EndMT) bekannt [40]. EndMT ist embryologisch essenziell für die Entwicklung des Herzens, nimmt jedoch im adulten Organismus eine entscheidende Rolle hinsichtlich der CAVD-Progression ein [36, 41, 42]. Dabei beschreibt EndMT die Transition der VEC zur Ausprägung mesenchymaler oder fibroblastischer Charakteristika [43]. Die Abnahme endothelialer Marker, wie *Vascular endothelial* (VE)-cadherin und gleichzeitige Zunahme mesenchymaler Marker, wie *alpha smooth muscle actin* (α SMA), ist dabei sinnbildlich und als Monitoring der EndMT-Progression geeignet [36]. Erhöhte TGF- β 1 Konzentrationen führen zusammenfassend über Smad-Protein abhängige und unabhängige Signalwege zur vermehrten Myofibroblasten-Transformation und vermehrter Produktion von Extrazellulärer Matrix (EZM). Nachfolgend kommt es zu fibrotischen Veränderungen der AK [44].

VIC sind mesenchymalen Ursprungs und die häufigste Zellart innerhalb der AK. Dabei existieren verschiedene Phänotypen der VIC. Physiologisch überwiegen die *quiescent* und *activated myofibroblast-like* Ausprägungsformen der VIC. Diese sind verantwortlich für die Homöostase der EZM sowie Kollagenproduktion. Unter pathologisch anhaltender Inflammation findet eine Transformation zum osteoblastischen Phänotyp statt [33, 45]. Hierfür wird u.a. eine Reaktivierung sog.

bone morphogenetic proteins und die Aktivierung des Wnt/ β -catenin Signalweges verantwortlich gemacht [46]. Die verminderte NO-Ausschüttung der VEC kann diese osteogene Transformation der VIC ebenso begünstigen [47, 48]. Auf Proteinebene exprimieren osteoblastische VIC vermehrt α SMA [49], bei gleichzeitig vermindertem Nachweis von Vimentin [50]. Das Verhältnis von α SMA zu Vimentin steigt folglich bei Progress der osteoblastischen Differenzierung. Als Konsequenz schreitet die Kalzifizierung der AK-Taschen durch Produktion knochensubstanzähnlicher Proteine weiter fort und ein Klappenersatz wird im Verlauf unumgänglich [16, 46].

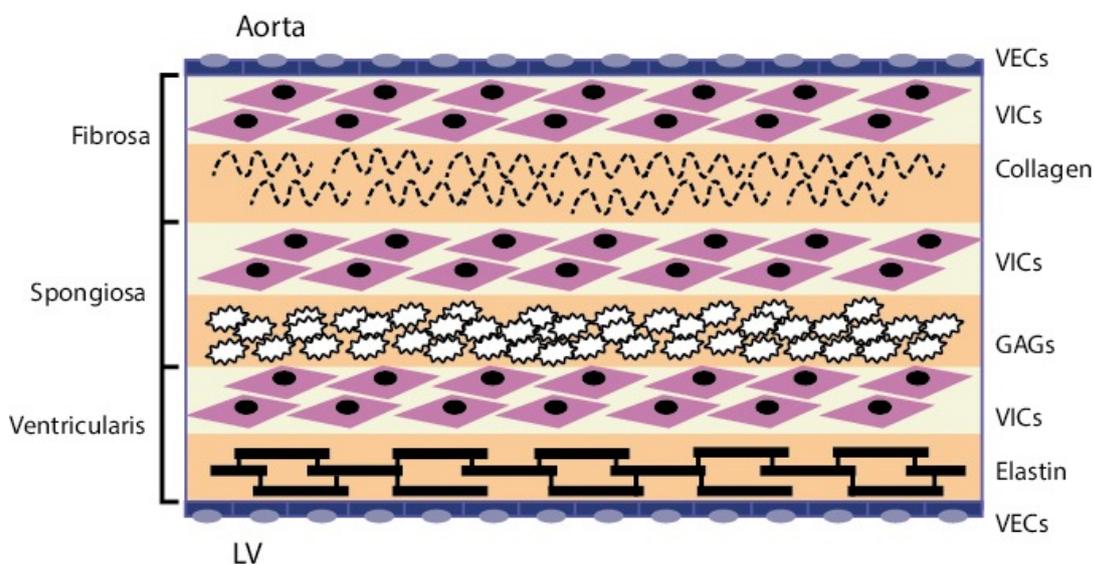


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Aortenklappe auf Zellebene

Lamina fibrosa, spongiosa und ventricularis bilden die Dreischichtigkeit der humanen Aortenklappe. Auf aortaler und linksventrikulärer Seite wird diese durch *valvular endothelial cells* (VEC) begrenzt. *Valvular interstitial cells* (VIC) finden sich in jeder histologischen Schicht. Die Lamina fibrosa enthält stabilisierendes Kollagen. Glykosaminoglykane und Elastin reduzieren die Auswirkungen von belastendem Scherstress. Abkürzungen: GAG – Glykosaminoglykane, LV – linker Ventrikel, VEC – *valvular endothelial cells*, VIC - *valvular interstitial cells*. Modifiziert nach [30].

1.2 Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel (engl.: *extracellular vesicles*, EV) werden von nahezu allen Zelltypen in die interstitielle Flüssigkeit sezerniert. Darunter auch von VEC, Makrophagen und Kardiomyozyten. Bei EV handelt es sich um Partikel, die durch eine Doppellipidschicht abgegrenzt sind und sich nicht replizieren können, d. h. keinen funktionsfähigen Zellkern enthalten [51, 52].

Die 2011 gegründete *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) fasst EV als heterogene Gruppe der Plasmamembranvesikel auf und definiert diese anhand unterschiedlicher Charakteristika. Hinsichtlich physikalischer Eigenschaften werden zum einen anhand ihrer Größe *small extracellular vesicles* (SEV) <200 nm und/oder *medium/large extracellular vesicles* >200 nm messend differenziert. Zum anderen existiert eine dichteabhängige Einteilung in *low*, *middle* und *high density*. Des Weiteren sind biochemische Marker, wie CD63+/CD81+, und Ursprungszelle der freigesetzten EV definitionsrelevant. Letztendlich sind auf Basis ihrer Größe und des Freisetzungprozesses drei Untergruppen der EV wesentlich: Exosomen, Ektosomen/Mikrovesikel und *apoptotic bodies* [51].

Mikrovesikel mit einem Durchmesser von 100-1000 nm werden direkt von der Plasmamembran abgeschnürt [53]. *Apoptotic bodies* werden situativ im Rahmen des programmierten Zelltodes freigesetzt und messen 50-5000 nm [54]. Exosomen stellen mit einer Größe von 30-200 nm den kleinsten Subtyp der EV dar. Exosomen stammen vom endosomalen System ab. Dabei werden intraluminal Vesikel in intrazellulären, sog. multivesikulären *bodies* (MVB), gebildet. Diese MVB fusionieren mit der zellulären Plasmamembran und Exosomen werden nach extrazellulär entlassen [53, 55]. Abbildung 2 zeigt die drei genannten Subtypen der EV in schematischer Ausführung.

EV enthalten in ihrem Inneren verschiedene bioaktive Moleküle, wie Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Metabolite, welche die Eigenschaften der Ursprungszellen widerspiegeln. Nach der Freisetzung von der Ursprungszelle zirkulieren sie in extrazellulären Räumen, wie Blut, Aszites, Urin und Speichel. EV haben sich dabei in den letzten Jahren als wichtiges Instrument der Zell-Zell-Kommunikation- und Interaktion herausgestellt. Die Abgabe der bioaktiven

Moleküle an die entsprechenden Empfängerzellen kann physiologische, aber auch pathologische Prozesse induzieren [56-58].

Die Nomenklatur der unterschiedlichen EV ist aktueller Bestandteil wissenschaftlicher Diskussion. Es existieren keine einheitlichen Definitionen sowie teils überlappende Charakterisierungsmerkmale, welche die Terminologie erschweren. Vor diesem Hintergrund wird im Folgenden experimentellen Teil der Dissertation die übergreifende Bezeichnung SEV verwendet [51, 59].

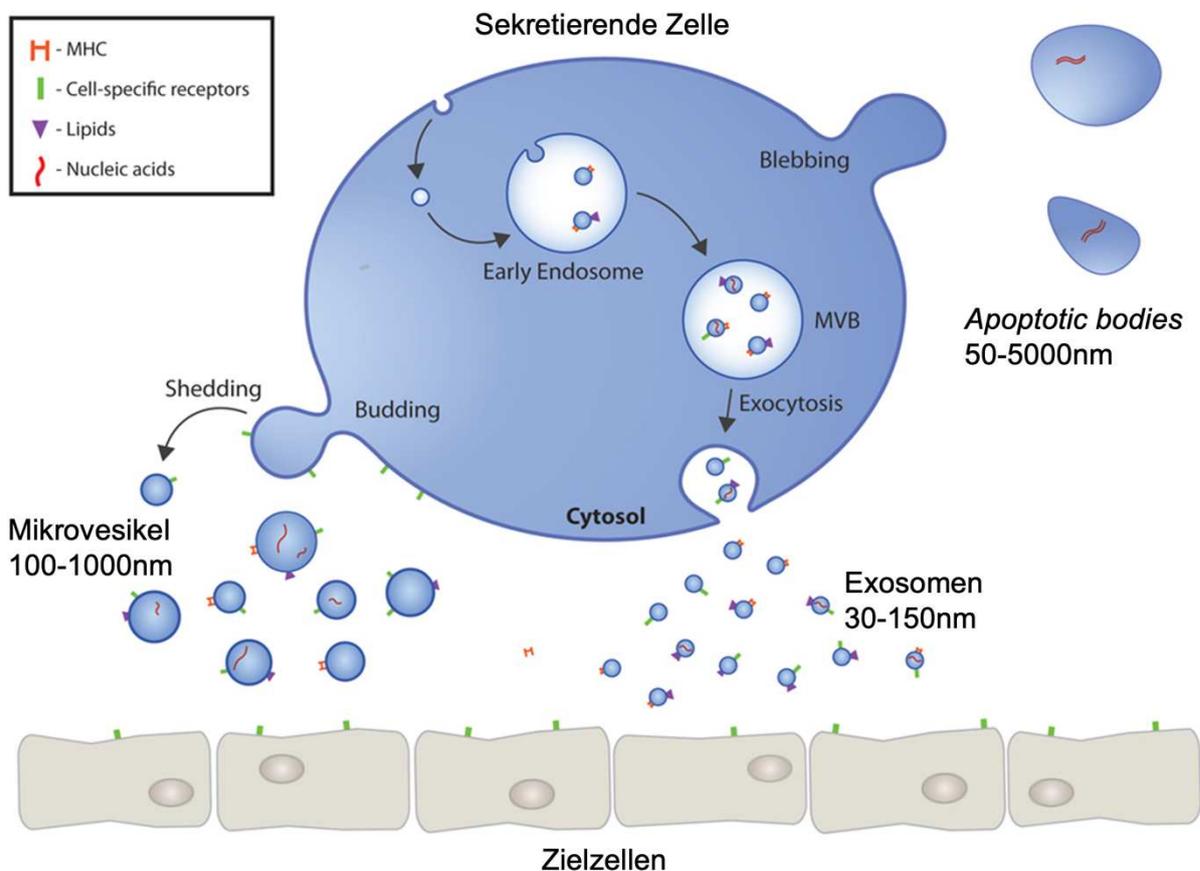


Abb. 2: Subtypen der extrazellulären Vesikel (EV)

Dargestellt sind drei Untergruppen der EV (*apoptotic bodies*, Mikrovesikel und Exosomen) mit entsprechender Größe und Freisetzungsmechanismus. Exosomen stammen vom endosomalen System ab und werden als intraluminale Vesikel in multivesikulären *bodies* (MVB) gebildet. MVB fusionieren mit der Plasmamembran und Exosomen werden nach extrazellulär entlassen, um an Zielzellen zu binden. In ihrem Inneren enthalten Exosomen z.B. spezifische Marker, wie CD63 und CD81, Hitzeschock-Proteine sowie oberflächlich Annexine und Phosphatidylcholin. Modifiziert nach [60, 61]. Abkürzungen: CD – engl.: *Cluster of Differentiation*, EV – extrazelluläre Vesikel, MHC - *Major Histocompatibility Complex*, MVB - multivesikulären *bodies*

1.3 Extrazelluläre Vesikel in kardiovaskulären Erkrankungen

Während EV in onkologischen Fachdisziplinen schon lange fester wissenschaftlicher Bestandteil sind, entwickelt sich zunehmendes Interesse an ihrer Rolle auch bei kardiovaskulären Erkrankungen [62]. Es ist bereits bekannt, dass EV über Zellkommunikation, Modulation der Genexpression und Variation des zellulären Phänotyps an der Aufrechterhaltung der normalen Herzfunktion beteiligt sind. Entscheidend ist jedoch, dass sich die Zusammensetzung der EV unter pathologischen Bedingungen verändern kann und in der Folge kardiovaskuläre Erkrankungen durch den Einfluss veränderter EV sogar gefördert werden können [52].

Mehrere Studien zeigen die Freisetzung von EV durch Zelltypen, wie Kardiomyozten, Fibroblasten, Makrophagen, VEC und Erythrozyten, welche an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind [52, 63]. Von VEC freigesetzte EV scheinen eine essenzielle Funktion in der Pathogenese der Herzinsuffizienz und KHK einzunehmen [63, 64]. Zum Beispiel tragen EV zur Bildung und Progression atherosklerotischer Plaques im Rahmen einer KHK bei. Das hierbei relevante prokoagulatorische Potential von EV basiert auf einer Aktivierung der Gerinnungskaskade. Zum einen ist der auf der Oberfläche von Mikrovesikeln lokalisierte *tissue factor* zu nennen. Zum anderen erlaubt die Freilegung von Phosphatidylserin auf der äußeren Membranschicht der EV die prokoagulatorische Konzentration der Faktoren VII und VIIa. EV sind somit an einer potenziellen Plaqueruptur im Sinne eines akuten Koronarsyndroms mitbeteiligt [65, 66]. Darüber hinaus beschreiben mehrere Studien eine erhöhte Anzahl zirkulierender EV bei KHK und auch AKS. Der Stellenwert der EV als Biomarker in Diagnostik und Prognostik wird hierbei ersichtlich [63, 65, 67].

Die Rolle von EV hinsichtlich der Pathogenese der CAVD bleibt bislang deutlich weniger beleuchtet [63, 64]. Dabei stellen bisherige Forschungsergebnisse EV zusammenfassend als wichtige Mediatoren der Initiierung und Progredienz von Inflammation und Kalzifizierung im Rahmen der CAVD dar [68]. Durch endotheliale Dysfunktion und Barrierestörung kommt es zur vermehrten Freisetzung endothelialer EV, die wiederum Leukozyten mit nachfolgender Inflammation aktivieren. Gleichzeitig werden weitere VEC im Sinne einer *Feedback*-Schleife aktiviert und der Prozess aufrechterhalten [65, 68]. Im Zuge der Progredienz der

CAVD ändert sich die Zusammensetzung der EV. Unter physiologischen Bedingungen finden sich anti-kalzifizierende Proteine, wie Fetuin-A und Matrix-Gla-Protein sowie anti-osteogen wirkende *microRNA* (miR), wie miR-30, -125-b, -143, -145 und 155, im Inneren der EV. Unter zunehmend kalzifizierenden Gegebenheiten weichen diese u.a. der alkalischen Phosphatase und Annexinen [68-70]. Annexine binden an Phosphatidylserin auf der Oberfläche der EV, sodass Kalziumionen in das Innere der EV einströmen können [68, 71]. Es kommt zur Mineralisierung und Kalziumüberladung der EV [68]. Diese kalzifizierten EV werden auch von osteogen differenzierten VIC ausgeschüttet. Durch Transport und Abgabe dieser Kalziumionen werden EV mitunter als der primäre Ausgangspunkt der Mikro- und Makrokalzifizierung der CAVD aufgefasst [68, 72]. Des Weiteren können die kalziumbeladenen EV sich auch selbst zwischen den Kollagenfasern der AK-Struktur ablagern [68, 73].

Außerdem scheinen EV unter pathologischen Bedingungen an der EndMT der VEC und osteogenen Differenzierung der VIC beteiligt zu sein [68]. Verschiedene *in-vitro* Kulturmodelle konnten diesbezüglich erste Erkenntnisse der VEC- und VIC-Interaktion offenbaren. In einer porcinen Ko-Kultur unter EndMT induzierenden Bedingungen mittels TGF- β 1 wurde gezeigt, dass VIC osteogene EndMT Prozesse der VEC hemmen können. Über welche Mechanismen diese Inhibition erfolgt, blieb jedoch unklar. Interessanterweise wurde in einer umgekehrten Ko-Kultur kein hemmender Effekt, ausgehend von VEC auf die osteogene Differenzierung der VIC, beobachtet [42]. In einem humanen 3D- Kulturmodell wurde vielmehr gezeigt, dass VEC pathologisches *Remodeling* von VIC, auch über parakrine Signale, induzieren können [74].

Inwieweit VEC die osteogene Differenzierung der VIC vor dem klinischen Endpunkt der CAVD sogar fördern können, soll daher Leitfrage dieser Dissertation sein. Da Indizien für eine relevante Zell-Zellkommunikation bestehen, soll außerdem untersucht werden, ob potenzielle osteogene Differenzierungsprozesse der VIC mitunter auf aktivierte, von VEC stammende, EV zurückzuführen sind. Um mögliche Unsicherheiten hinsichtlich der Übertragbarkeit von Daten tierischer Experimente von vorneherein auszuschließen, wurden für die *in-vitro* Experimente primäre humane VEC und VIC verwendet. Abschließend ist die Pathogenese der CAVD, auch unter Berücksichtigung potenzieller Einflüsse durch EV, in Abbildung 3 dargestellt.

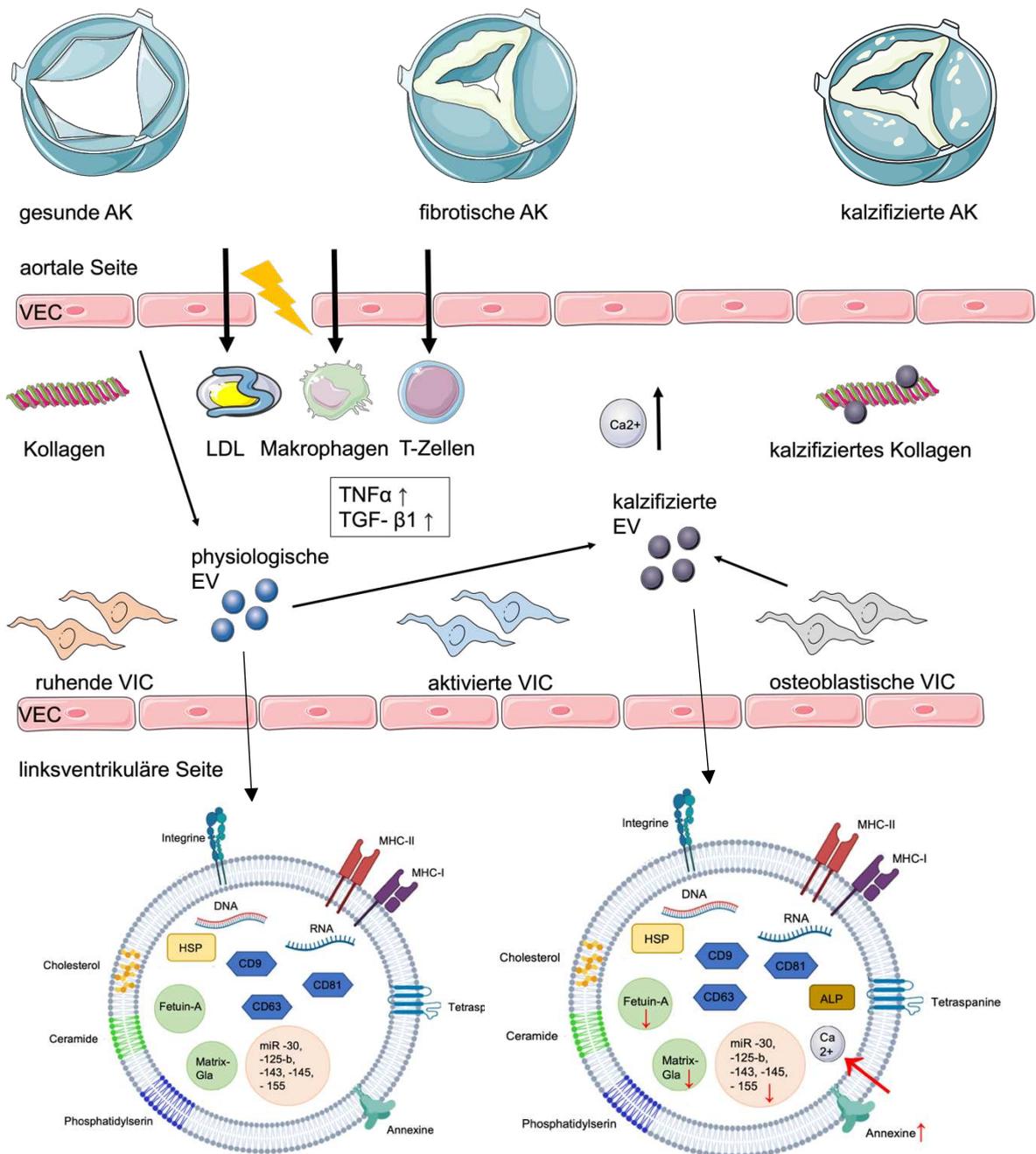


Abb. 3: Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (CAVD)

Die CAVD ist eine progressive Erkrankung der Aortenklappe (AK). Ausgelöst durch initiale Endothelschädigung dringen Lipide (LDL-Cholesterin), Makrophagen und T-Zellen in das Interstitium der AK ein. Endotheliale EV werden vermehrt freigesetzt und halten die Inflammation gemeinsam mit sezernierten Zytokinen aufrecht. Die Zusammensetzung der EV ändert sich und Kalziumionen akkumulieren in Inneren der EV. VIC differenzieren zum osteoblastischen Phänotyp, wodurch vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM) produziert wird. Die Öffnungsfläche der AK ist fibrotisch eingeschränkt und kalzifiziert letztendlich irreversibel. Abkürzungen: AK – Aortenklappe, CD – engl.: *Cluster of Differentiation*, EV – extrazelluläre Vesikel, EZM - extrazelluläre Matrix, HSP - Hitzeschock-Proteine, MHC - *Major Histocompatibility Complex*, TGF-β1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF-α – *Tumor nekrosis factor alpha*, VEC – *valvular endothelial cells*, VIC - *valvular interstitial cells*. Angelehnt an [61, 68, 75], erstellt mit [76].

1.4 Ziele der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss endothelialer SEV auf die Degeneration primärer humaner VIC vor dem klinischen Hintergrund der CAVD näher zu beleuchten. Dabei wurde zur Quantifizierung der SEV die Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) genutzt. Weitere Analysen fanden auf Basis histologischer Färbung und mittels Western-Blot-Analysen auf Proteinebene statt. Bisher existieren kaum Daten zur Degeneration von VIC humanen Ursprungs unter dem Einfluss von endothelialen SEV. Ob SEV hierbei innerhalb der Pathogenese eine Rolle spielen und eventuell zukünftig sogar an diagnostischen und therapeutischen Eckpunkten der AKS beteiligt sein könnten, wird im Folgenden näher betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Zellisolationen

2.1.1 Ethikvotum

Während der Durchführung von Herztransplantationen (HTX) sammelt die Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf humanes Gewebe von AK zur anschließenden Zellisolation. Hierzu liegt eine Genehmigung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 2018-298-bio vom 13.08.2019 vor.

Eine schriftliche Einverständniserklärung der entsprechenden Patienten wird vor dem Hintergrund der Deklaration von Helsinki unter ihren „Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen“ aufbewahrt [77].

2.1.2 Isolation und Kultivierung primärer humaner VEC und VIC

In der Klinik für Herzchirurgie besteht Zugang zu primären humanen VEC und VIC, welche, einem in den Laboreinrichtungen der *Experimentellen Chirurgie* bekannten Standardprotokoll folgend, aus humanem Gewebe von AK isoliert werden. Dabei erfolgte eine anonymisierte Nummerierung, um jedes Experiment mit VEC und VIC aus derselben AK durchführen zu können.

Die im Verlauf beschriebene Isolation und anschließende Kultivierung der VEC und VIC erfolgte ausschließlich unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank. Im Zuge dessen wurden stets Handschuhe getragen. Um potenzielle Irritationen oder Beschädigungen des Zellrasens zu vermeiden, wurden vor jedem Waschvorgang, oder Applikationsschritt, die verwendeten Lösungen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Sowohl VEC als auch VIC wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Dabei wurde alle zwei Tage das Kulturmedium erneuert. Verwendete Kulturmedien und Zusätze sind in Tabelle 1 bis 3 aufgelistet.

