

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

**Die Rolle der VEGF-Rezeptoren im Degenerationsprozess von
Aortenklappen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Melissa Maria Pfaff
2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. med. Felix Mayer

Meinen Eltern gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Weber A., Pfaff M., Schöttler F., Schmidt V., Lichtenberg A., Akhyari P.
Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific
Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitials Cells.
Biomedicines. April 2021.

Zusammenfassung

Bei der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (*Calcific aortic valve disease* - CAVD) handelt es sich um einen aktiven Prozess, der neben der Akkumulation von Lipiden, Inflammation und der Ablagerung von Kalzium auch die Bildung neuer Blutgefäße innerhalb der Aortenklappe (AK) beinhaltet. Diese Entstehung neuer Blutgefäße wird regelmäßig in degenerierten Aortenklappen beobachtet, dennoch ist ihre Funktion noch nicht vollständig erforscht und nicht eindeutig geklärt, ob Blutgefäße die Entstehung einer CAVD beschleunigen oder verlangsamen. Als Signalmolekül wird der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) mit seinen Rezeptoren als wichtige Vermittler bei Angiogenese und Vaskulogenese angesehen, trotzdem ist die Rolle bei der Entstehung der CAVD noch ungeklärt.

In vorangegangenen Studien zeigte sich die Expression des *Vascular Endothelial Growth Factor*-Rezeptors-2 (VEGFR-2) in degenerierten humanen AK erhöht, weitestgehend unerforscht sind Unterschiede der Expression bei verschiedenen Degenerationsgraden und zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CAVD.

Das Ziel dieser Arbeit war die Rolle der VEGFR im Kalzifizierungsprozess von AK genauer zu verstehen und herauszufinden, inwieweit sie an dem Prozess der Degeneration beteiligt sind. Hierzu wurde die mRNA-Expression der VEGFR mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in makroskopisch unveränderten, fibrotischen und kalzifizierten humanen AK untersucht und ein Modell entwickelt, welches nach dessen Validierung ermöglichte, die mRNA-Expression mittels RT-PCR von VEGFR im Zuge fortschreitender Degeneration oviner AK genauer zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von VEGFR-1 und -2, sowie des Korezeptors Neuropilin-1 (NRP-1) in degenerierten humanen AK nachgewiesen werden und genauere Analysen zeigten eine positive Korrelation zwischen einer Hochregulation der Rezeptoren, Kalzifizierung und Gefäßneubildung.

In einem daraufhin entwickelten *in-vitro* Modell zur Kultivierung oviner AK-Taschen konnte zunächst mittels histologischer Untersuchungen zu Degeneration und Kalzifizierung, mRNA-Expressions- und Proteinanalyse pro-degenerativer Marker gezeigt werden, dass eine Degeneration *in-vitro* herbeiführbar war. Nach 28 Tagen Kultivierung zeigten die AK-Taschen eine fortschreitende Degeneration mit Kalzifizierung, jedoch konnten weder Gefäßneubildungen noch eine Hochregulation der VEGFR beobachtet werden.

Insgesamt bilden die vorliegenden Ergebnisse eine Grundlage, sowohl die komplexen Mechanismen der CAVD und die Rolle der Neoangiogenese in diesem Prozess genauer zu verstehen, als auch präzisere Analysen anzuschließen, um zukünftig Therapien zu entwickeln, die eine Entstehung einer CAVD aufhalten oder verlangsamen.

Summary

Calcific aortic valve disease (CAVD) is an active process that includes lipid accumulation, inflammation and calcium deposition and also the formation of new blood vessels within the aortic valve. This formation of new blood vessels is regularly observed in degenerated aortic valves, but their function has not been fully resolved yet and it is still unknown whether blood vessels accelerate or slow down the development of CAVD. As a signaling molecule, the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFR) are regarded as important mediators in angiogenesis and vasculogenesis, but the role in the development of CAVD is still unclear. In previous studies, the expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) was shown to be increased in degenerated human aortic valve leaflets but differences in expression at different degrees and times of degeneration in the progress of CAVD are largely unexplored. The aim of this work was the better understanding of the role of VEGFR in the calcification process of aortic valves and to find out their involvement in the progress of degeneration. For this purpose, the mRNA expression of VEGFR was examined by using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in macroscopically unchanged, fibrotic and calcified human aortic valves and a model was developed which, after validation, enabled the mRNA expression of VEGFR in ovine aortic valves via RT-PCR to analyze it more precisely during the degeneration progress.

In this work a significant upregulation of VEGFR-1 and -2 as well as their coreceptor neuropilin-1 (NRP-1) could be demonstrated in degenerated human aortic valves and more detailed analyzes showed a positive correlation between upregulation of the receptors, calcification and new blood vessel formation. A novel in-vitro model for the cultivation of ovine aortic valve leaflets was developed and validated via histological examinations on degeneration and calcification, gene expression and protein analysis of pro-degenerative markers. After 28 days of cultivation, the aortic valve leaflets showed progressive degeneration and calcification, but neither new vessel formation nor upregulation of VEGFR could be observed.

Overall, the present results could form a basis for a more precise understanding of the complex mechanisms of CAVD and the role of neoangiogenesis in this process. It could help in the future to find therapies to stop or slow down the development of CAVD.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
AK	Aortenklappe
β -GP	β -Glycerolphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
	Calcific aortic valve disease /
CAVD	kalzifizierende Aortenklappenerkrankung
cDNA	Cyclische Desoxyribonukleinsäure
Col1A1	Alpha-1-Typ-I-Kollagen
Col3A1	Alpha-1-Typ-III-Kollagen
Col5A1	Alpha-1-Typ-V-Kollagen
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's modified- eagle medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Formaldehyd
FCS	Fetales Kälberserum
FLT-1	<i>fms-like-tyrosine-kinase-1</i>
FLT-4	<i>fms-like-tyrosine-kinase-4</i>
GAG	Glykosaminglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HTx	Herztransplantation
KCL	Kaliumchlorid
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit

LDL	<i>Low-density-Lipoprotein</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NRP	Neuropilin
OP	Operation
OPN	Osteopontin
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
pd	pro-degenerativ
qVIC	<i>quiescent</i> Valvuläre Interstitialzelle
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPL-13A	Ribosomales Protein L13a
RT-PCR	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation
TBST	Tris gepufferte Phosphatlösung mit Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
TGF- β	Transforming-growth-factor-beta
VEC	Valvuläre Endothelzelle
VIC	Valvuläre Interstitialzelle
VIM	Vimentin
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - Rezeptor
vWF	Von-Willebrand-Faktor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Aortenklappenstenose	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Klinische Auswirkungen und Therapie	1
1.2	Die Aortenklappe	2
1.2.1	Aufbau und Funktion der Aortenklappe	2
1.2.2	Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung	3
1.3	Vascular Endothelial Growth Factor und Rezeptoren	6
1.3.1	Rolle in der Angiogenese	8
1.4	Vascular Endothelial Growth Factor und Calcific Aortic Valve Disease	8
1.5	Ziele dieser Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Technische Geräte und Software	11
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3	Genexpressionsanalyse und Primer	15
2.1.4	Zellkultur	17
2.1.5	Histologie	18
2.1.6	Proteinanalyse	19
2.1.7	Antikörper	20
2.1.8	Puffer und Lösungen	22
2.2	Methoden	25
2.2.1	Humane Aortenklappen	25
2.2.2	Ovine Aortenklappen	26
2.2.3	Zellkultur	27
2.2.4	Genanalyse	28
2.2.5	Proteinanalyse	29
2.2.6	Histologie	31
2.2.7	Statistische Analysen	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Analyse gesamter humaner Aortenklappentaschen	34
3.1.1	Patientenkohorte	34
3.1.2	Degeneration in fibrotischen und kalzifizierten Aortenklappentaschen	35
3.1.3	Genexpression von VEGF-Rezeptoren in humanen Aortenklappentaschen	38

3.2	Analyse getrennter Anteile humaner Aortenklappentaschen	40
3.2.1	Patientenkohorte	40
3.2.2	Vermehrte Expression der VEGF-Rezeptoren im kalzifizierten Anteil gegenüber dem fibrotischen Anteil derselben Aortenklappentasche	40
3.3	<i>In-vitro</i> Aortenklappenmodell	42
3.3.1	Zunehmende Degeneration der kultivierten Aortenklappentaschen	42
3.3.2	Veränderungen der extrazellulären Matrix	43
3.3.3	Veränderungen des Endothels und zunehmende Degeneration	44
3.3.4	Genexpressionsanalyse	45
3.3.5	VEGF-Rezeptoren in ovinen Aortenklappentaschen	48
4	Diskussion	49
4.1	Untersuchung von VEGF-Rezeptoren in humanen Aortenklappen	49
4.1.1	Patientenkohorte und Einteilung der Gruppen	49
4.1.2	Veränderung der VEGFR-Expression abhängig vom Degenerationsgrad	50
4.2	Untersuchung von VEGF-Rezeptoren in ovinen Aortenklappentaschen	53
4.2.1	Entwicklung eines <i>in-vitro</i> Modells: Herstellung und Validierung	53
4.2.2	Analyse der Genexpression von VEGF-Rezeptoren <i>in-vitro</i>	55
5	Schlussfolgerung	56
6	Abbildungsverzeichnis	57
7	Tabellenverzeichnis	58
8	Literaturverzeichnis	59
9	Anhang	63
10	Danksagung	67

1 Einleitung

1.1 Die Aortenklappenstenose

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland bilden Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Todesursache. Analysen des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2019 machen deutlich, dass in diesem Jahr insgesamt 331.211 Personen aufgrund einer Erkrankung verstorben sind, die das Herz-Kreislauf-System betraf [1]. Darüber hinaus verursachten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems im Jahr 2015 etwa 13,7 % der gesamten Krankheitskosten in Deutschland, was in diesem Jahr den größten Anteil der entstandenen Ausgaben ausmachte [2].

Insgesamt stellt die Aortenklappenstenose die häufigste Herzklappenerkrankung in Industrienationen dar und zeigt eine steigende Prävalenz, da ihre Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt und gleichzeitig das Durchschnittsalter der Gesamtbevölkerung ebenfalls steigt [3]. Nicht-rheumatische Erkrankungen der Aortenklappe (AK) waren für 3,3% der Sterbefälle verantwortlich, die 2019 durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland verursacht wurden [1].

Studien zeigen auch, dass bei etwa 2% der über 65-Jährigen eine AK-Stenose vorliegt.

Zu klinischen Risikofaktoren, die mit einer AK-Stenose assoziiert sind, zählen neben steigendem Alter auch männliches Geschlecht, Nikotinkonsum, Hypertonie und Diabetes mellitus [4, 5].

1.1.2 Klinische Auswirkungen und Therapie

Eine Hauptursache der AK-Stenose ist die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (*Calcific aortic valve disease* - CAVD). Dabei kommt es durch fortschreitende Degeneration zu einer Verringerung der Klappenöffnungsfläche mit Behinderung des Blutflusses, wodurch die Druckbelastung auf den linken Ventrikel erhöht wird und eine linksventrikuläre Hypertrophie die Folge sein kann [6, 7].

Die Entwicklung einer AK-Stenose beginnt zunächst mit einer meist langjährigen Latenzzeit, die ohne Symptome einhergeht. Sobald ein Patient mit unbehandelter AK-Stenose Symptome entwickelt, verschlechtert sich seine Prognose - das durchschnittliche Überleben beträgt hierbei unbehandelt 2-3 Jahre und geht mit einem hohen Risiko für einen plötzlichen Herztod einher [8, 9].

Aktuell existiert keine medikamentöse Therapie, die die Progression der AK-Stenose aufhalten oder die Prognose verbessern kann, sodass der AK-Ersatz die einzige Therapie

darstellt [10, 11]. Ein AK-Ersatz kann entweder chirurgisch oder als Transkatheter-Aortenklappenimplantation (*Transcatheter aortic valve implantation* - TAVI) durchgeführt werden. Zu den Indikationen für eine Intervention zählen unter anderem ein klinischer Nutzen für den Patienten durch eine Intervention, eine Klappenöffnungsfläche von $< 1 \text{ cm}^2$ und eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion unter 50% [10].

Die Entscheidung, welche Therapie ein Patient erhält, wird für jeden Patienten individuell getroffen. Hierbei spielen Faktoren wie Alter, Komorbiditäten und Operationsrisiko eine Rolle. Für jüngere Patienten mit niedrigem Operationsrisiko stellt aktuell der chirurgische AK-Ersatz die bevorzugte Therapie dar, während bei Patienten mit sehr hohem operativem Risiko und schweren Komorbiditäten eher eine TAVI durchgeführt wird [10, 12].

1.2 Die Aortenklappe

1.2.1 Aufbau und Funktion der Aortenklappe

Die AK befindet sich zwischen linkem Ventrikel und Aorta und besteht in den meisten Fällen aus 3 halbmondförmigen Taschen [13]. Sie ermöglicht einen unidirektionalen Blutfluss während der Systole und verhindert ein Zurückfließen des Blutes während der Diastole. Die AK ist hohen mechanischen Kräften ausgesetzt und ein ungehinderter Vorwärtsfluss wird durch die Beweglichkeit, Biegsamkeit und strukturelle Zusammensetzung der einzelnen AK-Taschen gewährleistet [14, 15].

Die Versorgung der AK-Taschen wird durch Diffusion aus dem direkt umgebenden Blut sichergestellt, sodass Blutgefäße nur inkonsistent und im proximalen Abschnitt der AK-Taschen vorhanden sind [14, 16].

Jede AK-Tasche besteht aus 3 Schichten: *Lamina Fibrosa*, *Lamina Spongiosa* und *Lamina Ventricularis* (Abb.1). Es finden sich zwei Arten von Zellen in der AK: Valvuläre Endothelzellen (VEC) und valvuläre Interstitialzellen (VIC), die jeweils für die Aufrechterhaltung der Klappenfunktion von großer Wichtigkeit sind [15].

An beiden Außenseiten ist jede AK-Tasche von einer Schicht VECs umgeben, die vaskulären Endothelzellen sehr ähnlich sind, sich jedoch beispielsweise hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit und der Expression von verschiedenen Signalmolekülen unterscheiden [17]. So konnte gezeigt werden, dass VECs eine höhere Permeabilität als die Endothelzellen von großen Arterien besitzen [18]. Neben der Regulation der Permeabilität der AK sind VECs auch an der Vermittlung von Entzündungsprozessen beteiligt [17, 19].

Innerhalb der drei Schichten befinden sich VICs, die eine wichtige Rolle bei Organisation und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) spielen. VICs ähneln funktionell ruhenden Fibroblasten und regulieren den Umbau von Kollagen und anderer Matrixbestandteile [15]. VICs haben zudem das Potenzial, in verschiedene Zelltypen zu

differenzieren und so auf Veränderungen innerhalb der Klappe zu reagieren [20, 21]. Beispielsweise können mechanischer Stress oder Inflammation durch eine Ausschüttung verschiedenster Zytokine eine Aktivierung von VICs bewirken, welche einen Umbau der EZM, Proliferation und Apoptose zur Folge haben kann [20].

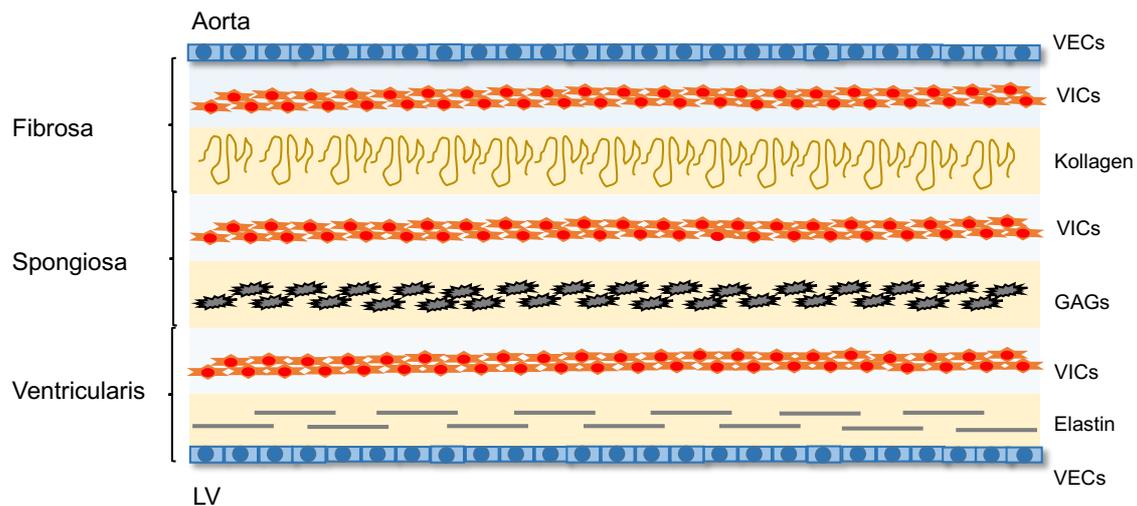


Abb. 1: Aufbau einer gesunden AK.

Die *Lamina Fibrosa* enthält ein dichtes Kollagennetzwerk nahe der aortalen Ausstrombahn, die mittlere *Lamina Spongiosa* ist reich an Glykosaminoglykanen, während die *Lamina Ventricularis*, am linken Ventrikel gelegen, vor allem Elastin beinhaltet. VEC = Valvuläre Endothelzelle, VIC = Valvuläre Interstitialzelle, GAG = Glykosaminoglykan, LV= Linker Ventrikel (modifiziert nach Rajamannan *et al.*, 2011).

1.2.2 Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung

Bei der Pathogenese der CAVD handelt es sich um einen komplexen und multifaktoriellen Prozess, der durch viele Komponenten aktiv reguliert und beeinflusst wird [7, 15, 22]. Dieser Prozess führt zu einer Verdickung, Fibrosierung und Kalzifizierung der AK-Taschen, was eine Versteifung der Klappe mit einer Behinderung des Ausstroms in die Aorta zur Folge hat [7, 15].

Bei der Entstehung der CAVD können die Initiations- und anschließende Progressionsphase unterschieden werden [23]:

Die Initiationsphase steht am Anfang des Prozesses und besteht aus endothelialer Dysfunktion, Lipidablagerung und Inflammation (Abb. 2). Mechanischer Stress und pathologisch veränderter Scherstress, vor allem auf der aortalen Seite der Klappe, führen zu einer Störung des Endothels mit daraus resultierender erhöhter Permeabilität [24-26].

Die dadurch entstandenen Schäden am Endothel begünstigen eine Ablagerung von Lipiden, die vor allem im subendothelialen Teil der Fibrosa akkumulieren [26-28].

Ein weiterer initialer Faktor der CAVD ist oxidativer Stress, der zu einer Oxidation der akkumulierten Lipide führt und wodurch sich, unter anderem, oxidiertes *Low-density-Lipoprotein* (LDL) bildet [15, 28]. Diese oxidierten Lipide wirken zytotoxisch und können bei gleichzeitig vorliegendem Endothelschaden zu einer Inflammation innerhalb der Klappe mit Einwanderung von Entzündungszellen führen [7, 26]. Es zeigen sich vermehrt Infiltrate von T-Lymphozyten und Makrophagen in frühen Stadien von CAVD, die als Zeichen von chronischer Inflammation angesehen werden und besonders in kalzium- und lipidreichen Regionen zu finden sind [26, 28].

Durch die eingewanderten Entzündungszellen werden Zytokine wie *transforming-growth-factor-beta* (TGF- β) ausgeschüttet, die zum einen eine Differenzierung von VICs bewirken und zum anderen Kalziumablagerungen verursachen [23]. Es entstehen wachsende Kalziumphosphat-Komplexe, die wiederum eine erneute Immunantwort begünstigen, wodurch sich ein Kreislauf bildet, der zu der anschließenden Progressionsphase führt [23].

Ein wichtiger Vorgang dieser Progressionsphase ist die Differenzierung der VICs [23].

VICs liegen in der adulten Klappe normalerweise als ruhende VICs, sogenannte *quiescent* VICs (qVICs) vor, die jedoch durch pathologische Prozesse aktiviert werden können [29].

Mögliche Trigger für eine Differenzierung von VICs sind neben inflammatorischen Zytokinen auch Veränderungen der EZM, oxidativer Stress und veränderter Scherstress [15].

VICs können in myofibroblastische und osteoblastische Phänotypen differenzieren, wobei beide Prozesse an einer entstehenden Kalzifizierung beteiligt sein können [23]. Eine Differenzierung in einen myofibroblastischen Phänotypen kann durch eine Stimulation mit TGF- β 1 verursacht werden, welche unter anderem zu einer erhöhten Expression von *Alpha smooth muscle actin* (α SMA) und Vimentin (VIM) führt. Mit der Differenzierung zu diesem Phänotypen werden beschleunigte Fibrose mit Vermehrung von fibrotischem Gewebe und ein Umbau der EZM mit Verdickung der AK in Verbindung gebracht [7].

Eine Differenzierung in einen osteoblastischen Phänotypen hat eine osteogene Verkalkung zur Folge, die in einer Entstehung von Knochen-ähnlichen Strukturen resultiert [23]. Dieser Prozess ist Gegenstand aktueller Forschung und wird als ein zentraler Schritt bei der Entstehung der CAVD gesehen, der mit einer Regulierung durch zahlreiche Moleküle und Signalwege einhergeht [30].

Im Zuge einer fortschreitenden Kalzifizierung findet sich zudem eine erhöhte Expression von Knochenmarkern wie beispielsweise Osteocalcin (*Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein*-BGLAP) und Osteopontin (OPN), die bei Stoffwechselprozessen von Skelettknochen vorkommen [7, 29]. Durch diesen Prozess der Kalzifizierung entsteht ein sich wiederholender Kreislauf, der zu weiterer Kalzifizierung führt und so das Voranschreiten der Stenose bedingt [30].