Für die Isolation der primären humanen VEC wurden Taschen der humanen AK umgehend nach der operativen Entfernung in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Art.-Nr. 10010-023) gelagert. In den Einrichtungen der *Experimentellen Chirurgie* schloss sich ein erneuter zweimaliger Waschvorgang mit PBS an und entsprechendes AK Gewebe

wurde in ein 15 ml *Centrifuge Tube* (15 ml Falcon®, VWR®, Radnor, PA, USA; Art.-Nr. 734-0451) überführt. Anschließend folgte unter Zugabe von 3 ml 0,25%iger Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Art.-Nr. 25200-56) eine 5-minütige Durchmischung im 37 °C warmen Wasserbad. Die Gewebesuspension wurde in eine Petrischale überführt und 9 ml entsprechendes VEC-Kulturmedium hinzugegeben. Nach einer vorsichtigen manuellen Ablösung der AK-Oberfläche mittels eines Einmalskalpells (pfm medical, Köln, NRW, Deutschland; Art.-Nr. 0200140010) wurde übrig gebliebenes Gewebe verworfen. Die resultierende Zellsuspension wurde durch ein 100 µm messendes Zellsieb (Starlab, Hamburg, Deutschland; Art.-Nr. CC8111-0102) filtriert. Nach 5-minütiger Zentrifugation (Heraeus Labofug 300, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bei 800 rcf (engl.: *relative centrifugal force*; rcf) wurde das entstandene Zellpellet unter Zugabe von VEC-Kulturmedium in einer gelantinebeschichteten T25-Zellkulturflasche (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, OÖ, Österreich; Art.-Nr. 690160) bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Passage eins war hiermit erreicht. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Rahmen des weiter unten beschriebenen Zell-Passagieren in eine größere T75-Zellkulturflasche (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, OÖ, Österreich; Art.-Nr. 658170) überführt. Nachdem auch hier eine entsprechende Konfluenz erreicht war, erfolgte die Aufreinigung primärer humaner VEC aus der Zellsuspension mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) der methodischen Erstbeschreibung folgend [78].

Hierfür wurde die Zellsuspension in Passage eins mit sog. *MicroBeads* inkubiert. Dabei handelt es sich um Magnetpartikel, welche an Antikörper gebunden sind, die an bestimmte Oberflächenmarker der zu selektierenden Zellpopulation binden. Um im Sinne einer positiven Selektion VEC zu separieren, wurde der für Endothelzellen spezifische Oberflächenmarker *Cluster of Differentiation 31* (CD31) verwendet [79]. Bei Durchfluss der Zellsuspension durch ein starkes, umhüllendes Magnetfeld wurden entsprechend markierte CD31⁺ Zellen zurückgehalten und somit von anderweitigen Zellpopulationen eluiert. Der methodische Ablauf des MACS ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Die entsprechend selektierten VEC wurden in einer T75-Zellkulturflasche erneut bis zur Konfluenz kultiviert und mit dem Erreichen dieser pelletiert und unter

Verwendung eines Einfriermediums in 2 ml fassenden Kryoröhrchen (Low Temperature Freezer Vials, Self-Standing, 2 ml, Silicone O-Ring Seal, VWR®, Radnor, PA, USA; Art.-Nr. 10018-758) in Flüssigstickstoff bis zur weiteren experimentellen Nutzung gelagert. Die Zusammensetzung des Einfriermediums ist in Tabelle 4 gelistet.

Für die Isolation primärer humaner VIC wurde die operativ entfernte AK-Tasche ebenfalls in PBS überführt und zweimalig mit PBS gewaschen. In vorgewärmtem VIC-Kulturmedium wurde das AK-Gewebe mittels eines Einmalskalpell in etwa 1 mm messende Gewebestücke fragmentiert. In VIC-Kulturmedium befindliche AK-Fragmente wurden in eine T25-Zellkulturflasche überführt und bis zum Auswachsen der VIC bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Übrig gebliebene Gewebereste wurden während des Passagierens bis zu einer Zell-Passage von drei bis vier entfernt. Die isolierten VIC wurden ebenfalls bis zur weiteren experimentellen Verwendung in Einfriermedium überführt und in Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff gelagert.

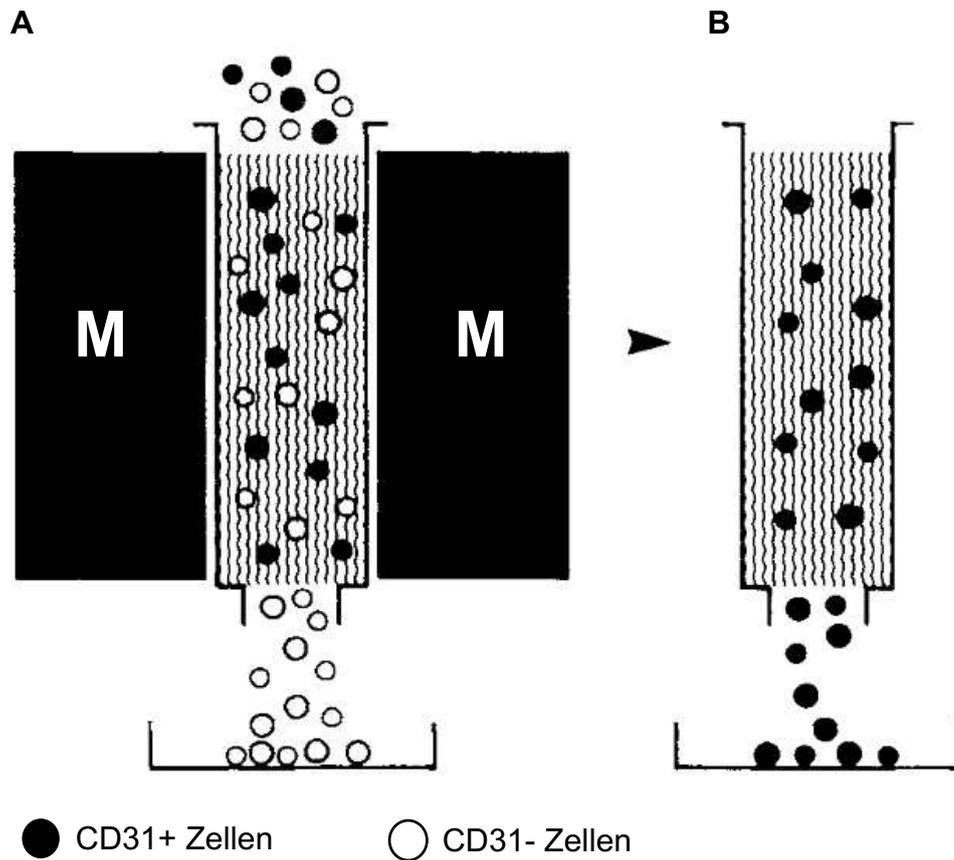


Abb. 4: Selektion primärer humaner VEC mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)

Die mit CD31 *MikroBeads* markierte Zellsuspension wird durch ein Magnetfeld (gekennzeichnet mit M) gespült (A). Entsprechend markierte CD31+ Zellen (hier als schwarze Kreise gekennzeichnet) werden in der Magnetsäule gehalten und nicht markierte Zellen (hier durch weiße Kreise dargestellt) ausgewaschen. Somit erfolgt nach Entfernung des Magnetfeldes eine positive Selektion der CD31+ VEC aus der Zellsuspension (B). Abkürzungen: CD31 - *Cluster of Differentiation 31*, MACS - *Magnetic Activated Cell Sorting*, VEC – *valvular endothelial cells*. Modifiziert nach [78].

Tabelle 1: Kulturmedium zur Kultivierung der VEC

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
Endothelial Cell Growth Medium MV Kit	Promo Cell®, Heidelberg, BW, Deutschland C-22120	500 ml
SupplementPack (in o.g. Kit enthalten)	Promo Cell®, Heidelberg, BW, Deutschland C-22120	25 ml
Penicillin/ Streptomycin	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA 15140122	1 %
Amphotericin B	EurimPharm, Saaldorf- Surheim, BY, Deutschland	0,5 %

Tabelle 2: Kulturmedium zur Kultivierung der VIC

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, 4,5g/L Glukose	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA 12430054	500 ml
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA LOT: BCBX1250 und BCCC0665	10 %
Penicillin/ Streptomycin	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA 15140122	1 %
Amphotericin B	EurimPharm, Saaldorf- Surheim, BY, Germany	0,5 %
nichtessentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA M5650	1 %

Tabelle 3: 1%ige Gelatine

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA G9391	5 g
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 10010-023	500 ml

Die Suspension wurde vor Verwendung autoklaviert und steril filtriert

Tabelle 4: Einfriermedium

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA D8418-50ML	10 %
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA LOT: BCBX1250; BCCC0665	10 ml

2.1.3 Passagieren der primären humanen VEC und VIC

Bei Erreichen jeweiliger Konfluenz wurden die VEC und VIC bis zu einer Passage von drei bis fünf passagiert und in neuen Zellkulturflaschen vereinzelt. Für das Passagieren wurde das Zellkulturmedium zunächst abgesaugt, der Zellrasen zweimalig mit PBS gewaschen und mit 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Durch Zugabe des entsprechenden Kulturmediums im Verhältnis 3:1 wurde diese Reaktion bei 37 °C und 5 % CO₂ nach drei Minuten unterbunden. Es folgte eine mikroskopische Erfolgskontrolle hinsichtlich des Ablösens des Zellrasens der Zellkulturflasche (DM IL LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, HE, Deutschland). Re-suspendiert wurde die Zellsuspension in einem 15 ml Falcon durch fünf-minütige Zentrifugation bei 1500 rcf (Heraeus Labofug 300, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pelletiert. Anschließend folgte eine Vereinzelnung in neue Zellkulturflaschen. Die Passagezahl erhöhte sich somit um eins. Eine weitere experimentelle Verwendung, oder das Einfrieren zur langfristigen Lagerung, ging dem Passagieren nach.

2.2 *In-vitro* Versuche mit primären humanen VEC und VIC

2.2.1 Zellzahlbestimmung

Um eine definierte Zellzahl auszusäen, wurden VEC und VIC mit einer Neubauer-Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hercht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, BY, Deutschland) gezählt. Hierfür wurden die VEC und VIC einmalig mit 10 ml PBS gewaschen und mit 3 ml 0,25%iger Trypsin- EDTA-Lösung vom Boden der entsprechenden Zellkulturflasche gelöst. Nach 3 Minuten Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde diese Reaktion unter Zugabe von 9 ml entsprechendem Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1500 rcf zentrifugiert. Überständiges Medium wurde entsorgt und das Zellpellet in neuem Kulturmedium re- suspendiert. Nach einer 1:1 Färbung der Zellsuspension mit 0,4 %iger Trypanblau-Lösung (VWR®, Radnor, PA, USA; Art.-Nr. K940) wurde die Durchschnittszellzahl von vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit dem Faktor 2×10^4 /ml multipliziert, um die Gesamtzellzahl zu ermitteln.

2.2.2 Aussaat und Behandlung

Für die Experimente mit zuvor isolierten primären humanen VEC und VIC wurden ausschließlich Zellen der Passagen drei bis fünf verwendet. Zuvor in Flüssigstickstoff gelagerte VEC und VIC wurden zunächst zügig aufgetaut und einzeln in gelantinebeschichteten T75-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Daran anschließend wurden die VEC und VIC für die Aussaat mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Großteil der Experimente wurden in gelantinebeschichteten, sechs Kavitäten fassenden Mikrotiterplatten (Cellstar® Multiwellplatte, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, OÖ, Österreich; Art.-Nr. 657160), mit 100 000 Zellen pro Kavität und 2 ml entsprechendem Kulturmedium, durchgeführt. Lediglich für die im Verlauf näher beschriebene Alizarinrot-Färbung wurden 30 000 Zellen in 48 Kavitäten fassende Zellkulturplatten (Cellstar® Multiwellplatte, Greiner Bio-One Kremsmünster, OÖ, Österreich; Art.-Nr. 677102) unter Hinzugabe von 500 µl Kulturmedium inkubiert. Das Kulturmedium wurde in der Folge alle zwei Tage erneuert.

Bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz in den Mikrotiterplatten wurde mit der Behandlung der VEC und VIC gestartet. Dabei wurden die VEC zwecks Aktivierung und anschließender Gewinnung von SEV mit TGF-β1 oder TNF-α behandelt [40].

Die VIC wurden unter degenerativen Bedingungen, unter Zusatz von β -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat (β -GP) und Calcium-Chlorid (CaCl_2), fortwährend kultiviert. Die verwendeten Agenzien finden sich in Tabelle 5 und 6.

Um innerhalb der durchgeführten Vorversuche den optimalen Zeitpunkt der VEC-Aktivierung und SEV-Ausschüttung dieser zu finden, wurden die VEC initial für verschieden lange Zeiträume (24 Stunden, 7 Tage und 14 Tage) mit TGF- β 1 oder TNF- α aktiviert. Ebenso wurde in den Vorversuchen die Degeneration der VIC zu verschiedenen Zeitpunkten (24 Stunden, 48 Stunden, 4 Tage und 6 Tage) untersucht. Auch hier wurde, wie nach Definierung der für die Hauptversuche geeigneten Zeitpunkte, das Kulturmedium alle zwei Tage erneuert. Den Versuchsaufbau veranschaulichen Abbildungen 5 bis 7.

Tabelle 5: Agenzien zur Behandlung der VEC

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
<i>Transforming growth factor beta 1</i> (TGF- β 1)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA 7754-BH-005	10 ng/ml
<i>Tumor nekrosis factor alpha</i> (TNF- α)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA H8916	10 ng/ml

Tabelle 6: Agenzien zur Behandlung der VIC

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
β -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat (β -GP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA 50020	10 mM
Calcium-Chlorid (CaCl_2)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland CN93.1-500G	1,5 mM



Abb. 5: Versuchsaufbau der *in-vitro* Experimente mit primären humanen VEC

Valvular endothelial cells (VEC) wurden aus humanen Aortenklappen (AK) isoliert und bis zur Konfluenz kultiviert. Für die *in-vitro* Experimente wurden die VEC für unterschiedliche Zeiträume unter Hinzugabe von 10 ng/ml TGF- β 1 oder 10 ng/ml TNF- α inkubiert. Dabei erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Nach Ablauf der jeweiligen Behandlungsdauer wurden die VEC geerntet und die *small extracellular vesicles* (SEV) aus den Überständen isoliert. Weitere Analysen konnten folgen. Abkürzungen: AK – Aortenklappe, NTA – Nanopartikel-Tracking-Analyse, SEV - *small extracellular vesicles*, TGF- β 1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF- α – *Tumor nekrosis factor alpha*, VEC - *valvular endothelial cells*



Abb. 6: Versuchsaufbau der *in-vitro* Experimente mit primären humanen VIC

Valvular interstitial cells (VIC) wurden aus humanen Aortenklappen (AK) isoliert und bis zur Konfluenz kultiviert. Für die *in-vitro* Experimente wurden die VIC für unterschiedliche Zeiträume unter degenerativen Bedingungen (10 mM β -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat, 1,5 mM Calcium-Chlorid) inkubiert. Dabei erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Nach Ablauf der jeweiligen Behandlungsdauer wurden die VIC für nachfolgenden Analysen geerntet bzw. eine Alizarinrot- Färbung durchgeführt. Abkürzungen: AK – Aortenklappe, VIC – *valvular interstitial cells*.

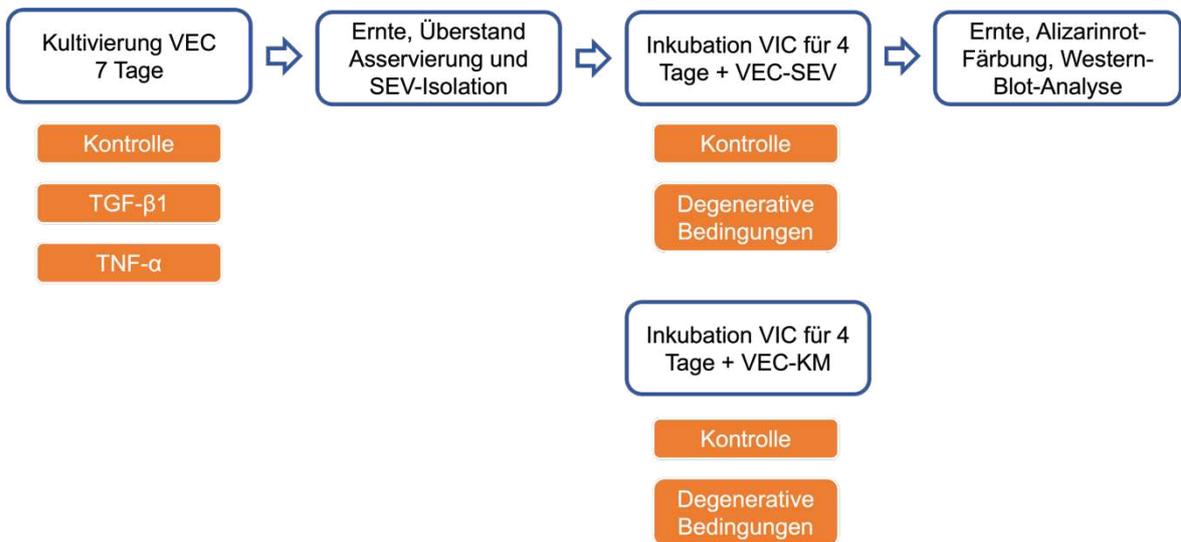


Abb. 7: Versuchsaufbau der *in-vitro* Experimente einer VEC-SEV vermittelten Degeneration primärer humaner VIC

Entsprechend der Ergebnisse aus den in Abb. 5 dargestellten Vorversuchen wurden *Valvular endothelial cells* (VEC) für sieben Tage mit 10 ng/ml TGF-β1 oder 10 ng/ml TNF-α behandelt. Nach Abschluss der Behandlungsdauer wurden die *small extracellular vesicles* (SEV) aus den Überständen isoliert. Auf Basis der Ergebnisse aus den in Abb. 6 dargestellten Vorversuchen wurden die aus den VEC isolierten SEV sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter degenerativen Bedingungen einer viertägigen *valvular interstitial cells* (VIC)-Kultur hinzugefügt. Außerdem wurden VIC für vier Tage in einem konditionierten Medium (KM) kultiviert (VIC-Kulturmedium/ degenerative Bedingungen und VEC-Überstände in einem Verhältnis von 1:1). Auch hier erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Abkürzungen: KM – konditioniertes Medium, SEV - *small extracellular vesicles*, TGF-β1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF-α – *Tumor nekrosis factor alpha*, VEC - *valvular endothelial cells*, VIC – *valvular interstitial cells*.

2.2.3 Durchlichtmikroskopie

In konstanten Zeitabschnitten von zwei Tagen wurden die Zelldichte und Morphologie der kultivierten VEC und VIC mittels eines Inversmikroskopes (DM IL LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, HE, Deutschland) erfasst. Zwecks Dokumentation wurden mit einer Mikroskopkamera (DFC425 C, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, HE, Deutschland) und der entsprechenden Software *Leica Application Suite* Version 3.8 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, HE, Deutschland) zu unterschiedlichen Zeitpunkten Bilder der kultivierten VEC und VIC aufgenommen.

2.2.4 Zellyse

Die Herstellung von Zellysaten ist die Voraussetzung für nachfolgende proteinbiochemische Experimente. Vor Beginn des Zellyse-Vorganges wurden die Überstände abgenommen, bei 13 000 rcf und 4 °C für 10 min zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung in Mikroreaktionsgefäßen bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die VEC und VIC in den Zellkulturplatten mit PBS gewaschen. 100 µl RIPA-Puffer wurden pro sechser Kavität der Mikrotiterplatte hinzugegeben. Mittels eines *Cell Scrapers* (Sarstedt, Nümbrecht, NRW, Deutschland; Art.-Nr. 20003521) wurde das resultierende Zellysat vom Boden der Zellkulturplatte entfernt und eine Proteinisolation angeschlossen. Hierfür wurden die Zellysate nach 15-minütigem Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 156) für 20 min bei 4 °C und 13 000 rcf zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und bis zur weiteren Verwendung ebenfalls in Mikroreaktionsgefäßen bei -80 °C gelagert. In Tabelle 7 ist der zur Zellyse benötigte Puffer gelistet.

Tabelle 7: Puffer zur Zellysierung

Lösung	Hersteller und Art.-Nr.	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, HE, Deutschland 20-188 04693124001 04906837001	RIPA-Lysepuffer Protease Inhibitor Cocktail Phosphatase Inhibitor Cocktail dH ₂ O

2.3 Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA)

SEV als Möglichkeit der Zell-Zell-Kommunikation gewinnen zunehmend an Forschungsinteresse. Zur Quantifikation dieser gibt es verschiedene Möglichkeiten, jedoch noch keinen allgemeinen Goldstandard [80, 81].

Das häufig genutzte *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) inkludiert keine sensitive Analyse von Partikeln, welche kleiner als 0,5 µm groß sind [82]. Die in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen relevanten SEV und Exosomen sind jedoch lediglich 30 – 200 nm groß [55]. Daher bietet sich als weitere Option der Quantifizierung von SEV die Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) an, da hiermit auch deutlich kleinere Partikel erfasst werden können.

Die NTA dient der Konzentrations- und Größenbestimmung von Partikeln und basiert auf zwei physikalischen Prinzipien. Zum einen werden ausgehend von dem Laserstrahl des ZetaView (Particle Metrix GmbH, Meerbusch, NRW, Deutschland) Partikel bestrahlt und die resultierende Lichtstreuung wird von der zugehörigen Software (ZetaView 8.02.30.02) genutzt, um im Rahmen einer Videoanalyse die Partikelkonzentration zu bestimmen. Die Partikelkonzentration wird nachfolgend als Partikel/ml angegeben. Zum anderen spielt die Brownsche Molekularbewegung eine Rolle. Denn hiernach ist die Diffusion von Partikeln einer Lösung antiproportional zur Größe dieser Partikel. Unter Hinzunahme einer Diffusionskonstanten und in Abhängigkeit von Temperatur und Viskosität der Lösung gelingt es dann der Software, die Partikelgröße zu bestimmen [83]. Den Aufbau des ZetaView veranschaulicht Abbildung 8.

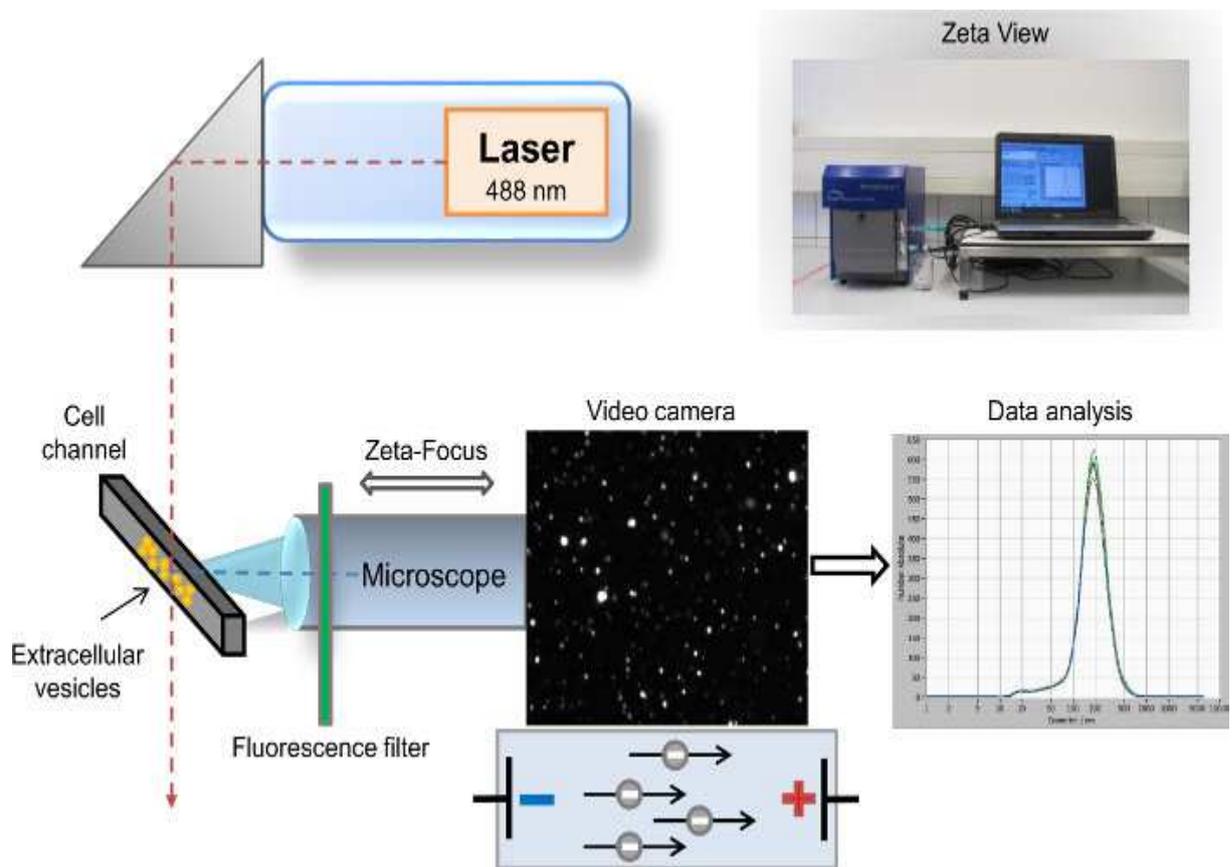


Abb. 8: Aufbau und Funktionsweise des ZetaView

Das ZetaView setzt sich zusammen aus einem Mikroskop mit horizontal ausgerichteter Achse und kombinierter Videokamera. Vertikal dazu orientiert sich ein Laser. Der ausgehende Laserstrahl trifft rechtwinklig auf eine Zelle, in welche in flüssiger Zusammensetzung Partikel gespritzt werden können. Diese Partikel werden während eines Durchlaufs vom Laserstrahl irritiert und die resultierende Bewegung von der Videokamera erfasst. Modifiziert nach [84].

2.3.1 Isolation von *small extracellular vesicles* (SEV)

Die SEV aus den VEC-Zellkulturüberständen wurden mittels *ExoQuick-TC Precipitation Solution* (System Bioscience, Palo Alto, CA, USA; Art.-Nr. EXOTC50A-1) den Herstellerangaben folgend, isoliert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Initial wurden 12 ml VEC-Zellkulturüberstand einer Zellreihe/Behandlung 15 min bei 3000 rcf zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und in ein neues Falcon überführt. Anschließend wurden 2,4 ml *ExoQuick-TC Precipitation Solution* hinzugefügt und über Nacht (ü. N.) bei 4 °C aufrechtstehend inkubiert. Danach erfolgt ein erneuter Zentrifugationsschritt für 30 min bei 1500 rcf. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Pellet nochmals 5 min bei 1500 rcf zentrifugiert. Letztendlich wurde das Pellet vollständig von Überstand befreit, in 600 µl PBS aufgenommen und bevorzugt sofort experimentell weiterverwendet. Andernfalls erfolgte eine Lagerung bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung. Abbildung 9 veranschaulicht schematisch den Vorgang der SEV-Isolation.

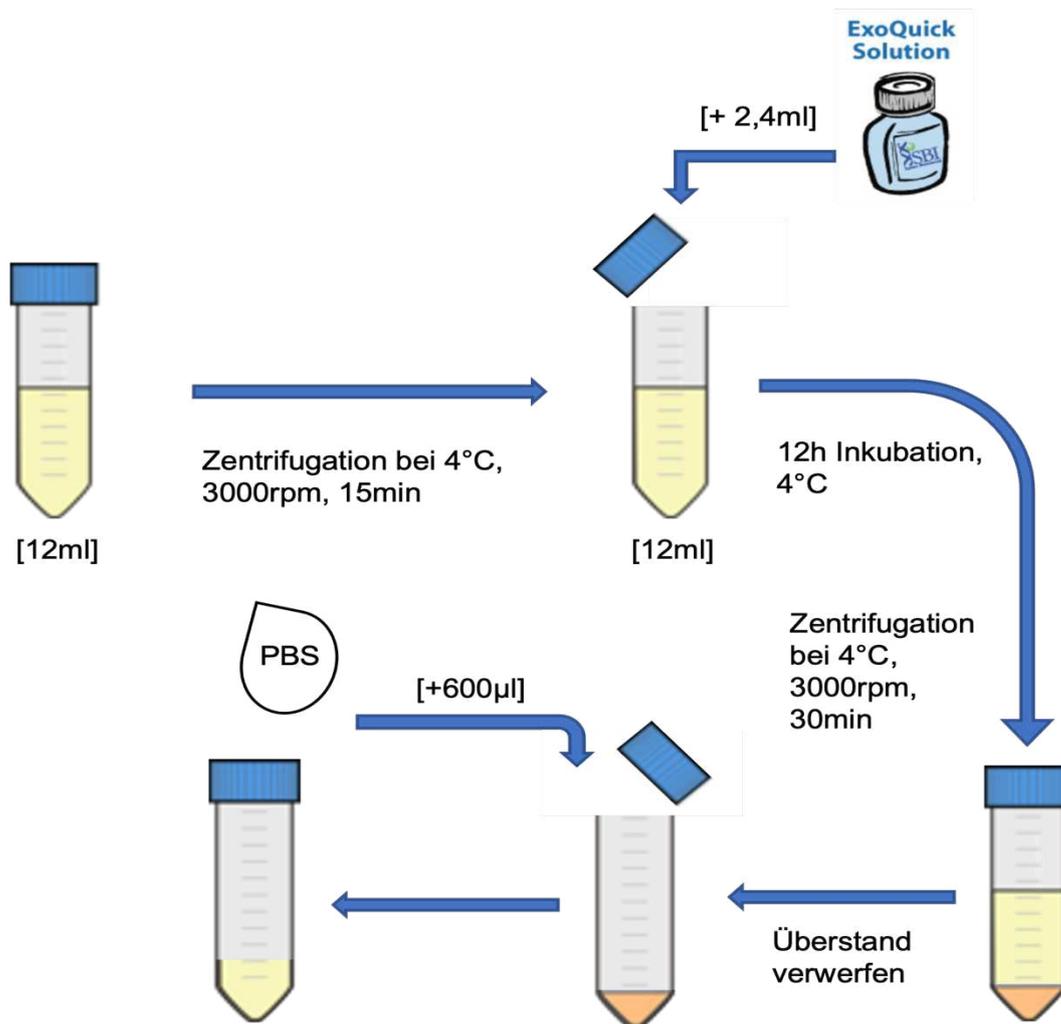


Abb. 9: Schematische Darstellung der SEV-Isolation

Nach Abschluss der Aktivierungsdauer der VEC wurden die Zellkulturüberstände einer Zellreihe nach der jeweiligen Behandlung sortiert und in einem Falcon gesammelt sowie zentrifugiert. Eine 12-stündige Inkubation erfolgte nach Hinzugabe von 2,4 ml *ExoQuick-TC Precipitation Solution* (System Bioscience, Palo Alto, CA, USA). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet der isolierten SEV in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) aufgenommen. Abkürzungen: PBS - phosphatgepufferte Salzlösung, rpm - *revolutions per minute*, SEV - *small extracellular vesicles*

2.3.2 Bestimmung der SEV-Anzahl

Für alle Experimente wurde die Messzelle mit der Nummer „Z158_C1149_cell0014“ genutzt. Vor Beginn jeder Messung wurde überprüft, ob die Grundeinstellungen vorliegen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Grundeinstellungen der NTA

Parameter	Wert
Sensitivität	70 %
Verschluss	70
Minimale Helligkeit	20
Minimale Größe	30 nm
Maximale Größe	150 nm
Spannung	OFF
Verdünnung mit Ampuwa	1:25

Die ZetaView Software (ZetaView 8.02.30.02) ermittelt innerhalb jeder Messung Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung von Anzahl und Durchmesser der Partikel. Außerdem werden Konzentration und *Drift* der Partikel erfasst.

Initial, sowie nach jeder nachfolgenden Messung, wurde die Messzelle mit 3 ml Ampuwa Spüllösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, HE, Deutschland) gereinigt, um potenziellen Verunreinigungen zu entfernen. Dem wurde ein „*Cell check*“ bis zum Erreichen einer sehr guten „*Cell quality*“ angeschlossen. Nach Applikation der Proben wurde die initial beschleunigte Geschwindigkeit mittels „*Check Particle Drift at 0V*“ überprüft und vor dem Beginn einer Messung ein *particle drift* unter 30 µm/s abgewartet.

Jede Messung setzte sich aus drei Wiederholungen („*Number of Experiments*“) bestehend aus zehn Zyklen („*#Cycles*“) zusammen. Dabei wurde jeweils auf elf Positionen („*Positions 11*“) die Messgröße („*Size*“) mit einer langsamen Aufnahmegeschwindigkeit („*Low*“) analysiert.

2.4 Histologische Färbung

2.4.1 Alizarinrot-Färbung

Die Alizarinrot-Färbung dient dem Nachweis sowie der anschließenden Quantifizierung von Kalziumablagerungen innerhalb der VIC-Kultur. Im Zuge dessen bilden Alizarinrot-S und Kalziumphosphat, welches unter degenerativen Bedingungen in der extrazellulären Matrix der VICs entsteht, einen anfärbbaren Chelatkomplex [85].

Für die Färbung wurden die Zellen nach Ablauf der jeweiligen Behandlungsdauer zunächst mit PBS gewaschen und im Anschluss für 10 min mit 4 %iger Formaldehydlösung fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die VIC für 20 min mit 2 %iger Alizarinrot-Lösung inkubiert. Ungebundenes Alizarinrot wurde in der Folge durch zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser (dH₂O) entfernt.

Tabelle 9: 2%ige Alizarinrot-Lösung

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
Alizarinrot-S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 0348.3	2 g
destilliertes Wasser (dH ₂ O)		ad 100 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 4,2 eingestellt. Vor Verwendung wurde die Lösung steril filtriert und anschließend lichtgeschützt gelagert.

2.4.2 Alizarinrot-Quantifizierung

Eine Fotodokumentation erfolgte zum einen makroskopisch, unter Hinzunahme eines *light pads* (Slimlite LED, KAISER, Buchen, BW, Deutschland), zum anderen mittels eines Inversmikroskops (DM IL LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, HE, Deutschland). Für die abschließende Quantifizierung wurde Alizarinrot mittels 100 mM Cethylpyridinium Chlorid Monohydrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art.-Nr. PHR1226) für 3 Stunden bei Raumtemperatur (RT) extrahiert und die Absorption bei 540 nm unter Hinzunahme des Infinite M1000 pro microplate reader (Tecan, Männerdorf, ZH, Schweiz) gemessen.

2.5 Proteinbiochemie

2.5.1 Proteinbestimmung mittels *Bicinchoninic acid assay*

Mittels eines *Bicinchoninic acid assay* (BCA) wurde die totale Proteinkonzentration für nachfolgende Western-Blot-Analysen der VEC- und VIC-Zelllysate gemäß der Herstellerangaben (BCA-Protein Assay Kit; Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA; Art.-Nr. 71285-M) bestimmt. Prinzipiell reagieren dabei zweiwertige Kupferionen unter Hinzugabe von Protein zu einwertigen Kupferionen. Letztere erzeugen unter Addition von Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption photometrisch erfasst wird [86].

Eine bovine Serum Albumin (BSA; Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA; Art.-Nr. A9418) Standardreihe, von 0 µg/µl bis 1 µg/µl, wurde ebenso wie die untersuchten Proben in Duplikaten in eine 96-Well Platte (Cellstar® Multiwellplatte, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, OÖ, Österreich; Art.-Nr. 651204) pipettiert. Im Verhältnis von einem Teil *Reagent A* und 50 Teilen *Reagent B* wurden 200 µl des *Working Reagent* jedem Well hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde die Absorption bei 562 nm mithilfe des *Infinite M1000 pro microplate reader* (Tecan, Männedorf, ZH, Schweiz) quantifiziert. Die Konzentrationen des BSA-Standards wurden gegen die gemessene Absorption aufgetragen, um mittels eines linearen Gleichungssystems die Proteinkonzentrationen der untersuchten Proben zu bestimmen.

2.5.2 Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) erfolgte die Proteinseparation der VEC- und VIC-Zelllysate anhand deren Molekulargewicht, um eine quantitative Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression spezifischer Proteine anschließen zu können.

Hierfür wurden 10 µg bis 30 µg Zelllysate mit 4 x Protein-Gellade-Puffer (siehe Tabelle 10) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C zwecks Denaturierung erhitzt. Für die Proteinauftrennung wurden die so fertiggestellten Proben gemeinsam mit einem Proteingrößenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; Art.-Nr. 26616) in ein Polyacrylamidgel, bestehend aus einem weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel, überführt. Das Polyacrylamidgel wurde, umgeben von Laufpuffer, in eine

Elektrophoresekammer (Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA; Art.-Nr. 1658004) eingespannt. Initial wurde eine Spannung von 60 Volt (V) gewählt, bis die Lauffront der Proteinkomplexe an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel konzentriert war. Danach wurde die Spannung auf 150 V, bis zum Abschluss der SDS-PAGE, erhöht. Die Zusammensetzung der in der SDS-PAGE verwendeten Komponenten findet sich in Tabelle 11 und 12.

Tabelle 10: Ladepuffer SDS-PAGE

Komponente	Hersteller und Art.-Nr.	Endkonzentration
Tris/HCl pH 6,8	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 4855.5	62,5 mM
Glycerin 60%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 3793.2	10 %
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland CN30.4	70 mM
Dithiothreitol	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA R0862	100 mM
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA B0126	0,01 %
destilliertes Wasser (dH ₂ O)		10 ml

Tabelle 11: Laufpuffer SDS-PAGE

Komponente	Hersteller und Art.-Nr.	Endkonzentration
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 4855.5	25 mM
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BW, Deutschland 23390.03	200 mM
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland CN30.4	0,1 %

der pH wurde im gebrauchsfertigen Puffer auf 8,3 eingestellt

Tabelle 12: Gelzusammensetzung SDS-PAGE

Komponente	Hersteller und Art.-Nr.	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
40 % Acrylamid-/Bisacrylamid Stammlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland A515.1	2,5 ml	500 µl
1 M Tris-Base in dH ₂ O (pH 6,8)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 4855.5	-	1,26 ml
1,5 M Tris-Base in dH ₂ O (pH 8,8)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 4855.5	2,5 ml	-
10 % SDS (w/v in dH ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland CN30.4	100 µl	
10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v in dH ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, HE, Deutschland 215589	50 µl	25 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA 161-0801	5 µl	5 µl
destilliertes Wasser (dH ₂ O)		4,85 ml	3,18 ml

2.5.3 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient der quantitativen Erfassung der zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch einen Transfer dieser Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Bio-RAD, Laboratories Inc., Hercules, CA, USA; Art.-Nr. 1620112) [87].

Unter Hinzunahme von Chromatographiepapier (Whatman 3MM CHR, Merck KGaA, Darmstadt, HE, Deutschland; Art.-Nr. WHA3030917) fand dieser Transfer, umgeben von gekühltem Transferpuffer, in einem Elektrobloetter (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BY, Deutschland) für 90 min bei 100 V statt. Die entsprechenden Nitrozellulosemembranen wurden danach für die weitere Verwendung in 50 ml *Centrifuge Tubes* (50 ml Falcon®, VWR®, Radnor, PA, USA; Art.-Nr. 525-0397) überführt. Im Anschluss wurden die freien Proteinbindungsstellen mit einer 5 %igen bovinen Serumalbumin (BSA) -

Blockierlösung für eine Stunde bei RT blockiert. Hierfür verwendete Komponenten finden sich in Tabelle 13 bis 15.

Tabelle 13: Transferpuffer Western-Blot-Analysen

Komponente	Hersteller und Art.-Nr.	Endkonzentration
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 4855.5	25 mM
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BW, Deutschland 23390.03	200 mM
Methanol	VWR®, Radnor, PA, USA 20847.320	20 %

Tabelle 14: Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween- 20 (TBST) Puffer

Komponente	Hersteller und Art.-Nr.	Endkonzentration
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 4855.5	10 mM
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BW, Deutschland 9265.2	150 mM
Tween-20	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA P1379	0,1%

Der pH-Wert wurde vor Verwendung auf 7,6 eingestellt.

Tabelle 15: 5%ige bovine Serumalbumin (BSA) – Blockierlösung

Substanz	Hersteller und Art.-Nr.	Konzentration
BSA	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA; Art.-Nr. A9418	2,5 g
TBST		ad 50 ml

2.5.4 Immundetektion

Im Anschluss an den Western-Blot-Vorgang fand im Rahmen der Immundetektion die Inkubation mit dem Primärantikörper rotierend bei 4 °C ü.N. statt. Durch dreimaliges Waschen der Nitrozellulosemembran mit Tris-gepufferter Salzlösung, inklusive Tween- 20 (TBST) Puffer für jeweils 5 min am nächsten Morgen, konnten Reste hiervon entfernt werden. Entsprechende Fluoreszenz-gekoppelte-Sekundärantikörper wurden anschließend für eine Stunde bei RT hinzugegeben. Es folgte erneut ein dreischrittiger Waschvorgang mit TBST. Die genutzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 16 und 17 genannt.

Nach Behandlung mit Western Bright Quantum (Advansta Inc., San Jose, CA, USA; Art.-Nr. K-12042-D10) erfolgte die Detektion der Fluoreszenzsignale am Amersham Imager (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Die Auswertung wurde mithilfe der Software ImageQuant TL (Version v8.1.0.0; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Tabelle 16: Primärantikörper für Western-Blot-Analysen

Antigen	Spezies	Verdünnung (in 5%iger BSA- Blockierlösung)	Inkubationszeit, - temperatur	Hersteller und Art.- Nr.
alpha smooth muscle actin (α -SMA)	Maus	1/1000	über Nacht (ü.N.) 4 °C	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA A5228
Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)	Kaninchen	1/1000	ü.N., 4 °C	Cell Signaling, Danvers, MA, USA 4915S
Glyceraldehyd- 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Kaninchen	1/1000	ü.N., 4 °C	Cell Signaling, Danvers, MA, USA CS2118
Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	Kaninchen	1/1000	ü.N., 4 °C	Cell Signaling, Danvers, MA, USA 13662
Vimentin	Maus	1/1000	ü.N., 4°C	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, BW, Deutschland 10515
Vascular endothelial (VE) -cadherin	Kaninchen	1/1000	ü.N., 4 °C	Abcam, Cambridge, UK 33168

Tabelle 17: Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

Antigen	Spezies	Verdünnung (in 5%iger BSA- Blockierlösung)	Inkubationszeit, - temperatur	Hersteller und Art.-Nr.
<i>Anti-mouse</i> HRP- gekoppelt	Ziege	1/10 000	1 Stunde, RT	Jackson Immuno, Cambridge, UK 115-035-044
<i>Anti-rabbit</i> HRP- gekoppelt	Ziege	1/10 000	1 Stunde, RT	Jackson Immuno, Cambridge, UK 111-035-003

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und anschließende graphische Darstellung der Daten als Mittelwert \pm Standardfehler (engl.: *standard error of the mean*, SEM) erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism Version 9.5.0 für macOS (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Bei vergleichender Darstellung zweier Gruppen wurde ein *Mann-Whitney U test* durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurden die erhobenen Ergebnisse mittels eines *Kruskal-Wallis test* sowie *Dunn's multiple comparisons test* statistisch analysiert und relativ zu einer Kontrolle dargestellt. P-Werte $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet und dementsprechend gekennzeichnet.

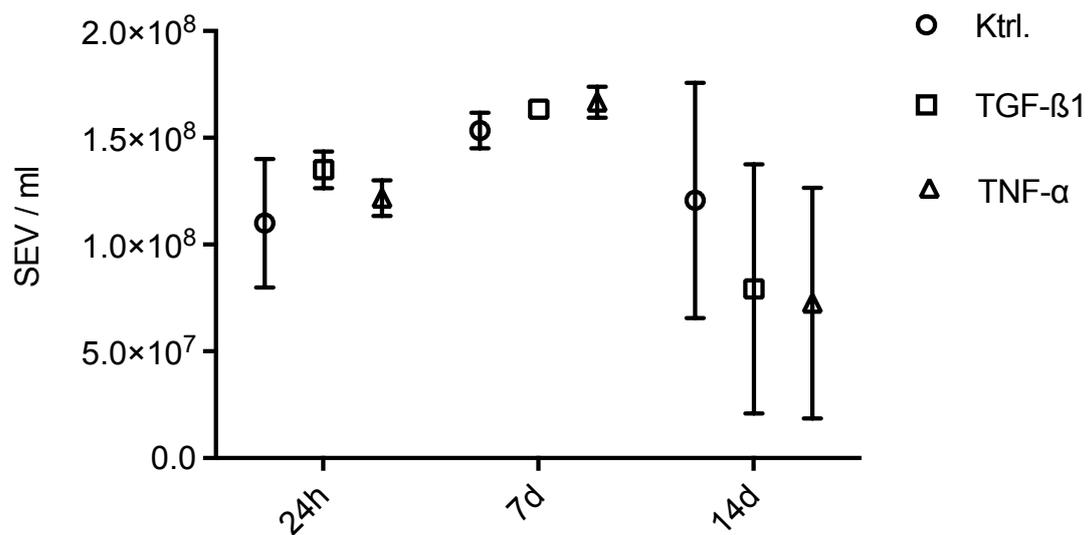
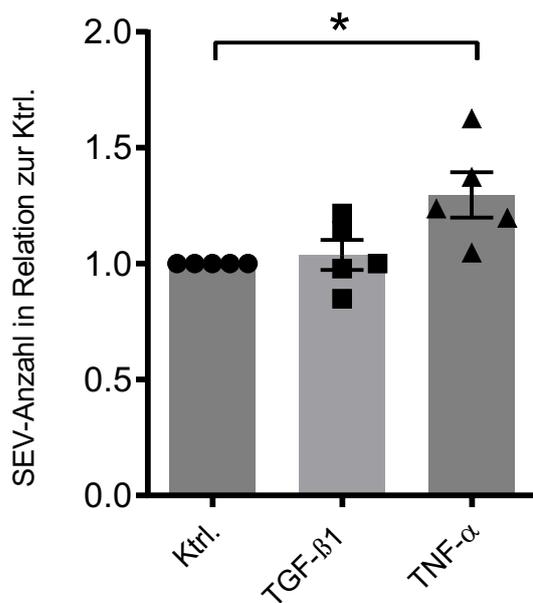
3 Ergebnisse

3.1 NTA der freigesetzten SEV primärer humaner VEC

Zwecks Protokolletablierung wurden innerhalb der Vorversuche die primären humanen VEC mit 10 ng/ml TGF- β 1 sowie 10 ng/ml TNF- α für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert (siehe 3.3). Nach Abschluss der jeweiligen Inkubationsdauer von 24 Stunden, 7 und 14 Tagen wurden die SEV aus den VEC-Zellkulturüberständen isoliert. Es folgte eine quantitative Messung der SEV mittels NTA.

Bereits nach 24-stündiger Inkubation mit TGF- β 1 und TNF- α wurde eine erhöhte SEV-Sekretion in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt (Ktrl.: $1,1 \times 10^8$ SEV/ml \pm $3,014 \times 10^7$ SEV/ml; TGF- β 1: $1,35 \times 10^8$ SEV/ml \pm $8,66 \times 10^6$ SEV/ml; TNF- α : $1,217 \times 10^8$ SEV/ml \pm $8,333 \times 10^6$ SEV/ml). Nach siebentägiger Inkubation war die höchste endotheliale SEV-Sekretion zu beobachten (Ktrl.: $1,533 \times 10^8$ SEV/ml \pm $8,333 \times 10^6$ SEV/ml; TGF- β 1: $1,633 \times 10^8$ SEV/ml \pm $3,333 \times 10^6$ SEV/ml; TNF- α : $1,667 \times 10^8 \pm 7,265 \times 10^6$ SEV/ml). Dabei ergab die durch TNF- α ausgelöste VEC-Aktivierung nach 7 Tagen eine signifikant erhöhte relative SEV-Freisetzung der VEC, vergleichend zur unbehandelten Kontrollgruppe (Ktrl.: 1,00 vs. TNF- α : $1,297 \pm 0,097$, $p=0,0235$). Nach 14 Tagen sank die gemessene Anzahl der SEV in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe wieder (Ktrl.: $1,207 \times 10^8$ SEV/ml \pm $5,502 \times 10^7$ SEV/ml; TGF- β 1: $7,923 \times 10^7$ SEV/ml \pm $5,827 \times 10^7$ SEV/ml; TNF- α : $7,263 \times 10^7$ SEV/ml \pm $5,403 \times 10^7$ SEV/ml).

Insgesamt geht eine degenerative oder aktivierende Inkubationsdauer der VEC von 7 Tagen mit der höchsten freigesetzten SEV-Anzahl und gleichzeitig geringster Streuung der Messwerte einher, weshalb innerhalb der Hauptversuche isolierte SEV einer siebentägigen VEC-Kultur verwendet wurden. Abbildung 10 zeigt die vergleichenden Messwerte der SEV-Freisetzung.

A**B****Abb. 10: Endotheliale SEV-Sekretion**

Die SEV-Freisetzung (SEV/ml) der VEC wurde quantitativ mittels NTA erfasst. In **A** sind die detektierten SEV-Mittelwerte \pm SEM, nach Kulturdauer und zugefügten Agenzien sortiert, dargestellt (n=3). In **B** zeigt sich eine signifikante Zunahme der SEV-Freisetzung nach siebentägiger Inkubation mit TNF- α . Dargestellt sind SEV-Mittelwerte \pm SEM (n=5). Signifikanzen wurden berechnet mit ANOVA (Kruskal-Wallis mit Dunn's multiple comparisons). * p=0,0235. Abkürzungen: d – days, h – hours, Ktrl. – Kontrolle, NTA – Nanopartikel-Tracking-Analyse, SEV – small extracellular vesicles, TGF- β 1 - Transforming growth factor beta 1, TNF- α – Tumor nekrosis factor alpha

3.2 Effektivität der SEV-Isolation mittels *ExoQuick-TC Precipitation Solution*

Nach der Isolation der SEV aus den VEC-Kultur-Überständen unter Hinzunahme von *ExoQuick-TC Precipitation Solution* wurde die SEV-Anzahl in den Restüberständen mithilfe der NTA gemessen, um die Effektivität der Isolation zu überprüfen. Unter Beibehaltung der in den Grundeinstellungen (Tabelle 8) zuvor festgelegten Sensitivität von 70% waren in den Restüberständen keine SEV mehr nachweisbar. Nur bei einer erhöhten Sensitivität von 85% konnten noch einzelne SEV detektiert werden. Die Anzahl an SEV im Isolat zeigte sich signifikant erhöht verglichen mit den entsprechenden Restüberständen (Isolat: $5,55 \times 10^7$ SEV/ml \pm $5,232 \times 10^6$ SEV/ml vs. Restüberstand: $1,537 \times 10^7$ SEV/ml \pm $1,886 \times 10^6$ SEV/ml; $U=0$, $p=0,0286$). Es ist davon auszugehen, dass der Großteil der SEV durch die Isolation mittels *ExoQuick-TC Precipitation Solution* erfasst wurde und diese somit erfolgreich war. Ferner wurden mittels *ExoQuick-TC Precipitation Solution* SEV mit einem *peak* von 149,3 nm bei $4,9 \times 10^6$ Partikeln/ml isoliert.