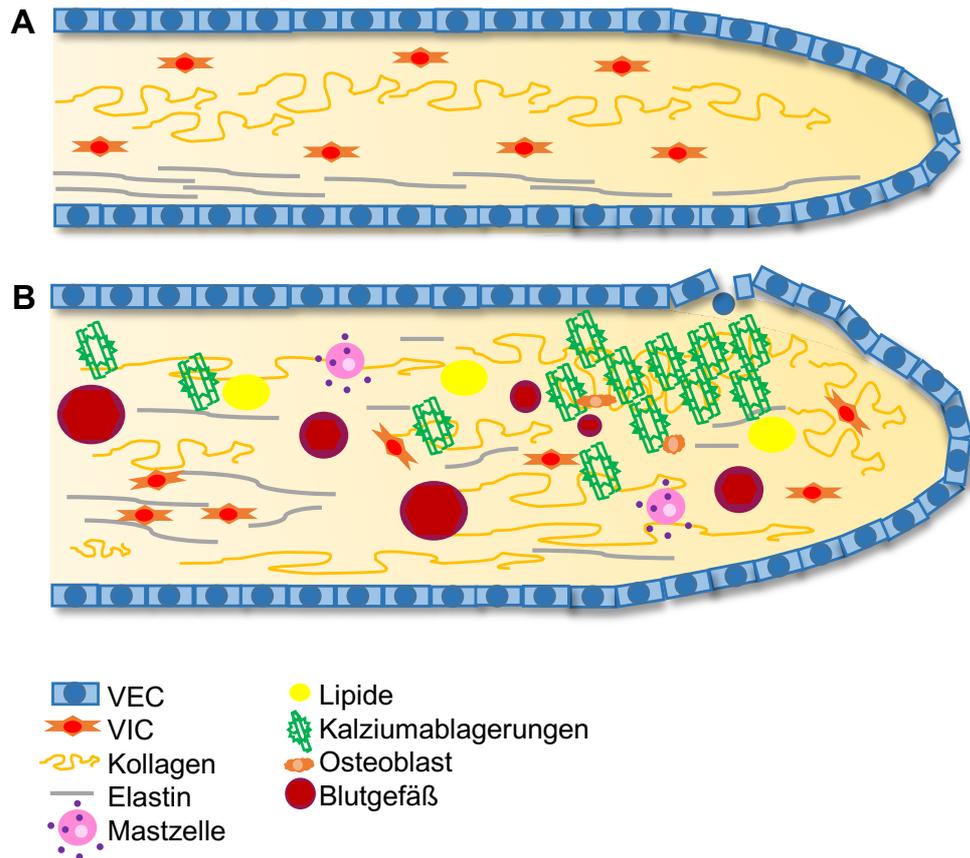


Abb. 2: Pathogenese der CAVD.

(A) Gesunde AK mit erhaltener Klappenarchitektur. (B) Pathomechanismus der CAVD: Es kommt zur endothelialen Dysfunktion, chronischer Inflammation und Ablagerung von Lipiden. Es folgen eine Ablagerung von Kalzium, eine Differenzierung von VICs in einen osteoblastischen Phänotypen sowie die Bildung neuer Blutgefäße. Zudem kommt es zu einer Verdickung, Fibrosierung und fortschreitenden Kalzifizierung der AK.

VEC = Valvuläre Endothelzelle, VIC = Valvuläre Interstitialzelle (modifiziert nach Syväranta, 2013 [31]).

1.3 Vascular Endothelial Growth Factor und Rezeptoren

Die Moleküle des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) bilden eine Gruppe aus 5 verschiedenen Glykoproteinen, die für die Kontrolle und das Wachstum verschiedenster Komponenten des vaskulären Systems verantwortlich sind [32, 33]. Zu dieser Genfamilie gehören neben VEGFA auch der Plazentawachstumsfaktor (*placental growth factor* PIGF), VEGFB, VEGFC und VEGFD [32]. Vor allem VEGFA wird hierbei in der Literatur als zentraler Regulator für Gefäßbildung angesehen, während VEGFC und VEGFD als Regulatoren der Lymphangiogenese agieren [32].

VEGFA dient hauptsächlich als Signalmolekül für Endothelzellen und besitzt neben seiner angiogenetischen Wirkung auch die Fähigkeit, eine Apoptose dieser Zellen zu verhindern [32]. Mittlerweile sind mehrere Isoformen von VEGFA bekannt, die sich in ihrer biologischen Funktion hinsichtlich ihrer Membranständigkeit und Rezeptoren-Interaktion unterscheiden [32]. Zusätzlich kann VEGFA die Permeabilität von Gefäßen regulieren, indem eine Fenestrierung des Endothels bewirkt wird und daraus eine erhöhte Durchlässigkeit resultiert [34]. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren, darunter der *Epidermal growth factor* (EGF) und TGF- β , sowie inflammatorische Zytokine führen zu einer vermehrten Expression von VEGFA und auch Hypoxie kann zu einer Erhöhung der Expression führen [32].

Während vor allem vaskuläre Endothelzellen Bindungsstellen für VEGF besitzen, konnte jedoch auch gezeigt werden, dass einige andere Zellen, wie beispielsweise Monozyten, die dem Knochenmark entstammen, sowie Makrophagen VEGF-Bindungsstellen aufweisen [32, 35, 36].

VEGF vermittelt seine Wirkung durch Bindung an VEGF-Rezeptoren (VEGFR), welche zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehören und hierbei der gleichen Subklasse wie die Rezeptoren für *EGF* und den *Platelet-derived growth factor* (PDGF) zugeordnet werden [33]. Dabei sind VEGFR-1 und -2 strukturell stark verwandt und die Bindungsstelle für VEGFA [35]. Beide Rezeptoren besitzen 7 Immunglobulin-ähnliche Domänen auf extrazellulärer Seite, eine transmembrane Region und eine Tyrosinkinasesequenz [37]. Zur gleichen Familie dieser Rezeptoren gehörend ist auch der VEGFR-3, welcher sich durch eine zusätzliche Disulfidbrücke von den anderen beiden unterscheidet und kein Rezeptor für VEGFA ist [33].

Eine Bindung von VEGF-Molekülen führt zu einer Dimerisierung mit anschließender Aktivierung der Rezeptoren, was über eine Autophosphorylierung zu einer Auslösung von verschiedenen Signalkaskaden führt [33].

Der VEGFR-1 oder *fms-like-tyrosine-kinase-1* (FLT-1) bindet neben VEGF-A auch VEGF-B und PIGF. Zudem ist auch eine lösliche Form von VEGFR-1 bekannt (*soluble-FLT-1*), bei

dem es sich um eine Splicevariante des VEGFR-1 handelt und welcher in der Lage ist, VEGF-Aktivität zu inhibieren. Diese lösliche Variante von VEGFR-1 fungiert als *Decoy*-Rezeptor und verringert vor allem die VEGF-vermittelte Wirkung von VEGFR-2. [35, 38].

Des Weiteren zeigt der membranständige VEGFR-1 eine schwache Tyrosin-Autophosphorylierung nach VEGF-Bindung, weswegen auch ihm eine regulierende Funktion zugeschrieben wird, die die VEGFR-2-Aktivität negativ beeinflusst [39]. Studien zeigen jedoch auch, dass VEGFR-1 unter pathologischen Bedingungen pro-angiogenetische Effekte besitzt, weswegen VEGFR-1 eine Doppelfunktion in der Angiogenese zugeschrieben wird und er so unter unterschiedlichen Bedingungen die Angiogenese entweder positiv oder negativ beeinflussen kann [35]. Weitere Funktionen des VEGFR-1, sowie seine pro- und antiangiogenetische Wirkung werden diskutiert und sind noch nicht abschließend geklärt [32].

VEGFR-2 oder *kinase insert domain receptor* (KDR) bindet VEGFA mit geringerer Affinität im Vergleich zu VEGFR-1. Die Hauptaufgabe von VEGFR-2 ist die Entwicklung von Angiogenese und Hämatopoese als Hauptvermittler der mitogenen, angiogenen und permeabilitäts-vermittelnden Wirkung von VEGFA [35]. Eine Aktivierung von VEGFR-2 führt zum Wachstum von Endothelzellen, indem verschiedene Signalwege nach VEGFA-Bindung innerhalb der Zelle aktiviert werden [32].

VEGFR-3 oder *fms-like-tyrosine-kinase-4* (FLT-4) bindet VEGFC und VEGFD und ist für die Lymphangiogenese von großer Bedeutung [33, 40]. In der Embryonalentwicklung ist er an der Bildung des kardiovaskulären Netzwerks beteiligt, später beschränkt sich seine Funktion auf lymphatische Gefäße [41]. Er kann mit VEGFR-2 interagieren und dessen Signalwege beeinflussen [42]. Beide Rezeptoren können gemeinsame Heterodimere bilden, die sich beispielsweise in fenestrierten Kapillaren finden [33].

Zusätzlich interagieren die VEGFR mit einer Familie von Korezeptoren, den Neuropilinen (NRP) [35]. Hierzu gehörend sind NRP-1 und NRP-2, welche ebenfalls VEGF-Moleküle binden können, sich jedoch strukturell von den VEGFR unterscheiden und nach aktuellem Stand der Forschung kein eigenes Signal nach VEGF-Bindung weitergeben können [35]. Neben VEGFA bindet NRP-1 weitere Wachstumsfaktoren, darunter TGF- β , und ist an Prozessen des Nervensystems und viralen Infektionen beteiligt. Hierbei zeigen aktuelle Studien, dass NRP-1 eine Rolle bei SARS-CoV2-Infektionen spielt, die genaue Funktion ist jedoch Gegenstand aktueller Forschung [43].

Es konnte dagegen nachgewiesen werden, dass eine Koexpression von NRP-1 eine Verstärkung der Bindung von VEGFA an VEGFR-2 zur Folge hat und so zu einer effektiveren Signaltransduktion von VEGFR-2 führt [39].

Darüber hinaus ist bekannt, dass NRP-2 mit VEGFR-3 interagiert und mit der Entwicklung von Lymphgefäßen assoziiert ist [39].

1.3.1 Rolle in der Angiogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die *de novo* Gefäßneubildung aus Endothelzellen, während Angiogenese als Prozess der Entstehung neuer Blutgefäße beschrieben wird [39]. Beide Vorgänge sind kritische Schritte während der Entwicklung und anschließenden physiologischen Homöostase, sie sind jedoch auch bei pathologischen Veränderungen, wie beispielsweise bei der Entstehung von Tumoren, verschiedensten Erkrankungen des Auges oder bei Wundheilung von Bedeutung [39, 44].

In der Literatur wird die Bildung neuer Blutgefäße als koordinierter und hochkomplexer Prozess beschrieben, in den neben den VEGFR auch eine Reihe von weiteren Rezeptoren involviert sind [35]. Der VEGF-Signalweg wird hierbei als kritischer und limitierender Schritt der physiologischen Angiogenese gesehen [35]. Studien zeigen, dass Mäuse, deren Allele für VEGFR-1 und VEGFR-2 ausgeschaltet werden, nicht überlebensfähig sind und *in utero* versterben [45, 46]. Auch postnatal ist VEGF von Bedeutung und hierbei vor allem an Gefäßbildung parallel zum Organwachstum beteiligt - daher gilt VEGF als essenziell für den Organismus im Wachstum [32, 47, 48]

Darüber hinaus ist VEGF an pathologischer Angiogenese beteiligt, wie beispielsweise malignen Tumoren. Hierbei zeigt sich die VEGF-Expression in vielen Tumoren erhöht und steht gleichzeitig in positiver Korrelation mit Invasivität, Metastasierung und schlechter Prognose des Tumors [39, 49]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit VEGF-Antikörpern einen inhibitorischen Effekt hinsichtlich des Wachstums von Tumorzellen erzielt und infolgedessen gehört eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen VEGF bei vielen malignen Tumoren mittlerweile zur ergänzenden Standardtherapie [32, 50].

1.4 Vascular Endothelial Growth Factor und Calcific Aortic Valve Disease

Das Vorhandensein neuer Blutgefäße in degenerierten AK wird regelmäßig beobachtet und beschrieben [51, 52].

Einige Studien konnten in degenerierten AK mit zunehmender Inflammation und Kalzifizierung vermehrt auch das Auftreten von Neoangiogenese nachweisen, weswegen Neoangiogenese als ein Teil des aktiven Prozesses der CAVD vermutet wird [51]. Eine Untersuchung von AK mit ossifizierten Anteilen zeigt neue Blutgefäße in allen untersuchten AK und ein Fortschreiten der Ossifikation durch Angiogenese wird diskutiert [53]. Umgekehrt werden in Klappen ohne signifikante Kalzifikation in der Regel keine neuen Blutgefäße gefunden [54]. Obwohl die Neoangiogenese mit der CAVD assoziiert ist, ist deren Rolle noch

nicht geklärt [52]. Es ist unklar, ob die entstehenden Blutgefäße in der AK eine CAVD beschleunigen, indem sie den Eintritt von Entzündungsmediatoren, wie Mastzellen, erleichtern oder ob ihre Entstehung sekundär bedingt ist, um zum Beispiel abgelagerte Moleküle abzutransportieren [52].

Auch in Klappengewebe ist eine Angiogenese assoziiert mit VEGF [52]. Bei Untersuchungen von degenerierten AK zeigt sich VEGF in Bereichen mit neuen Gefäßbildungen und Kalziumablagerungen signifikant erhöht [55].

So wird vermutet, dass von Mastzellen ausgeschüttetes VEGF Angiogenese in kalzifizierten AK induziert [52]. Darüber hinaus wird diskutiert, ob Mastzellen und Myofibroblasten den Prozess der CAVD beschleunigen, indem sie durch VEGF-Ausschüttung eine Imbalance zwischen antiangiogenen und angiogenen Faktoren bedingen und so eine Gefäßneubildung entsteht [56]. Studien zeigen, dass eine erhöhte Gefäßdichte in AK signifikant mit der Expression von VEGF und VEGFR-2 korreliert, bei VEGFR-1 kann jedoch keine Korrelation festgestellt werden [54]. Auch zeigt sich in degenerierten AK eine positive Korrelation zwischen Hypoxie und der Expression von VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 und die Bildung neuer Gefäße zur Reduzierung eines hypoxischen Zustands wird diskutiert [54, 55].

VEGF und seine Rezeptoren werden als relevant für die Pathogenese der CAVD angesehen, jedoch sind dessen Rolle und die der Neoangiogenese weiterhin unklar und stehen noch immer zur Diskussion [54].

1.5 Ziele dieser Arbeit

Im Prozess der CAVD zeigen sich mit Progression der Erkrankung Gefäßneubildungen in den betroffenen Anteilen der Klappen, wobei deren Funktion noch nicht genau verstanden ist. Die VEGFR gelten als essenziell für die Bildung neuer Blutgefäße, jedoch ist deren Rolle im Degenerationsprozess von AK bis heute weitestgehend ungeklärt. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle die VEGFR im Degenerationsprozess von AK spielen und inwieweit sie hierbei beteiligt sind.

Hierzu wurden zunächst humane AK-Taschen makroskopisch hinsichtlich ihres Degenerationsgrades eingeteilt und sowohl die Ausprägung der Degeneration als auch die Bildung neuer Blutgefäße histologisch und mittels Genexpressionsanalyse untersucht.

Anschließend wurde eine Analyse der Genexpression von VEGFR durchgeführt und die gebildeten Gruppen untereinander verglichen.

Darüber hinaus wurde ein Modell entwickelt, welches eine *in-vitro* Degeneration oviner AK-Taschen herbeiführte. Nach dessen Etablierung ermöglichte es die genauere Analyse der Genexpression von VEGFR im Zuge fortschreitender Degeneration oviner AK.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte und Software

Technische Geräte

-80 °C Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Modellnummer: HFU700TV
-20 ° C Gefrierschrank	AEG, Berlin, Deutschland, Modellnummer: AHB93331LW
Amersham Imager 600	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland, Art.-Nr. 29083467
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Autoklav	Systemec, Linden, Deutschland, VX95
Dstroy-SR-15	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland, Art.-Nr. 710398
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA,
Mini-PROTEAN® Tetra	Art.-Nr. 1658004
Homogenisator	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. Z359971-1EA
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, HERAcell 240
Kamera	Canon, Tokio, Japan, Powershot SX20IS
Kryostat	Leica, Wetzlar, Deutschland, CM 1950
Mikroskope	Leica, Wetzlar, Deutschland, DM IL LED und DM2000 LED
Mikroskop - Kamera	Leica, Wetzlar, Deutschland, DFC 425 C
PCR-Gerät	Applied Biosystems, Foster City, USA, 7300 Real Time PCR System
pH-Elektrode	WTW, Weilheim, Deutschland, SenTix21®
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland, inoLab®
Plattformschüttler	Heidolph Instruments, Schachbach, Deutschland, Polymax 2040
PowerPac™200	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Electrophoresis	
Rollenmischer	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland, Modell RS-TR 05

Tecan Reader M1000 P	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland, T3000
Vortexmischer	Heidolph Instruments, Schachbach, Deutschland, REAX top und Scientific Industries, Vortex Genie 2
Waagen	Sartorius, Göttingen Deutschland, BP 211D/ 2001 MP2/ MC1 LC 2200 P
Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Function line
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland, Typ 1092, No. 10204201C
XCell SureLock™ Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Invitrogen Art.-Nr. EI0002
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Centrifuge 5804R, 5424B und 5415R, Heraeus Laborfuge 300, Hettich Universal 16

Software

Datenverwaltung	Microsoft, Redmond, USA, Microsoft Office Excel 2016
Image J Software	National Institutes of Health, Bethesda, USA, Version 1.52a
Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland, Application Suite, Version 3.8.0
Real-Time- PCR	StepOnePlus™ Software v2.3
Statistik	GraphPad Software, San Diego, USA, GraphPad Prism 6

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Mikrovertiefung Platte	Starlab, Hamburg, Deutschland, Art.-Nr. CC7672-7506
Blottingpapier ROTILABO® 1,5 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. CL75.1

Dako Pen	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland, Art.-Nr. S2002
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland, Art.-Nr. k12450
Einbettgeschälchen	Medite, Burgdorf, Deutschland, Art.-Nr. 48-6302-00
Einmalskalpell	Pfm medical AG, Köln, Deutschland, Art.-Nr. 02.001.30.010
Falcons 15 mL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich, Art.-Nr- 655201
Falcons 50 mL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich, Art.-Nr. 227261
Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, Art.-Nr. 531032
Gelkassetten-Kämme (1 mm, 12-Well)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art.-Nr. NC3012
Gewebekulturflasche T-175	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich, Art.-Nr. 660175
Gewebekulturflasche T-75	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich, Art.-Nr. 658175
Gewebekulturflasche T-25	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich, Art.-Nr. 690175
Kosmetiktücher	Tapira, Friedewald, Deutschland, Art.-Nr. 07730012
KyroCompound	VWR International, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. VWRK1620-C
Kryoröhrchen	VWR International, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 479-1262
Küvetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 759210
Mikrozentrifugationsgefäße 1,5 mL	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland, Art.-Nr. G052BP
Nadelspitzen:BD Vacutainer Safety-Lok (Ø=0,8mm)	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr. REF 367286
Nitrozellulose Membran 0,45 um	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA, Art.-Nr. 1620115

Novex® Gelkassetten 1,5mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art.-Nr. NC2015
OP-Handschuhe steril	Semperit Investments, Segment Sempermed, Wien, Österreich, Art.-Nr. 822751721
PCR Soft Tubes 0,2 mL	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland, Art.-Nr. 711087
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg, Deutschland, Art.-Nr. S1110-3800, S1122- 1830, S111-1800, S1120-3810, S1123-1840, S1120-1810, S1126-7810
Pipettenspitzen Stripette® Zellkultur	Corning Inc., Corning, USA, Art.-Nr. 4487, Art.-Nr. 4488, Art.-Nr. 4489
Plastikbeutel	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. E706.1
Reaktionsgefäße 2 mL	Biosigma Biotechnologies, Venedig, Italien, Art.-Nr. 390691
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Biosigma Biotechnologies, Venedig, Italien, Art.-Nr. 390689
Seitenschneider	Brüder Mannesmann Werkzeug, Remscheid, Deutschland, Art.-Nr. M10956
Silikonschlauch 1/2"x3/32 60 cm, unsteril VE 10	Free Life Medical GmbH, Aachen, Deutschland, Art.-Nr. FLU0080090
Spritzenfilter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland, Art.-Nr. 17597
Stericup 500 mL	Millipore Corporation, Billerica, USA, Art.-Nr. SCGPU05RE
Stickstoff, flüssig	Uniklinik Düsseldorf, Firma Linde
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor-& Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland, Art.-Nr. 03-0040/45
Steriles Tuch	Lohmann & Rauscher, Neuwied, Deutschland, Art.-Nr. 33010

2.1.3 Genexpressionsanalyse und Primer

Chemikalien

2-Propanol >99% (Isopropanol)	VWR International, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 20839.366
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Santa Clara, USA, Art.-Nr. 5067-1511
Aqua destillata	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland, PZN-Nr. 04914151
Chloroform 99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. C2432-500ML
Ethanol LiChrosolv®	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.11727.2500
Master Mix GoTaq® qPCR	Promega, Wallstadt, Deutschland Art.-Nr- A6001
QuantiTect®Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.-Nr. 205313
Rnase Away®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art.-Nr. 7003
Rnase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.-Nr. 79256
Rnase-freies Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.15333.2500
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.-Nr. 74106
Trizol Reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. T9424

Primer

Tabelle 1: Humane Primer

Gen	Vorwärtssequenz (5'-3')	Rückwärtssequenz (5'-3')
FLT1	GAAATCACCTACGTGCCGGA	CGTTCAGATGGTGGCCAATG
KDR	CGGTCAACAAAGTCGGGAGA	CAGTGCACCACAAAGACACG
FLT4	GGAGTCACACGTCATCGACA	AGCAACACCTTGCAGTAGGG
NRP1	CTCCACGCGATTTCATCAGGA	CCACCTGTGAGCTGGAAGTC
COL1A1	ATGACTATGAGTATGGGGAAGCA	TGGGTCCCTCTGTTACACTTT
COL3A1	TGGAGGATGGTTGCACGAAA	ACAGCCTTGCGTGTTCGATA
COL5A1	AGATGGCAAGTGGCACAGAA	GTGGTCCGAGACAAAGAGCA
ACTA2	CGGGACTAAGACGGGAATCCT	AGAGCCATTGTACACACCA
RPL13A	GTACGCTGTGAAGGCATCAA	GTTGGTGTTCATCCGCTTG