Abbildung 11 zeigt diesbezüglich beispielhafte Messkurven der NTA sowie eine vergleichende Gegenüberstellung von Isolat und Restüberständen.

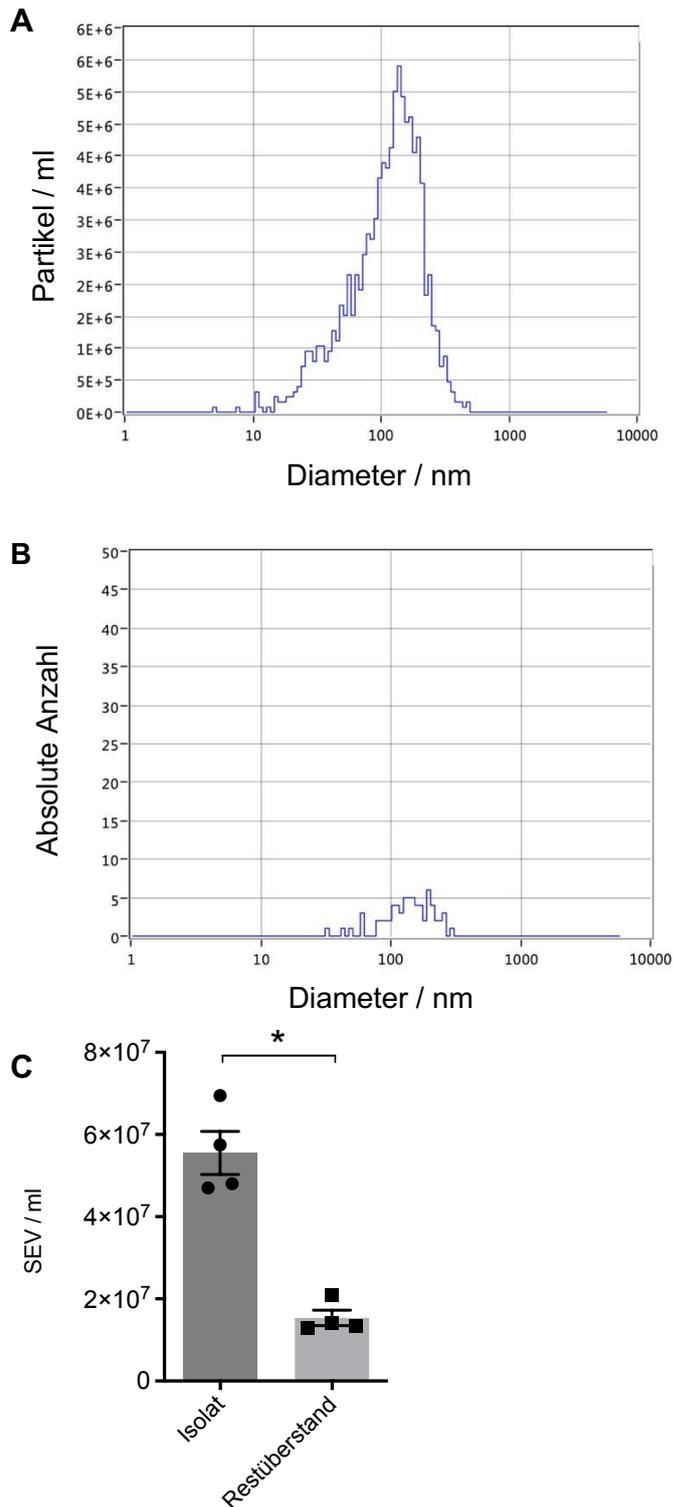


Abb. 11: Isolat und Restüberstände nach SEV-Isolation

A zeigt eine beispielhafte SEV-Messung des Isolats unter Beibehaltung der in Tabelle 8 aufgeführten Grundeinstellungen. Die in **B** gezeigte Messkurve bei 85% Sensitivität macht deutlich, dass die Restüberstände kaum noch detektierbare SEV enthalten. In **C** dargestellt sind Mittelwert \pm SEM beispielhafter Messungen der Restüberstände im Vergleich zu den isolierten SEV ($n=4$). Im Isolat zeigten sich signifikant mehr SEV als in den Restüberständen. Signifikanzen wurden berechnet mit Mann-Whitney. * $p=0,0286$. Abkürzungen: SEV – *small extracellular vesicles*

3.3 Degeneration und inflammatorische Aktivierung primärer humaner VEC

3.3.1 Morphologie der VEC

Zwecks Protokolletablierung wurden innerhalb der Vorversuche die primären humanen VEC unter Hinzugabe von 10 ng/ml TGF- β 1 zur EndMT-ähnlichen Degeneration sowie unter Addition von 10 ng/ml TNF- α zur inflammatorischen Aktivierung angeregt [40, 42]. Die zuvor genannten Agenzien wurden dem VEC-Kulturmedium für unterschiedlich lange Zeiträume zugesetzt. Die Kultur erfolgte über 24 Stunden, 7 Tage und 14 Tage. Die ausgesäte Zellzahl betrug stets 100 000 VEC pro Kavität einer sechs-Kavitäten fassenden Mikrotiterplatte. Dabei wurden die morphologischen Veränderungen des Zellrasens in mikroskopischen Aufnahmen festgehalten. Abbildung 12 zeigt exemplarische Aufnahmen.

Dabei wurde unter einer TGF- β 1 hervorgerufenen VEC-Degeneration eine moderat verminderte Konfluenz im Vergleich zur Kontrollkultur hervorgerufen. Insbesondere nach einer 14-tägigen Kulturdauer fanden sich zunehmend avitale und beschädigte VEC wieder. Die Aktivierung der VEC mithilfe von TNF- α war bereits nach 24 Stunden beginnend, nach 7 Tagen deutlich, anhand einer spindelförmigen Konformationsänderung, sichtbar. Auch hier fanden sich in mikroskopischer Begutachtung nach 14 Tagen vermehrt avitale Zellreste und eine Proteinaufreinigung aus den VEC war deutlich erschwert. Ebenso wurde eine deutliche Zunahme der Schwankungen der isolierten SEV-Zahl beobachtet (siehe Abbildung 10A). Somit wurde die Kultivierungsdauer für die anschließenden Hauptversuche auf 7 Tage festgelegt.

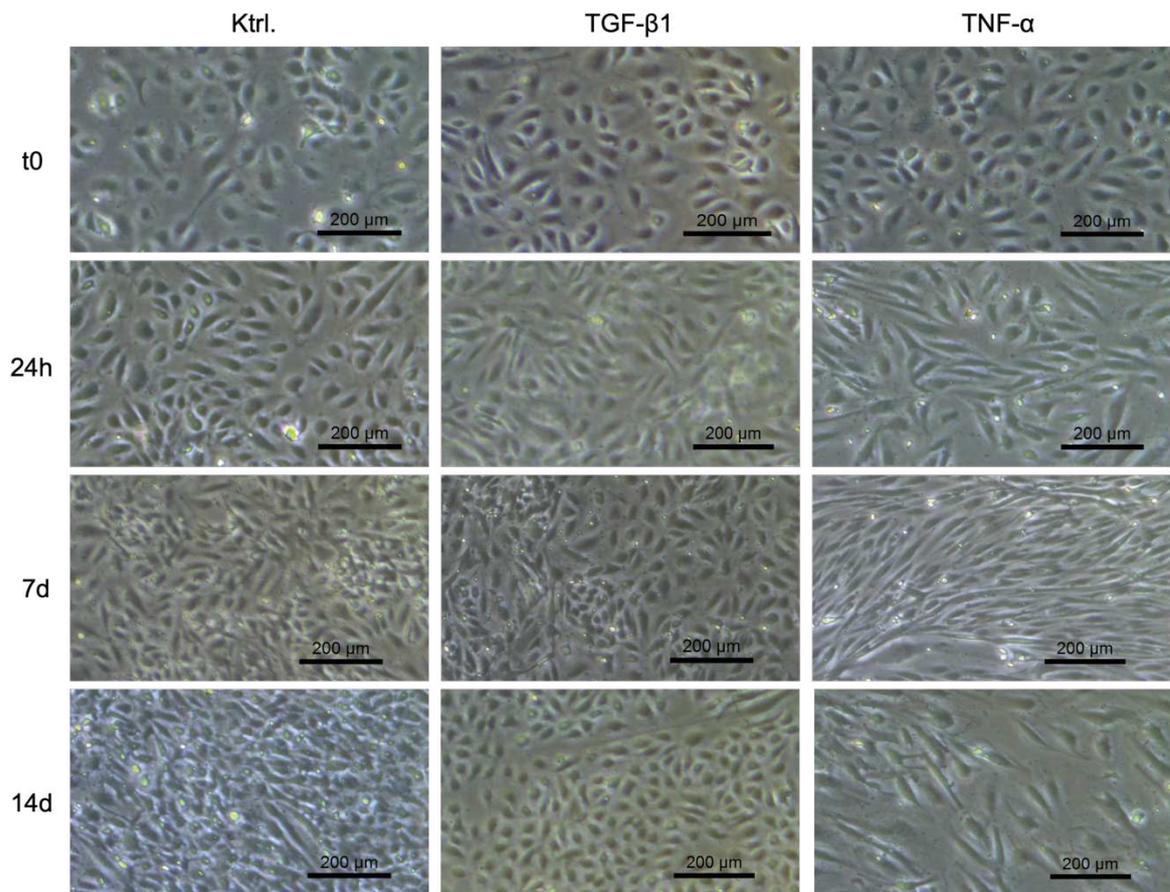


Abb. 12: Mikroskopaufnahmen degenerativ veränderter und aktivierter VEC

Abgebildet sind durchlichtmikroskopische Aufnahmen der VEC-Kultur bei Behandlungsbeginn, nach 24 Stunden, 7 Tagen und 14 Tagen nach Addition von 10 ng/ml TGF-β1 oder 10 ng/ml TNF-α. Während VEC der Kontrollgruppe bis auf eine zunehmende Konfluenz auch nach 14 Tagen keine wesentlichen morphologischen Unterschiede aufwies, zeigten die mit TNF-α aktivierten VEC bereits nach 24 Stunden eine progredient spindelförmige Erscheinung. Unter einer TGF-β1 induzierten Degeneration war rein morphologisch eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte Konfluenz zu beobachten. 10-fache Vergrößerung. Maßstab: 200 µm. Abkürzungen: d – days, h – hours, Ktrl – Kontrolle, TGF-β1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF-α – *Tumor nekrosis factor alpha*, VEC – *valvular endothelial cells*

3.3.2 Western-Blot-Analysen der VEC

Eine vergleichende Untersuchung der VEC-Kultivierungsdauer fand mittels Western-Blot-Analysen auch auf Proteinebene statt.

Der in der Literatur gängige EndMT-Nachweis nach TGF- β 1-induzierter Degeneration durch eine erhöhte Proteinexpression von α SMA wurde auch in dieser Arbeit genutzt [42]. Bei α SMA handelt es sich um eine Isoform des Aktin, welche physiologisch in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur zu finden ist. Im Rahmen der CAVD wird α SMA auch von Myofibroblasten exprimiert, was auf fibrotische Umbauprozesse zurückführen ist [88]. Zu allen drei untersuchten Zeitpunkten wiesen mit TGF- β 1 behandelte VEC eine höhere relative α SMA-Proteinexpression als die jeweilige unbehandelte Kontrollgruppe auf (Ktrl.: 24h: 1,0 vs. TGF- β 1: 24h: $1,44 \pm 0,106$; Ktrl.: 7d: 1,0 vs. TGF- β 1: 7d: $1,416 \pm 0,195$; Ktrl.: 14d: 1,0 vs. TGF- β 1: 14d: $2,12 \pm 0,156$). (Abbildung 13 A).

VE-cadherin als endothel-spezifisches Adhäsionsmolekül spielt eine entscheidende Rolle im physiologischen Stoffwechsel der VEC. Intakte Zell-Zellkontakte, Leukozyten-Invasion und Zellproliferation werden u.a. von VE-cadherin mitreguliert [89]. Eine herunterregulierte bzw. allenfalls konstante VE-cadherin-Proteinexpression ist folglich als Hinweis einer VEC-Degeneration auf Basis einer Zellschädigung zu werten [90]. Diese reduzierte VE-cadherin-Proteinexpression nach induzierter Zellschädigung durch TGF- β 1 fand sich in den durchgeführten Vorversuchen v.a. in der siebentägigen VEC-Kultur wieder (Ktrl.: 7d: 1,0 vs. TGF- β 1: 7d: $1,052 \pm 0,559$). Abbildung 13 B zeigt die entsprechenden Western-Blot-Analysen.

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vorrangig von Makrophagen ausgeschüttet wird [91, 92] und als Initiator einer systemischen Entzündungsreaktion aufgefasst wird [93]. Letztendlich ist diese Entzündungsreaktion auch an der Pathogenese der CAVD, inklusive Bildung arteriosklerotischer Plaques, beteiligt [94]. Daher wurde TNF- α in dieser Arbeit zur pathologischen Aktivierung der VEC genutzt. Mehrere Studien belegen, dass eine durch TNF- α induzierte Entzündungsreaktion zu einer erhöhten Expression von *Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM) und *Intracellular adhesion molecule-1*

(ICAM) durch Aktivierung des *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF-κB) und Ap-1 Weges führt [95, 96]. Die Aktivierung der VEC durch TNF-α wurde daher über die Proteinexpression von ICAM und VCAM untersucht.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten zeichnete sich unter TNF-α-Stimulation eine deutlich erhöhte Expression von ICAM (Ktrl.: 24h: 1,0 vs. TNF-α: 24h: 29,31 ± 7,451, p=0,0459; Ktrl.: 7d: 1,0 vs. TNF-α: 7d: 10,03 ± 5,991, p=0,1377; Ktrl.: 14d: 1,0 vs. TNF-α: 14d: 20,18 ± 14,27, p=0,0459) und VCAM (Ktrl.: 24h: 1,0 vs. TNF-α: 24h: 73,91 ± 54,39, p=0,0127; Ktrl.: 7d: 1,0 vs. TNF-α: 7d: 12,97 ± 9,065, p=0,1377; Ktrl.: 14d: 1,0 vs. TNF-α: 14d: 12,43 ± 6,963, p=0,3448) in den mit TNF-α behandelten VEC im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ab. Entsprechende Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 13 C und D dargestellt.

Zusammenfassend konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass eine pathologische Aktivierung der VEC durch TNF-α, gekennzeichnet durch erhöhte ICAM - und VCAM-Proteinexpression, im Vergleich zur Kontrollkultur, erfolgreich war. Eine Degeneration der VEC durch TGF-β1 Zusatz wurde durch erhöhte αSMA-Proteinexpression und tendenziell reduzierter VE-cadherin-Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur bestätigt.

Aufgrund der abnehmenden Proteinkonzentration bei zunehmender Kulturdauer von 14 Tagen und demgegenüber insgesamt relativ geringer Streuung der Messwerte bei siebentägiger Kultur bestätigte auch die Western-Blot-Analyse die zuvor aufgrund von Morphologie und SEV-Freisetzung ausgewählte VEC-Kulturdauer von 7 Tagen für die nachfolgenden Hauptversuche.

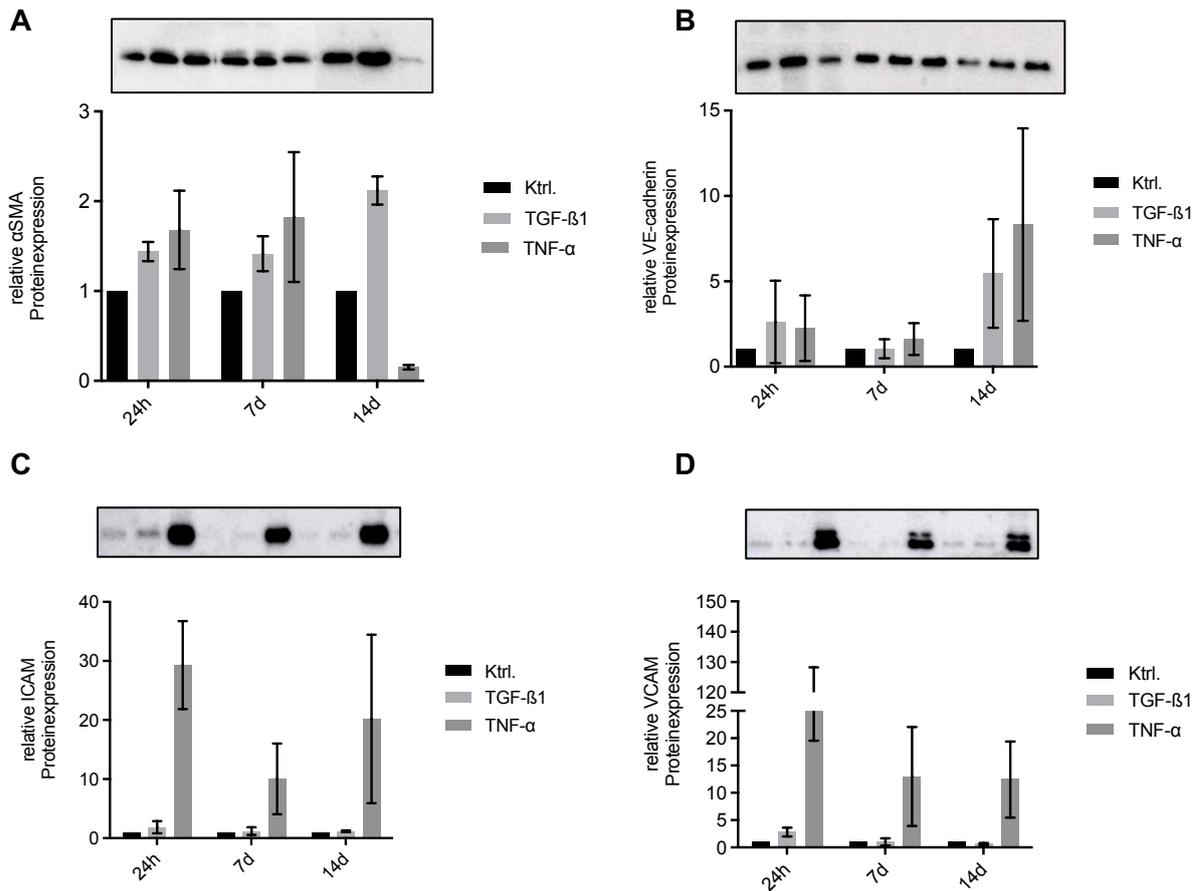


Abb. 13: Western-Blot-Analysen der VEC-Vorversuche

Relative Proteinexpression von α SMA (A), VE-cadherin (B), ICAM (C) und VCAM (D) nach Inkubation der VEC mit zugesetztem TGF- β 1 und TNF- α . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zur unbehandelten Kontrollgruppe nach 24 Stunden, 7 und 14 Tagen. (n=3). Abkürzungen: α SMA - *alpha smooth muscle actin*, d - *days*, h - *hours*, ICAM - *intercellular adhesion molecule*, Ktrl. - *Kontrolle*, TGF- β 1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF- α - *Tumor nekrosis factor alpha*, VCAM - *vascular cell adhesion molecule*, VEC - *valvular endothelial cells*, VE-cadherin - *Vascular endothelial cadherin*

3.4 Degeneration primärer humaner VIC

An der Pathogenese der CAVD sind VIC entscheidend beteiligt. Auf Basis einer anhaltenden Inflammation findet eine degenerative Transformation der VIC zum osteoblastischen Phänotyp statt [33, 45].

In den *in-vitro* Experimenten wurde das in der *Experimentellen Chirurgie* verbreitete Degenerationsmodell der VIC durch eine Inkubation mit β -GP und CaCl_2 auf humane primären VIC übertragen. Zur Protokolletablierung wurden auch hier verschiedene Zeiträume der degenerativen Kultur getestet. Nach 24 Stunden, 48 Stunden, 4 Tagen und 6 Tagen erfolgte die Begutachtung anhand der Morphologie, den Ergebnissen der Alizarinrot-Färbung und der Western-Blot-Analyse. Die Aussaat erfolgte stets mit 100 000 Zellen bzw. mit 30 000 Zellen in den 48-Well-Zellkulturplatten für die Alizarinrot-Färbung.

3.4.1 Morphologie der VIC

Morphologische Veränderung der VIC-Kultur wurden durchlichtmikroskopisch festgehalten. VIC der Kontrollgruppe wiesen auch nach sechstägiger Kultur keine morphologischen Differenzen zum Ausgangsbild auf. Nach 24 Stunden zeigten die VIC unter degenerativen Bedingungen erste und nach 48 Stunden bereits deutliche morphologische Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 14). Es zeigte sich eine Volumenabnahme der einzelnen Zellen sowie eine Ausbildung knötchenartiger Strukturen. Mit weiter zunehmender Kulturdauer zeigten sich letztere progredient und die Dichte des Zellrasens nahm ab. Nach einer sechstägigen Inkubationsdauer der VIC unter degenerativen Bedingungen fanden sich durchlichtmikroskopisch vermehrt avitale Zellreste und eine adäquate Proteinaufreinigung war nicht mehr möglich. Die Kultivierungsdauer der primären humanen VIC wurde demzufolge für die Hauptversuche auf 4 Tage begrenzt. Hier waren morphologische Merkmale der Zelldegeneration ausreichend erfüllt und es fand sich dennoch ausreichendes Zellmaterial für nachfolgende Analysen. Abbildung 14 zeigt exemplarische Aufnahmen.

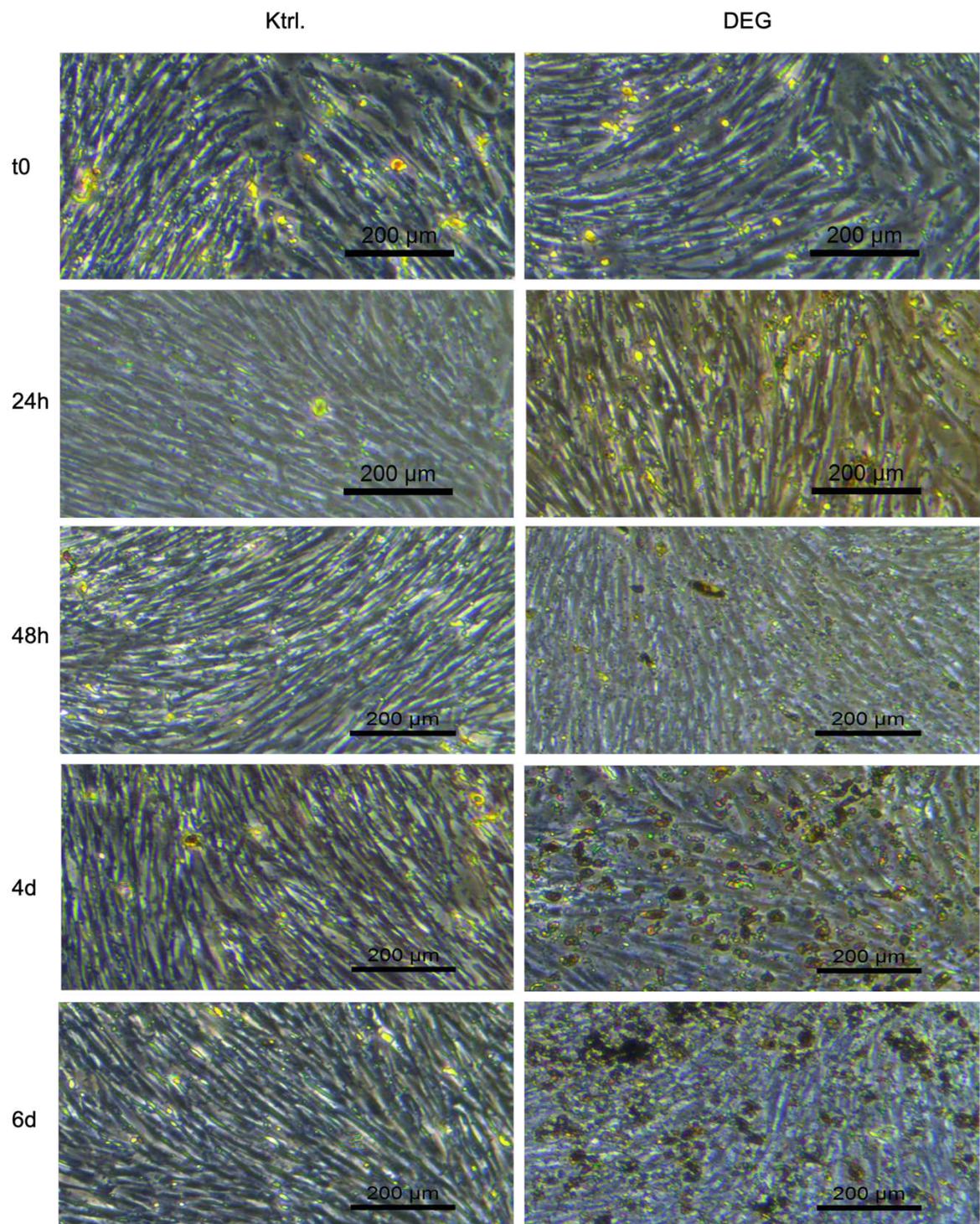


Abb. 14: Mikroskopaufnahmen von VIC unter degenerativen Bedingungen

Durchlichtmikroskopie primärer humaner VIC unter degenerativen Bedingungen am Tag des Inkubationsstartes sowie nach 24 Stunden, 48 Stunden, 4 und 6 Tagen. Vergleichsweise sind dieselben Zeitpunkte der Kontrollgruppe abgelichtet. Hier fanden sich keine morphologischen Veränderungen. Unter degenerativen Bedingungen hingegen zogen sich die einzelnen Zellen zusammen und avitale Zellreste formierten sich knötchenartig. 10-fache Vergrößerung. Maßstab: 200 µm. Abkürzungen: d – *days*, DEG – *degenerative Kulturbedingungen*, h – *hours*, Ktrl. – *Kontrolle*, VIC – *valvular interstitial cells*

3.4.2 Alizarinrot-Färbung der VIC

Die Alizarinrot-Färbung wurde verwendet, um die unter den degenerativen Bedingungen entstandenen Kalziumablagerungen zu erfassen. In der makroskopischen Fotodokumentation zeigte sich, mit 48 Stunden beginnend, eine progrediente Rotfärbung der degenerativ behandelten VIC-Kultur. Diese fand ihr Maximum nach 6 Tagen unter Zusatz von β -GP und CaCl_2 . Parallel dazu fanden sich in der unbehandelten Kontrollgruppe nach viertägiger Inkubation allenfalls leichte, rotanfärbbare Kalziumablagerungen. Nach 6 Tagen ließen sich auch hier zunehmend Kalziumchelatkomplexe anfärben.

Unter Berücksichtigung der durchgeführten relativen Alizarinrot-Zeitreihe (Ktrl.: 24h: 1,0 vs. DEG: 24h: $2,126 \pm 0,989$; Ktrl.: 48h: 1,0 vs. DEG: 48h: $2,224 \pm 0,635$; Ktrl.: 4d: 1,0 vs. DEG: 4d: $2,776 \pm 1,172$; Ktrl.: 6d: 1,0 vs. DEG: 6d: $3,105 \pm 0,233$) bestätigte sich die morphologisch gewählte VIC-Kulturdauer von 4 Tagen für die Hauptversuche. Denn eine deutliche Rotfärbung im Sinne der Degeneration, bei gleichzeitig gering beeinträchtigter Kontrollgruppe, war zu vernehmen. Abbildung 15 zeigt entsprechende mikroskopische und makroskopische Aufnahmen sowie die dazugehörige Alizarinrot-Quantifizierung.

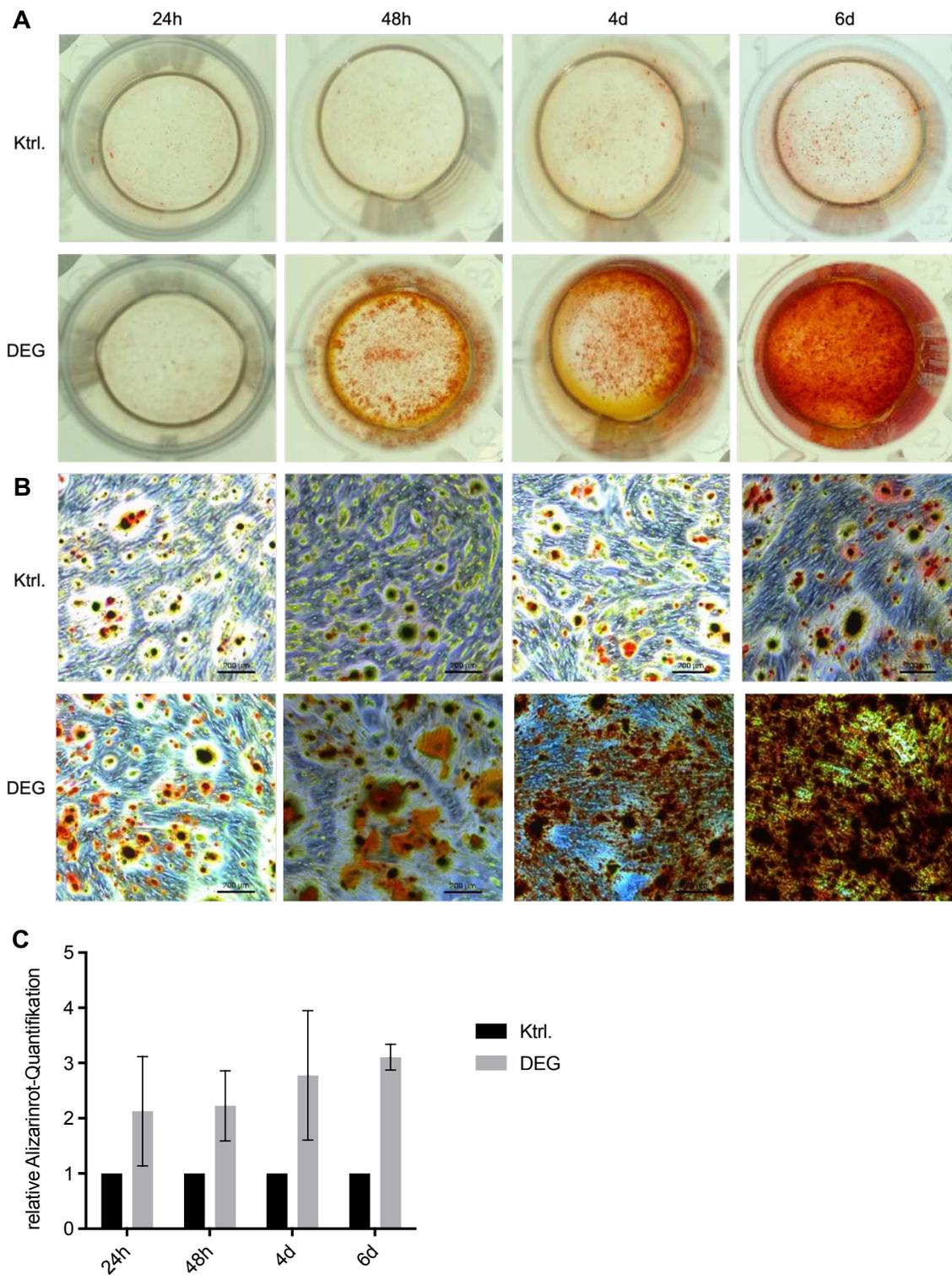


Abb. 15: Alizarinrot-Färbung der VIC-Vorversuche

A zeigt makroskopische Aufnahmen nach Alizarinrot-Färbung von Kalziumablagerungen der VIC-Kultur nach 24 Stunden, 48 Stunden, 4 und 6 Tagen unter degenerativen Bedingungen. **B** zeigt die mikroskopischen Aufnahmen nach Alizarinrot-Färbung zu den o.g. Zeiträumen. 5-fache Vergrößerung. Maßstab: 200 μ m. In **C** ist die Alizarinrot-Quantifizierung nach absorptiver Messung der Kontrollgruppe und degenerativ behandelten VIC dargestellt (n=3). Abkürzungen: d – days, DEG – degenerative Kulturbedingungen, h – hours, Ktrl. – Kontrolle, VIC – valvular interstitial cells

3.4.3 Western-Blot-Analysen der VIC

Durch den Zusatz von β -GP und CaCl_2 degenerieren VIC und eine osteoblastische Transformation der VIC folgt. Um diese auf Proteinebene nachzuweisen, erfolgte eine Quantifikation mittels Western-Blot-Analysen. Hierbei wurde die Proteinexpression von α SMA und Vimentin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe nach 24 Stunden, 48 Stunden, 4 und 6 Tagen untersucht und mittels einer relativen α SMA/Vimentin-Proteinratio in Abbildung 16 dargestellt.

Vimentin ist ein Typ-3 Intermediärfilament, v.a. in mesenchymalen Zellen vorkommend, und stabilisiert das Zytoskelett entgegen potenzieller Zellschäden [97]. In osteoblastisch transformierten VIC ist Vimentin vermindert nachweisbar [98]. Der Differenzierungsmarker α SMA ist bei Degeneration der VIC vermehrt nachweisbar [33].

Zu allen vier untersuchten Zeitpunkten wies die unbehandelte Kontrollgruppe der VIC eine niedrigere relative α SMA/Vimentin-Proteinexpression im Vergleich zur degenerativen VIC-Kultur auf. Mit zunehmender Kulturdauer stieg die relative α SMA/Vimentin-Proteinexpression der degenerativ behandelten VIC sukzessive bis zum Maximum am vierten Kulturtag an (relative α SMA/Vimentin-Proteinexpression nach 24h: $1,308 \pm 0,418$; 48h: $1,42 \pm 0,414$; 4d: $1,697 \pm 0,142$). Nach viertägiger degenerativer Inkubation zeigte sich gleichzeitig die geringste Streuung der Ergebnisse untersuchter Proben. Nach sechstägigem Zusatz von β -GP und CaCl_2 war eine reduzierte relative α SMA/Vimentin-Proteinexpression im Vergleich zur viertägigen degenerativen VIC-Kultur zu beobachten (4d: $1,697 \pm 0,142$ vs. 6d: $1,467 \pm 0,975$). Gleichzeitig zeigte sich hier eine deutlich größere Streuung der Ergebnisse analysierter Proben, zurückzuführen auf zunehmend avitale Zellreste, ersichtlich in der morphologisch mikroskopischen Begutachtung (siehe Abbildung 14)

Auf Basis dieser Western-Blot-Analysen eignet sich somit auch auf Proteinebene die viertägige degenerative VIC-Kultur für nachfolgenden beschriebene Experimente.

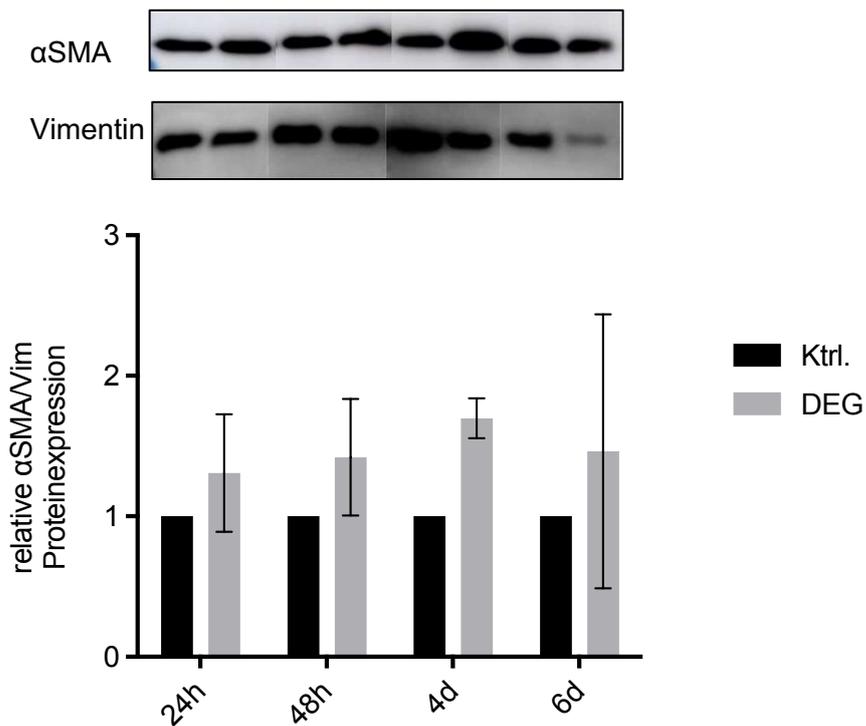


Abb. 16: Western-Blot-Analysen der degenerativen VIC-Kultur

Die erhöhte relative α SMA/Vimentin-Proteinexpression der jeweiligen degenerativen Behandlungsgruppen (hellgrauer Balken) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (schwarzer Balken) ist Ausdruck der widerfahrenen Zellschädigung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3) nach 24 Stunden, 48 Stunden, vier- und sechstägigem Zusatz von von β -GP und CaCl_2 . Abkürzungen: α SMA - *alpha smooth muscle actin*, β -GP - beta-Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat, CaCl_2 - Calciumchlorid, d – *days*, DEG – degenerative Kulturbedingungen, h – *hours*, Ktrl. – Kontrolle, VIC – *valvular interstitial cells*

3.5 Untersuchung einer VEC-SEV vermittelten Degeneration primärer humaner VIC

Durch initiale Endothelschädigung werden im Rahmen der CAVD endotheliale SEV freigesetzt. Die Zusammensetzung endothelialer SEV ändert sich im weiteren Progress der CAVD [65, 68-70]. Welchen Einfluss diese pathologisch veränderten SEV auf die weitere Pathogenese degenerativ veränderter VIC im Kontext der CAVD haben, ist bislang ungeklärt. Im Nachgang zur Protokolletablierung innerhalb der Vorversuche wurde daher die viertägige Degeneration der VIC unter Zugabe von isolierten, aktivierten bzw. degenerativ veränderten SEV aus einer siebentägigen VEC-Kultur untersucht.

3.5.1 Degeneration und inflammatorische Aktivierung von VEC

Um die Degeneration durch TGF- β 1 und die Aktivierung durch TNF- α der siebentägigen VEC-Kultur, vor der Isolation und weiteren Nutzung der endothelialen SEV, nachzuweisen, wurde entsprechend der Western-Blot-Analysen in Kapitel 3.3.2 die Proteinexpression untersucht.

Die unter TGF- β 1 Zusatz stehende VEC-Kultur zeigte eine erhöhte relative Proteinexpression des Differenzierungsmarkers α SMA im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Ktrl.: 1,0 vs. TGF- β 1: 1,597 \pm 0,181).

Das Adhäsionsmolekül VE-cadherin zeigte sich in den Behandlungsgruppen konstant zur unbehandelten Kontrollgruppe (Ktrl.: 1,0 vs. TGF- β 1: 1,17 \pm 0,104).

Die siebentägige TNF- α Stimulation der kultivierten VEC hatte eine signifikant gesteigerte relative Expression von ICAM (Ktrl.: 1,0 vs. TNF- α : 54,0 \pm 16,93, $p=0,0005$) und VCAM (Ktrl.: 1,0 vs. TNF- α : 81,05 \pm 35,52, $p=0,0001$) zur Folge. Abbildung 17 zeigt entsprechende Western-Blot-Analysen.

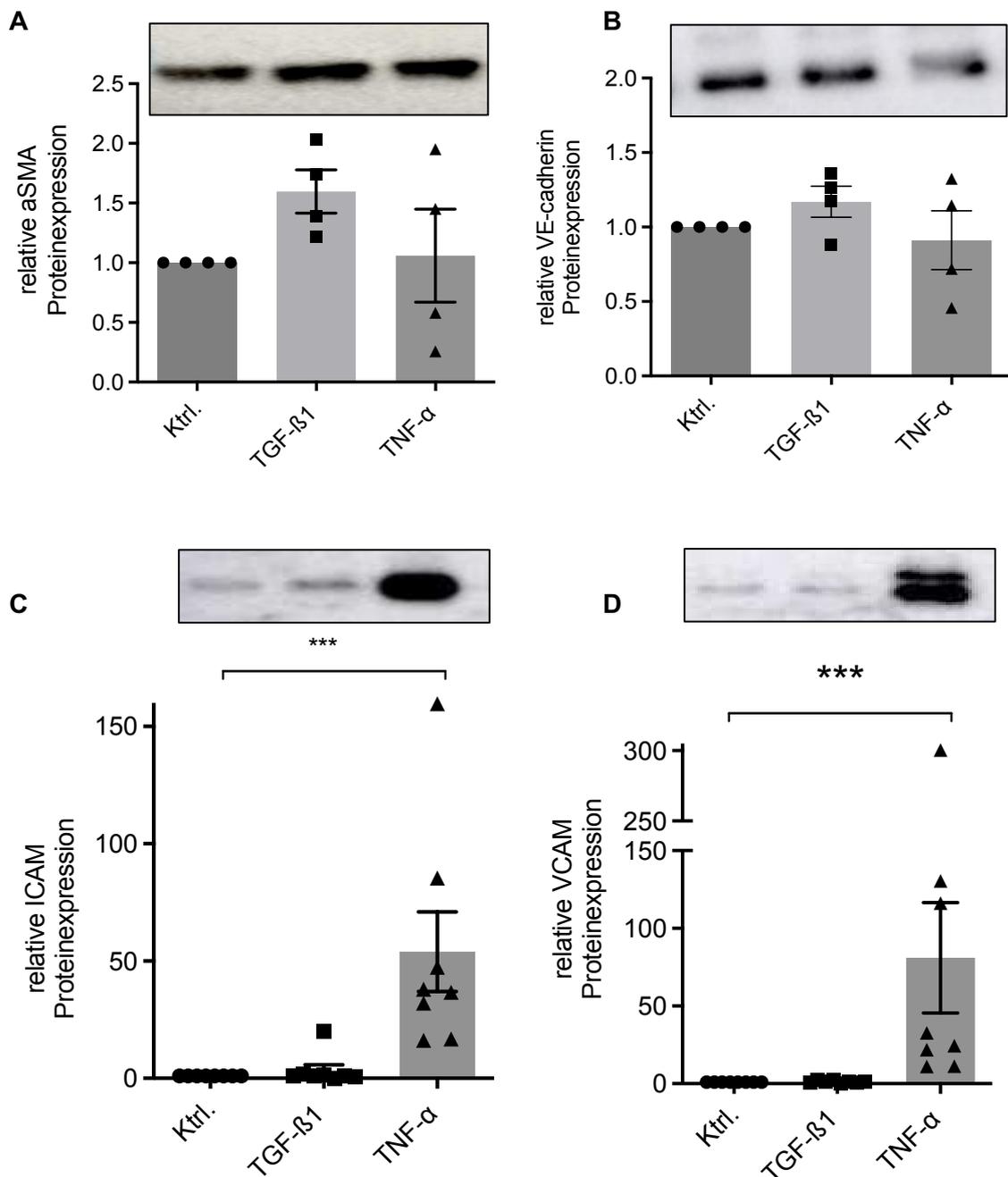


Abb. 17: Western-blot-Analysen der VEC-Hauptversuche

Quantifizierung der Western-blot-Analysen der relativen Proteinexpression von α -SMA (**A**), VE-cadherin (**B**), ICAM (**C**) und VCAM (**D**) der siebentägigen VEC-Kultur. Während ICAM und VCAM nach TNF- α Stimulation signifikant erhöht exprimiert werden, zeigt sich die Expression von α SMA in der TGF- β 1 Kultur ebenfalls tendenziell erhöht. Die Expression von VE-cadherin blieb durch die Behandlung wenig beeinflusst. Entsprechende Werte sind auf die unbehandelte Kontrollkultur bezogen und als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (n=4 bzw. n=7). Signifikanzen wurden berechnet mit ANOVA (Kruskal-Wallis mit Dunn's multiple comparisons). ICAM p=0,0005. VCAM p=0,0001. Abkürzungen: α SMA - *alpha smooth muscle actin*, ICAM - *intercellular adhesion molecule*, Ktrl. – Kontrolle, TGF- β 1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF- α – *Tumor nekrosis factor alpha*, VCAM - *vascular cell adhesion molecule*, VEC – *valvular endothelial cells*, VE-cadherin – *Vascular endothelial cadherin*

3.5.2 Einfluss von SEV einer VEC-Kontrollkultur auf die Degeneration von VIC

Die Degeneration primärer humaner VIC unter dem Einfluss endothelialer SEV wird nachfolgend beleuchtet.

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob isolierte SEV einer unbehandelten VEC-Kontrollkultur allein einen Effekt auf die Degeneration von VIC haben. Ebenso wurde analysiert, ob das aus unbehandelten VEC-Überständen gewonnene, konditionierte Medium (KM) die Degeneration der VIC beeinflusst. Im Zuge dessen wurden o.g. VIC-Kulturen mit einer unbehandelten VIC-Kontrollkultur und einer degenerativen VIC-Kultur nach 4 Tagen morphologisch, mittels Alizarinrot-Färbung und auf Proteinebene miteinander verglichen.

Während sich durchlichtmikroskopisch in der viertägigen degenerativen VIC-Kultur die Formation knötchenartiger Strukturen im Rahmen der Zellschädigung zeigte, blieben übrige VIC-Kulturen ohne offensichtliches morphologisches Korrelat. Abbildung 18 zeigt repräsentative Aufnahmen.

Innerhalb der viertägigen VIC-Kultur unter degenerativen Bedingungen zeigte sich der Nachweis von Alizarinrot in der relativen Quantifikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht (Ktrl.: 1,0 vs. DEG: $3,098 \pm 0,926$ $p= 0,0064$). Gleichzeitig wies die VIC-Kultur unter dem Zusatz von endothelialen SEV einer VEC-Kontrollkultur (Ktrl.: 1,0 vs. Ktrl.-SEV: $2,298 \pm 0,995$) oder unter KM einer VEC-Kontrollkultur (Ktrl.: 1,0 vs. Ktrl.-KM: $1,071 \pm 0,107$) keine vermehrt anfärbbaren Kalziumchelatkomplexe in der Alizarinrot-Färbung auf. Entsprechende mikro- und makroskopische Aufnahmen der Alizarinrot-Färbung und eine Quantifizierung sind in Abbildung 18 dargestellt.

Die Untersuchung der relativen α SMA/Vimentin-Proteinratio (Abbildung 18) zeigte keine Differenzen in der Proteinexpression innerhalb der Behandlungsgruppen in Bezug auf die unbehandelte Kontrollkultur (Ktrl.: 1,0; DEG: $1,134 \pm 0,236$; Ktrl.-SEV: $1,165 \pm 0,339$; Ktrl.-KM: $1,246 \pm 0,197$).

Insgesamt zeigte sich die VIC-Kultur durch additive SEV einer unbehandelten VEC-Kultur nicht beeinflusst. Primäre humane VIC einer Kultur mit KM einer unbehandelten VEC-Kultur zeigten ebenso keine Differenzen zur reinen VIC-Kontrollkultur.

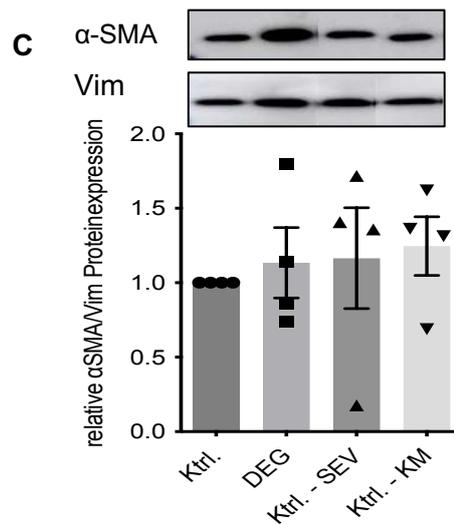
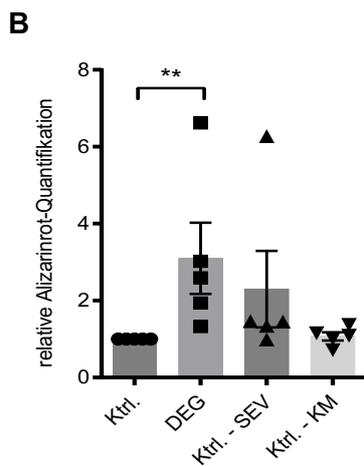
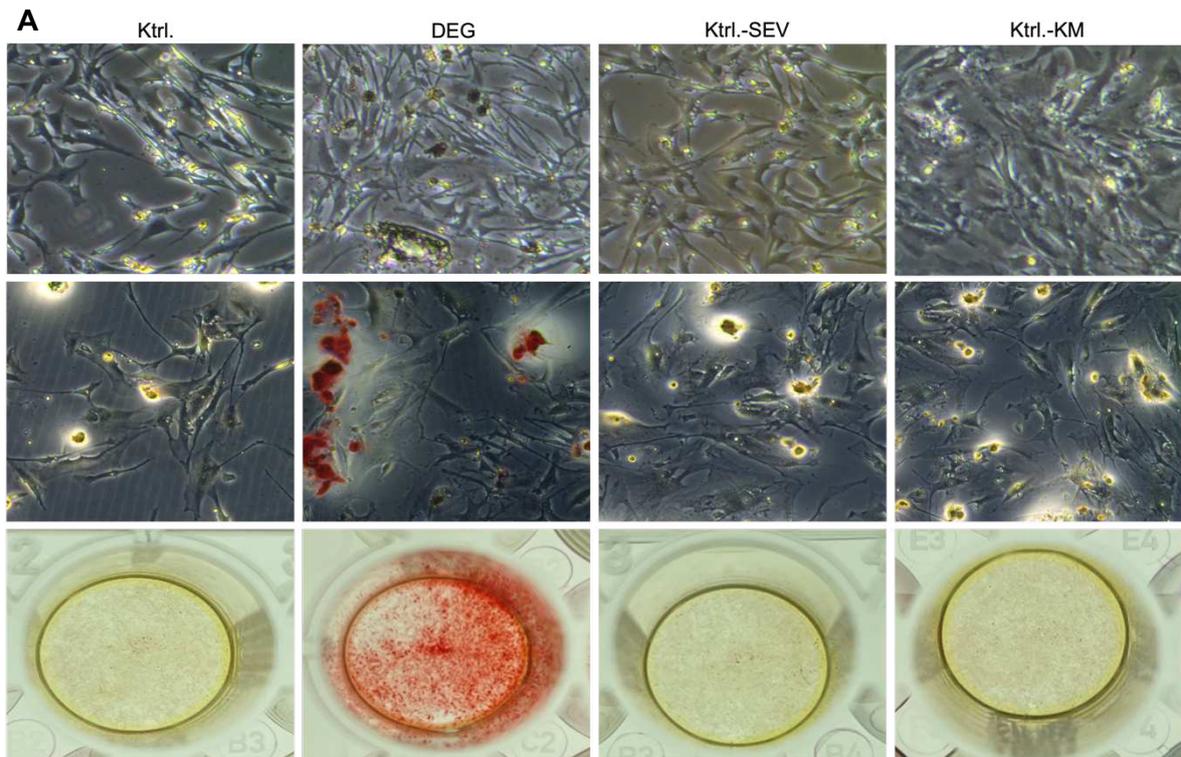


Abb. 18: Einfluss von SEV einer VEC-Kontrollkultur auf die Degeneration von VIC

A zeigt mikro- und makroskopische Aufnahmen der VIC am Tag der Ernte sowie nach Alizarinrot-Färbung (Tag 4). Nur die degenerative VIC-Kultur zeigt (anfärbbare) knötchenartige Formationen im Rahmen der Zellschädigung. 10-fache Vergrößerung. Maßstab: 200µm. Die degenerative VIC-Kultur zeigt sich in der Alizarinrot-Quantifizierung (**B**) signifikant gesteigert. **C** stellt die α -SMA/Vimentin-Proteinratio, ohne Differenzen in der Proteinexpression dar. Die Werte wurde auf eine unbehandelte, viertägige VIC-Kontrollkultur bezogen und sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet (n=4 bzw. n=5). Signifikanzen wurden berechnet mit ANOVA (Kruskal-Wallis mit Dunn's multiple comparisons). p=0,0064. Abkürzungen: α SMA - *alpha smooth muscle actin*, DEG – degenerative Kulturbedingungen, KM – konditioniertes Medium, Ktrl. – Kontrolle, SEV – *small extracellular vesicles*, VEC – *valvular endothelial cells*, VIC – *valvular interstitial cells*, Vim – Vimentin

3.5.3 Einfluss von SEV einer degenerativen/aktivierten VEC-Kultur auf die Degeneration von VIC

Im Nachgang zu 3.5.2 wurde untersucht, ob endotheliale SEV aus TGF- β 1/TNF- α - vorbehandelten VEC-Kulturen degenerative Veränderungen der VIC fördern. Dabei wurden unter degenerativen Bedingungen inkubierte VIC mit degenerierten/aktivierten SEV der VEC gemeinsam in viertägige Kultur gebracht und verglichen mit VIC einer rein degenerativen Kultur ohne Zusatz von endothelialen SEV. Die Auswirkungen der durch endotheliale SEV vermittelten Degeneration primärer humaner VIC wurden morphologisch begutachtet und über die Alizarinrot-Färbung sowie Western-Blot-Analysen quantifiziert.