FLT1= VEGFR-1, KDR= VEGFR-2, FLT4= VEGFR-3, NRP1= Neuropilin 1, COL1A1= Kollagen Typ 1, COL3A1= Kollagen Typ 3, COL5A1= Kollagen Typ 5, ACTA2= α -SMA, RPL13A= Ribosomales Protein L13a

Tabelle 2: Ovine Primer

Gen	Vorwärtssequenz (5'-3')	Rückwärtssequenz (5'-3')
FLT1	CGAGACGACAGTGAATGGAT	TATTTACTTCTCCAGGGTATCTCCA
KDR	AGGTAAGCCTCTTGGTCGTG	TGTGTGTTGCTCCTTCTTTCAAC
NRP1	GGGTTTCCCGACAAGTACCC	CAATCAGGGGTCCAACATGG
COL1A1	AAGACATCCCACCAGTCACC	TAAGTTCGTGCGAGATCACG
COL3A1	GACATAGAGGCTTTGATGGACGA	CACTTCCTCGAGCTCCATCG
COL5A1	CGAGAACCCGGATGAGAACC	GGCCTCCGATCCCTTCATAGA
ACTA2	TAGAACACGGCATCATCACC	TGAGAAGGGTTGGATGCTCT
BGLAP	GAAGAGACTCAGGCGCTACC	GCTCATCACAGTCAGGGTTG
TNFRSF11B	GCGTGTGTGAATGTGAGGAG	CGAGAAGAACCCATCTGGAC
TGF- β	GAGCCAGAGGCGGACTACTA	TCGGACGTGTTGAAGAACAT
RPL 13A	GATCCCACCACCCTATGACA	CTTCAGACGCACAACCTTGA

FLT1= VEGFR-1, KDR= VEGFR-2, NRP1= Neuropilin 1, COL1A1= Kollagen Typ 1, COL3A1= Kollagen Typ 3, COL5A1= Kollagen Typ 5, ACTA2= α -SMA, BGLAP= *Bone γ -Carboxylglutamic Acid-containing Protein* (Osteocalcin), TNFRSF11B= *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 11B* (Osteoprotegerin), TGF- β = *Transforming growth factor beta*, RPL13A= Ribosomales Protein L13a

2.1.4 Zellkultur

Chemikalien

β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. G9422
Amphotericin B	Gilead, Foster City, USA, Art.-Nr. 62044908
Aqua destillata	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland, PZN-Nr. 04914151
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. CN93.1
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. D-5879
Dulbecco's modified- eagle medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. D6546
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. F7524
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. G9391
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland, Art.-Nr. 6096595.00.00
Nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. M7145-100ML
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	gibco by LifeTechnologies, Carlsbad, USA, Art.-Nr 14190-094
Penicillin/Streptomycin	gibco by LifeTechnologies, Carlsbad, USA, Art.-Nr. 15140-122
Glutamin 200mM	gibco by LifeTechnologies, Carlsbad, USA, Art.-Nr. 25030-024
Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	gibco by LifeTechnologies, Carlsbad, USA, Art.-Nr. 25200-056

Grundmedium

DMEM
1% FCS
1% Glutamin
1% Penicillin/ Streptomyc
1% Amphotericin B

1% Nicht-essenzielle Aminosäuren

2.1.5 Histologie

Chemikalien

2-Methylbutan/ Isopentan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 3927.2
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 5025.5
Albumin Fraction V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 8076.3
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art. Nr. A5533-25G
Ammoniaklösung 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. CP17.1
Aqua destillata	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland, PZN-Nr. 04914151
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland, Art.-Nr. 1B-109
Diamidino-2- Phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 6335.1
Di-Natriumhydrogen phosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 4984.3
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art. Nr. 136489-100G
Eosin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. 861006-100G
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 6755.2
Ethanol 100% (EtOH)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd (FA) 37%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 4979.2
Formaldehyd (FA) 4%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. P087.3
Gill 3 Hämatoxylin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art.-Nr. 6765009
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. H3136-25G
Jod	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 7935.1
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. HN02.3
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 3904.1
Kaliumjodid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 8491.3
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. N069.1

Leica Eindeckmedium (CV Ultra)	Leica, Wetzlar, Deutschland, Art.-Nr. 14070937891
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.09249.0500
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. HN00.3
Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.06392.1000
Pikrinsäure	VWR International, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 84512.260
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. P4417-50TAB
Phosphowolframsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. P4006-250G
RotiHistokitt II	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. T160.2
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland, Art.-Nr. 5A-394
Salzsäure (HCl) 37%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 2601.1
Säurefuchsin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. T128.1
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. T9284-500ML
Tween 20 Detergent	Calbiochem Novabiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 655205
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 9681.1
Xylol	VWR International, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 2897.325
2.1.6 Proteinanalyse	
2-Propanol	VWR International, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 20839.366
Albumin Fraction V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 8076.3
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. A3678-25G
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. A515.1
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. B0126-25G
Complete™ Mini	Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. 11836153001
Proteasehemmer-Cocktail	
Dithiothreitol 99% (dTT)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. D9779

Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. I9516
Methanol	VWR International, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 20847.320
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylen-diamin (TEMED)	BIO RAD, Hercules, USA, Art.-Nr. 161-0801
PageRuler Plus Pre-stained ProteinLadder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art.-Nr. 26616
Pearce™ BCA Protein Assay Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr 23225
PhosSTOP	Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. 04906845001
RIPA Lysis Buffer, 10 X	Millipore Corporation, Billerica, USA, Art.-Nr. 20-188
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. CN 30.1
Tris Base	Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Art.-Nr. T1503-1KG
Tris HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 9090.3
Tween 20 (Polyoxyethylen- sorbitan-monolaurat)	Calbiochem Novabiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 655205
WesternBright® Quantum®	Advansta Inc., San Jose, USA, Art.-Nr. K-12042-C20

2.1.7 Antikörper

Primärantikörper

	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
anti- α SMA	Maus	1:1000 (BSA)* 1:300 (BSA)**	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA A5228
anti-Vimentin	Meerschweinchen	1:1000 (TBST)* 1:100 (BSA)**	Progen Biotechnik, Heidelberg, Deutschland GP53
anti-vWF	Hase	1:300 (BSA)**	Dako, Hamburg, Deutschland A0082

anti-GAPDH	Hase	1:2000 (TBST)*	Cell Signaling, Danvers, USA 5174S
<u>Sekundärantikörper</u>			
Goat-anti-rabbit	Ziege	1:10000 (TBST)*	Dianova, Hamburg, Deutschland 111-035-003
Goat-anti-mouse	Ziege	1:10000 (TBST)*	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA 115-035-044
Goat-anti-guinea-pig	Ziege	1:10000 (TBST)*	Dianova, Hamburg, Deutschland 106-035-003
Goat anti-rabbit	Ziege	1:200 (BSA)**	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA A-11010
Goat-anti-guinea-pig	Ziege	1:200 (BSA)**	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA A11073
Goat anti-mouse	Ziege	1:200 (BSA)**	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA A-11029

* Western-Blot

** Immunfluoreszenz

2.1.8 Puffer und Lösungen

Name	Inhalt	Menge
Alcianblau-Lösung 1%	Alcianblau	2 g
	Destilliertes Wasser	200 mL
Alizarinrot- Lösung 2% (pH 4.2)	Alizarinrot S	1 g
	Destilliertes Wasser	50 mL
Alkalischer Alkohol	Ammoniumhydroxid 30%	40 mL
	EtOH 96%	360 mL
Alkoholischer Safran	Safran du Gatinais,	12 g
	EtOH 100%	200 mL
Alkoholisches Hämatoxylin 2%	Hämatoxylin	10 g
	EtOH 96%	500 mL
Bouin´s Lösung	Pikrinsäure	300 mL
	FA 37%	100 mL
	Essigsäure 100%	20 mL
Brilliant Crocein R Stock	Brilliant Crocein R	4 g
	Destilliertes Wasser	398 mL
BSA-Lösung 1%	Albumin Fraction V	1 g
	PBS	100 mL
BSA-Lösung 5 %	Albumin Fraction V	2,5 g
	TBST	50 mL
BSA- 5%-Tween 0,1%- Lösung	Albumin Fraction V,	5 g
	Tween 20 Detergent	100 uL
	PBS	99,9 mL
Crocein-Säurefuchsin	Säurefuchsin Stock	20 mL

	Brilliant Crocein R	80 mL
Eisenchlorid-Lösung	Eisen-Chlorid-Hexahydrat	12,4 g
	HCl 37%	5 mL
	Destilliertes Wasser	500 mL
Eosin-Lösung	Eosin	1 g
	EtOH 100%	100 mL
	Eisessig	200 uL
	Destilliertes Wasser	100 mL
Essigsäure 1%	Essigsäure 100%	5 mL
	Destilliertes Wasser	190 mL
H ₂ O ₂ - Lösung 3%	H ₂ O ₂ 30%	8 mL
	PBS	72 mL
HCl-Lösung 1%	HCL 37%	2,7 mL
	Destilliertes Wasser	97,3 mL
Jodlösung	Jod	10 g
	Kaliumjodid	20 g
	Destilliertes Wasser	500 mL
Laufpuffer	Glycin	200 mM
	Tris Base	25 mM
	SDS	0,10 %
	Destilliertes Wasser	ad 1L
Natriumthiosulfatlösung 5%	Natriumthiosulfat,	10 g
	Destilliertes Wasser	200 mL
Phosphatgepufferte Salzlösung	NaCl,	8 g
	KCl,	0,2 g

	Na ₂ HPO ₄	1,78 g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	Destilliertes Wasser	1000 mL
Phosphowolframsäure 5%	Phosphowolframsäure	25 g
	Destilliertes Wasser	500 mL
Säurefuchsin Stock	Säurefuchsin	0,5 g
	Destilliertes Wasser	497,5 mL
	Essigsäure 100%	2,5 mL
Silbernitratlösung 5%	Silbernitrat,	10 g
	Destilliertes Wasser	200 mL
Transferpuffer	Glycin	200 mM
	Tris base	25 mM
	Methanol	20 %
	Destilliertes Wasser	1 L
Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST, pH 7,6)	Tris base	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,10%
	Destilliertes Wasser	1 L
Triton-X-Lösung 0,25%	Triton X	250 uL
	PBS	99,75 mL
Weigerts Eisenhämatoxylin	Eisenchloridlösung	40 mL
	Jodlösung	20 mL
	Alkoholisches Hämatoxylin	60 mL

2.2 Methoden

2.2.1 Humane Aortenklappen

2.2.1.1 Patienten

Die Untersuchungen erfolgten an humanen AK von Spendern, bei denen in der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf eine Herztransplantation (HTx) oder ein AK-Ersatz durchgeführt wurde. Es wurden nur Spender mit trikuspiden AK berücksichtigt, von einer Trennung nach Alter und Geschlecht wurde abgesehen.

Folgende Ausschlusskriterien hinsichtlich der Anamnese des Patienten wurden vor Auswahl formuliert:

Vorerkrankungen:

- Diabetes Mellitus Typ 1
- Chronische Niereninsuffizienz (Kreatininwert >1,2 mg/dl)

Infektionen:

- Humane Immundefizienz (HIV)
- Virale und Autoimmun-Hepatitis
- Endokarditiden

2.2.1.2 Ethikvotum und Einverständnis

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an humanen AK wurden von der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität ein Ethikvotum mit der folgenden Nummer erteilt: Am 12.12.2013 mit der Studiennummer 4412R.

Alle Patienten, deren AK in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden ausführlich über die Studie informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung.

2.2.1.3 Anamnese und Datenbank

Zu jedem Patienten wurde eine ausführliche Anamnese erstellt, die unter anderem Daten wie Operationsindikation, Alter, Geschlecht, Größe, Körpergewicht und Vorerkrankungen beinhaltet. Ein besonderer Schwerpunkt wurde hierbei auf Merkmale gelegt, die das kardiovaskuläre System betreffen: Vorerkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2, arterielle Hypertonie, Koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), sowie Nikotinkonsum.

Die Daten wurden pseudonymisiert in der Datenbank der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf festgehalten.

2.2.1.4 Erhalt der Aortenklappen und Einteilung der Gruppen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen AK entstammen aus der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Nach erfolgter Operation wurden die AK- Taschen umgehend fotografiert und anschließend in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Einteilung der AK-Taschen erfolgte nach Patienten, bei denen eine HTx durchgeführt wurde und Patienten nach AK-Ersatz. Darüber hinaus wurden die AK-Taschen makroskopisch hinsichtlich ihrer Degeneration beurteilt: Ohne sichtbare Veränderung, mit fibrotischen oder kalzifizierten Degenerationen.

So ließen sich drei Gruppen unterscheiden: Die AK-Taschen, die keine makroskopisch sichtbare Degenerationen aufwiesen, fungierten als Kontrollgruppe (n=14). Diese AK stammten ausschließlich von Patienten, bei denen eine HTx durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde eine Gruppe mit fibrotischen Veränderungen ohne Anzeichen von Kalzifizierungen der AK (n= 20) und eine Gruppe mit umfangreichen kalzifizierten Anteilen (n= 20) gebildet.

Ergänzend wurde bei 10 Patienten die degenerierte AK-Tasche vor Konservierung makroskopisch in einen fibrotischen und einen kalzifizierten Anteil getrennt und diese zur weiteren Analyse verwendet.



Abb. 3: Humane AK.

(A) AK-Tasche nach Herztransplantation ohne Anzeichen von Degeneration. (B) Fibrotische AK-Tasche ohne Anzeichen von Kalzifizierungen. (C) Kalzifizierte AK-Tasche.

2.2.2 Ovine Aortenklappen

2.2.2.1 Erhalt der Aortenklappen

Für die in dieser Arbeit untersuchten AK wurden Herzen von 6-9 Monate alten Schafen verwendet, die von einem lokalen Schlachter bezogen wurden (Laame GmbH & Co. KG, Wuppertal). Die Tötung der Schafe erfolgte nicht zur Durchführung der hier beschriebenen Experimente, keine Versuche wurden an lebenden Tieren durchgeführt und es erfolgten keine Experimente vor Schlachtung der Tiere. Für die Präparation der ovinen AK erfolgte zunächst die Entfernung der Herzspitze. Das linke Herz wurde an der Wand des linken Ventrikels aufgeschnitten und die Mitralklappe sowie der linke Vorhof durchtrennt.

Anschließend wurde die AK mittels Durchtrennung an den Kommissuren zwischen Aorta und linkem Ventrikel eröffnet – die Anatomie der Klappe blieb dabei erhalten. Die AK-Taschen wurden unter sterilen Bedingungen zur weiteren Verarbeitung mittels Skalpell aus der Aorta herausgetrennt (Abb. 4 A-F).

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 In-vitro-Aortenklappenmodell

Nach Präparation wie unter 2.2.2.1 beschrieben wurden die ovinen AK-Taschen in steriler PBS-Lösung (Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 100U/mL Penicillin-Streptomycin und 1 % Amphotericin B) gewaschen und alle Blutbestandteile entfernt. Mit einem Skalpell wurden Ringe von 1 cm Breite aus einem Silikon Schlauch hergestellt, mit einer Drahtschere Nadelspitzen von etwa 1 cm Länge von Blutentnahmenadeln (*Vacutainer*) abgetrennt und anschließend autoklaviert.

Für das AK-Modell wurden die AK-Taschen unter passiver Spannung mit jeweils 3 Nadeln pro AK-Tasche auf den Silikonringen befestigt (Abb. 4 G-I).

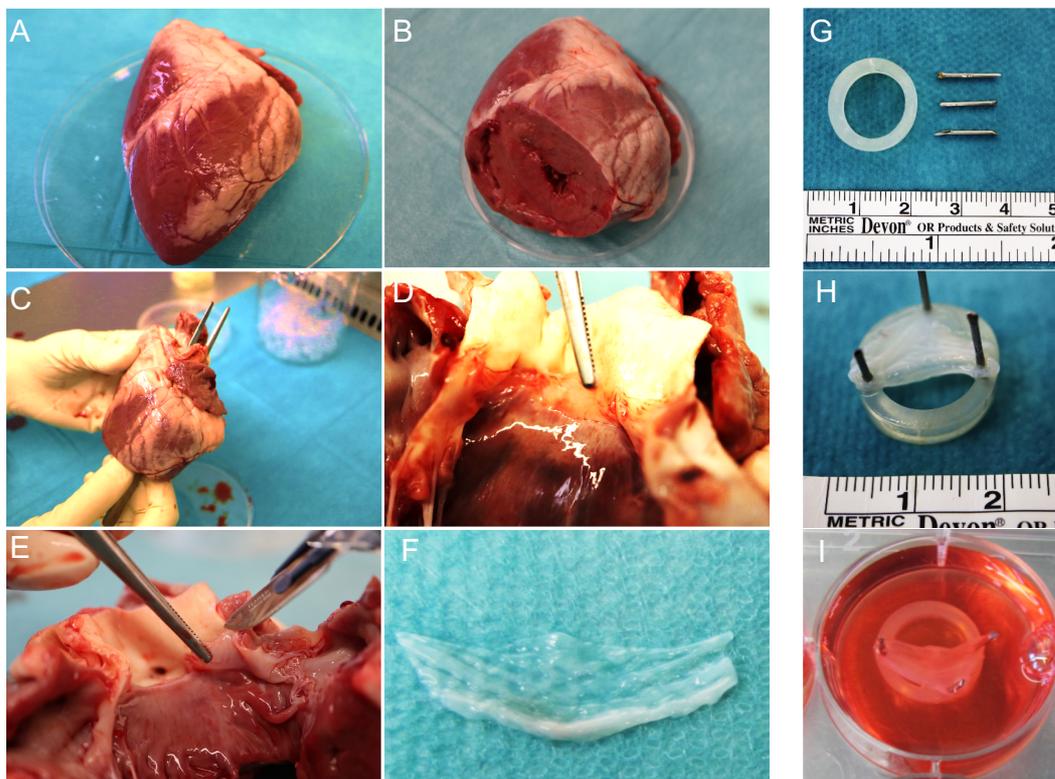


Abb. 4: Präparation und Herstellung des in-vitro-Aortenklappenmodells.

(A) Ovinen Herz (B) – (F) Präparation der ovinen AK-Taschen (G) Benötigte Materialien (Silikonring und Nadeln) (H) Aufgespannte AK-Tasche (I) Kultivierung von gespannter AK-Tasche

2.2.3.2 In-Vitro-Degeneration

Die AK-Taschen wurden unter pro-degenerativen (pd) Bedingungen kultiviert: *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) versetzt mit 10 % FCS, 10 mM β -Glycerolphosphat (β -GP) und 1.5 mM Calciumchlorid. Die AK-Taschen wurden in 6-Well-Platten in 10 mL DMEM kultiviert. Pro Spender wurde eine AK-Tasche unter pro-degenerativen Bedingungen kultiviert, während eine zweite AK-Tasche vom gleichen Spender als Vergleich unter Kontrollbedingungen verwendet wurde. Die Kultivierungsdauer betrug bis zu 56 Tage (d), ein Mediumwechsel erfolgte alle 7 d.

2.2.4 Genanalyse

2.2.4.1 Vorbereitung Gewebe

Die humanen und ovinen AK-Taschen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und mittels Mörser zerkleinert. Anschließend wurden die Proben in ein 2 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und in je 1 mL Trizol mittels Homogenisator für 5 Minuten lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 0,2 mL Chloroform hinzugefügt und die Probe so lange vermischt, bis die Phasentrennung aufgehoben war. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 6° C und 11.000 Umdrehungen (*revolutions per minute*, rpm) pro Minute. Danach wurde die entstandene obere wässrige Phase mittels Pipette entnommen und mit 0,5 mL Isopropanol versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 6°C bei 11.000 Umdrehungen (rpm) zentrifugiert. Der hier entstandene Überstand wurde entfernt und das gebildete Pellet mit 1 mL 75 % Ethanol (EtOH) gewaschen. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation von 5 min bei 4° C und 8600 Umdrehungen (rpm) sowie eine erneute Entfernung des Überstandes. Abschließend wurde das Pellet für 2 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 100 uL RNase-freiem Wasser gelöst.

2.2.4.2 Isolation RNA

Die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) wurden mittels *RNeasy mini kit*® nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die RNA in 30 uL RNase-freiem Wasser gelöst und die Proben zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Eine Lagerung der RNA erfolgte bei -80 ° C.

2.2.4.3 Messung der RNA-Konzentration und -Qualität

Die Messung der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe des Tecan Readers M1000 Pro durchgeführt. Eine Kalibrierung erfolgte mit 2 uL Wasser. Anschließend wurden jeweils 2 uL pro Probe entnommen und zur Messung verwendet.

Die Qualitätskontrolle wurde mittels Kapillargelelektrophorese durchgeführt, indem das Agilent RNA 6000 Nano Kit und ein Agilent 2100 Bioanalyzer System verwendet wurde. Die Qualität der gemessenen RNA wurde mittels RNA-Integritätsnummer (RIN) klassifiziert, die von der Bioanalyzer-Software berechnet wurde. RIN-Werte von 1 zeigten dabei die niedrigste Qualität bei gleichzeitig hoher Degradierung an, während RIN-Werte von 10 die höchste Qualität anzeigten. Proben mit RIN-Werten über 7 wurden für die Genexpressionsanalyse verwendet.

2.2.4.4 Herstellung der cyclischen DNA

Zur Umschreibung der RNA in cyclische Desoxy-RNA (cDNA) wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* unter Befolgung der Herstellerangaben sowie ein Thermocycler verwendet. Pro Probe wurden jeweils 1 µg RNA umgeschrieben.

Nach Herstellung der cDNA wurde die Konzentration der cDNA-Lösung auf 5ng/ul eingestellt und die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.4.5 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Die semiquantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde unter Verwendung von GoTaq® qPCR Master Mix mittels *Real-time-Cycler* durchgeführt. Für jedes zu untersuchende Gen wurden pro Probe immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Das PCR-Protokoll beinhaltete einen initialen Schritt für 2 Minuten bei 50° C, gefolgt von 2 Minuten bei 95° C. Es erfolgten 40 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95° C, 30 Sekunden bei 60° und daraufhin Einzelschritte für 15 Sekunden bei 95° C, 1 Minute bei 60°C und 15 Sekunden bei 95° C.

Die Primer-Sequenzen für humane und ovine Gene sind Kapitel 2.1.3 zu entnehmen. Die Expression des ribosomalen Proteins L13a (RPL-13A) diente als Referenz-Gen für humane und ovine Proben. Bei Abweichungen der Doppelbestimmungen von CT-Werten > 1 erfolgte eine Wiederholung. Hierbei wurde die StepOne Software v2.3 verwendet, die weitere Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta CT$ -Methode [57].

2.2.5 Proteinanalyse

Eine Differenzierung von VICs in einen myofibroblastischen Phänotypen führt zu einer erhöhten Expression von α SMA und VIM [7]. Zur Analyse von α SMA und VIM wurden ovine AK-Taschen verwendet.

2.2.5.1 Vorbereitung der Proben und Proteinkonzentrationsbestimmung

Die AK-Taschen wurden, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, präpariert, in flüssigem Stickstoff gefroren und mittels Mörser zerkleinert. Anschließend wurde jeweils 200 µL RIPA-Puffer versetzt mit *Complete™ Mini Proteasehemmer-Cocktail* und *PhosSTOP* zu den Proben hinzugegeben und diese für 15 Minuten mittels Ultraschall lysiert.

Daraufhin wurden die Proben für 20 Minuten bei 13.000 Umdrehungen (rpm) zentrifugiert und der entstandene Überstand zur weiteren Verwendung in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt.

Der Proteingehalt wurde mittels *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* unter Befolgung der Herstellerangaben bestimmt, hierbei wurde eine 96-Well-Platte verwendet.

Die Proben wurden in einer Endkonzentration von 1 µg/µL mit Laemmli-Puffer angesetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung Laemmli-Puffer

Reagenz	Menge
Tris HCL	375 mM
Glycerol	60%
Sodiumdodecylsulfat	12,6 %
Dithiothreitol	600 mM
Bromphenolblau	0,09 %
Destilliertes Wasser	

2.2.5.2 Sodiumdodecylsulfat -Polyacrimid-Gelelektrophorese

Im nächsten Schritt wurde eine Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer gefüllt und ein Polyacrylamid-Gel bestehend aus Sammel- und Trenngel in die Kammer eingesetzt. Die Zusammensetzung der beiden Gele ist Tabelle 4 zu entnehmen. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, ergänzend wurde als Proteingrößenstandard *PageRuler Prestained Protein Ladder* verwendet. Für die ersten 15 Minuten wurde eine Spannung von 60 Volt angelegt, eine Auftrennung der Proteine fand unter einer Spannung von 200 Volt statt, bis die Lauffront der Proteine das Gel komplett durchlaufen hatte.

Tabelle 4: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für die Gelelektrophorese

Reagenz	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Destilliertes Wasser	4,85 mL	3,18 mL
Bisacrylamid 40%	2,5 mL	0,5 mL
Tris Base 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	1,26 mL
Sodiumdodecylsulfat 10% (w/v in destilliertem Wasser)	100 uL	50 uL
Tetramethylethylendiamin	5 uL	5 uL
Ammoniumperoxosulfat 10%	50 uL	25 uL

2.2.5.3 Western Blot und Immunodetektion

Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot-Analyse, indem die Proteine von dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 100 Volt, 3 Ampere und 300 Watt für 90 Minuten. Im Anschluss wurde eine Blockierung mit 5 % BSA in 0,1% Tris-gepufferter Salzlösung versetzt mit Tween 20 (TBST) für 60 Minuten durchgeführt. Eine Inkubation mit Primärantikörpern gegen α SMA und VIM erfolgte bei 4° C über Nacht. Zur Normalisierung der Werte wurde zusätzlich ein Primärantikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Nach drei Waschschritten mit 10 mL TBST für jeweils 5 Minuten folgte zur Detektion der Primärantikörper eine Inkubation mit Sekundärantikörpern für 60 Minuten und anschließend drei Waschschrritte mit TBST.

2.2.5.4 Auswertung

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das *WesternBright® Quantum®* Detektionssystem nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Digitalisierung der Membran fand mittels Amersham Imager 600 statt, eine densitometrische Auswertung erfolgte mit der ImageJ Software 1.52a.

2.2.6 Histologie

2.2.6.1 Anfertigung von Kryo-Schnitten

Die humanen und ovinen AK-Taschen wurden in PBS gewaschen und anschließend mit *KP-CryoCompound* in flüssigem Stickstoff kältekonservert. Für die anschließende Durchführung von histologischen Färbungen wurden jeweils Schnitte von 8 um angefertigt (Leica CM1950 Mikrotom).

2.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen, anschließend in einer Hämatoxylin-Lösung inkubiert und erneut in destilliertem Wasser gewaschen. Es erfolgte eine Differenzierung in 5 % Essigsäure. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen und in 70 % EtOH dehydriert. Die anschließende Eosin-Färbung erfolgte durch 2 % Eosin B Lösung. Nach einer Dehydratation mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % EtOH) erfolgte eine Entfettung mit Xylol.

2.2.6.3 Alizarin-Färbung

Die Schnitte wurden in 4 % Formaldehyd (FA) fixiert und mit 2 % Alizarinrot S Lösung mit einem pH-Wert von 4.3 gefärbt. Anschließend erfolgte eine Dehydratation mittels Azeton, Azeton-Xylol (Verhältnis 1:1) und Xylol.

2.2.6.4 Von-Kossa-Färbung

Die Schnitte wurden in -20° C kaltem Aceton fixiert, an der Luft getrocknet und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgte eine Inkubation in 5 % Silbernitratlösung. Nach dreimaligem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung reduziert und unter Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte eine Fixierung in einer 5 % Natriumthiosulfatlösung und eine erneute Spülung mit destilliertem Wasser und Leitungswasser. Daraufhin wurde eine Kernfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat durchgeführt, bevor die Schnitte in destilliertem Wasser gespült wurden. Nach Dehydratation mittels aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 % EtOH) erfolgte eine Entfettung mit Xylol.

2.2.6.5 Movat Pentachrom-Färbung

Die Durchführung der Movat-Pentachrom-Färbung erfolgte nach gängigen Standardprotokollen. Es erfolgte ein Waschschrift mit destilliertem Wasser und eine Fixierung der Schnitte in 37 % FA. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in 50° C warmer Bouin's-Lösung (Pikrinsäure, 100 % Essigsäure und 37 % FA) und anschließend in 5 % Natriumthiosulfat inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die Präparate in Alcianblau gefärbt, erneut mit Leitungswasser gewaschen und anschließend in alkalischem EtOH (3 % Ammoniak mit EtOH) stabilisiert. Nach intensivem Abwaschen unter Leitungswasser wurden die Schnitte mit Weigerts-Arbeitslösung (5 % alkoholisches Hämatoxylin, 10 % Eisenchlorid und Weigerts-Jod-Lösung) gefärbt. Nach Abspülen mit Leitungs- und destilliertem Wasser erfolgte eine Färbung mit Brilliant- Crocein-

Säurefuchsin-Lösung, ein erneutes Abspülen und eine Färbung mit Phosphorwolframsäure (5 %). Es folgte ein Waschschriff mit 1 % Essigsäure und destilliertem Wasser mit anschließender Dehydratisierung in EtOH. Nachdem die Proben in alkoholischer Safran-Lösung gefärbt wurden, erfolgte eine Dehydratisierung in EtOH und eine Entfettung der Schnitte mit Xylol.

2.2.6.6 Fixierung der Färbungen

Die gefärbten Proben wurden mit Roti™HistoKitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versiegelt und mittels Leica DM2000 Mikroskop mit Kamera (Leica DFC 425C) digital dargestellt.

2.2.6.7 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Schnitte wurden in 4 % FA für 10 Minuten fixiert und anschließend für weitere 10 Minuten in 0.25 % Triton-X-100 in PBS inkubiert. Anschließend folgten 3 Waschschriffe in PBS. Nach Blockierung mit 5 % BSA für 60 Minuten wurden Primärantikörper gegen von-Willebrand-Faktor (vWF), VIM und α SMA über Nacht bei 4° C inkubiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Sekundär-Fluoreszenz-Antikörpern (Alexa488 und Alexa546) für 60 Minuten und 4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) für 10 Minuten. Nach 3 Waschschriffen mit PBS und einmaligem Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Proben mit Leica Eindeckmedium konserviert. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mittels DM2000 Mikroskop, einer DFC425C Kamera und LAS Software (Leica Version 3.8) aufgenommen.

2.2.7 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mittels Prism 6 Software von GraphPad durchgeführt. Für Vergleiche mit zwischen zwei ungepaarten Gruppen wurde ein *Student's t-Test* verwendet, bei drei Gruppen ein nichtparametrischer *Kruskal-Wallis-Test* mit darauffolgenden *Dunn's multiple comparisons Test*. Für gepaarte Analysen wurde ein *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* angewendet. Statistische Unterschiede von kategorialen Variablen bei Analyse der Patientendaten wurden mit einem *Chi-Quadrat-Test* (χ^2 -Test) berechnet.

Alle dargestellten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Signifikanzen wurden als p-Wert < 0,05 (*), <0,01 (**), <0,001 (***) oder ns (nicht signifikant) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse gesamter humaner Aortenklappentaschen

3.1.1 Patientenkohorte

Die Patienten wurden nach makroskopischer Einteilung der AK-Taschen in 3 Gruppen eingeteilt (Kontroll-AK, fibrotische AK, kalzifizierte AK, s. Kapitel 2.2.1.4).

Der Anteil männlicher Patienten in der Kontrollgruppe betrug 100 %, während der Anteil bei Patienten mit fibrotischen Veränderungen bei 50 % und bei Patienten mit kalzifizierten Veränderungen bei 55 % lag. Das Durchschnittsalter bei Patienten der Kontrollgruppe betrug 57 Jahre, bei Patienten mit fibrotischen Veränderung 71 Jahre und bei Patienten mit kalzifizierten Veränderungen der AK 77 Jahre (Kontrolle: 57 ±11, fibrotische AK: 71 ± 10, kalzifizierte AK: 77 ± 5, $p < 0.0001$). Die häufigste Komorbidität war arterielle Hypertonie, an der 80 % aller Patienten erkrankt waren, gefolgt von Dyslipoproteinämie (48 %) und Diabetes mellitus Typ 2 (46%). Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen.

Tabelle 5: Patientendaten den 3 gebildeten Gruppen zugeordnet.

	Kontroll- AK (n= 14)	Fibrotische AK (n= 20)	Kalzifizierte AK (n= 20)	p-Werte
Geschlecht (männlich)	14 (100)	10 (50)	11 (55)	0.0056
Alter (in Jahren)	57 ± 11	71 ± 10	77 ± 5	< 0.0001
BMI (kg/m ²)	26 ± 4	29 ± 6	28 ± 5	0.2909
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:				
- Raucheranamnese	1 (7)	8 (40)	7 (35)	0.0952
- Arterielle Hypertonie	11 (79)	15 (75)	17 (85)	0.7300
- T2DM	7 (50)	8 (40)	10 (50)	0.7763
- Dyslipoproteinämie	5 (36)	9 (45)	12 (60)	0.3549
KHK	6 (43)	14 (70)	14 (70)	0.1943
Extrakardiale Gefäßkrankungen (cAVK, pAVK)	1 (7)	8 (40)	7 (35)	0.0952

AK = Aortenklappe, BMI = *Body mass index*, T2DM= Diabetes Mellitus Typ 2, KHK = Koronare Herzkrankheit, cAVK = Cerebrale arterielle Verschlusskrankheit, pAVK = Periphere arterielle Verschlusskrankheit. Zur Berechnung wurde für kategoriale Variablen ein Chi-Quadrat-Test, für metrische Parameter ein Kruskal-Wallis-Test verwendet, das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt, dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung (SD) oder n (%).

3.1.2 Degeneration in fibrotischen und kalzifizierten Aortenklappentaschen

3.1.2.1 Veränderte Klappenarchitektur und Kalzifizierung

Zur genaueren Beurteilung der Degeneration wurden histologische Untersuchungen an AK-Taschen aus allen 3 Gruppen durchgeführt (n= 3). Eine H.E.-Färbung diente als Übersicht (Abb. 5 A). Um Kalziumablagerungen darzustellen, wurde eine Alizarin-Färbung durchgeführt, bei der in kalzifizierten AK-Taschen deutliche Kalziumablagerungen (rot) im Bereich der Fibrosa zu erkennen waren (Abb. 5 B). Auch in fibrotischen Aortenklappen ließen sich teilweise kleinere Anteile von kalzifizierten Arealen erkennen, während in AK-Taschen nach HTx keine Kalziumablagerungen zu erkennen waren. Ergänzende Von-Kossa-Färbungen bestätigten das Ergebnis.

Zur Darstellung der EZM diente eine Movat-Pentachrom-Färbung, die eine erhaltene EZM mit klarer Abgrenzung aller drei Schichten in AK-Taschen der Kontrollgruppe zeigte, bei fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen war keine klare Abgrenzung mehr zu erkennen (Abb. 5 C). Sowohl fibrotische als auch kalzifizierte AK-Taschen zeigten sich unregelmäßig verdickt.

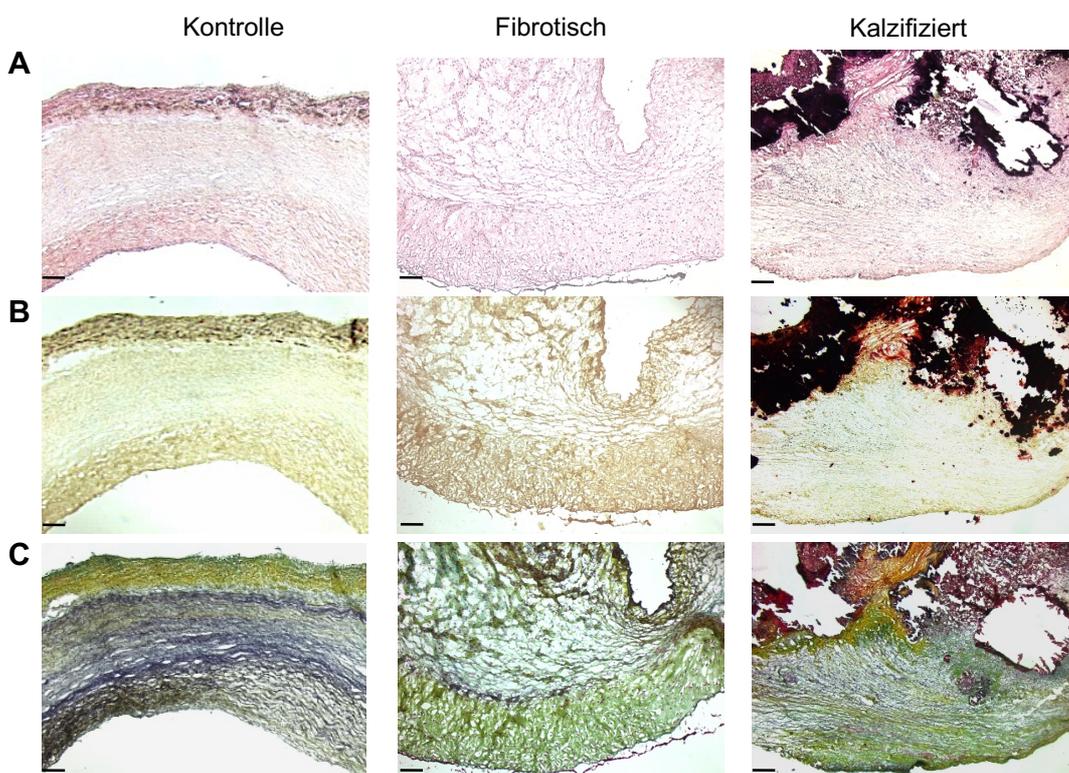


Abb. 5: Histologische Darstellung humaner AK-Taschen. H.E.-Übersichtsfärbung (A), Alizarinfärbung (B) und Movat-Pentachrom-Färbung (C) von Kontroll- (HTx), fibrotischem und kalzifiziertem Klappengewebe. Maßstab = 100 um. Repräsentative Bilder aus 3 Experimenten.

3.1.2.2 Gefäßneubildungen in kalzifizierten Aortenklappentaschen

Zur Detektion von Gefäßendothel wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen vWF durchgeführt, welcher als Marker für Endothelzellen fungiert [58].

Die Färbungen wurden an fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen durchgeführt und mit AK-Taschen der Kontrollgruppe verglichen (Abb. 6). Die Untersuchungen zeigten eine vermehrte Anfärbung von Gefäßendothel in kalzifizierten AK-Taschen, insbesondere in Bereichen, die besonders starke Kalzifizierungen aufwiesen. Weder in Untersuchungen von AK-Taschen der Kontrollgruppe noch in fibrotischen AK-Taschen konnten Gefäße gefunden werden.

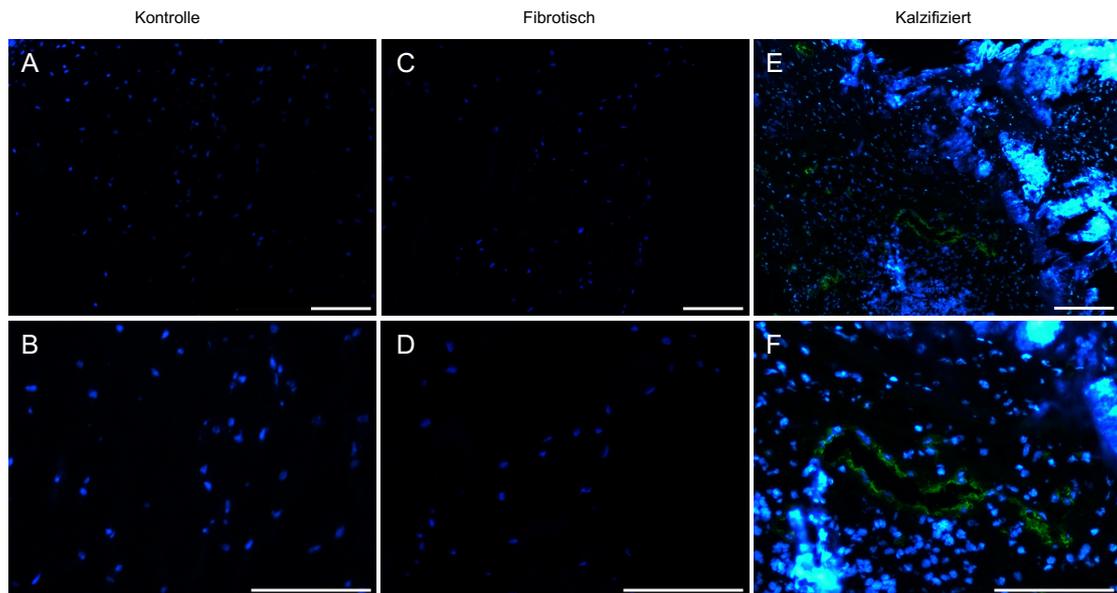


Abb. 6: Immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen vWF.

Anfärbungen mit Antikörpern gegen vWF (grün) erfolgte in AK-Taschen der Kontrollgruppe (A und B), fibrotischen (C und D) und kalzifizierten AK-Taschen (E und F). Blau = Zellkerne (DAPI). Maßstab = 100 μ m. Repräsentative Bilder aus 2 Experimenten.

3.1.2.3 Genexpression

Betrachtet wurde die Expression der *messenger*-RNA (mRNA) der drei gebildeten Gruppen, die in Kapitel 2.2.1.4 aufgeführt sind: Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe und beinhaltete ausschließlich makroskopisch unveränderte AK, die von Patienten stammen, bei denen eine HTx durchgeführt wurde (n=14). Darüber hinaus wurde jeweils eine Gruppe mit fibrotischen (n= 20) und kalzifizierten (n= 20) AK-Taschen gebildet, wobei die Genexpression immer auf die Kontrollgruppe bezogen wurde. In Klammern dargestellt sind Mittelwerte der relativen mRNA-Expression mit Standardfehler.

3.1.2.3.1 Erhöhte Expression von Kollagen und ACTA-2 in degenerierten AK

Zunächst wurden die AK-Taschen hinsichtlich der Ausprägung ihrer Degeneration untersucht: Diese geht mit Veränderungen der EZM und damit verbundenem Kollagenumbau einher [15, 59]. So wurde die Genexpression von Alpha-1-Typ-I-Kollagen (Col1A1), Alpha-1-Typ-III-Kollagen (Col3A1) und Alpha-1-Typ-V-Kollagen (Col5A1) in allen 3 Gruppen betrachtet, welche im Gruppenvergleich signifikante Unterschiede zeigte (Abb. 7 A-C).

Die mRNA-Expression von Col1A1 zeigte sich sowohl in fibrotischen ($p=0,006$), als auch kalzifizierten ($p<0,0001$) AK im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kontrolle: $1,25 \pm 0,25$, fibrotisch: $18,43 \pm 4,96$, kalzifiziert: $95,2 \pm 25,8$). Auch der direkte Vergleich von fibrotischen und kalzifizierten AK zeigte an, dass die mRNA-Expression von Col1A1 in kalzifizierten AK signifikant erhöht war ($p=0,0079$). Eine Betrachtung der Genexpression von Col3A1 zeigte auch hier eine signifikante Steigerung der Genexpression in fibrotischen ($p < 0,0001$) und kalzifizierten ($p=0,0003$) AK-Taschen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: $3,08 \pm 1,31$, fibrotisch: $58,26 \pm 13,65$, kalzifiziert: $98,52 \pm 36,95$). Kein signifikanter Unterschied bestand beim Vergleich von fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen. Eine Analyse von Col5A1 kam zu einem ähnlichen Ergebnis: Auch hier bestand eine signifikant erhöhte Genexpression von fibrotischen ($p=0,0044$) und kalzifizierten ($p=0,0004$) AK im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: $1,77 \pm 0,55$, fibrotisch: $5,9 \pm 0,92$, kalzifiziert: $7,98 \pm 1,51$), während der direkte Vergleich beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufwies.