Durchlichtmikroskopisch war eine verminderte Konfluenz der VIC, unter Zusatz degenerativ (durch TGF- β 1) veränderter endothelialer SEV, im Vergleich zur rein degenerativen VIC-Kultur zu beobachten. Die degenerative VIC-Kultur mit durch TNF- α aktivierten endothelialen SEV wies vermehrt knötchenartige Zellkonformationen im Vergleich zur degenerativen VIC-Kultur auf.

Unter Zusatz endothelialer SEV ließen sich vermehrt Kalziumablagerungen mittels Alizarinrot anfärben als in der rein degenerativen VIC-Kultur. Außerdem zeigten sich Unterschiede je nach initialem Stimulus der endothelialen SEV. Bei Zugabe endothelialer SEV einer mit TNF- α inkubierten VEC-Kultur zeigte sich eine signifikante Erhöhung anfärbbarer Kalziumkomplexe in der VIC-Kultur im Vergleich zur rein degenerativen VIC-Kultur (DEG: 1,0 vs. DEG+TNF- α SEV: $2,633 \pm 0,687$, $p=0,0252$). Aber auch unter Zusatz TGF- β 1 stimulierter endothelialer SEV wurden tendenziell mehr Kalziumkomplexe als in der rein degenerativen VIC-Kultur angefärbt (DEG: 1,0 vs. DEG+TGF- β 1 SEV: $2,109 \pm 0,733$).

Auch auf Proteinebene zeigten die degenerativen VIC-Kulturen unter zusätzlichem Einfluss der endothelialen SEV eine erhöhte α SMA/Vimentin-Proteinexpression im Vergleich zu rein degenerativen VIC-Kulturen. Die Degenerationsmarker zeigten sich unter von TNF- α aktivierten SEV mehr ausgeprägt als unter dem Einfluss TGF- β 1 stimulierter SEV (Ktrl.: 1,0; TGF- β 1: $1,336 \pm 0,251$; TNF- α : $1,786 \pm 0,44$).

Sowohl morphologisch als auch histologisch und auf Proteinebene zeigte sich die Degeneration der primären humanen VIC durch den Zusatz von degenerierten/aktivierten endothelialen SEV im Vergleich zur rein degenerativen VIC-Kultur gesteigert (siehe Abbildung 19).

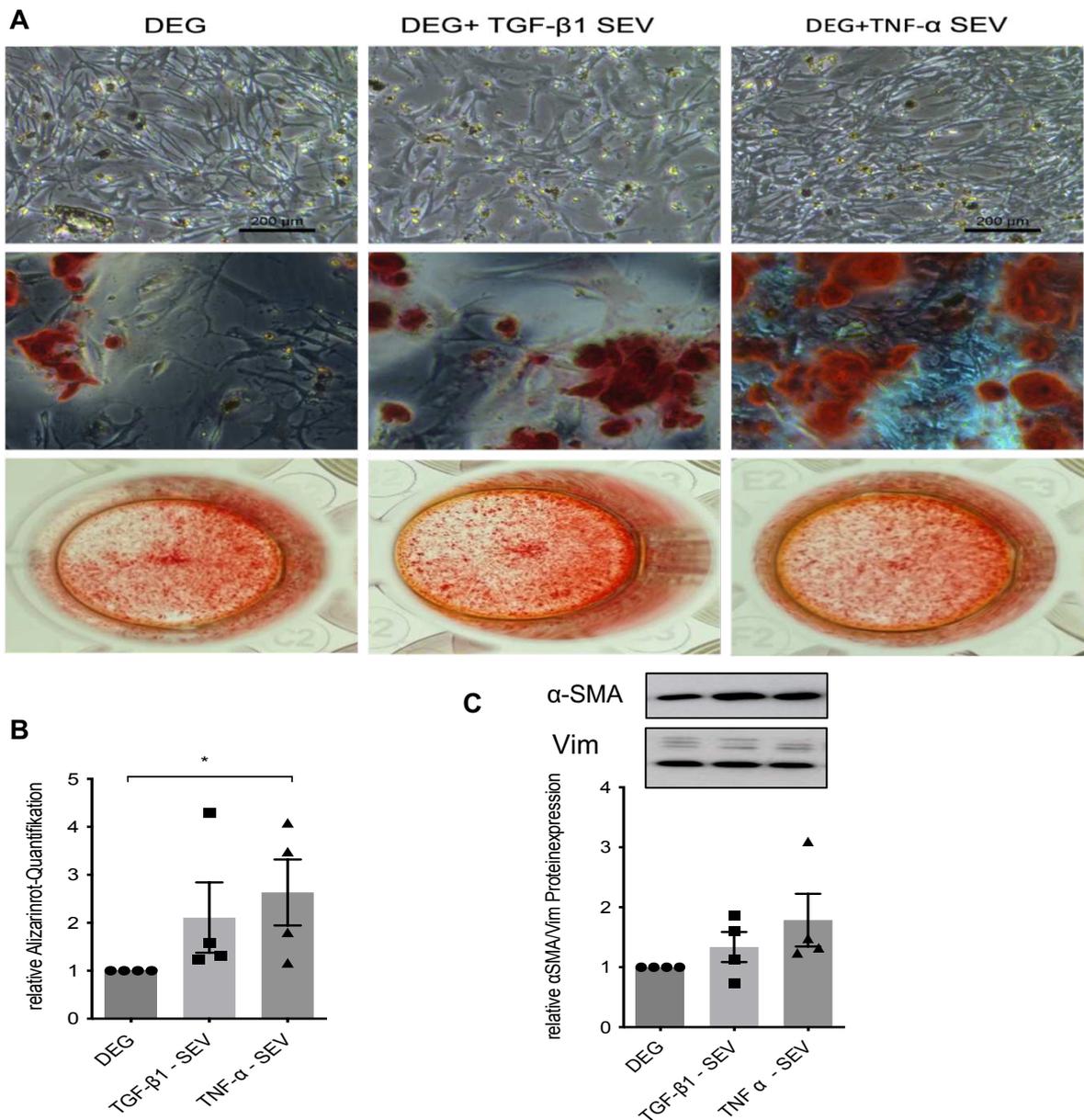


Abb. 19: Einfluss von SEV einer degenerativen VEC-Kultur auf die Degeneration von VIC

In **A** dargestellte Mikroskopaufnahmen der VIC-Kultur unter additiv TGF-β1 stimulierten SEV zeigen eine verminderte Konfluenz sowie mehr geschädigte Zellpopulationen unter TNF-α aktivierten SEV. Die mikro – und makroskopischen Aufnahmen nach Alizarinrot-Färbung zeigen eine gestärkte Anfärbbarkeit von Kalziumkomplexen in der VIC-Kultur mit durch TNF-α aktivierten SEV. 10-fache Vergrößerung. Maßstab: 200µm. Die in **B** gezeigte relative Alizarinrot-Quantifizierung ist unter TNF-α aktivierten SEV signifikant gesteigert, $p=0,0252$. **C** stellt die α-SMA/Vimentin-Proteinratio, mit erhöhter Expression degenerativer Marker in den mit endothelialen SEV behandelten VIC-Kulturen, dar. Die Werte wurden auf eine rein degenerative, viertägige VIC-Kultur bezogen und sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet ($n=4$). Signifikanzen wurden berechnet mit ANOVA (Kruskal-Wallis mit Dunn's multiple comparisons). Abkürzungen: αSMA - *alpha smooth muscle actin*, DEG – degenerative Kulturbedingungen, SEV – *small extracellular vesicles*, TGF-β1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF-α – *Tumor nekrosis factor alpha*, VEC – *valvular endothelial cells*, VIC – *valvular interstitial cells*, Vim – *Vimentin*

3.5.4 Degeneration von VIC in einer endothelialen Ko-Kultur

Abschließend wurde untersucht, ob das aus degenerativ/inflammatorisch aktivierten, vorbehandelten VEC-Überständen gewonnene, KM die Degeneration der VIC beeinflusst. Im Zuge dessen wurden VIC-Kulturen mit degenerativem Kulturmedium und endothelialen Zellkulturüberständen aus einer vorangegangenen degenerativen/aktivierenden Behandlung im Verhältnis 1:1 mit einer rein degenerativen VIC-Kultur morphologisch verglichen und mittels Alizarinrot-Färbung und Western-Blot-Analysen näher untersucht.

Durchlichtmikroskopisch zeigten die VIC-Kulturen unter KM deutlich weniger degenerative Zellveränderungen als die rein degenerative VIC-Kultur. Dabei gab es zwischen den beiden Behandlungsgruppen (KM nach endotheliale TGF- β 1 oder TNF- α Zusatz) keine morphologischen Differenzen. Entsprechende repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 20 gezeigt.

Mithilfe von Alizarinrot ließen sich rein makroskopisch betrachtet in den VIC-Kulturen unter KM deutlich weniger Kalziumkomplexe anfärben als in der degenerativen VIC-Vergleichskultur. Differenziert zwischen den Behandlungsgruppen, ließen sich, v.a. auch mikroskopisch betrachtet, in der VIC-Kultur unter KM nach vorausgegangener endothelialer TNF- α Stimulation mehr Kalziumkomplexe anfärben als nach TGF- β 1 Zusatz. Abbildung 20 zeigte beispielhafte Aufnahmen und die Quantifizierung (DEG: 1,0; TGF- β 1 KM: $1,231 \pm 0,253$; TNF- α KM: $1,294 \pm 0,507$).

Auf Proteinebene zeigte sich in den VIC-Kulturen unter KM die α SMA/Vimentin-Proteinratio im Vergleich zur degenerativen VIC-Kultur nicht wesentlich verändert. (DEG: 1,0; TGF- β 1 KM: $1,191 \pm 0,2971$; TNF- α KM: $1,314 \pm 0,082$).

Zusammenfassend zeigte sich die VIC-Kultur von KM aus degenerativ/inflammatorisch aktivierten vorbehandelten VEC-Überständen wenig beeinflusst.

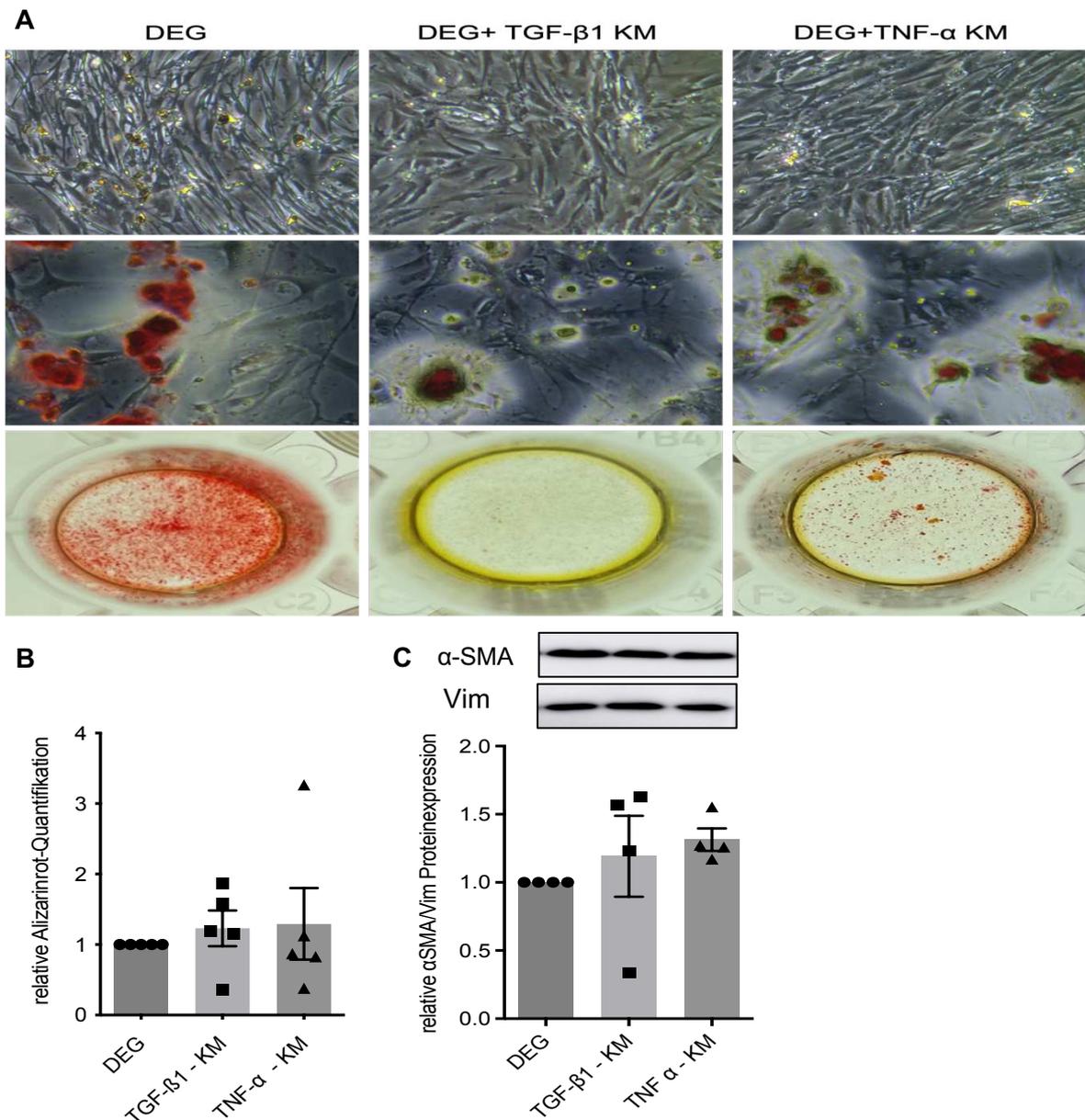


Abb. 20: Einfluss einer endothelialen Ko-Kultur auf die Degeneration von VIC

Die VIC unter KM blieben durchlichtmikroskopisch ohne morphologisch fassbare Veränderungen **(A)**. Die mikro – und makroskopischen Aufnahmen nach Alizarinrot-Färbung der Behandlungsgruppen zeigen im Vergleich zur degenerativen VIC-Kultur verminderte Kalziumablagerungen **(A)**. 10-fache Vergrößerung. Maßstab: 200 μ m. Die VIC-Kultur unter KM nach endothelialer TNF- α Stimulation zeigt dabei tendenziell mehr anfärbbare Kalziumkomplexe als unter KM nach TGF- β 1 Zusatz, was sich auch in der in **B** dargestellten Quantifizierung bestätigt. Die Degenerationsmarker sind in der relativen α -SMA/Vimentin-Proteinratio **(C)** in den Behandlungsgruppen tendenziell unverändert und wurden auf eine rein degenerative, viertägige VIC-Kontrollkultur bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=4 bzw. n=5). Signifikanzen wurden berechnet mit ANOVA (*Kruskal-Wallis* mit *Dunn's multiple comparisons*). Abkürzungen: α SMA - *alpha smooth muscle actin*, DEG – degenerative Kulturbedingungen, KM – konditioniertes Zellkulturmedium, TGF- β 1 - *Transforming growth factor beta 1*, TNF- α – *Tumor nekrosis factor alpha*, VIC – *valvular interstitial cells*, Vim – Vimentin

4 Diskussion

Die manifeste AKS stellt eine irreversible und, vor dem Hintergrund demographischer Entwicklungen zunehmend relevante kardiovaskuläre Erkrankung dar. Effektive pharmakologische Therapieoptionen fehlen. Neben kardiovaskulären Risikofaktoren und pathologischen Transformationsprozessen beteiligter VEC und VIC scheinen auch SEV eine Rolle innerhalb der Pathogenese zu spielen. Die vorliegende Promotionsarbeit liefert erste Anhaltspunkte, dass endotheliale SEV einen Einfluss auf die Degeneration der VIC im Rahmen der CAVD haben und unter pathologischen Bedingungen möglicherweise das Voranschreiten der CAVD beschleunigen. Im Folgenden werden die erfassten Ergebnisse in den Kontext des aktuellen Forschungsstandes eingebettet.

4.1 Versuchsaufbau und Protokolletablierung

Die im ersten Teil dieser Arbeit gezeigten Versuche dienten der Protokolletablierung und veranschaulichten anhand von Zeitreihen die Degeneration und Aktivierung von VEC bzw. die Degeneration von VIC. Hierbei konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 EndMT-Prozesse und TNF- α inflammatorische Aktivierung der VEC induzieren kann. Im Kontrast zu einer Vielzahl anderer Arbeiten wurden hierbei ausschließlich humane VEC und VIC verwendet, worin eine der Besonderheiten der vorliegenden Arbeit begründet ist.

4.1.1 TGF- β 1 induziert EndMT der VEC im Progress der CAVD

Die Entwicklung der CAVD ist ein multifaktorieller Prozess, der bislang nicht vollständig aufgeklärt ist. An der Pathogenese ist die EndMT von VEC entscheidend beteiligt, wobei genaue Mechanismen hierbei ebenso unklar sind [42, 99]. Potenziell auslösende Faktoren der EndMT sind Zytokine, mechanische Kräfte und metabolische Substanzen [40].

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden VEC unter Zusatz von 10 ng/ml TGF- β 1 inkubiert, um degenerative Veränderungen der VEC auszulösen. Dabei zeigte sich der mesenchymale Marker α -SMA nach 24 Stunden, 7 und 14 Tagen erhöht (Abbildung 13 A und Abbildung 17 A). VE-cadherin blieb in der Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konstant (Abbildung 13 B und Abbildung 17 B).

Zahlreiche Studien, u.a. Ma *et al.* [40], Yoshimatsu *et al.* [99] und Moustakas *et al.* [100], fassen TGF- β 1 als bestuntersuchten EndMT Induktor für *in-vitro* Experimente, gemessen an erhöhter α -SMA- und erniedrigter VE-cadherin-Proteinexpression, auf. Auch die in dieser Arbeit gewählte Kulturdauer von 7 Tagen für EndMT-Induktion der VEC bestätigt sich in der Literatur [40, 101]. Weiterführend sind durch TGF- β 1 aktivierte Signalwege der EndMT größtenteils entschlüsselt. TGF- β 1, u.a. Mitglieder der aus 33 Teilen bestehenden Obergruppe, wie *bone morphogenetic proteins*, binden an Serin/Threonin-Kinaserezeptoren. Nachfolgend werden v.a. Proteine der Smad-Familie, wie Smad 2 und 3, phosphoryliert. Mittels Translokation in den Nukleolus werden EndMT spezifische Zielgene, wie z.B. p21 aktiviert und mesenchymale Marker vermehrt exprimiert [99].

Auch wenn die EndMT-Induktion durch TGF- β 1 bei humanen VEC in der Literatur schon mehrfach beschrieben ist, lassen sich die in der Dissertation erhobenen Ergebnisse diesbezüglich in Einklang bringen. Die gewählte Konzentration von 10 ng/ml TGF- β 1 scheint geeignet, um EndMT Prozesse in VEC zu induzieren, um nachfolgend pathologisch veränderte SEV aus VEC isolieren zu können. Die in der Literatur charakteristische Herunterregulation von VE-cadherin zeigt sich in den erhobenen Ergebnissen allenfalls tendenziell, was jedoch auch auf den aktiven, progressiven Verlauf der EndMT zurückzuführen ist. Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass zu einem frühen Zeitpunkt der Pathogenese partielle EndMT-Prozesse erfasst wurden und neben mesenchymalen (α -SMA) auch noch endotheliale (VE-cadherin) Marker zu detektieren waren [99].

Auch die fortwährende Relevanz dieses Forschungsthemas wird deutlich. Denn Ma *et al.* [40] belegten, dass sich durch Inhibition TGF- β 1 aktivierter Signalwege EndMT Prozesse reduzieren lassen, was zukünftig einen weiteren Baustein in der Therapie der CAVD darstellen könnte.

4.1.2 TNF- α induziert inflammatorische Aktivierung der VEC

Immunhistochemische Analysen der AK von Patienten mit CAVD legen erhöhte Expression von Leukozyten und TNF- α als Zeichen chronischer Inflammation dar. Als inflammatorisches Zytokin nimmt TNF- α im Prozess der CAVD somit eine zentrale Rolle ein und beeinflusst VEC entscheidend [102].

Ausgehend von einer physiologischerweise kopfsteinpflasterartigen Morphologie präsentierten sich in dieser Arbeit schon nach 24-stündiger Inkubation der VEC mit 10 ng/ml TNF- α spindelförmige morphologische Veränderungen, die sich mit weiterer Kulturdauer progredient zeigten.

Diese charakteristischen Konformationsänderungen der Endothelzellen sind in der Literatur vielfach beschrieben. Auch McKenzie *et al.* [103] detektierten, beginnend nach acht-stündiger Inkubation von *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) mit 10 ng/ml TNF- α , eine morphologische Elongation einzelner Zellen. Nach 24 Stunden waren in diesen *in-vitro* Experimenten nahezu allen HUVECs spindelförmig differenziert. Zurückzuführen sind diese morphologischen Veränderungen auf eine Umorganisation des zellulären Zytoskelettes, insbesondere F-Aktin [104]. Damit einhergehend zeigte sich hier durch TNF- α eine progrediente Zunahme der Zellpermeabilität, welche das Eindringen von weiteren Entzündungszellen durch die geschädigte Endothelbarriere erleichtert [103, 104].

Parallel zu morphologischen Veränderungen erwies sich die Expression von ICAM und VCAM durch den Zusatz von TNF- α in der VEC-Kultur signifikant gesteigert (Abbildung 17 C und D). ICAM und VCAM sind im Nachweis von inflammatorischer endothelialer Aktivierung durch TNF- α bereits hinreichend etabliert [95, 96]. Jedoch werden in der Literatur selten humane VEC verwendet, wodurch sich diese Arbeit von anderen unterscheidet. Letztendlich verstärken auch ICAM und VCAM die Transmigration von Leukozyten durch defektes Endothel [105]. NF- κ B abhängige intrazelluläre Signalwege werden aktiviert, wodurch sich das proinflammatorische (vermehrt Interleukine, Zytokine) und kalzifizierende (vermehrt alkalische Phosphatase, Osteokalzin) Potenzial von TNF- α in veränderter Gentranskription äußert [106]. Gee *et al.* [107] fassen NF- κ B abhängige Signalwege in einem 3D-Kulturmodell mit humanen VEC und VIC als essenziell in der EndMT Entstehung von VEC und osteogenen Differenzierung von VIC auf. Gemeinsame Signalwege

von in der vorliegenden Arbeit untersuchtem Zusammenspiel betreffend VEC und VIC werden deutlich. Ferner zeigten pharmakologische Ansätze NF- κ B getriggerte Signalwege zu inhibieren erste Erfolge hinsichtlich einer Unterbindung weiterer Progredienz der CAVD [107].

Zusammenfassend legen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse nahe, dass TNF- α geeignet ist, um für anschließende *in-vitro* Experimente EndMT ähnliche Veränderungen in VEC zu induzieren. Gängige Nachweismethoden der Literatur hierfür finden sich auch in dieser Arbeit.

4.1.3 Osteogene Differenzierung primärer humaner VIC

Die osteogene Transformation der VIC stellt einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese der CAVD dar. Um die osteogene Differenzierung *in-vitro* nachzustellen, wurde für diese Arbeit ein bislang vorwiegend auf ovine VIC bezogenes Degenerationsmodell mit 10 mM β -GP und 1,5 mM CaCl₂ verwendet.

Nach 24-stündiger degenerativer Inkubation der VIC formierten sich erste, nach 48 Stunden deutliche knötchenartige Zellstrukturen, bei morphologisch unauffälliger Kontrollkultur (Abbildung 14). Sog. „Kalzifizierungsknötchen“ werden von Benton *et al.* [108] sowie Fisher *et al.* [109] als etabliertes Modell der CAVD betitelt, um den Degenerationsfortschritt von VIC *in-vitro* zu erfassen. Gleichzeitig machen Cloyd *et al.* [110] jedoch deutlich, dass die *in-vitro* Degeneration der VIC nur teilweise die vollständigen phänotypischen Gegebenheiten und damit einhergehenden pathologischen Prozesse der VIC *in-vivo* nachahmen kann. Potenzielle Limitationen dahingehend werden offensichtlich.

Die degenerative Kulturdauer der primär humanen VIC wurde in dieser Arbeit auf vier Tage begrenzt. Darüber hinaus war eine hinreichende Proteinaufreinigung nicht möglich. Fisher *et al.* [109] führt dies auf progredient nekrotisierende Prozesse zurück.

Trotz der morphologisch offensichtlichen „Kalzifizierungsknötchen“ (Abbildung 14) nach degenerativer Inkubation der VIC mit β -GP und CaCl₂ zeigten sich die Degenerationsmarker (α -SMA/Vimentin-Proteinratio, Abbildung 16) lediglich in der Tendenz erhöht. An diese potenziellen Schwächen des Degenerationsmodelles der

VIC lässt sich mit den neusten Erkenntnissen von Goto und Aikawa *et al.* [111] anknüpfen.

Untersuchungen mit humanen VIC zeigten hier, dass die Verwendung von organischem Phosphat, wie es auch in dieser Arbeit zur Degeneration der VIC verwendet wurde, mit einem reduzierten Kalzifizierungspotenzial bei zunehmender Passagezahl einhergeht. In der vorliegenden Dissertation wurden VIC der Passagen 3 - 5 verwendet. In den Studien von Goto und Aikawa *et al.* [111] konnte schon bei VIC in Passage 4 durch organisches Phosphat keine adäquate Kalzifizierung mehr erzielt werden. Zurückgeführt wurde dies auf eine abnehmende Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (TNAP) bei zunehmender Passagezahl. Die TNAP hydrolysiert β -GP zu anorganischem Phosphat, das in entstehende, kalzifizierende Hydroxylapatitkristalle eingebaut wird. Reduziert sich nun passageabhängig die Aktivität der TNAP, steht bei Verwendung von organischem Phosphat weniger anorganisches Phosphat zur Kalzifizierung der VIC zur Verfügung. Anorganisches Phosphat kalzifiziert VIC TNAP-unabhängig und es zeigte sich keine Abnahme der TNAP-Aktivität in höheren Passagen der VIC. Weiterhin wurde auch auf eine spenderabhängige Komponente des Kalzifizierungspotenzials der VIC aufmerksam gemacht. Auch diese scheint TNAP-abhängig zu sein und äußert sich bei Degeneration mittels organischen Phosphates stärker als bei Verwendung von anorganischem Phosphat.

Somit scheint anorganisches Phosphat in zukünftigen Untersuchungen evtl. besser geeignet, um eine gleichbleibende, passage- und spenderunabhängige Kalzifizierung zu erzielen. Ferner konnten Schlotter *et al.* [112] zeigen, dass VIC der aortalen Seite stärker kalzifizieren als VIC der ventrikulären Seite. Daher sollte während zukünftigen Isolationsvorgängen (siehe Kapitel 2.1.2) die Lokalisation der VIC beachtet werden, um Streuungen der Messwerte zu reduzieren und eine signifikante Expression der Degenerationsmarker (α -SMA/Vimentin-Proteinratio, Abbildung 16) zu erzielen.

Nichtsdestotrotz zeigte sich in dieser Arbeit die Kalzifizierung der VIC durch β -GP und CaCl_2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe in der Alizarinrot-Färbung signifikant gesteigert (Abbildung 18 A). Von einer degenerativen Veränderung der VIC ist somit trotz der spenderabhängigen Zellheterogenität und den passageabhängigen Komponenten auszugehen. Ferner erwies sich das ovine VIC-Degenerationsmodell mit 10 mM β -GP und 1,5 mM CaCl_2 auch für humane

VIC als geeignet. Im Unterschied zur fünf - sechstägigen Inkubation oviner VIC [113] konnte gezeigt werden, dass die degenerative Inkubationsdauer humaner VIC auf vier Tage begrenzt werden sollte (Abbildung 14). Die hier verwendeten humanen VIC wiesen deutlich früher als die ovinen VIC Zeichen der morphologischen Zellschädigung auf (nach 24 Stunden bei humanen VIC, vgl. Abbildung 14; vs. 6 Tage bei ovinen VIC [114]). Im ovinen Modell wurden VIC von jungen Schafen verwendet (6-8 Monate), wohingegen die hier verwendeten humanen VIC von potenziell multimorbiden Empfängern einer HTX stammen. Obwohl die humanen VIC in initialer Begutachtung durchlichtmikroskopisch morphologisch intakt zu sein schienen, kann eine vorbestehende Zellschädigung aufgrund der Morbidität der Patienten nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte die vergleichsweise kürzere Dauer bis zum Auftreten von morphologischen Zellschäden der humanen VIC erklären.

4.1.4 *ExoQuick-TC Precipitation Solution* gesteuerte Isolation von EV

EV erlangen in Diagnostik und Therapie der CAVD zunehmendes Forschungsinteresse [68]. In dieser Arbeit wurden EV mittels *ExoQuick-TC Precipitation Solution* aus den Zellkulturüberständen von VEC isoliert.

Anschließende Quantifizierung mittels NTA offenbarte eine Konzentration von $4,9 \times 10^6$ Partikel/ml mit einem Peak von 149,3 nm. Dabei schien die Isolation der EV erfolgreich gewesen zu sein, da in den Restüberständen nach EV-Isolation kaum noch EV detektiert werden konnten (Vergleich Abbildung 11).

Nach Herstellerangaben können mittels *ExoQuick-TC Precipitation Solution* Exosomen in einem Zielbereich von 60-150nm durch Ausfällung von Polymeren aus Zellkulturüberständen isolieren werden. Nach der Pelletierung der Exosomen wird der Restüberstand mitsamt dem enthaltenen überschüssigen Polymer verworfen und das Exosomenpellett in PBS resuspendiert. Durch den Resuspensionsprozess wird das restliche enthaltene Polymernetz stark verdünnt und löst sich in der Folge auf. Enthaltene, intakte Exosomen werden freigesetzt [115].

Die vom Hersteller gewählte Zusammensetzung der Polymernetzstruktur soll, gemessen an der Größe, eine Isolation von größeren EV wie Mikrovesikeln aus dem Ursprungsmedium unterbinden [115]. Der gemessene Peak von 149,3 nm (Abbildung 11) zeigt, dass ein Großteil der isolierten EV in dem o.g. Isolationszielbereich von 60-150nm liegt. Beachtet man unterschiedliche existierenden Größendefinitionen von Exosomen als Untergruppe der EV (30-100 nm [55] bzw. 30-200nm [53]) wird deutlich, dass es sich bei den isolierten EV aus den VEC-Zellkulturüberständen in dieser Arbeit durchaus um Exosomen handeln kann. Andere Arbeiten zeigen anhand elektronenmikroskopischer Bilder, nach Isolation von EV mittels *ExoQuick-TC Precipitation Solution* aus Zellkulturüberständen, die typische zweischichtige rund-längliche Form von Exosomen [116]. Veerman *et al.* [117] konnten nach ExoQuick getriggelter EV-Isolation aus Zellkulturüberständen problemlos CD81, CD9, CD63 als entsprechende Exosomen spezifische Oberflächenmarker nachweisen. Somit wurden entsprechend größentechnischer Analysen und sachgemäßer Verwendung der *ExoQuick-TC Precipitation Solution* vermutlich Exosomen aus den VEC-Zellkulturüberständen isoliert. Ein Nachweis von Oberflächenmarker, gemäß der ISEV, steht in dieser Arbeit allerdings aus und sollte zukünftig angeschlossen werden, um mögliche Limitationen diesbezüglich auszugleichen. Dennoch scheint die initial gewählte Bezeichnung von SEV (siehe Kapitel 1.2) vor dem Hintergrund der ordnungsgemäßen Anwendung von *ExoQuick-TC Precipitation Solution* und des gemessenen *peaks* in der NTA als gerechtfertigt.

Des Weiteren wurden in dieser Dissertation aus VEC-Zellkulturüberständen isolierte SEV vorzugsweise direkt experimentell weiterverwendet, denn Görgens *et al.* [118] konnten kürzlich zeigen, dass eine Lagerung von EV in PBS innerhalb weniger Stunden bis Tage mit einer Reduktion der EV-Anzahl einhergeht.

Mit der Ultrazentrifugation, Chromatographie und Antikörper-gekoppelten *MagnetBeads*-Methoden existieren weitere geläufige Optionen zur Isolation von EV [115]. Taylor *et al.* [81] beschreiben eine mengenmäßig größere Ausbeute bei der Isolation von Exosomen mittels *ExoQuick* im Vergleich zu vorgenannten Methoden, was bei nachfolgenden potenziell über SEV vermittelten Experimenten dieser Arbeit von Vorteil war. Andererseits legten Aziz *et al.* [116] dar, dass in Exosomen die durch Ultrazentrifugation gewonnen wurden, mehr Gesamt-mRNA zu detektieren ist, was für inhaltliche Analysen isolierter SEV von Vorteil sein könnte. Außerdem

deuten einige Publikation auf eine tendenziell erhöhte Verunreinigung nach *ExoQuick* gesteuerter Isolation von Exosomen, im Vergleich zur Ultrazentrifuge, hin [115, 119]. Diese Verunreinigungen scheinen auf ko-präzipitierte Proteinaggregate zurückzuführen sein [116] und äußern sich geringfügig auch in dieser Arbeit durch mehrere detektierte *peaks* in der NTA (Abbildung 11). Beschriebenen Verunreinigungen und Polymerresiduen könnte in zukünftigen Experimenten mit einer G-25 Entsalzungssäule vorgebeugt werden [115]. Somit existieren je nach Wahl der Methode gewisse Vor- und Nachteile, wobei in dieser Arbeit auf *ExoQuick* zurückgegriffen wurde. Ausschlaggebend hierfür waren die Zeiteffektivität [115], die kostengünstigere Alternative im Vergleich zur Ultrazentrifuge [116] und dem ausreichend guten mRNA/Gengehalt in den isolierten Exosomen [116].

4.2 Inflammatorische Aktivierung und Degeneration der VEC beeinflusst die Freisetzung endothelialer EV

EV als Instrument der Zell-Zellkommunikation werden im Rahmen der Endothelzellschädigung und im weiteren Progress der CAVD von VEC freigesetzt [120]. Bereits 24 Stunden nach inflammatorischer Aktivierung der VEC mittels TNF- α bzw. Degeneration durch TGF- β 1 wurde eine erhöhte Anzahl an EV detektiert (Abbildung 10). Nach siebentägiger Kulturdauer erreichte die Anzahl gemessener EV in den Behandlungsgruppen ihr Maximum. Unter endothelialer TNF- α Aktivierung zeigte sich die Konzentration freigesetzter EV nach 7 Tagen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur signifikant gesteigert. Eine Degeneration bzw. inflammatorische Aktivierung der VEC scheint also zu einer erhöhten EV-Freisetzung der VEC zu führen.

Literaturnachweise zu einer erhöhten Freisetzung von EV durch VEC nach *in-vitro* Stimulation mit TGF- β 1 finden sich wenig. Das Zusammenspiel von TGF- β 1 induzierter EV-Freisetzung ist bislang eher im onkologischen Kontext beleuchtete worden [121]. Krohn *et al.* [122] konnte jedoch eine TGF- β 1 induzierte Freisetzung kalzifizierender EV durch vaskuläre *smooth muscle cells* nachweisen. Die in der Tendenz deutlich erhöhte Konzentration von EV (Abbildung 10) nach 7-tägiger Inkubation der VEC mit TGF- β 1 in dieser Arbeit lässt sich damit in Einklang bringen und liefert erste Hinweise, dass mehrere Zellarten des kardiovaskulären Systems, TGF- β 1 getriggert pathologisch kalzifizierte EV freisetzen.

Auch zu *in-vitro* Studien der EV-Freisetzung von VEC unter TNF- α existiert wenig Evidenz. Hosseinkhani *et al.* [123] zeigten jedoch, dass aus den Zellkulturüberständen von HUVEC nach Inkubation mit 10 ng/ml TNF- α vermehrt EV isoliert werden konnten. Analysen der Subpopulationen ergaben hierbei, dass mit TNF- α stimulierte HUVEC mehr *small extracellular vesicles* als *medium/large extracellular vesicles* freisetzen. Des Weiteren wurde die Expression inflammatorischer Proteine der Ursprungszellen (HUVEC) nach TNF- α Aktivierung mit denen der freigesetzten EV verglichen. Zu großen Teilen stimmte die Expression immunmodulatorisch wirksamer Proteine, wie ICAM-1 und verschiedener Zytokine (beispielsweise Interleukin-1 α , Interleukin-1 β), überein. Es wurde nachgewiesen, dass sich das inflammatorische Profil der mit TNF- α stimulierten HUVEC auf deren

freigesetzten EV überträgt und dort widergespiegelt wird. Weiterführende Experimente dieser Studie hinsichtlich der Effekte der endothelial aktivierten EV zeigten Differenzen in Abhängigkeit der Größe der EV. Während *medium/large extracellular vesicles* Inflammation und ICAM-1 Expression in vaskulären Endothelzellen als Zielzellen induzierten, zeigte sich durch SEV eine gesteigerte Monozyten Migration.

Auch de Jong *et al.* [124] legten mittels iTRAQ basierter Proteomik Analyse dar, dass inflammatorische Zellkulturbedingungen das Protein- und mRNA-Profil von freigesetzten EV verändern können. Dabei reflektieren von *Human microvascular endothelial cells* freigesetzte EV in ihrer Protein- und mRNA-Struktur die endotheliale Aktivierung nach inflammatorischer Induktion mit 10 ng/ml TNF- α . Interessanterweise beeinflusste eine erhöhte Glukosekonzentration, wie es *in-vivo* beispielsweise bei Patienten mit Diabetes mellitus zu erwarten wäre, die Protein- und mRNA Struktur der EV, im Gegensatz zu inflammatorischen Zellkulturbedingungen, nicht.

Dies unterstützt die Ergebnisse der Promotionsarbeit, dass degenerative/inflammatorisch aktivierende Einflüsse auf die VEC einerseits zu einer erhöhten Konzentration an SEV führen und dadurch andererseits pathologische Veränderungen der inhaltlichen Zusammensetzung der SEV erzeugt werden. Außerdem erscheint infolgedessen v.a. TNF- α geeignet, um *in-vitro* pathologische Transformationen endothelialer SEV zu erzielen. Ebenso wird deutlich, dass pathologisch differenzierte SEV in der Lage sind, ihre inflammatorisch veränderte Struktur im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation an Zielzellen zu übermitteln, was wiederum die Leitfrage der Dissertation stützt.

Auch mehrere klinisch fokussierte Studien zeigten bei Patienten mit AKS signifikant erhöhte Level an EV und Mikropartikeln, die von Thrombozyten, Leukozyten, aber auch Endothelzellen freigesetzt werden. Ferner wird eine nachfolgende Aktivierung von Monozyten aber auch weiteren Endothelzellen durch die zirkulierenden EV beschrieben. Der weitere Progress der CAVD wird somit durch fortwährende EV-Freisetzung aufrecht erhalten [120, 125, 126]. Die klinische Relevanz der erhobenen Ergebnisse wird auch vor dem Hintergrund zunehmender Nutzung von EV als Biomarker in der Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich [63].

Abschließend reduzierte sich nach 14-tägiger Kulturdauer die Anzahl erfasster SEV in beiden Behandlungsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 10). Hierbei könnte die Zunahme avitaler Zellreste, erfasst in der morphologischen Begutachtung und der reduzierten Proteinmenge, (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) eine Rolle spielen.

In einem 3D-Zellkulturmodell führten Thippabhotla *et al.* [127] eine sinkende Anzahl freigesetzter EV nach 13 Tagen ebenso auf abnehmende Zellviabilität zurück. Auch vor diesem Hintergrund erscheint die gewählte Zellkulturdauer von sieben Tagen zwecks SEV-Gewinnung als sinnvoll.

4.3 SEV einer degenerativen/aktivierenden VEC-Kultur fördern die Degeneration von VIC

Abschließend wurde die Degeneration primärer humaner VIC unter dem Einfluss endothelialer SEV untersucht. Morphologisch, histologisch und auf Proteinebene zeigte sich die Degeneration der VIC durch den Zusatz von degenerierten/aktivierten endothelialen SEV im Vergleich zur rein degenerativen VIC-Kultur gesteigert (Abbildung 19). Gleichzeitig blieb die Degeneration der VIC von endothelialen SEV einer VEC-Kontrollkultur unbeeinflusst (Abbildung 18). Des Weiteren erwies sich die Degeneration der VIC sowohl unter Zusatz des KM einer VEC-Kontrollkultur als auch unter KM aus degenerativ/inflammatorisch aktivierten vorbehandelten VEC-Überständen unbeeinflusst (Abbildung 18 und 20). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die beobachtete Zunahme der VIC-Degeneration auf endotheliale SEV zurückzuführen ist und nicht auf die bloße Anwesenheit des VEC-Kulturmediums. Im Zuge dessen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass unter physiologischen Bedingungen endotheliale SEV keine degenerativen Effekte auf VIC haben, nach pathologischer Vorschädigung durch TGF- β 1 und TNF- α jedoch die Degeneration der VIC fördern. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben scheint eine (kalzifizierende) Transformation der SEV hinsichtlich ihrer Zusammensetzung hierfür verantwortlich zu sein.

Hjortnaes *et al.* [42] legte in VEC-VIC Ko-Kultur-Modellen passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit dar, dass VEC die osteogene Differenzierung von VIC fördern. Dafür wurde eine Transformation der VEC in endotheliale VIC verantwortlich gemacht. Im Nachgang zu dieser Arbeit scheinen auch SEV an den zellulären Vorgängen hinsichtlich der Interaktion zwischen VEC und VIC beteiligt zu sein. In der Literatur wird vor dem Hintergrund der CAVD vorzugsweise die Freisetzung kalzifizierender SEV, ausgehend von *valvular smooth muscle cells*, VIC und Makrophagen, beschrieben [128].

Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten darauf hin, dass auch VEC pathologisch veränderte SEV freisetzen, die das Voranschreiten der CAVD mitbedingen. Diesbezüglich konnte in bisherigen Forschungsarbeiten von nicht-endothelialen Zellen gezeigt werden, dass die Umgebungsbedingungen maßgeblich daran beteiligt sind, ob SEV kalzifizierenden Prozessen protektiv entgegenwirken oder

diese fördern. Unter physiologischen Bedingungen produzieren beispielsweise glatte Gefäßmuskelzellen SEV als adaptive Reaktion, um eine intrazelluläre Kalziumüberladung zu vermeiden. Dabei werden SEV mit Fetuin-A und Matrix-Gla-Protein beladen, die als Inhibitoren kalzifizierender Prozesse fungieren [70, 129]. Andere Studien weisen darauf hin, dass sich unter physiologischen Bedingungen auch das Kalziumbindeprotein AnxA6 in den SEV befindet, um die intrazelluläre Kalziumhomöostase aufrechtzuerhalten und Zellschäden durch Kalziumüberladung zu verhindern [69]. Die milieuhängige Beladung von SEV mit anti-osteogen wirkenden miRNAs, wie z. B. miR-30 oder -145, sprechen ebenfalls dafür, dass SEV unter physiologischen, nicht-kalzifizierenden Bedingungen, die valvuläre Homöostase aufrechterhalten [68, 130]. Diese zellulären Mechanismen könnten dafür verantwortlich sein, dass die SEV der endothelialen Kontrollkultur keinen degenerativen Einfluss auf die VIC in dieser Arbeit haben (Abbildung 18).

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter degenerativen Bedingungen, bei Zugabe von TGF- β 1 bzw. inflammatorisch aktivierten Bedingungen bei Zugabe von TNF- α , die endothelialen SEV einen degenerativen Einfluss auf die VIC haben. Die Degeneration von VIC zeigte sich unter dem Einfluss endothelialer SEV nach TNF- α Stimulation der VEC in der Alizarinrot-Färbung signifikant gesteigert. (Abbildung 19).

Khan *et al.* [131] erzeugten in HUVECs nach Inkubation mit 10 ng/ml TNF- α einen Zellzyklusarrest, der in einem seneszenten zellulärem Phänotyp, mit verstärkter Aktivierung NF- κ B abhängiger Signalwege und gesteigerter ROS-Produktion, resultierte. Seneszente Endothelzellen wiederum setzen vermehrt EV frei [132], was sich dieser Arbeit (siehe Abbildung 10), aber auch in ersten klinisch orientierten Versuchsreihen zeigt: Sowohl bei Patienten mit vaskulär kalzifizierenden Erkrankungen, wie Atherosklerose [133], als auch bei älteren Patienten im Allgemeinen [132] ist die Freisetzung von EV durch Endothelzellen im Vergleich zu gesunden oder jüngeren Patienten gesteigert. Diese von Endothelzellen freigesetzten, seneszenten EV, tragen oberflächlich mehr kalziumionenbindendes Annexin A5, wodurch sich der Kalziumspiegel durch vermehrten Einstrom von Kalziumionen in diesen EV erhöht [132, 134]. Ferner sind diese kalziumbeladenen EV seneszter Endothelzellen dazu in der Lage, kalzifizierende Prozesse zu initiieren und zu vermitteln. Alique *et al.* [135] wiesen diesbezüglich einen Anstieg der Runx2-

und BMP2-Proteinexpression in entsprechenden Zielzellen nach. Darüber hinaus sind einige miR's an der endothelialen Seneszenz beteiligt, wobei die Herunterregulierung von miR126-3p hervorzuheben ist, die für die Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase entscheidend ist [135].

Die in Abbildung 18 und 20 gezeigten Ergebnisse legen einen nahezu zu vernachlässigenden Einfluss des KM auf die Degeneration der VIC dar. Laut Herstellerangaben (Promo Cell®, Heidelberg, BW, Deutschland, C-22120) verbrauchen die VEC in einer *in-vitro* Zellkultur innerhalb weniger Stunden bis Tage die zugesetzten *Supplements* des VEC-Zellkulturmediums, wodurch sich auch der regelmäßige, empfohlene Mediumwechsel begründen lässt. Hieraus lässt sich weiter schlussfolgern, dass das Zellkulturmedium und die *Supplements* der VEC-Kultur unter Verwendung des KM einen allenfalls marginalen Einfluss auf die VIC-Kultur haben können, da diese zum Zeitpunkt der Transition auf die VIC durch vorherige die VEC-Kultur vermutlich schon verbraucht worden sind.

Auch die additiven Agenzien der VEC-Kultur (TGF- β 1 und TNF- α) haben mit 10 ng/ml zwar eine deutlich höhere Konzentration als die VEC-Zellkultur *Supplements*, basierend auf einer sehr kurzen Halbwertszeit sowohl *in vivo* [136, 137] als auch *in-vitro* [138, 139], jedoch eine begrenzte Wirkdauer, wodurch sich ihr Einfluss auf die Degeneration der VIC-Kultur unter Verwendung des KM ebenfalls als geringfügig einstufen lässt.

Die genannten Aspekte stützen die Hypothese dieser Arbeit, dass die degenerativen Veränderungen der VIC auf endotheliale SEV und nicht auf das bloße VEC-Zellkulturmedium, zurückzuführen sind. Denn im Gegensatz zum KM erzeugen degenerative/inflammatorische endotheliale Zellkulturbedingungen, wie in Abschnitt 4.2 erläutert, langfristige zelluläre Veränderungen der SEV, die dann an Zielzellen (VIC) übermittelt werden können.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die in dieser Arbeit durch TNF- α stimulierten VEC im Rahmen o.g. Literaturrecherche möglicherweise in einen seneszenten Phänotyp transferieren und die im Zuge dessen freigesetzten SEV kalzifizierende Prozesse im Rahmen der CAVD fördern können.