Die Analyse von α SMA, codiert durch das Gen ACTA-2, zeigte eine hochsignifikante Steigerung der Expression in fibrotischen AK-Taschen im Vergleich zu AK-Taschen der Kontrollgruppe (Abb.7 D, Kontrolle: $1,48 \pm 0,37$, fibrotisch: $4,98 \pm 0,65$, $p=0,0003$). Auch in kalzifizierten AK war die Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kalzifiziert: $3,59 \pm 0,61$, $p=0,0356$). Der Vergleich zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen wies keine signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,3952$).

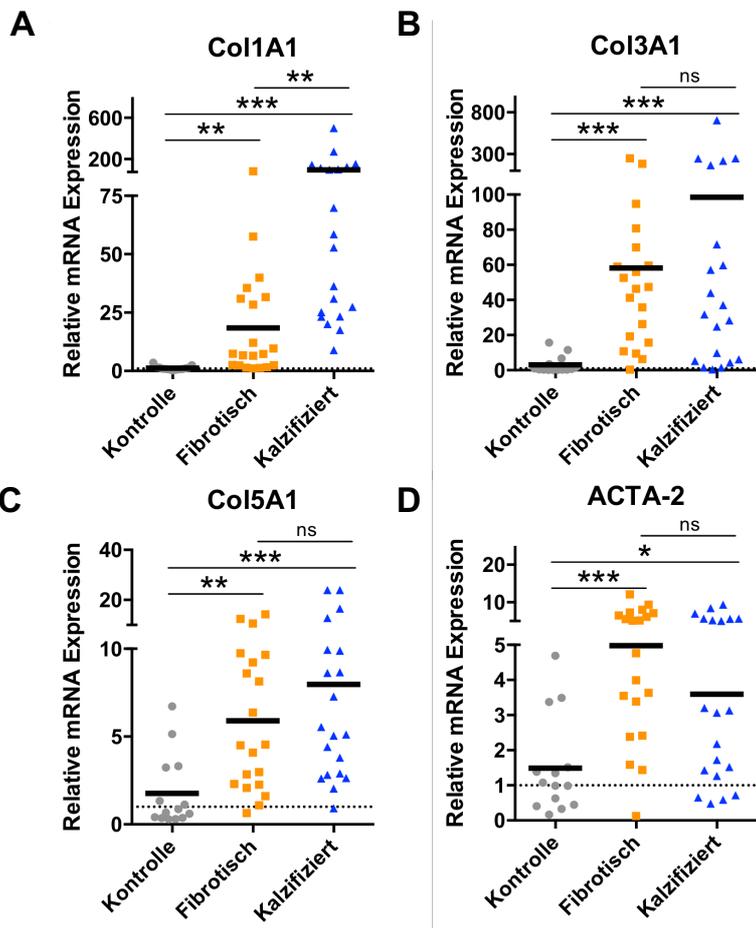


Abb. 7: Expression EZM assoziierter Gene in humanen AK.

Vergleich der Genexpression von Col1A1 (A), Col3A1 (B), Col5A1 (C) und ACTA-2 (D) in AK der Kontrollgruppe, fibrotischen und kalzifizierten AK. n= 54. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$ berechnet nach Kruskal-Wallis-Test mit darauffolgender *Dunn's multiple comparisons* Analyse

3.1.3 Erhöhte Genexpression von VEGF-Rezeptoren in degenerierten humanen Aortenklappentaschen

Die Genexpressionsanalyse der VEGFR wurde an den gleichen Gruppen durchgeführt, die auch für die Analysen in Kapitel 3.1.2.3.1 verwendet wurden.

Die Genexpression von VEGFR-1, welcher durch das Gen FLT-1 codiert wird, zeigte sich in kalzifizierten AK im Vergleich zu AK der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 8 A, $p = 0,0238$). Die mRNA-Expression in fibrotischen AK zeigte keine signifikante Veränderung gegenüber AK-Taschen der Kontrollgruppe ($p = 0,6740$) und auch beim direkten Vergleich fibrotischer und kalzifizierter AK bestand kein signifikanter Unterschied (Kontrolle: $1,38 \pm 0,37$, fibrotisch: $1,46 \pm 0,17$, kalzifiziert: $2,41 \pm 0,46$).

Die Analyse der Genexpression von VEGFR-2, durch das Gen KDR codiert, zeigte sowohl in fibrotischen als auch kalzifizierten AK signifikante Unterschiede (Abb. 8 B, Kontrolle: $1,28 \pm 0,27$, fibrotisch: $4,45 \pm 0,90$, kalzifiziert: $8,05 \pm 1,79$):

In kalzifizierten AK bestand eine hochsignifikante Erhöhung der KDR-Expression gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$), auch die mRNA-Expression in fibrotischen AK-Taschen zeigte sich signifikant erhöht ($p = 0,0023$).

Genexpressionsanalysen von FLT-4 (VEGFR-3) ergaben, dass das Gen in humanen Klappen nicht detektiert werden konnte (Abb. A 1 und Abb. A 2 im Anhang).

Ähnliche Ergebnisse, wie die mRNA-Expression von VEGFR-2, zeigten Untersuchungen der NRP-1-Expression (Abb. 8 C): Diese war in fibrotischen AK im Vergleich zu AK der Kontrollgruppe signifikant gesteigert ($p < 0,0001$) und auch in kalzifizierten AK lag eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von NRP-1 gegenüber AK der Kontrollgruppe vor ($p = 0,0001$). Unterschiede in der Genexpression zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK waren hierbei nicht signifikant (Kontrolle: $1,22 \pm 0,28$, fibrotisch: $5,36 \pm 0,54$, kalzifiziert: $5,23 \pm 0,72$).

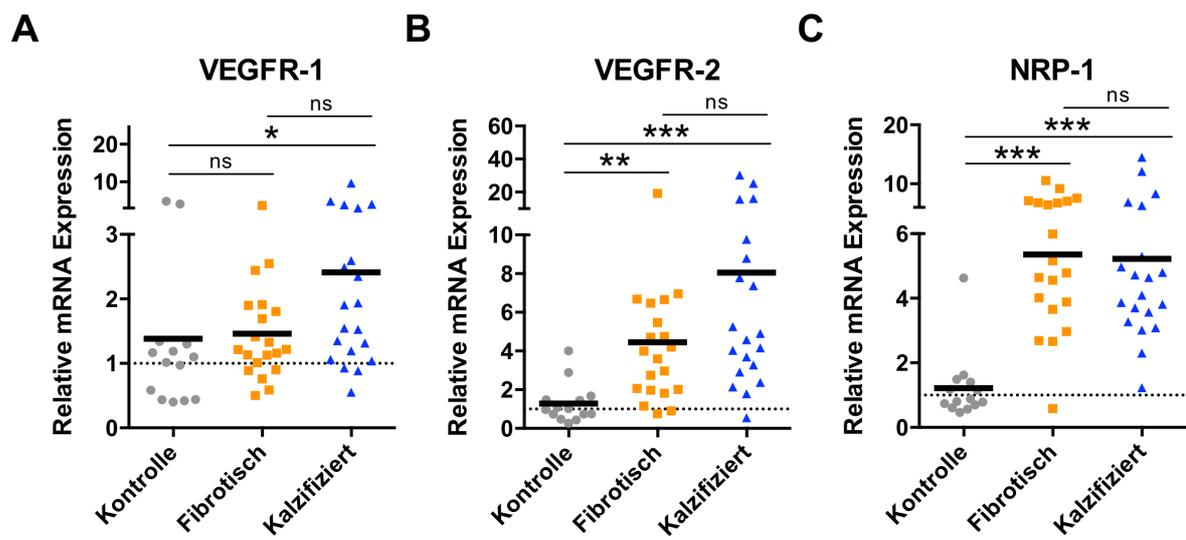


Abb. 8: Expression VEGFR assoziierter Gene in humanen AK. Vergleich der Expression von VEGFR-1 (A), VEGFR-2 (B) und NRP-1 (C) in AK der Kontrollgruppe, fibrotischen und kalzifizierten AK. n= 54. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$ berechnet nach Kruskal-Wallis-Test mit darauffolgender *Dunn's multiple comparisons* Analyse

3.2 Analyse getrennter Anteile humaner Aortenklappentaschen

3.2.1 Patientenkohorte

Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.3 erfolgte die getrennte Analyse von kalzifizierten und fibrotischen Arealen innerhalb der gleichen AK. Hierzu wurden 12 AK-Taschen verwendet (Tabelle 6) und wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, makroskopisch in einen fibrotischen und einen kalzifizierten Teil getrennt. 75% der Patienten dieser Gruppe waren männlich, das Durchschnittsalter zum OP-Zeitpunkt betrug 72 Jahre (± 5). An arterieller Hypertonie waren alle Patienten dieser Gruppe erkrankt, 92 % litten an einem Diabetes mellitus Typ 2.

Tabelle 6: Patientendaten der Gruppe für Analysen der gleichen AK-Tasche

	Alle Patienten (n = 12)
Geschlecht (männlich)	9 (75)
Alter (in Jahren)	72 \pm 5
BMI (kg/m ²)	31 \pm 5
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:	
- Raucheranamnese	3 (75)
- Arterielle Hypertonie	12 (100)
- T2DM	11 (92)
- Dyslipoproteinämie	5 (42)
KHK	11 (92)
Extrakardiale Gefäßerkrankungen (cAVK, pAVK)	1 (1)

AK = Aortenklappe, BMI = *Body mass index*, T2DM= Diabetes Mellitus Typ 2, KHK = Koronare Herzkrankheit, cAVK = Cerebrale arterielle Verschlusskrankheit, pAVK = Periphere arterielle Verschlusskrankheit. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder n (%).

3.2.2 Vermehrte Expression der VEGF-Rezeptoren im kalzifizierten Anteil gegenüber dem fibrotischen Anteil derselben Aortenklappentasche

Die Analyse der Expression von VEGFR-1 ergab eine signifikante Erhöhung der mRNA-Genexpression im kalzifizierten Teil der AK-Tasche (Fibrotisch: 1,00 \pm 0,00, Kalzifiziert: 16,11 \pm 56, p=0,0020). Auch die VEGFR-2-Expression zeigte sich im kalzifizierten Teil signifikant gesteigert (Fibrotisch: 1,00 \pm 0,00, Kalzifiziert: 6,13 \pm 1,76, p= 0,0020). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Analyse der NRP-1-Expression – auch hier zeigte sich im kalzifizierten Teil eine signifikante Steigerung (Fibrotisch: 1,00 \pm 0,00, Kalzifiziert: 2,23 \pm 0,32, p= 0,0020).

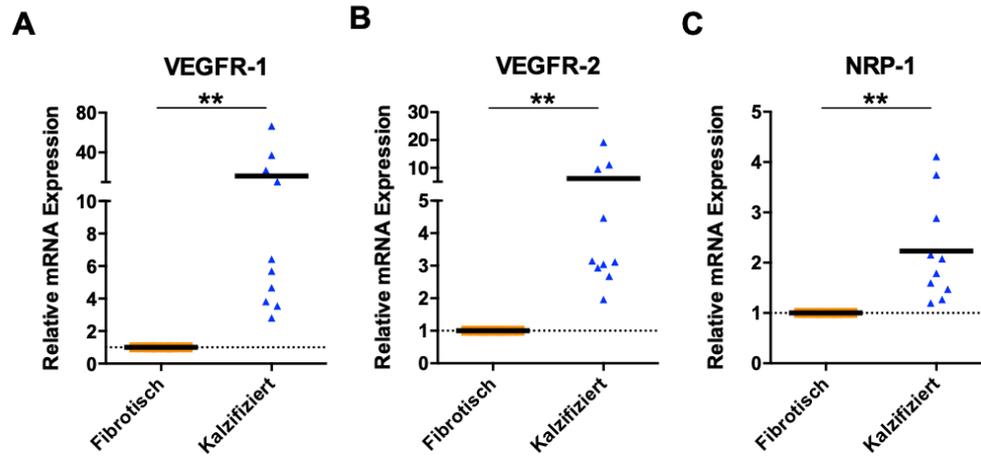


Abb. 9: Expression VEGFR assoziierter Gene in getrennten Anteilen humaner AK. Vergleich der Expression von VEGFR-1 (A), VEGFR-2 (B) und NRP-1 (C). Vergleich zwischen fibrotischem und kalzifiziertem Anteil. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. ** = $p < 0,01$ berechnet nach Kruskal-Wallis-Test mit darauffolgender *Dunn's multiple comparisons* Analyse.

3.3 *In-vitro* Aortenklappenmodell

3.3.1 Zunehmende Degeneration der kultivierten Aortenklappentaschen

Das *in-vitro* Aortenklappenmodell wurde entwickelt, um die Rolle der VEGFR auch *in-vitro* untersuchen zu können. Dieses Modell ermöglichte eine Kultivierung von ovinen AK-Taschen unter Spannung, um so den Begebenheiten im lebenden Organismus möglichst nahe zu entsprechen. Zunächst wurde untersucht, ob sich eine Degeneration von AK *in-vitro* herbeiführen ließ.

Wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, wurden AK-Taschen bis zu 56 d unter pd- und Kontrollbedingungen kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Um morphologische Veränderungen der AK-Taschen im *in-vitro*-Modell zu erfassen, wurden diese über den gesamten Kulturzeitraum hinweg fotografisch dokumentiert. Diese zeigen ein Fortschreiten der Kalzifizierung unter pd-Bedingungen (Abb. 10). Nach 14 d Kulturdauer waren erste kalzifizierte Areale sichtbar, die Form der AK-Taschen zeigte an den Kommissuren leichte Veränderungen. Mit zunehmender Kulturdauer unter pd-Bedingungen nahmen die kalzifizierten Areale zu und es kam zu einer Abnahme der Elastizität, besonders im Bereich der Kommissuren. Nach 56 d Kulturdauer zeigten sich sichtbare Kalziumknoten und die AK-Taschen wiesen eine erhöhte Steifheit auf.

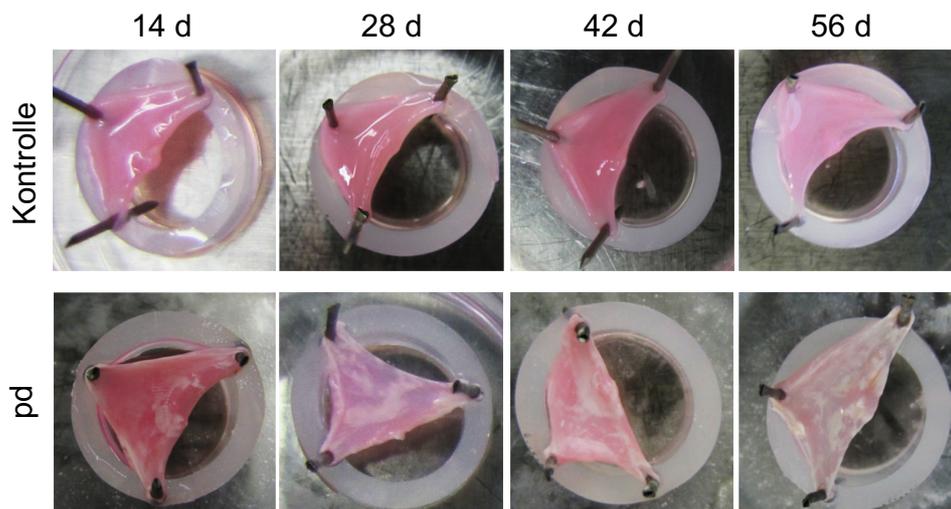


Abb. 10: *In-vitro* Degeneration Aortenklappenmodell.

Vergleich von Kontroll- und pd-Gruppe. d= Tage Kulturdauer (modifiziert nach Weber *et al.*, 2021)

Zur histologischen Darstellung von Kalziumablagerungen wurde eine Alizarinrot-Färbung durchgeführt (Abb. 11). Diese Färbung zeigte eine beginnende Degeneration der AK-Taschen in den äußeren Schichten, vorrangig der *Lamina Ventricularis*. Mit zunehmender Kulturdauer unter pd-Bedingungen konnte ein Fortschreiten bis zur *Lamina Spongiosa* beobachtet werden. Nach 28 d Kulturdauer zeigten sich deutliche Kalziumablagerungen in

den *Laminae Ventricularis* und *Fibrosa* (Abb. 11 B). In AK-Taschen, die 56 d unter pd-Bedingungen kultiviert wurden, waren deutliche Kalziumablagerungen in allen drei Schichten der AK sichtbar (Abb. 11 C). Eine ergänzende Von-Kossa-Färbung bestätigten das Ergebnis (Abb. A 3 im Anhang).

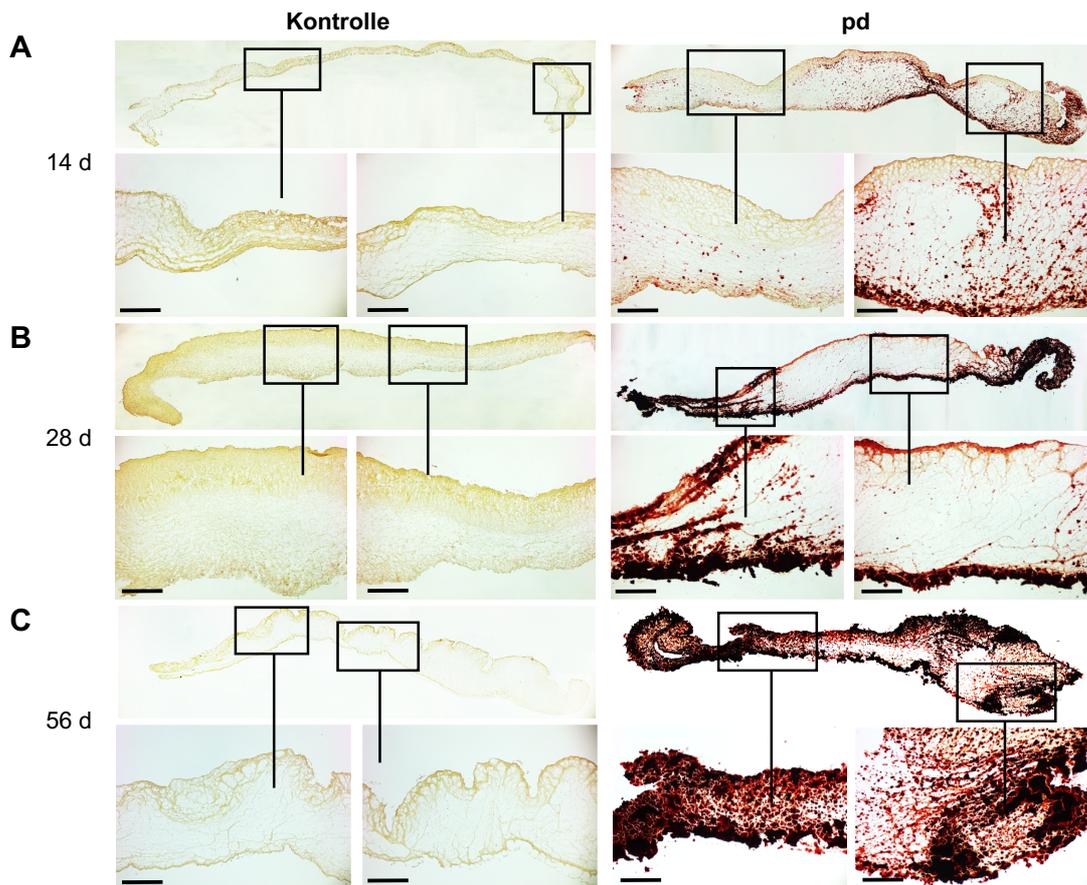


Abb. 11: Fortschreitende Degeneration in kultivierten AK-Taschen.

Alizarinrot-Färbung unter Kontroll- und pd-Bedingungen nach (A) 14 d (B) 28 d und (C) 56 d. Kalziumablagerungen sind in rot dargestellt. Maßstab = 100 μ m. d = Tage. Repräsentative Bilder aus 5 Experimenten (modifiziert nach Weber *et al.*, 2021).

3.3.2 Veränderungen der extrazellulären Matrix

Um Veränderungen in der Architektur der extrazellulären Matrix (EZM) zu erfassen, wurde eine Movat-Pentachrom-Färbung angefertigt (Abb. 12). Nach 14 d Kulturdauer unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine dreischichtige EZM mit einheitlichem Durchmesser. Unter pd-Bedingungen waren unregelmäßige Verdickungen zu beobachten, die insbesondere durch eine starke Verdichtung der *Lamina Spongiosa* verursacht wurden. Nach 28 d unter pd-Bedingungen konnte eine veränderte Organisation der EZM beobachtet werden. Es zeigte sich ein erhöhter Anteil an Proteoglykanen (blau) in der *Lamina Spongiosa*, während die kollagenreiche (gelb) *Lamina fibrosa* erste Defekte zeigte. Die AK-

Taschen, die unter pd-Bedingungen kultiviert wurden, waren nach 56 d unregelmäßig verdickt und die Klappenarchitektur zeigte deutliche Defekte. In allen drei Schichten zeigte sich ein erhöhter Anteil an Proteoglykanen. Ergänzende H.E.-Färbungen zeigten ein ähnliches Ergebnis (Abb. A 4 im Anhang).

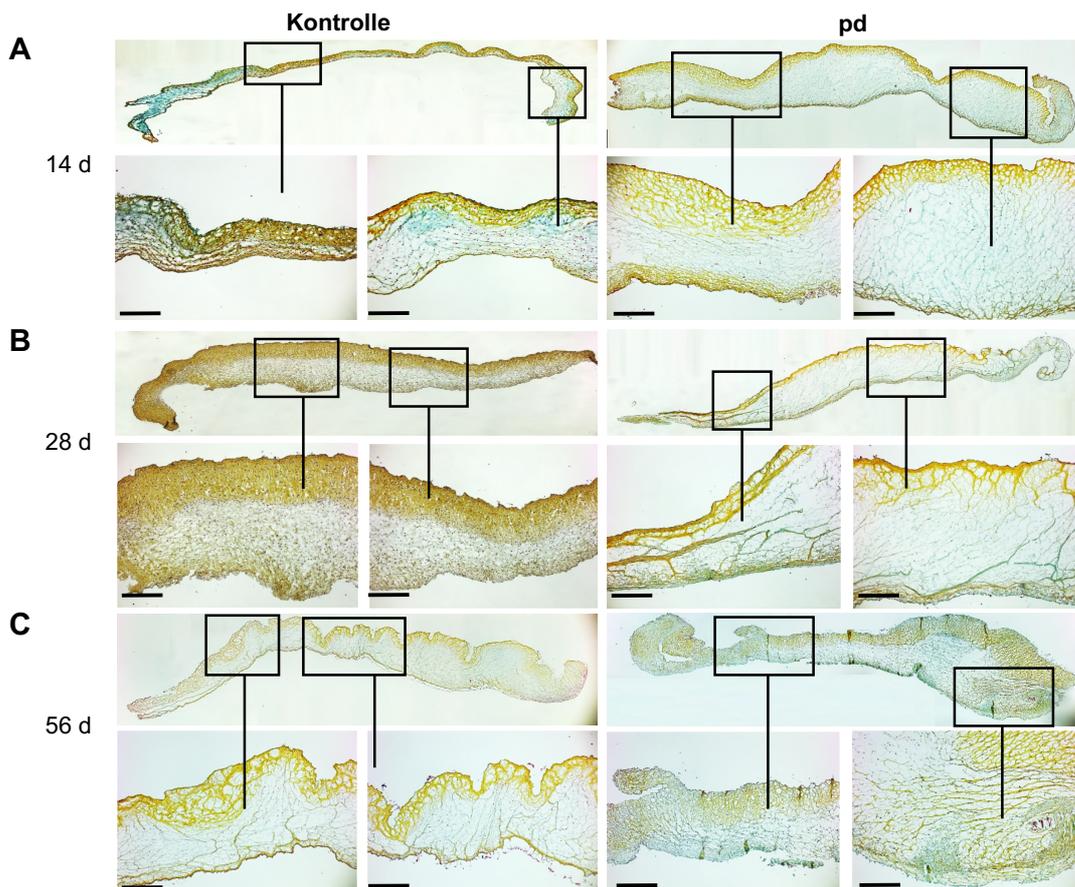


Abb. 12: Fortschreitende Veränderung der EZM in kultivierten AK-Taschen.

Movat-Pentachrom-Färbung unter Kontroll- und pd-Bedingungen nach (A) 14 d (B) 28 d und (C) 56 d. Maßstab = 100 μ m. d = Tage. Repräsentative Bilder aus 5 Experimenten (modifiziert nach Weber *et al.*, 2021).

3.3.3 Veränderungen des Endothels und zunehmende Degeneration

Immunhistochemische Untersuchungen von vWF zeigten eine kontinuierliche und erhaltene Endothelschicht in den Kontrollbedingungen, wohingegen nach 28 d eine abgelöste und zerstörte Endothelzellschicht in den AK-Taschen unter pd-Bedingungen vorlag (Abb. 13 A und B). Eine Gefäßneubildung mittels Anfärbung von Gefäßendothel konnte nicht nachgewiesen werden.

In Färbungen mit AK gegen α SMA und VIM zeigten sich in AK-Taschen, die unter pd-Bedingungen kultiviert wurden, im Vergleich zu den Kontrollbedingungen VIM vermindert und

α SMA erhöht (Abb. 13 B und C). Western-Blot-Analysen für α SMA und VIM bestätigten das Ergebnis (Abb. A 5 im Anhang).

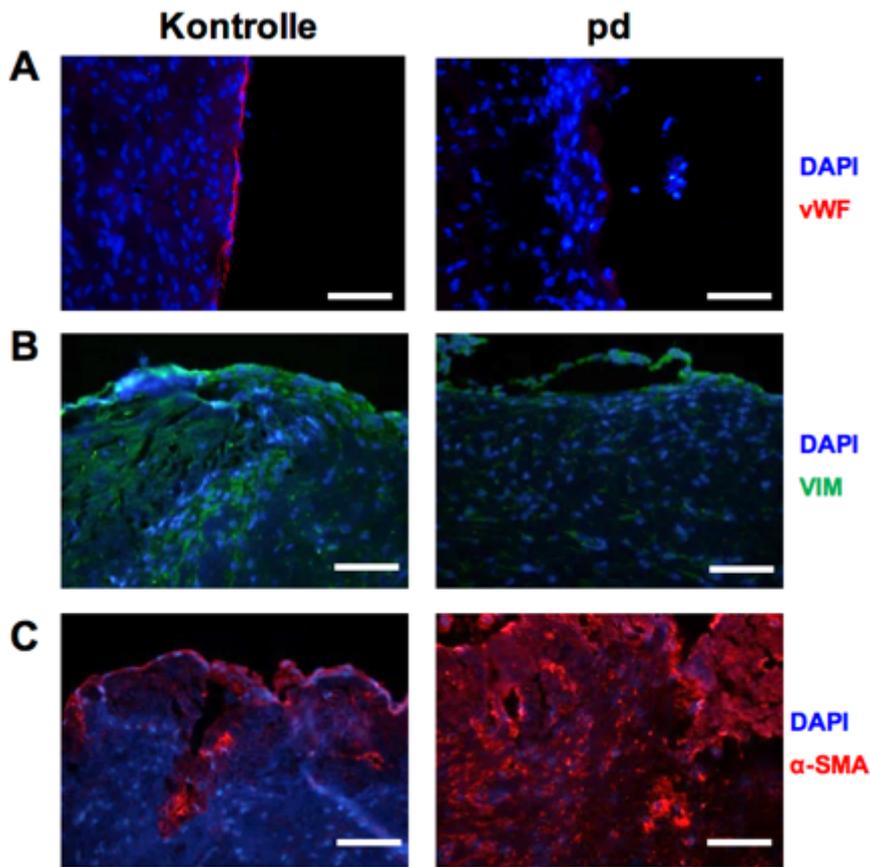


Abb. 13: Immunhistologische Aufnahmen mit Antikörpern gegen vWF, VIM und α SMA.

Die Untersuchung erfolgte an AK-Taschen unter pd- und Kontrollbedingungen nach 28 d Kultivierung. (A) Darstellung des Endothels mittels Anfärbung von vWF (rot). (B) Anfärbung VIM (grün) (C) Anfärbung α -SMA (rot). Blau = Zellkerne (DAPI). Maßstab = 100 μ m. Repräsentative Bilder aus 4 Experimenten (modifiziert nach Weber *et al.*, 2021).

3.3.4 Genexpressionsanalyse

Die Analysen und Auswertungen der Genexpression erfolgten wie in Kapitel 2.2.4.5 erläutert. Es fand eine Normierung der erhaltenden Werte auf die jeweilige Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt statt.

3.3.4.1 RNA-Ausbeute und Qualitätskontrolle

Die RNA-Ausbeute der kultivierten AK-Taschen nach 14 und 28 d Kultivierung zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und pd-Bedingungen (Abb. 14 A). Nach 56 d Kulturdauer zeigte sich die RNA-Ausbeute für sowohl Kontroll- als auch pd-Bedingung auf einem niedrigen Niveau. Die Ausbeute der AK-Taschen unter pd-Bedingungen lag hierbei signifikant unter der Ausbeute der Kontrollbedingung ($p < 0,0079$).

RIN-Werte von AK-Taschen lagen nach 28 d kultiviert unter Kontrollbedingungen bei 8,30 (Abb. 14 B), bei AK-Taschen kultiviert unter pd-Bedingungen bei 9,20 (Abb. 14 C).

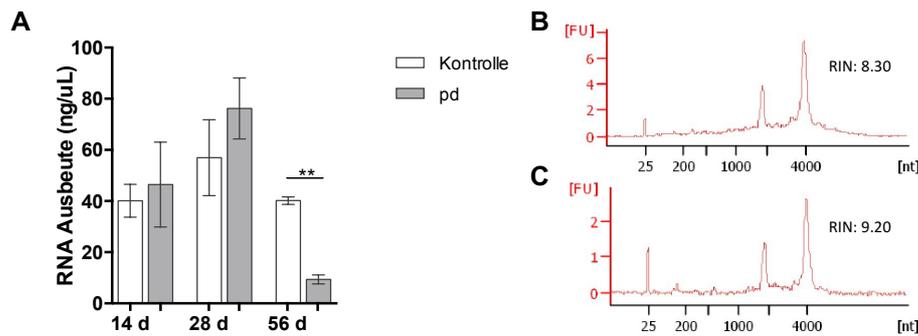


Abb. 14: RNA-Ausbeute und Qualitätskontrolle in kultivierten AK-Taschen.

(A) Vergleichende RNA-Ausbeute von AK-Taschen unter Kontroll- und pd-Bedingungen nach 14, 28 und 56 d Kultivierung. d = Tage. n= 7-9; **= $p < 0,01$; dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler. (B) Repräsentative RIN-Werte von AK-Taschen nach 28 d Kultivierung unter Kontrollbedingungen (C) Repräsentative RIN-Werte von AK-Taschen nach 28 d Kultivierung unter pd-Bedingungen. d = Tage, RIN = RNA-Integritätsnummer, FU = Fluoreszeinheiten, nt = Nukleotide (modifiziert nach Weber *et al.*, 2021).

3.3.4.2 mRNA-Expression pro-degenerativer Marker

Analysiert wurde die Genexpression von Col1A1, Col3A1 und Col5A1 in kultivierten AK-Taschen nach 7 d (Abb. 15 A-C). Es wurde deutlich, dass in AK-Taschen unter pd-Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verminderte mRNA-Expressionen von Col1A1 (Kontrolle: $1,11 \pm 0,26$, pd: $0,38 \pm 0,26$, $p = 0,0159$) und Col3A1 vorlagen (Kontrolle: $1,18 \pm 0,32$, $p = 0,0159$). Die Expression von Col5A1 zeigte sich ebenfalls verringert, wies jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf (Kontrolle: $1,45 \pm 0,49$, pd: $0,74 \pm 0,35$, $p = 0,53$). Nach 14 d Kulturdauer zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, wobei sich nur die Genexpression von Col1A1 in der pd-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert zeigte (Kontrolle: $0,97 \pm 0,21$, pd: $0,46 \pm 0,035$, $p = 0,0159$). Nach 28 d Kulturdauer wies die mRNA-Expression von sowohl Col1A1 als auch Col3A1 und Col5A1 in AK-Taschen unter pd-Bedingungen eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Col1A1 Kontrolle: $1,36 \pm 0,43$, Col1A1 pd: $15,28 \pm 6,70$, $p = 0,0152$; Col3A1 Kontrolle: $1,09 \pm 0,22$, Col3A1 pd: $4,36 \pm 1,69$, $p = 0,0411$; Col5A1 Kontrolle: $0,92 \pm 0,15$, Col5A1 pd: $4,02 \pm 1,48$, $p = 0,0041$).

Die mRNA-Expression von α SMA, codiert durch das Gen ACTA-2, zeigte in den kultivierten AK-Taschen sowohl nach 7 d als auch nach 14 d keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und pd-Gruppe (Abb. 15 D, 7d Kontrolle: $0,87 \pm 0,28$, pd: $0,73 \pm 0,27$, $p = 0,6571$

und 14 d Kontrolle: $1,06 \pm 0,23$, pd: $1,01 \pm 0,18$, $p > 0,9999$). Bei einer Kulturdauer von 28 d zeigte die pd-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Expression von ACTA-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: $1,10 \pm 0,19$, pd: $4,62 \pm 1,70$, $p = 0,0082$).

Eine Analyse der mRNA-Expression von Osteoprotegerin und BGLAP wies jeweils nach 7 d und 14 d keinen Anstieg der mRNA-Expression in der pd- im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Nach 28 d fand sich jedoch in der pd-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression beider Gene (Abb. A 6 im Anhang).

Die Genexpression von TGF- β zeigte über alle drei Zeiträume hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und pd-Gruppe, ab 14 d Kultivierung zeigte sich jedoch eine ansteigende Tendenz in der pd-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ab (Abb. A 7 im Anhang).

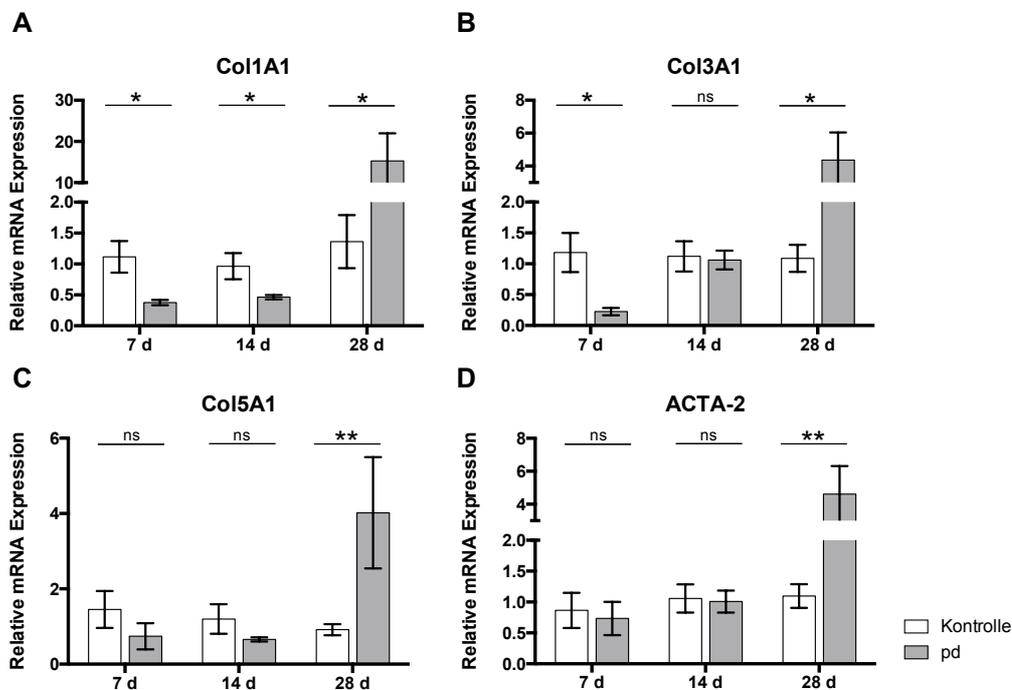


Abb. 15: Genexpression von Col1A1, Col3A1, Col5A1 und ACTA-2.

Vergleich von kultivierten AK-Taschen unter Kontroll- und pd-Bedingungen nach 7, 14 und 28 d. d = Tage. n = 4-8. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, berechnet nach *Student's t-Test*.

3.3.5 VEGF-Rezeptoren in ovinen Aortenklappentaschen

3.3.5.1 Genexpressionsanalyse *in-vitro* Modell

Die mRNA-Expression von VEGFR-1 und -2, sowie NRP-1 wurde jeweils nach 7, 14 und 28 d ermittelt (Abb. 19).

Die mRNA-Expression von VEGFR-1, codiert durch das Gen FLT-1, zeigte sich nach 7 d Kulturdauer in der pd-Gruppe signifikant erhöht (Kontrolle: $1,01 \pm 0,06$, pd: $1,83 \pm 0,1$, $p=0,0079$). Nach 14 d ließen sich keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen feststellen (Kontrolle: $1,08 \pm 0,19$, pd: $0,86 \pm 0,19$ $p= 0,3052$). Nach 28 d Kulturdauer zeigte sich eine erhöhte Tendenz der Genexpression von FLT-1 in der pd-Gruppe, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies (Kontrolle: $1,22 \pm 0,54$, pd: $1,81 \pm 0,67$, $p=0,5714$).

Eine Analyse der Genexpression von KDR, als Gen von VEGFR-2, zeigte sowohl nach 7 als auch nach 14 d eine signifikant verminderte mRNA-Expression in den AK-Taschen kultiviert unter pd-Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle (7d Kontrolle: $1,03 \pm 0,12$, 7T pd: $0,34 \pm 0,1$, $p= 0,0159$; 14d Kontrolle: $1,13 \pm 0,26$, 14d pd: $0,34 \pm 0,1$, $p= 0,0173$). Nach 28 d ließen sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen feststellen. (28 d Kontrolle: $1,341 \pm 0,36$, 28 T pd: $1,18 \pm 0,43$ $p= 0,7791$).

Bei der Analyse der Genexpression von NRP-1 zeigte sich nach 7 d Kulturdauer kein signifikanter Unterschied (Kontrolle: $1,27 \pm 0,46$, pd: $0,98 \pm 0,2$, $p= 0,8016$). Nach 14 d Kulturdauer fand sich in der pd-Gruppe eine signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe, wogegen nach 28 d die mRNA-Expression von NRP-1 in der pd-Gruppe signifikant erhöht war (14d Kontrolle: $1,32 \pm 0,17$, pd: $0,72 \pm 0,13$, $p= 0,0175$; 28d Kontrolle: $1,13 \pm 0,19$, 28d pd: $2,17 \pm 0,46$, $p= 0,0379$).

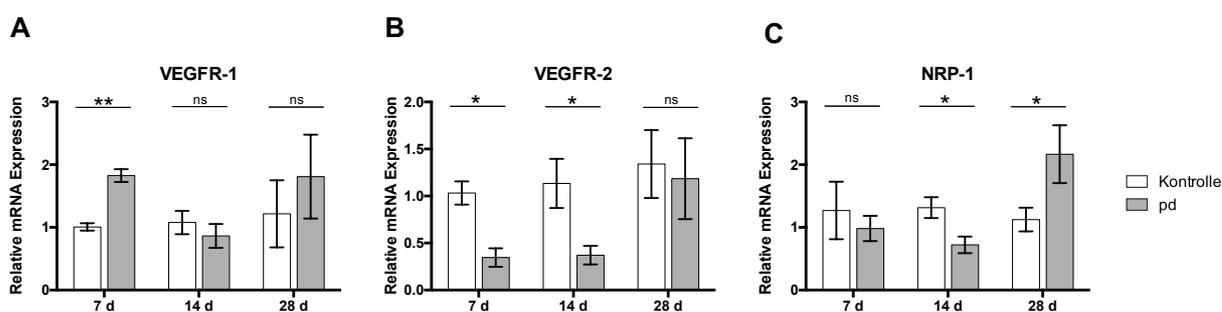


Abb. 16: Genexpression VEGFR-1, VEGFR-2 und NRP-1.

Vergleich von kultivierten AK-Taschen unter Kontroll- und pd-Bedingungen nach 7, 14 und 28 d. d = Tage. n= 3-7. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, berechnet nach *Student's t-Test*.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung von VEGF-Rezeptoren in humanen Aortenklappen

4.1.1 Patientenkohorte und Einteilung der Gruppen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der VEGFR-Expression wurden AK-Taschen von insgesamt 64 Patienten verwendet, an 9 AK-Taschen erfolgten histologische Untersuchungen. Es wurde eine Einteilung in 3 Gruppen vorgenommen: Eine Gruppe beinhaltete AK-Taschen ohne makroskopisch sichtbare Veränderungen, eine Gruppe bestand aus AK-Taschen mit fibrotischen Degenerationen ohne Kalzifizierungen und eine Gruppe beinhaltete AK-Taschen mit ausgeprägten Kalzifizierungen. Die Zuordnung der einzelnen AK-Taschen erfolgte ausschließlich anhand von makroskopischen Charakteristika der jeweiligen Gruppe. Die verwendeten Proben stammen von Patienten nach chirurgischem AK-Ersatz oder HTx. Nach makroskopischer Beurteilung erfolgte eine retrospektive Zuordnung zu den entsprechenden Gruppen. Die makroskopisch unveränderten AK-Taschen stammen ausschließlich von Patienten nach HTx, während fibrotische und kalzifizierte AK-Taschen größtenteils zu Patienten gehören, bei denen ein chirurgischer AK-Ersatz durchgeführt wurde.

Bei der Gruppenbildung stellte die Ausprägung der Degeneration das einzige Kriterium für die Zuordnung dar und erfolgte unabhängig von Funktionalität der AK-Tasche, klinischen Befunden oder Diagnosen. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde auch schon in anderen Veröffentlichungen verwendet [61, 62]. Die Gruppe mit makroskopisch nicht sichtbaren Veränderungen der AK-Tasche wurde als Kontrollgruppe verwendet. Darüber hinaus wurde bei 10 AK-Taschen eine makroskopische Trennung von fibrotischen und kalzifizierten Arealen durchgeführt, die anschließend getrennt analysiert wurden.

Aufgrund dieser Einteilung und einer begrenzten Probenverfügbarkeit ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich medizinischer Daten und Vorerkrankungen zwischen den Patientengruppen: Alle Patienten der Kontrollgruppe waren männlich, während in den beiden anderen Gruppen der Anteil beider Geschlechter etwa 50% betrug. Auch das Durchschnittsalter lag mit 57 Jahren in der Kontrollgruppe deutlich unter dem Durchschnittsalter der Patienten mit fibrotischen (71 Jahre) und kalzifizierten AK-Taschen (77 Jahre). Außerdem sollte bedacht werden, dass es sich bei der Kontrollgruppe zwar um makroskopisch unveränderte AK-Taschen handelte, sich diese jedoch von gesunden AK-Taschen unterscheiden können. Für genauere Ergebnisse könnten neben der makroskopischen Einteilung der Gruppen genauere Analysen zum Degenerationsgrad berücksichtigt werden, um beispielsweise nur mikroskopisch sichtbare Kalzifizierungen erkennen zu können, um auf diese Weise eine noch präzisere Gruppentrennung je nach Degenerationsgrad zu erreichen.

4.1.2 Veränderung der VEGFR-Expression abhängig vom Degenerationsgrad

Zunächst wurden die AK-Taschen hinsichtlich ihres Degenerationsgrades untersucht. Die makroskopisch unveränderten AK-Taschen zeigten auch histologisch kaum Kalzifizierungen. Die fibrotischen AK-Taschen wiesen im Vergleich zu den makroskopisch unveränderten AK-Taschen histologisch weniger Kollagenfasern und unregelmäßige Verdickungen auf, während die AK-Taschen mit makroskopischen Kalzifizierungen auch histologisch großflächige Kalziumablagerungen zeigten.