4.4 Aussagekraft und Limitationen

Für die *in-vitro* Experimente und Analysen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden primäre VEC und VIC aus humanen AK verwendet, wodurch potenzielle Schwierigkeiten hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen von Anfang an ausgeschlossen wurden. Dies unterscheidet die Dissertation von anderen Arbeiten, die vorrangig auf ovine oder porcine VEC und VIC zurückgreifen. Außerdem wurden in den experimentellen Versuchen zur Interaktion zwischen VEC und VIC isolierte endotheliale SEV und VIC aus derselben AK verwendet. Der Einfluss spenderabhängiger Veränderungen der VEC und VIC im Kontext der Interaktion konnte somit vernachlässigt werden. Allerdings blieben spenderabhängige Komorbiditäten, Geschlecht und Vormedikation der Patienten unberücksichtigt.

Für die *in-vitro* Experimente wurden ausschließlich durchlichtmikroskopisch unauffällige, vitale Zellen verwendet und jeweils ein kurzes Versuchsprotokoll angeschlossen (7 Tage bei VEC, 4 Tage bei VIC). Es ist somit davon auszugehen, dass eher frühe Stadien der CAVD erfasst wurden. Inwieweit der erhobene Einfluss von SEV auf die Degeneration von VIC auch auf spätere Stadien der CAVD übertragbar ist, bleibt spekulativ. Ferner blieb in der zweidimensionalen *in-vitro* Zellkultur die Interaktion von VEC und VIC mit der EZM und anderen Zelltypen, wie Makrophagen oder Leukozyten, unberücksichtigt. Dem könnte in zukünftigen Experimenten ein dreidimensionales Zellkulturmodell angeschlossen werden.

Ob die SEV mit der Umgebung der Zielzellen interagieren oder mittels Aufnahme in die Zielzellen ihre Wirkung erzielt haben, blieb ungeklärt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen könnten hierbei Abhilfe leisten. Auch wenn die Ergebnisse der Promotionsarbeit darauf schließen lassen, dass das VEC-Kulturmedium und dessen zugesetzten *Supplements* (Vgl. Tabelle 1), im Kontrast zu den pathologisch veränderten SEV, einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Degeneration der VIC haben, sollte in nachfolgenden Analysen beispielsweise mittels *high pressure liquid chromatography* auf Rückstände der VEC-*Supplements* in der VIC-Kultur untersucht werden, um eine quantifizierbare Aussage dahingehend tätigen zu können.

Trotz der geringen Anzahl an Experimenten offenbarten sich bereits einige statisch signifikante Unterschiede in den Behandlungsgruppen. Andere Experimente

zeigten nur einen statistischen Trend, den es in Untersuchungen mit höherer Anzahl an Experimenten sowie weiteren Analysemethoden zu festigen gilt.

Nach eingehender Literaturrecherche gehört diese Arbeit zusammenfassend zu den ersten, welche den Einfluss von endothelialen SEV nach TGF- β 1 und TNF- α Stimulation auf die Degeneration von primären humanen VIC untersucht hat und leistet damit einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese der CAVD.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Ergebnisse der Promotionsarbeit, dass von VEC freigesetzte SEV, im Nachgang zu einer degenerativen bzw. inflammatorischen Schädigung, die Degeneration von VIC vor dem Hintergrund der CAVD in teilweise signifikantem Ausmaß fördern. Endotheliale TGF- β 1 und TNF- α Stimulation führt weiterhin zu einer erhöhten Freisetzung von SEV. Gleichzeitig liegt die Vermutung nahe, dass TGF- β 1 und TNF- α pathologische Veränderungen hinsichtlich der Zusammensetzung der von VEC freigesetzten SEV induzieren, welche über zelluläre Mechanismen an VIC übermittelt werden.

Daher sollten Analysen der in SEV enthaltenen miR und Proteine in zukünftigen Projekten angeschlossen werden, um den gezeigten Einfluss endothelialer SEV auf VIC weiter zu untersuchen. Auch die zellulären Mechanismen, mit denen freigesetzte SEV ihre Zielzellen erreichen, gilt es in nachfolgenden Arbeiten weiter zu entschlüsseln, um potenziell den Krankheitsprozess der CAVD zu verlangsamen. Erste Ansätze dahingehend SEV abhängige Signalwege zu beeinflussen, zeichnen sich durch Inhibitoren NF- κ B abhängiger Signalwege bereits ab [131].

Ferner sind SEV als generelle Biomarker bereits etabliert [140] und werden zukünftig an Bedeutung innerhalb der Diagnostik der CAVD gewinnen. Neben dieser diagnostischen Detektion pathologisch veränderter SEV existieren ebenso erste therapeutische Ansätze physiologische SEV und als Botenstoffmoleküle veränderte SEV zu nutzen [67, 133]. Von mesenchymalen Stammzellen abstammende Exosomen können beispielsweise die Regeneration und Angiogenese kardialer Zellen nach einem ischämischen Ereignis positiv beeinflussen [141].

Insgesamt stellt sich somit die immense Bedeutung endothelialer SEV sowohl in der Pathogenese, der Diagnostik und auch Therapie der CAVD im Kontext dieser Promotionsarbeit heraus.

5 Literatur-und Quellenverzeichnis

1. Organization, W.H. *Cardiovascular diseases*. 2022 [11.10.2022]; Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1.
2. Tsao, C.W., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*, 2022. **145**(8): p. e153-e639.
3. Bardon, K.M. and M. Garelnabi, *The impact of altered mechanobiology on aortic valve pathophysiology*. *Arch Biochem Biophys*, 2020. **691**: p. 108463.
4. Waschke, J., T.M. Böckers, and F. Paulsen, *Sobotta Lehrbuch Anatomie*. 2. Auflage. ed. 2019, Germany: Urban & Fischer.
5. Herold, G., *Innere Medizin 2022*. 2021, Berlin ; Boston: De Gruyter.
6. 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*, 2014. **34**(11): p. 2387-93.
7. Kraller, S., et al., *Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy*. *Eur Heart J*, 2022. **43**(7): p. 683-697.
8. Yi, B., et al., *Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories*. *Aging (Albany NY)*, 2021. **13**(9): p. 12710-12732.
9. Lindroos, M., et al., *Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(5): p. 1220-5.
10. Otto, C.M., et al., *Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(3): p. 142-7.
11. Daniel, W.G., et al., *Klappenvitien im Erwachsenenalter*. *Clin Res Cardiol*, 2006. **95**(11): p. 620-41.
12. Ross, J., Jr. and E. Braunwald, *Aortic stenosis*. *Circulation*, 1968. **38**(1 Suppl): p. 61-7.
13. Czarny, M.J. and J.R. Resar, *Diagnosis and management of valvular aortic stenosis*. *Clin Med Insights Cardiol*, 2014. **8**(Suppl 1): p. 15-24.
14. Bhatia, N., et al., *Aortic valve disease in the older adult*. *J Geriatr Cardiol*, 2016. **13**(12): p. 941-944.
15. Nishimura, R.A., et al., *2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *Circulation*, 2014. **129**(23): p. e521-643.
16. Alushi, B., et al., *Calcific Aortic Valve Disease-Natural History and Future Therapeutic Strategies*. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 685.
17. Zilla, P., et al., *Global Unmet Needs in Cardiac Surgery*. *Glob Heart*, 2018. **13**(4): p. 293-303.
18. Coffey, S., et al., *Global epidemiology of valvular heart disease*. *Nat Rev Cardiol*, 2021. **18**(12): p. 853-864.
19. Bundesamt, S. *Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten*. 2017 [23.10.2022].
20. Lindman, B.R., et al., *Calcific aortic stenosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16006.
21. Nassimiha, D., et al., *Association of coronary risk factors with progression of valvular aortic stenosis in older persons*. *Am J Cardiol*, 2001. **87**(11): p. 1313-4.

22. Novaro, G.M., et al., *Clinical factors, but not C-reactive protein, predict progression of calcific aortic-valve disease: the Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(20): p. 1992-8.
23. Oliver, J.M., et al., *Discrete subaortic stenosis in adults: increased prevalence and slow rate of progression of the obstruction and aortic regurgitation*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(3): p. 835-42.
24. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 630-4.
25. Kamath, A.R. and R.G. Pai, *Risk factors for progression of calcific aortic stenosis and potential therapeutic targets*. Int J Angiol, 2008. **17**(2): p. 63-70.
26. Braverman, A.C., et al., *The bicuspid aortic valve*. Curr Probl Cardiol, 2005. **30**(9): p. 470-522.
27. Dweck, M.R., N.A. Boon, and D.E. Newby, *Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(19): p. 1854-63.
28. Sathyamurthy, I. and S. Alex, *Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis?* Indian Heart J, 2015. **67**(5): p. 503-6.
29. Freeman, R.V. and C.M. Otto, *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. Circulation, 2005. **111**(24): p. 3316-26.
30. Lerman, D.A., S. Prasad, and N. Alotti, *Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Eur Cardiol, 2015. **10**(2): p. 108-112.
31. Otto, C.M., *Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1395-8.
32. 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, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
33. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1407-18.
34. Mulholland, D.L. and A.I. Gotlieb, *Cell biology of valvular interstitial cells*. Can J Cardiol, 1996. **12**(3): p. 231-6.
35. Misfeld, M. and H.H. Sievers, *Heart valve macro- and microstructure*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007. **362**(1484): p. 1421-36.
36. Ma, X., et al., *Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Calcific Aortic Valve Disease*. Acta Cardiol Sin, 2020. **36**(3): p. 183-194.
37. Mohty, D., et al., *Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(1): p. 187-93.
38. Parra-Izquierdo, I., et al., *Interferons Are Pro-Inflammatory Cytokines in Sheared-Stressed Human Aortic Valve Endothelial Cells*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(19).
39. Rattazzi, M. and P. Pauletto, *Valvular endothelial cells: guardians or destroyers of aortic valve integrity?* Atherosclerosis, 2015. **242**(2): p. 396-8.
40. Ma, J., et al., *TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 260.
41. Wirrig, E.E. and K.E. Yutzey, *Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(4): p. 737-41.
42. Hjortnaes, J., et al., *Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells*. Atherosclerosis, 2015. **242**(1): p. 251-260.

43. Hulshoff, M.S., et al., *Epigenetic Regulation of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Chronic Heart Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(9): p. 1986-1996.
44. Pardali, E., et al., *TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).
45. Cirka, H.A., M.H. Kural, and K.L. Billiar, *Mechanoregulation of aortic valvular interstitial cell life and death*. *J Long Term Eff Med Implants*, 2015. **25**(1-2): p. 3-16.
46. Di Vito, A., et al., *Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).
47. Richards, J., et al., *Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling*. *Am J Pathol*, 2013. **182**(5): p. 1922-31.
48. El Accaoui, R.N., et al., *Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(9): p. H1302-13.
49. Blevins, T.L., et al., *Phenotypic characterization of isolated valvular interstitial cell subpopulations*. *J Heart Valve Dis*, 2006. **15**(6): p. 815-22.
50. Jenke, A., et al., *Transforming growth factor- β 1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020. **319**(5): p. H1123-h1141.
51. Théry, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. *J Extracell Vesicles*, 2018. **7**(1): p. 1535750.
52. Fu, S., et al., *Extracellular vesicles in cardiovascular diseases*. *Cell Death Discov*, 2020. **6**: p. 68.
53. Crescitelli, R., et al., *Subpopulations of extracellular vesicles from human metastatic melanoma tissue identified by quantitative proteomics after optimized isolation*. *J Extracell Vesicles*, 2020. **9**(1): p. 1722433.
54. Kakarla, R., et al., *Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells*. *Exp Mol Med*, 2020. **52**(1): p. 1-6.
55. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. *J Cell Biol*, 2013. **200**(4): p. 373-83.
56. Yokoi, A. and T. Ochiya, *Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology*. *Semin Cancer Biol*, 2021. **74**: p. 79-91.
57. Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. **30**: p. 255-89.
58. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(6): p. 654-9.
59. Witwer, K.W. and C. Théry, *Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature*. *J Extracell Vesicles*, 2019. **8**(1): p. 1648167.
60. Gustafson, D., S. Veitch, and J.E. Fish, *Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology*. *Front Cardiovasc Med*, 2017. **4**: p. 71.
61. Aheget, H., et al., *Exosomes: Their Role in Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Diseases*. *Cancers (Basel)*, 2020. **13**(1).
62. Shah, R., T. Patel, and J.E. Freedman, *Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(10): p. 958-966.
63. de Freitas, R.C.C., et al., *Circulating Extracellular Vesicles As Biomarkers and Drug Delivery Vehicles in Cardiovascular Diseases*. *Biomolecules*, 2021. **11**(3).

64. Berezin, A.E. and A.A. Berezin, *Extracellular Endothelial Cell-Derived Vesicles: Emerging Role in Cardiac and Vascular Remodeling in Heart Failure*. *Front Cardiovasc Med*, 2020. **7**: p. 47.
65. Boulanger, C.M., et al., *Extracellular vesicles in coronary artery disease*. *Nat Rev Cardiol*, 2017. **14**(5): p. 259-272.
66. Leroyer, A.S., et al., *Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(7): p. 772-7.
67. Chong, S.Y., et al., *Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Alternative Biomarker Sources, Therapeutic Agents, and Drug Delivery Carriers*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(13).
68. Jansen, F., X. Xiang, and N. Werner, *Role and function of extracellular vesicles in calcific aortic valve disease*. *Eur Heart J*, 2017. **38**(36): p. 2714-2716.
69. Kapustin, A.N., et al., *Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization*. *Circ Res*, 2011. **109**(1): p. e1-12.
70. Reynolds, J.L., et al., *Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(11): p. 2857-67.
71. New, S.E., et al., *Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques*. *Circ Res*, 2013. **113**(1): p. 72-7.
72. Cui, L., et al., *End stage renal disease-induced hypercalcemia may promote aortic valve calcification via Annexin VI enrichment of valve interstitial cell derived-matrix vesicles*. *J Cell Physiol*, 2017. **232**(11): p. 2985-2995.
73. Krohn, J.B., et al., *Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms*. *J Physiol*, 2016. **594**(11): p. 2895-903.
74. Gee, T.W., et al., *Valve endothelial-interstitial interactions drive emergent complex calcific lesion formation in vitro*. *Biomaterials*, 2021. **269**: p. 120669.
75. Small, A., et al., *Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(4): p. 623-632.
76. Art, S.S.M. *Les Laboratoires Servier*. [cited 2023; Available from: <https://smart.servier.com/>].
77. *World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects*. *Jama*, 2013. **310**(20): p. 2191-4.
78. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. *Cytometry*, 1990. **11**(2): p. 231-8.
79. Liu, L. and G.P. Shi, *CD31: beyond a marker for endothelial cells*. *Cardiovasc Res*, 2012. **94**(1): p. 3-5.
80. They, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3 22.
81. Taylor, D.D., W. Zacharias, and C. Gercel-Taylor, *Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling*. *Methods Mol Biol*, 2011. **728**: p. 235-46.
82. Konokhova, A.I., et al., *Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles*. *J Biomed Opt*, 2012. **17**(5): p. 057006.
83. Mehdiyani, A., et al., *An innovative method for exosome quantification and size measurement*. *J Vis Exp*, 2015(95): p. 50974.

84. Weber, A., et al., *Rapid Fluorescence-based Characterization of Single Extracellular Vesicles in Human Blood with Nanoparticle-tracking Analysis*. J Vis Exp, 2019(143).
85. Puchtler, H., S.N. Meloan, and M.S. Terry, *On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium*. J Histochem Cytochem, 1969. **17**(2): p. 110-24.
86. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
87. Burnette, W.N., "*Western blotting*": *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
88. Wang, J., R. Zohar, and C.A. McCulloch, *Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction*. Exp Cell Res, 2006. **312**(3): p. 205-14.
89. Vestweber, D., *VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(2): p. 223-32.
90. Schäfer, R., et al., *Impaired VE-cadherin/beta-catenin expression mediates endothelial cell degeneration in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2003. **108**(13): p. 1585-91.
91. Parameswaran, N. and S. Patial, *Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2010. **20**(2): p. 87-103.
92. Agbanoma, G., et al., *Production of TNF- α in macrophages activated by T cells, compared with lipopolysaccharide, uses distinct IL-10-dependent regulatory mechanism*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1307-17.
93. Bhattacharyya, S., P.K. Dudeja, and J.K. Tobacman, *Tumor necrosis factor alpha-induced inflammation is increased but apoptosis is inhibited by common food additive carrageenan*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 39511-22.
94. Chao, C.Y., et al., *Andrographolide inhibits ICAM-1 expression and NF- κ B activation in TNF- α -treated EA.hy926 cells*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(10): p. 5263-71.
95. Yan, S., et al., *Clematichinenoside inhibits VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- α -treated endothelial cells via NADPH oxidase-dependent I κ B kinase/NF- κ B pathway*. Free Radic Biol Med, 2015. **78**: p. 190-201.
96. Youn, G.S., et al., *Celastrol ameliorates HIV-1 Tat-induced inflammatory responses via NF- κ B and AP-1 inhibition and heme oxygenase-1 induction in astrocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **280**(1): p. 42-52.
97. Surolia, R. and V.B. Antony, *Pathophysiological Role of Vimentin Intermediate Filaments in Lung Diseases*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 872759.
98. Yang, R., et al., *Telocytes-derived extracellular vesicles alleviate aortic valve calcification by carrying miR-30b*. ESC Heart Fail, 2021. **8**(5): p. 3935-3946.
99. Yoshimatsu, Y. and T. Watabe, *Roles of TGF- β signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis*. Int J Inflam, 2011. **2011**: p. 724080.
100. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition*. J Clin Med, 2016. **5**(7).
101. Ghosh, A.K., et al., *Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT*. Cell Signal, 2012. **24**(5): p. 1031-6.
102. Éva Sikura, K., et al., *Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- κ B, a link between inflammation and mineralization*. J Adv Res, 2021. **27**: p. 165-176.

103. McKenzie, J.A. and A.J. Ridley, *Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability*. J Cell Physiol, 2007. **213**(1): p. 221-8.
104. Stroka, K.M., J.A. Vaitkus, and H. Aranda-Espinoza, *Endothelial cells undergo morphological, biomechanical, and dynamic changes in response to tumor necrosis factor- α* . Eur Biophys J, 2012. **41**(11): p. 939-47.
105. Rajan, S., et al., *NF-kappaB, but not p38 MAP kinase, is required for TNF-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells*. J Cell Biochem, 2008. **105**(2): p. 477-86.
106. Galeone, A., et al., *The role of TNF- α and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 875363.
107. Gee, T., et al., *NFkB (Nuclear Factor κ -Light-Chain Enhancer of Activated B Cells) Activity Regulates Cell-Type-Specific and Context-Specific Susceptibility to Calcification in the Aortic Valve*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(3): p. 638-655.
108. Benton, J.A., et al., *Statins block calcific nodule formation of valvular interstitial cells by inhibiting alpha-smooth muscle actin expression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1950-7.
109. Fisher, C.I., J. Chen, and W.D. Merryman, *Calcific nodule morphogenesis by heart valve interstitial cells is strain dependent*. Biomech Model Mechanobiol, 2013. **12**(1): p. 5-17.
110. Cloyd, K.L., et al., *Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell 'calcified' nodules*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48154.
111. Goto, S., et al., *Standardization of Human Calcific Aortic Valve Disease in vitro Modeling Reveals Passage-Dependent Calcification*. Front Cardiovasc Med, 2019. **6**: p. 49.
112. Schlotter, F., et al., *Spatiotemporal Multi-Omics Mapping Generates a Molecular Atlas of the Aortic Valve and Reveals Networks Driving Disease*. Circulation, 2018. **138**(4): p. 377-393.
113. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. Diab Vasc Dis Res, 2019. **16**(3): p. 254-269.
114. Selig, J.I., *Die Rolle der extrazellulären Matrix in der degenerativen Aortenklappenerkrankung unter dem Einfluss von Diabetes*, in *Klinik für Herzchirurgie Universitätsklinikum Düsseldorf*. 2018, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Universitätsbibliothek Düsseldorf.
115. Peterson, M.F., et al., *Integrated systems for exosome investigation*. Methods, 2015. **87**: p. 31-45.
116. Aziz, M.A., et al., *Comparing Two Methods for the Isolation of Exosomes*. J Nucleic Acids, 2022. **2022**: p. 8648373.
117. Veerman, R.E., et al., *Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin*. J Extracell Vesicles, 2021. **10**(9): p. e12128.
118. Görgens, A., et al., *Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations*. J Extracell Vesicles, 2022. **11**(6): p. e12238.
119. Tang, Y.T., et al., *Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum*. Int J Mol Med, 2017. **40**(3): p. 834-844.
120. Akhmerov, A. and T. Parimon, *Extracellular Vesicles, Inflammation, and Cardiovascular Disease*. Cells, 2022. **11**(14).

121. Rodrigues-Junior, D.M., et al., *Extracellular Vesicles and Transforming Growth Factor β Signaling in Cancer*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 849938.
122. Krohn, J.B., et al., *Discoidin Domain Receptor-1 Regulates Calcific Extracellular Vesicle Release in Vascular Smooth Muscle Cell Fibrocalcific Response via Transforming Growth Factor- β Signaling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(3): p. 525-33.
123. Hosseinkhani, B., et al., *(Sub)populations of extracellular vesicles released by TNF- α -triggered human endothelial cells promote vascular inflammation and monocyte migration*. J Extracell Vesicles, 2020. **9**(1): p. 1801153.
124. de Jong, O.G., et al., *Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes*. J Extracell Vesicles, 2012. **1**.
125. Diehl, P., et al., *Increased levels of circulating microparticles in patients with severe aortic valve stenosis*. Thromb Haemost, 2008. **99**(4): p. 711-9.
126. Weber, A., et al., *The Course of Circulating Small Extracellular Vesicles in Patients Undergoing Surgical Aortic Valve Replacement*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 6381396.
127. Thippabhotla, S., C. Zhong, and M. He, *3D cell culture stimulates the secretion of in vivo like extracellular vesicles*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 13012.
128. Bakhshian Nik, A., J.D. Hutcheson, and E. Aikawa, *Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification*. Front Cardiovasc Med, 2017. **4**: p. 78.
129. Shroff, R.C., et al., *Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(1): p. 103-12.
130. Lo Cicero, A., P.D. Stahl, and G. Raposo, *Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **35**: p. 69-77.
131. Khan, S.Y., et al., *Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNF α can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 39501.
132. Alique, M., et al., *Microvesicles from the plasma of elderly subjects and from senescent endothelial cells promote vascular calcification*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(3): p. 778-789.
133. Yin, M., X. Loyer, and C.M. Boulanger, *Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis*. Eur J Pharmacol, 2015. **763**(Pt A): p. 90-103.
134. Mas-Bargues, C., C. Borrás, and M. Alique, *The Contribution of Extracellular Vesicles From Senescent Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells to Vascular Calcification*. Front Cardiovasc Med, 2022. **9**: p. 854726.
135. Alique, M., et al., *Microvesicles from indoxyl sulfate-treated endothelial cells induce vascular calcification in vitro*. Comput Struct Biotechnol J, 2020. **18**: p. 953-966.
136. Ma, Y., et al., *A novel recombinant slow-release TNF α -derived peptide effectively inhibits tumor growth and angiogenesis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13595.
137. Hermonat, P.L., et al., *Mechanism of action and delivery possibilities for TGF β 1 in the treatment of myocardial ischemia*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 235-43.
138. Gordon, R., et al., *Proteolytic activation of proapoptotic kinase protein kinase C δ by tumor necrosis factor α death receptor signaling in dopaminergic neurons during neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 82.
139. Rollins, B.J., et al., *Environment-dependent growth inhibition of human epidermal keratinocytes by recombinant human transforming growth factor-beta*. J Cell Physiol, 1989. **139**(3): p. 455-62.

140. Santos, P. and F. Almeida, *Exosome-Based Vaccines: History, Current State, and Clinical Trials*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 711565.
141. Tan, S.J.O., et al., *Novel Applications of Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes for Myocardial Infarction Therapeutics*. *Biomolecules*, 2020. **10**(5).

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari für die Überlassung meines Promotionsthemas und die Aufnahme in das Team der *Experimentellen Chirurgie* des Universitätsklinikums Düsseldorf danken. Vielen Dank für Ihre fortwährende Unterstützung und die hilfreichen Anregungen im experimentellen Rahmen, aber auch der wissenschaftlichen Anfertigung dieser Schrift.

Außerdem möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg dafür danken, dass ich meine Labortätigkeit in den Räumlichkeiten der *Experimentellen Chirurgie* durchführen durfte.

Herrn Univ.-Prof. Timm Filler möchte ich für die Zweitbetreuung meines Promotionsprojektes danken.

Zu besonderem Dank bin ich Frau Dr. rer. nat. Vera Schmidt verpflichtet. Ohne ihre Anleitung, ihre wertvollen Tipps hinsichtlich der Methodik und ihre bedingungslose Unterstützung wäre diese Arbeit nie zu einem Ende gekommen.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth, Frau Dr. rer. nat. Jessica Selig und Giesela Müller für Ihre Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen.

Dem gesamten restlichen Team der experimentellen Chirurgie, mit denen ich den Sommer 2021 im Labor verbringen durfte, möchte ich für eine unvergessliche Zeit danken!

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern, Ingrid und Alex Daus, die auf meinem Weg immer hinter mir standen, bedanken. Ohne euch wäre ich heute nicht dort, wo ich bin. Abschließend möchte ich mich bei meinem Freund, Damon Mohebbi, bedanken. Danke, dass ich mich immer auf dich verlassen kann und du mein größter Rückhalt bist.