In kalzifizierten AK-Taschen finden sich häufig Gefäße in unmittelbarer Nähe zu den kalzifizierten Arealen [51, 52, 54]. Daraufhin wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit vWF an zwei kalzifizierten AK-Taschen durchgeführt, um Gefäßendothel zu detektieren [58]. In den kalzifizierten AK-Taschen fanden sich in unmittelbarer Nähe zu kalzifizierten Arealen Anfärbungen von Gefäßendothel, während weder in AK-Taschen der Kontrollgruppe noch in fibrotischen AK-Taschen Gefäße gefunden wurden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bisherigen Erkenntnissen der Literatur [51, 52, 54].

Zur genaueren Beurteilung der Degeneration erfolgte eine Analyse der mRNA-Expression von Col1A1, Col3A1 und Col5A1. Es zeigte sich sowohl in fibrotischen als auch kalzifizierten AK-Taschen eine signifikant vermehrte mRNA-Expression aller hier untersuchten Kollagen-Gene, eine vermehrte Expression von Col1A1 fand sich außerdem im direkten Vergleich von kalzifizierten mit fibrotischen AK-Taschen.

Kollagene sind weithin am Prozess der CAVD beteiligt: So werden Klappenverdickung und nachfolgende Fibrose durch eine übermäßige Ablagerung von Kollagen und anderen EZM-Komponenten verursacht und führen zu einer Verhärtung und Vernarbung des Klappengewebes [59, 63]. Degenerierte AK zeigen so im Vergleich zu gesunden AK einen geringeren Kollagengehalt, während eine erhöhte mRNA-Expression vor allem von Typ-I-Kollagen in degenerierten AK beobachtet wird. Hierbei überwiegt der Abbau von Kollagen die Synthese, welches als Zunahme des Kollagenumsatzes und somit als ein Zeichen für aktiven Umbau der EZM und Veränderungen der Kollagenorganisation innerhalb der AK gewertet wird [64].

Auch in diesem Fall könnte die Erhöhung der mRNA-Expression der untersuchten Kollagene in fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen für Prozesse von aktivem Umbau und Strukturänderung der EZM sprechen.

In fibrotischen AK-Taschen fand sich eine vermehrte Genexpression von VEGFR-2 und NRP-1, während in kalzifizierten AK-Taschen eine vermehrte Expression von VEGFR-1, VEGFR-2 und NRP-1 vorlag. Eine getrennte Analyse von kalzifizierten und fibrotischen Anteilen innerhalb einer AK-Tasche zeigte, dass die mRNA-Expression von VEGFR-1 und -2 und NRP-1 im kalzifizierten Teil der AK-Tasche signifikant erhöht war. Dies könnte für einen

Zusammenhang zwischen VEGFR-Expression, Gefäßneubildung und Kalzifizierung in degenerierten AK-Taschen sprechen.

Auch Soini *et al.* fanden heraus, dass eine erhöhte Gefäßdichte in degenerierten AK mit der Expression von VEGFR-2 und VEGF korreliert [54]. Eine Arbeit von Syväranta *et al.* zeigt eine positive Korrelation zwischen Kalzifikationsgrad und einer Neubildung von Gefäßen [56]. Auch Akahori *et al.* beobachteten Neoangiogenese gemeinsam mit VEGF-Expression in kalzifizierten Arealen von AK [65]. Deckers *et al.* konnten nachweisen, dass auch Osteoblasten VEGFR exprimieren können und VEGF-A eine Differenzierung von Osteoblasten bewirkt, was wiederum zu Kalziumablagerungen führt und ebenfalls eine erhöhte VEGFR-Expression in kalzifizierten AK-Taschen erklären könnte [66].

So zeigt sich innerhalb der AK eine enge Korrelation zwischen Kalzifizierung, Gefäßneubildung und VEGFR-Expression, jedoch ist nicht geklärt, ob die entstehenden Blutgefäße in der AK eine CAVD beschleunigen, indem sie den Eintritt von Entzündungsmediatoren erleichtern oder ob ihre Entstehung sekundär bedingt ist, um zum Beispiel abgelagerte Moleküle abzutransportieren [52].

Soini *et al.* fanden neben einer Korrelation zwischen Gefäßneubildung und vermehrter Expression von VEGFR-2 in AK eine Assoziation zwischen Gefäßneubildung und ausgeprägter Inflammation, jedoch keine direkte Assoziation zu Kalzifizierung oder Fibrose innerhalb der AK [54]. Coté *et al.* fanden heraus, dass das Vorkommen chronischer inflammatorischer Infiltrate mit mehreren Aspekten der CAVD korreliert, wie beispielsweise dem Umbau der EZM oder osteogener Kalzifizierung. Auch konnten sie eine positive Korrelation zwischen Inflammation und Gefäßneubildungen in degenerierten AK nachweisen [67]. Syväranta *et al.* konnten zeigen, dass in degenerierten Bereichen von AK mit gleichzeitiger Gefäßneubildung vermehrt degranulierte Mastzellen vorkommen, die VEGF enthalten [56].

Coté *et al.* diskutieren als Funktion der neu entstandenen Gefäße einen erleichterten Zugang für Entzündungszellen in die AK als Ursache für deren Entstehung, welches auch das in dieser Arbeit festgestellte vermehrte Vorkommen von VEGFR-1 und -2 vor allem in kalzifizierten AK-Taschen erklären könnte [67].

Auch könnte der initiale Endothelschaden, der am Anfang der CAVD steht, Ursache für eine vermehrte Genexpression von VEGFR-1 und -2 und damit einhergehende Neoangiogenese sein [26]. Hierbei beschreiben Durbin *et al.* die Mechanismen, die zu einer Entstehung und Progression von CAVD führen, als generelle Reaktion auf eine Verletzung von Gewebe [68]. VEGF-A wird grundsätzlich als wichtiger Faktor im Wundheilungsprozess angesehen, da er in frühen Phasen Angiogenese induziert. Insbesondere bewirkt VEGF-A

Endothelzellmigration und -proliferation und zeigt sich zusammen mit VEGFR in akuten Wunden erhöht [69-71].

Nach Verletzung treten bereits nach wenigen Tagen neue Gefäße auf. Das Kapillarwachstum im Bereich der Wunde dient als Kanal für Nährstoffe und andere Mediatoren des Heilungsprozesses und zur Entfernung von Metaboliten. Darüber hinaus beeinträchtigt eine Hemmung der Angiogenese die Wundheilung [44, 72, 73]. Es wurde beobachtet, dass VICs nach Gewebsverletzung aktiviert werden und Reparaturprozesse zur Wundheilung initiieren. Bei Dysregulation dieses Prozesses kommt es zu Umbau der EZM, Fibrose, Angiogenese und Kalzifizierungen [20, 68, 74]. Vor diesem Hintergrund könnte die beobachtete Hochregulation der Genexpression von VEGFR-1 und -2 gemeinsam mit der Neoangiogenese in degenerierten humanen AK-Taschen auch Bestandteil des Reparaturprozesses innerhalb der AK sein und somit dem Wundheilungsprozess ähneln. Die neu gebildeten Gefäße könnten beispielsweise als vereinfachter Zugang für Komponenten des Reparaturprozesses dienen oder den Abtransport von Metaboliten wie Kalzium und Lipiden erleichtern. In diesem Fall wäre die vermehrte Expression der VEGFR als protektiver Faktor anzusehen, der einer Entwicklung der CAVD entgegenwirkt.

Hypoxie könnte eine weitere Ursache für die vermehrte Expression der VEGFR in degenerierten AK darstellen, da bekannt ist, dass Hypoxie zu einer vermehrten Expression von VEGF führt [75]. Hierbei konnten Akahori *et al.* eine enge Verbindung von Hypoxie, VEGF und Kollagenexpression besonders in kalzifizierten Arealen der AK zeigen [65, 75].

Perrotta *et al.* fanden heraus, dass ein Umbau der EZM und eine Verhärtung der AK-Tasche sowohl mit Hypoxie also auch mit einer Hochregulation von VEGF besonders in Bereichen mit Neoangiogenese und Kalzifizierungen korreliert und diskutieren die Bildung neuer Blutgefäße zur Überwindung des hypoxischen Zustands innerhalb der AK [55]. Die Entstehung neuer Gefäße könnte demnach auch in der degenerierten AK einem erleichterten Sauerstofftransport dienen.

So könnten VEGFR und Neoangiogenese in degenerierten AK sowohl mit inflammatorischen Prozessen, Wundheilung oder Hypoxie assoziiert sein und es ist ebenfalls denkbar, dass eine Kombination aller Prozesse zu einer Neubildung von Gefäßen und vermehrter VEGFR-Expression in der AK führt oder noch weitere Faktoren hierfür ursächlich sind. Bei der CAVD handelt es sich um einen komplexen Vorgang und sowohl Inflammation, als auch Gewebsschäden und Hypoxie sind Teil dieses Prozesses [26]. Demnach sind weitere Analysen notwendig, um die genaue Funktion der Neoangiogenese und die der VEGFR in humanen degenerierten AK zu verstehen.

4.2 Untersuchung von VEGF-Rezeptoren in ovinen Aortenklappentaschen

4.2.1 Entwicklung eines *in-vitro* Modells: Herstellung und Validierung

Um die Rolle der VEGFR auch *in-vitro* untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit ein neues Modell entwickelt, welches ovine AK-Taschen unter pd- Bedingungen über verschiedene Zeiträume hinweg kultiviert.

Obwohl heutzutage das Verständnis über Mechanismen der Entstehung und Progression von CAVD stetig wächst und zahlreiche Informationen zu molekularen und zellulären Vorgängen bekannt sind, besteht immer noch ein Mangel an reproduzierbaren *in-vitro* Modellen, die natürliche Bedingungen wiedergeben und pathologische Zustände erzeugen können [60, 76-78].

Mit zunehmender Kulturdauer zeigte sich eine fortschreitende Degeneration der AK-Taschen, die unter pd-Bedingungen kultiviert wurden. Nach 14 d wurden erste Kalziumablagerungen makroskopisch sichtbar und die AK-Taschen wiesen eine erhöhte Steifheit auf. Mit zunehmender Kulturdauer zeigte sich auch eine fortschreitende Kalzifizierung der AK-Taschen, die auch histologisch nachgewiesen werden konnte. Nach 56 d zeigten sich makroskopisch deutlich sichtbare Kalziumknoten.

CAVD ist charakterisiert durch Veränderungen der valvulären EZM-Architektur, welche eine wichtige Rolle beim Vermitteln von pro-degenerativen Veränderungen spielen [59, 79].

Die Veränderungen der EZM, die bei Organisation und Zusammensetzung während des Fortschreitens der CAVD auftreten, verschlechtern die mechanischen Eigenschaften der Klappe und führen letztendlich zu versteiften und stenotischen AK-Taschen, die den gerichteten Blutfluss behindern und die Herzfunktion beeinträchtigen [7, 59, 80]. Histologische Analysen der EZM zeigten mit zunehmender Degeneration eine deutliche Zerstörung, sowie eine deutliche strukturelle Desorganisation der EZM. Die Kalziumakkumulation zeigte sich vor allem in den äußeren Schichten der AK-Taschen, hierbei vor allem in der *Lamina Ventricularis*, bevor sie sich in die *Lamina Spongiosa* fortsetzte, während eine Verdickung der AK-Taschen hauptsächlich auf einer flächigen Vergrößerung der *Lamina Spongiosa* beruhte.

Es wurden histologische Untersuchungen mit dem Endothelzellmarker vWF durchgeführt, um das Endothel der AK-Taschen genauer darzustellen und Gefäßneubildungen innerhalb der AK-Taschen zu detektieren [58]. Die Schädigung des Endothels ist ein frühes Merkmal der CAVD und begünstigt die Akkumulation von Kalzium und Lipiden, die Infiltration von Entzündungszellen und die Expression von prokalzifizierenden Faktoren beim Fortschreiten der CAVD [26, 81]. In dem *in-vitro* Modell zeigte sich die Endothelzellschicht der AK-Taschen unter pd-Bedingungen deutlich beeinträchtigt und zerstört, während die Endothelzellschicht bei AK-Taschen unter Kontrollbedingungen komplett erhalten war.

Nach 28 d konnte eine Erhöhung der pro-degenerativen Marker nachgewiesen werden. So zeigte sich, wie auch in den humanen AK-Taschen, eine vermehrte Kollagenexpression. Eine erhöhte Genexpression von Kollagen, sowie der Umbau der EZM und Änderungen der Kollagenorganisation könnten auf ein Fortschreiten der Degeneration hindeuten [64].

Auch die Expression von α SMA als Marker für aktivierte VICs war sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene deutlich erhöht [20]. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Analysen humaner AK-Taschen, so erkennt man eine ähnliche Tendenz.

Ein Anstieg der pro-degenerativen Marker erst nach 28 d Kulturdauer könnte dadurch erklärt werden, dass die CAVD ein langsam entstehender Prozess ist, der darüber hinaus in der Literatur in zwei Phasen getrennt wird: Die Initiations- und die Progressionsphase [23, 30, 82]. Überträgt man die Mechanismen der Initiationsphase auf das *in-vitro* Modell, so könnten die Akkumulation von Kalzium, sowie die entstehenden Schäden am Endothel dieser Phase zuzuordnen sein [23, 26]. Erst in der späteren Progressionsphase kommt es zu einer Aktivierung und Differenzierung von VICs und auch die vermehrte Ablagerung von Kollagen mit anschließender osteogener Kalzifizierung wird dieser zweiten Phase zugeordnet [23]. Darüber hinaus zeigte sich Osteocalcin, welches mit der Differenzierung von VICs in einen osteoblastischen Phänotypen assoziiert ist, ebenfalls erst nach 28 d Kulturdauer in degenerierten AK-Taschen erhöht [29]. Auch konnte ein gleichzeitiger Anstieg von Osteoprotegerin, welcher als Inhibitor von osteogener Kalzifizierung beschrieben wird, in den degenerierten AK-Taschen beobachtet werden [83]. Dies könnte bedeuten, dass der Übergang von Initiations- zu Progressionsphase erst nach mehreren Wochen Kulturdauer erfolgt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das entwickelte Modell eine Degeneration mit Kalzifizierungen von AK-Taschen *in-vitro* herbeiführen kann. Nach 28 d Kultur unter pd-Bedingungen zeigen die kultivierten AK-Taschen des *in-vitro* Modells morphologische, molekulare und zelluläre Eigenschaften auf, die denen von degenerierten humanen AK-Taschen ähneln.

Jedoch weist dieses Modell auch Limitationen auf, wie beispielsweise die Kultivierung der AK-Taschen unter passiver Spannung. Im Körper sind die AK-Taschen verschiedensten hämodynamischen Begebenheiten ausgesetzt, wie beispielsweise erhöhter Scherstress, variierender Blutdruck und Veränderung der Spannung innerhalb der Klappe. Diese Faktoren führen zu Gewebsumbau und Inflammation, die eine CAVD verursachen oder verstärken können [7]. Auch der fehlende Kontakt zum direkten Blutfluss stellt eine weitere Limitation des *in-vitro* Modells dar. Bei zukünftigen Verbesserungen des *in-vitro* Modells sollte eine Ausübung von dynamischem Scherstress und realistischen mechanischen Kräften berücksichtigt werden. Auch eine Anpassung der Kulturbedingungen an Zellen und Faktoren

des Blutkreislaufs ist von Bedeutung, um sich den Begebenheiten im lebenden Organismus weiter annähern zu können [60].

4.2.2 Analyse der Genexpression von VEGF-Rezeptoren *in-vitro*

In dem etablierten Modell konnte keine Hochregulation von VEGFR-1 und -2 in degenerierten AK-Taschen beobachtet werden, allerdings zeigte sich NRP-1 nach 28 d Kulturdauer in degenerierten AK-Taschen signifikant erhöht.

Des Weiteren konnte nach 28 d keine Gefäßneubildung in kultivierten degenerierten AK-Taschen beobachtet werden, was auf einen Zusammenhang zwischen Gefäßbildung und der Expression von VEGFR-1 und -2 hindeuten könnte.

Darüber hinaus erfordert die Entstehung und das Wachstum neuer Blutgefäße einen direkten Kontakt zum Organismus, da diese entweder durch im Blut zirkulierende Vorläufer-Zellen entstehen oder durch Aussprossung von bereits bestehenden Blutgefäßen gebildet werden [84]. Das Ausbleiben der Gefäßneubildung könnte somit auch eine Folge des fehlenden Kontakts zum Organismus sein, da es sich bei dem *in-vitro* Modell um ein geschlossenes System handelt und so auch eine ausbleibende inflammatorische Reaktion sowie eine fehlende Einwanderung von Entzündungszellen mit Ausschüttung von VEGF hierdurch bedingt sein könnte [7]. Ebenso könnte eine ausbleibende Erhöhung von TGF- β in den degenerierten AK-Taschen dafür sprechen, da Klappengewebe auf Verletzungen ähnlich wie andere Gewebe reagiert, bei denen insgesamt die Heilungsreaktion durch erhöhte Spiegel von TGF- β ausgelöst wird [70, 85]. Immunzellen und andere Zellen des Blutes setzen bei Verletzung TGF- β frei, welches chemotaktische Wirkung besitzt. Darüber hinaus ist es auch an weiteren Prozessen der Wundheilung beteiligt [70, 85-87]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass beispielsweise eine Einwanderung von Blutzellen und das Ausschütten von Zytokinen und VEGF nicht stattfinden konnten und inflammatorische Vorgänge innerhalb der AK-Tasche nicht initiiert wurden, was wiederum eine ausbleibende Gefäßbildung und fehlende Erhöhung der VEGFR-Expression erklären könnte.

Betrachtet man die fortschreitende Degeneration der AK-Taschen im entwickelten *in-vitro* Modell, so zeigte sich erst nach einer Kulturdauer von 28 d ein Anstieg pro-degenerativer Marker. Eine mutmaßliche Ursache könnte hierbei der einsetzende Übergang von Initiations- zur späteren Progressionsphase sein. Auch zeigte sich erst nach 28 d eine signifikante Erhöhung von NRP-1, sodass möglicherweise eine längere Kulturdauer notwendig wäre, um eine gesteigerte mRNA-Expression der VEGFR zu erreichen. Da mRNA-Analysen nach längeren Kultivierungsphasen aufgrund geringer RNA-Gewinnung mit diesem *in-vitro* Modell nicht möglich waren, bedarf es zusätzlicher Optimierungen in diesem Bereich.

5 Schlussfolgerung

Die Rolle der VEGFR im Degenerationsprozess von AK konnte nicht abschließend geklärt werden, jedoch zeigte sich ein enger Zusammenhang zwischen VEGFR und Gefäßneubildungen in degenerierten AK.

Es zeigten sich neben Gefäßneubildungen eine erhöhte Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 in humanen degenerierten AK, wobei Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Ausprägungsformen der Degeneration festgestellt werden konnten und sich vor allem Gefäßneubildungen und eine vermehrte Expression von VEGFR-1 und -2 in kalzifizierten Bereichen der AK zeigten. Demnach besteht eine enge Korrelation zwischen fortschreitender Kalzifizierung in humanen AK und VEGFR-Expression.

In-vitro ließ sich eine Degeneration von ovinen AK-Taschen herbeiführen, welche sowohl histologisch als auch auf Genexpressionsebene der Degeneration von humanen degenerierten AK-Taschen ähnelte. Das entwickelte *in-vitro* Modell bietet somit eine wichtige Basis für weitere Grundlagenforschung an degenerierten AK.

Es konnte nach einer Kultivierung von 28 d trotz fortschreitender Kalzifizierung und Degeneration weder eine Gefäßneubildung noch eine vermehrte Expression der VEGFR nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sind folglich notwendig, um herauszufinden, ob möglicherweise der fehlende Kontakt zum lebenden Organismus oder ein geringer Zeitraum der Kultivierung von 28 d hierfür ursächlich sind.

Generell weisen die vorliegenden Ergebnisse auf den engen Zusammenhang zwischen Gefäßneubildungen und der Expression von VEGFR in degenerierten AK hin, jedoch ist nach wie vor unklar, ob die durch VEGF und VEGFR vermittelte Neoangiogenese den Entstehungsprozess von CAVD beschleunigt oder verlangsamt. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Rolle von VEGFR im Degenerationsprozess von AK besser zu verstehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden einen wichtigen Baustein für das weitere Verständnis der komplexen Eigenschaften und Mechanismen von CAVD, sodass in Zukunft medikamentöse Optionen als Alternative zum Aortenklappenersatz in der Therapie der CAVD entwickelt werden können.

6 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Aufbau einer gesunden AK 3
- Abb. 2: Pathogenese der CAVD 5
- Abb. 3: Humane AK 26
- Abb. 4: Präparation und Herstellung des in-vitro-Aortenklappenmodells 27
- Abb. 5: Histologische Darstellung humaner AK-Taschen: Kontrolle, fibrotisch und kalifiziert 35
- Abb. 6: Immunhistologische Aufnahmen mit Antikörpern gegen vWF 36
- Abb. 7: Genexpression von Col1A1 (A), Col3A1 (B), Col5A1 (D) und ACTA-2 (D) 38
- Abb. 8: Genexpression von VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (KDR) und Neuropilin-1 (NRP-1) 39
- Abb. 9: Genexpression von FLT-1 (A), KDR (B) und NRP-1 (C) innerhalb einer AK-Tasche 41
- Abb. 10: *In-vitro* Degeneration Aortenklappenmodell 42
- Abb. 11: Fortschreitende Degeneration in kultivierten AK-Taschen 43
- Abb. 12: Fortschreitende Veränderung der EZM in kultivierten AK-Taschen 44
- Abb. 13: Immunhistologische Aufnahmen mit Antikörpern gegen vWF, VIM und α SMA 45
- Abb. 14: RNA-Ausbeute (A) und Qualitätskontrolle (B+C) in kultivierten AK-Taschen 46
- Abb. 15: Genexpression von Col1A1, Col3A1, Col5A1 und ACTA-2 47
- Abb. 16: Genexpression VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 und NRP-1 48

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane Primer 16

Tabelle 2: Ovine Primer 16

Tabelle 3: Zusammensetzung Laemmli-Puffer 30

Tabelle 4: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für die Gelelektrophorese 31

Tabelle 5: Patientendaten in 3 Gruppen zugeordnet 34

Tabelle 6: Patientendaten der Gruppe für Analysen der gleichen AK-Tasche 40

8 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. *Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2019*. 2020.
2. Statistisches Bundesamt. *Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten*. Pressemitteilung 2017.
3. Osnabrugge, R.L., et al., *Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(11): p. 1002-12.
4. 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.
5. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. Lancet, 2006. **368**(9540): p. 1005-11.
6. Adams, H.S.L., et al., *Contemporary review of severe aortic stenosis*. Intern Med J, 2019. **49**(3): p. 297-305.
7. 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.
8. Bonow, R.O., et al., *2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines 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 (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons*. Circulation, 2008. **118**(15): p. e523-661.
9. Perera, S., et al., *Outcomes of patients with untreated severe aortic stenosis in real-world practice*. N Z Med J, 2011. **124**(1345): p. 40-8.
10. Vahanian, A., et al., *2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)*. European Heart Journal, 2021.
11. Marquis-Gravel, G., et al., *Medical Treatment of Aortic Stenosis*. Circulation, 2016. **134**(22): p. 1766-1784.
12. Leon, M.B., et al., *Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery*. N Engl J Med, 2010. **363**(17): p. 1597-607.
13. Benninghoff, D., *Taschenbuch Anatomie 2. Auflage*. Urban & Fischer, 2014.
14. Schoen, F.J., *Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering*. Circulation, 2008. **118**(18): p. 1864-80.
15. 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.
16. Weind, K.L., C.G. Ellis, and D.R. Boughner, *Aortic valve cusp vessel density: Relationship with tissue thickness*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2002. **123**(2): p. 333-340.
17. Gould, S.T., et al., *Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease*. Circ Res, 2013. **113**(2): p. 186-97.
18. Zeng, Z., et al., *Macromolecular transport in heart valves. II. Theoretical models*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007. **292**(6): p. H2671-H2686.
19. Butcher, J.T., et al., *Unique Morphology and Focal Adhesion Development of Valvular Endothelial Cells in Static and Fluid Flow Environments*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2004. **24**(8): p. 1429-1434.

20. 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.
21. Aikawa, E., et al., *Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering*. *Circulation*, 2006. **113**(10): p. 1344-52.
22. Otto, C.M., *Calcific Aortic Stenosis — Time to Look More Closely at the Valve*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **359**(13): p. 1395-1398.
23. Goody, P.R., et al., *Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. **40**(4): p. 885-900.
24. Haidekker, M.A., N. L'Heureux, and J.A. Frangos, *Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(4): p. H1401-6.
25. Yap, C.H., et al., *Dynamic deformation characteristics of porcine aortic valve leaflet under normal and hypertensive conditions*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(2): p. H395-405.
26. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. *Circulation*, 1994. **90**(2): p. 844-853.
27. O'Brien, K.D., et al., *Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(4): p. 523-32.
28. Olsson, M., J. Thyberg, and J. Nilsson, *Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(5): p. 1218-22.
29. Hulin, A., et al., *Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets*. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 21.
30. Pawade, T.A., D.E. Newby, and M.R. Dweck, *Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **66**(5): p. 561-77.
31. Syväranta, S., *Mechanisms of Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Calcific Aortic Valve Stenosis*, in *Wihuri Research Institute Division of Cardiology/Department of Medicine University of Helsinki, Finland*. 2013.
32. Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nature Medicine*, 2003. **9**(6): p. 669-676.
33. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(5): p. 359-71.
34. Roberts, W.G. and G.E. Palade, *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor*. *Journal of Cell Science*, 1995. **108**(6): p. 2369-2379.
35. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(4): p. 581-611.
36. Yang, Z.F., et al., *Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Small-for-Size Liver Grafts Enhances Macrophage Activities through VEGF Receptor 2-Dependent Pathway*. *The Journal of Immunology*, 2004. **173**(4): p. 2507-2515.
37. Terman, B.I., et al., *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **187**(3): p. 1579-86.
38. Shibuya, M., *VEGFR and Type-V RTK Activation and Signaling*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013. **5**(10).
39. Apte, R.S., D.S. Chen, and N. Ferrara, *VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development*. *Cell*, 2019. **176**(6): p. 1248-1264.
40. Kaipainen, A., et al., *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(8): p. 3566-3570.

41. Karkkainen, M.J. and T.V. Petrova, *Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5598-5605.
42. Heinolainen, K., et al., *VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling*. *Circ Res*, 2017. **120**(9): p. 1414-1425.
43. Mayi, B.S., et al., *The role of Neuropilin-1 in COVID-19*. *PLoS Pathog*, 2021. **17**(1): p. e1009153.
44. Bao, P., et al., *The role of vascular endothelial growth factor in wound healing*. *J Surg Res*, 2009. **153**(2): p. 347-58.
45. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. *Nature*, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
46. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. *Nature*, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
47. Gerber, H.P., et al., *VEGF is required for growth and survival in neonatal mice*. *Development*, 1999. **126**(6): p. 1149-59.
48. Haigh, J.J., *Role of VEGF in Organogenesis*, in *VEGF in Development*. 2008, Springer New York: New York, NY. p. 52-67.
49. Kerbel, R.S., *Tumor Angiogenesis*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(19): p. 2039-2049.
50. Fukumura, D., et al., *Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges*. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018. **15**(5): p. 325-340.
51. Mazzone, A., et al., *Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(9): p. 1670-6.
52. Weiss, R.M., J.D. Miller, and D.D. Heistad, *Fibrocalcific aortic valve disease: opportunity to understand disease mechanisms using mouse models*. *Circ Res*, 2013. **113**(2): p. 209-22.
53. Mohler, E.R., 3rd, et al., *Bone formation and inflammation in cardiac valves*. *Circulation*, 2001. **103**(11): p. 1522-8.
54. Soini, Y., T. Salo, and J. Satta, *Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis*. *Hum Pathol*, 2003. **34**(8): p. 756-63.
55. Perrotta, I., et al., *HIF-1 α and VEGF: Immunohistochemical Profile and Possible Function in Human Aortic Valve Stenosis*. *Ultrastructural Pathology*, 2015. **39**(3): p. 198-206.
56. Syväranta, S., et al., *Vascular endothelial growth factor-secreting mast cells and myofibroblasts: a novel self-perpetuating angiogenic pathway in aortic valve stenosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(6): p. 1220-7.
57. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
58. Jaffe, E.A., L.W. Hoyer, and R.L. Nachman, *Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(5): p. 1906-9.
59. Hutson, H.N., et al., *Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture*. *PLoS One*, 2016. **11**(9): p. e0163858.
60. Weber, A., et al., *Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitial Cells*. *Biomedicines*, 2021. **9**(5).
61. 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.
62. Nagy, E., et al., *Upregulation of the 5-Lipoxygenase Pathway in Human Aortic Valves Correlates With Severity of Stenosis and Leads to Leukotriene-Induced Effects on Valvular Myofibroblasts*. *Circulation*, 2011. **123**(12): p. 1316-1325.
63. Di Vito, A., et al., *Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).
64. Eriksen, H.A., et al., *Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis*. *Atherosclerosis*, 2006. **189**(1): p. 91-8.

65. Akahori, H., et al., *Nuclear factor- κ B-hypoxia-inducible factor-2 pathway in aortic valve stenosis*. The Journal of heart valve disease, 2014. **23** **5**: p. 558-66.
66. Deckers, M.M., et al., *Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation*. Endocrinology, 2000. **141**(5): p. 1667-74.
67. Coté, N., et al., *Inflammation Is Associated with the Remodeling of Calcific Aortic Valve Disease*. Inflammation, 2013. **36**(3): p. 573-581.
68. Durbin, A.D. and A.I. Gotlieb, *Advances towards understanding heart valve response to injury*. Cardiovasc Pathol, 2002. **11**(2): p. 69-77.
69. Brown, L.F., et al., *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1375-9.
70. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(5): p. 585-601.
71. Oh, H., et al., *Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15732-9.
72. Sorg, H., C. Krueger, and B. Vollmar, *Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber*. Journal of Anatomy, 2007. **211**(6): p. 810-818.
73. Klein, S.A., et al., *Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits murine cutaneous wound healing*. J Surg Res, 1999. **82**(2): p. 268-74.
74. Jian, B., et al., *Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. 457-65; discussion 465-6.
75. Dor, Y., R.M. Porat, and E. Keshet, *Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis*. American journal of physiology. Cell physiology, 2001. **280** **6**: p. C1367-74.
76. Bowler, M.A. and W.D. Merryman, *In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system*. Cardiovasc Pathol, 2015. **24**(1): p. 1-10.
77. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 266-277.
78. Nehrenheim, L., et al., *Native aortic valve derived extracellular matrix hydrogel for three dimensional culture analyses with improved biomimetic properties*. Biomed Mater, 2019. **14**(3): p. 035014.
79. Rodriguez, K.J. and K.S. Masters, *Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix*. J Biomed Mater Res A, 2009. **90**(4): p. 1043-53.
80. Hinton, R.B., et al., *Extracellular Matrix Remodeling and Organization in Developing and Diseased Aortic Valves*. Circulation Research, 2006. **98**(11): p. 1431-1438.
81. Lindman, B.R., et al., *Calcific aortic stenosis*. Nature Reviews Disease Primers, 2016. **2**(1): p. 16006.
82. New, S.E.P., E. Aikawa, and D.A. Towler, *Molecular Imaging Insights Into Early Inflammatory Stages of Arterial and Aortic Valve Calcification*. Circulation Research, 2011. **108**(11): p. 1381-1391.
83. Lis, G.J., et al., *Elevated serum osteoprotegerin is associated with decreased osteoclastic differentiation in stenotic aortic valves*. J Physiol Pharmacol, 2014. **65**(3): p. 377-82.
84. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-257.
85. Walker, G.A., et al., *Valvular Myofibroblast Activation by Transforming Growth Factor- β* . Circulation Research, 2004. **95**(3): p. 253-260.
86. Wahl, S.M., et al., *Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5788-92.
87. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth*. J Exp Med, 1986. **163**(5): p. 1037-50.

9 Anhang

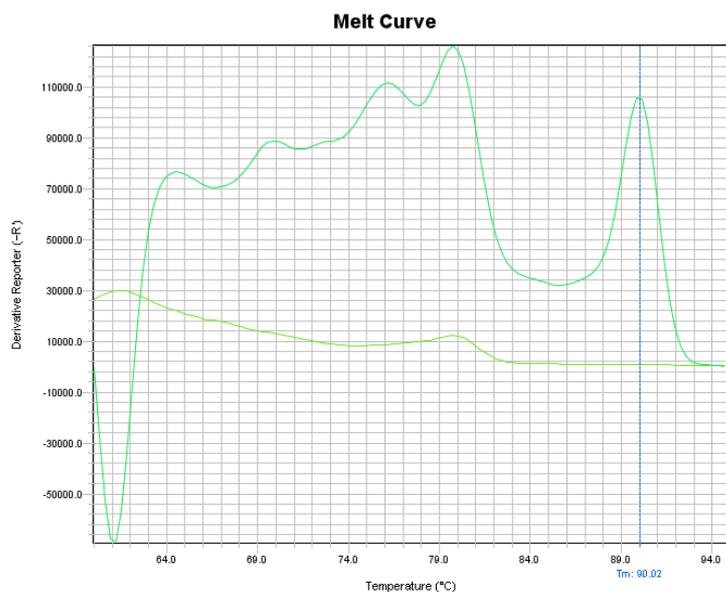


Abb. A 1: Schmelzkurve FLT-4. Genexpressionsanalysen von FLT-4 (VEGFR-3) ergaben, dass das Gen in humanen Klappen nicht detektiert werden konnte.



Abb. A 2: Amplifikationsplot FLT-4. Genexpressionsanalysen von FLT-4 (VEGFR-3) ergaben, dass das Gen in humanen Klappen nicht detektiert werden konnte.

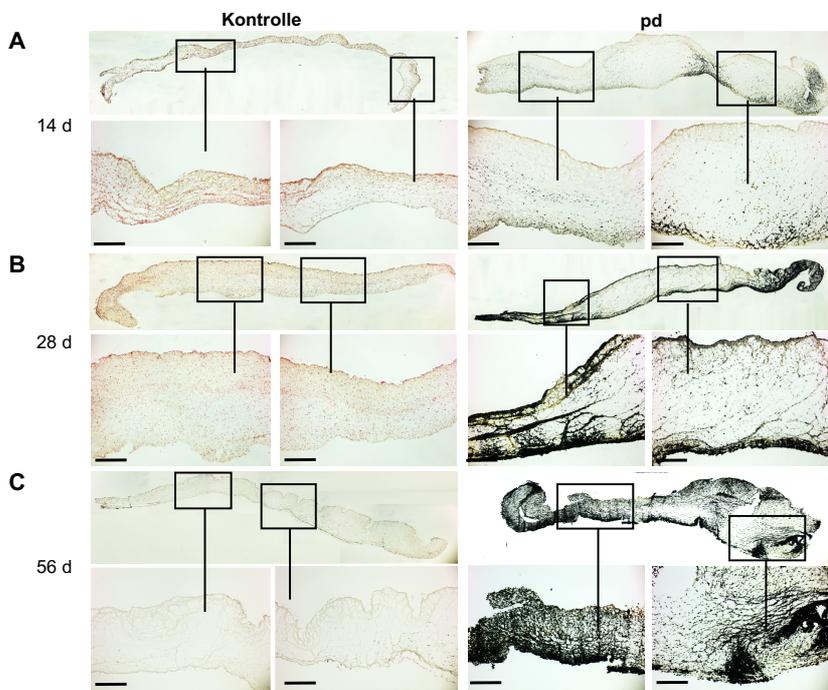


Abb. A 3: Von-Kossa Färbung *in-vitro* Aortenklappenmodell.

Kontroll- und pd-Bedingungen nach (A) 14 d (B) 28 d und (C) 56 d. Maßstab = 100 um. d = Tage. Repräsentative Bilder aus 5 Experimenten. Modifiziert nach Weber *et al.*, 2021.

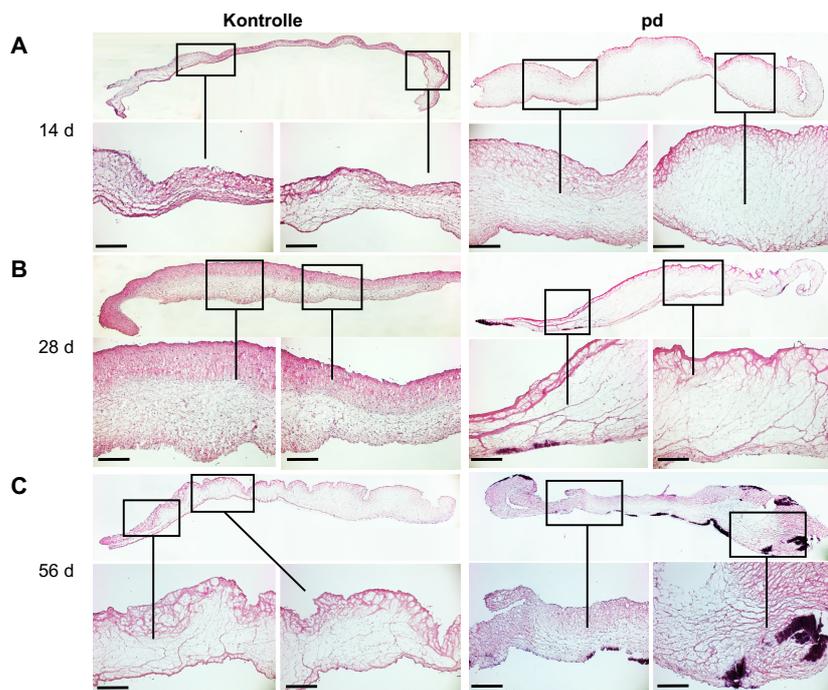


Abb. A 4: H.E.-Färbung *in-vitro* Aortenklappenmodell.

Kontroll- und pd-Bedingungen nach (A) 14 d (B) 28 d und (C) 56 d. Maßstab = 100 um. d = Tage. Repräsentative Bilder aus 5 Experimenten. Modifiziert nach Weber *et al.*, 2021.

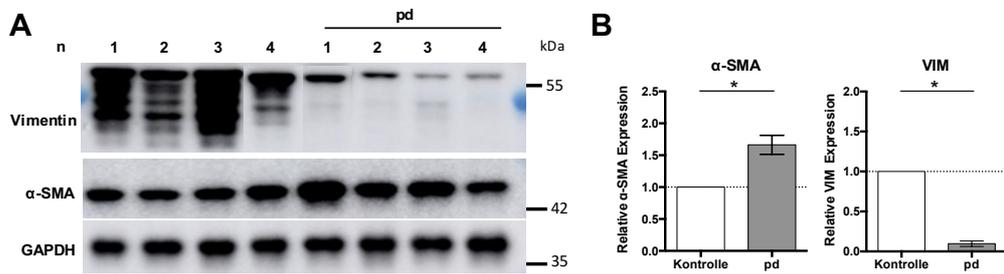


Abb. A 5: Western Blot Analyse von VIM und α -SMA in kultivierten AK-Taschen.

(A) Dargestellt sind ein repräsentatives Bandenmuster für VIM (55 kDa) und α -SMA (42 kDa) sowie GAPDH als Ladekontrolle (35 kDa). (B) Graphische Darstellung des Gehalts an α -SMA und VIM in AK-Taschen unter pd-Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Kulturdauer betrug 28 Tage. n=4. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (modifiziert nach Weber *et al.*, 2021).

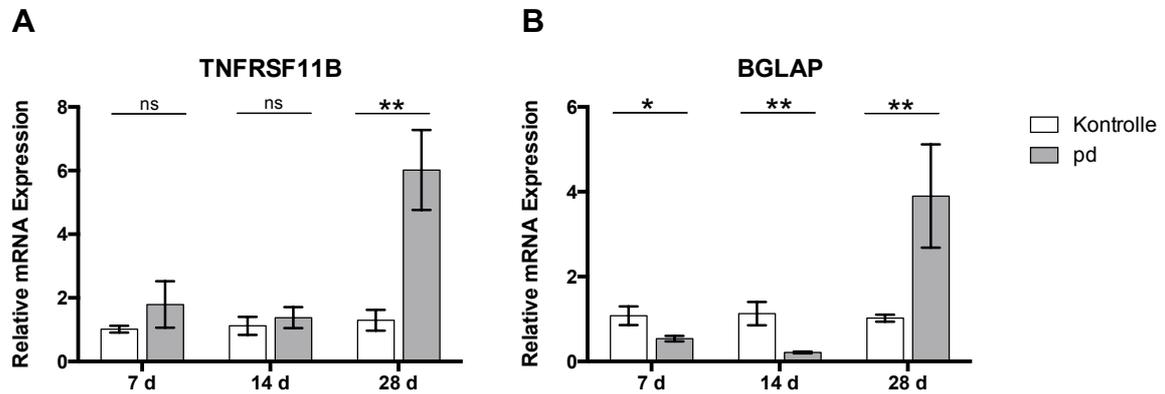


Abb. A 6: Genexpression von TNFRSF11B (Osteoprotegerin) und BGLAP (Osteocalcin).

Vergleich von kultivierten AK-Taschen unter Kontroll- und pd-Bedingungen nach 7, 14 und 28 d. n= 4-7. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, berechnet nach *Student's t-Test*.

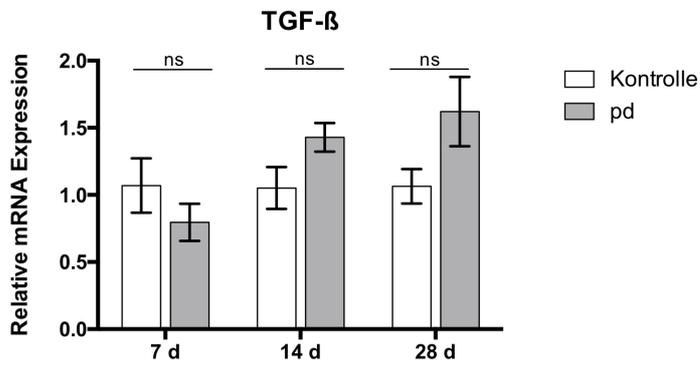


Abb. A 7: Genexpression von TGF-β

Vergleich von kultivierten AK-Taschen unter Kontroll- und pd-Bedingungen nach 7, 14 und 28 d. n= 5-8. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Berechnet nach *Student's t-Test*.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen, ohne deren Unterstützung die Anfertigung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari** für die Möglichkeit dieser Dissertation, für die Betreuung meiner Arbeit und für all die unzähligen Gelegenheiten, tiefere Einblicke in das große Spektrum der Herzchirurgie und die experimentelle Forschung gewinnen zu können.

Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg als Direktor der *Klinik für Herzchirurgie* der Universitätsklinik Düsseldorf meine Dissertation in dem Forschungslabor seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Kröpil für die Ko-Betreuung meiner Dissertation und seine konstruktiven Anregungen im Entstehungsprozess dieser Arbeit.

Meinem Arbeitsgruppenleiter **Dr. Andreas Weber** für die stetige Unterstützung, das große Verständnis, die immer selbstverständliche Hilfe und die daraus entstandene Freundschaft, die ich sehr schätze.

Allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, allen voran **Dr. Barth, Dr. Selig, Dr. Niazy und Dr. Jenke**, sowie bei allen studentischen Mitarbeitern für die kompetente Einarbeitung, die Hilfe und die wertschätzende Arbeitsatmosphäre im Team.

Frau Gisela Müller für all die kleinen und großen Tätigkeiten, die für den Laboralltag und das Gelingen aller experimentellen Arbeiten unverzichtbar waren.

Meiner Kollegin und mittlerweile guten Freundin **Frau Vera Schmidt** für die Unterstützung sowohl im wissenschaftlichen und experimentellen Arbeiten als auch in allen Lebenslagen und die langjährige Freundschaft.

Bei allen Laborpartnern, Kommilitonen und Freunden für den Zusammenhalt, die gemeinsame Zeit und die prägenden Momente während meines ganzen Studiums, sowie bei meiner Familie für den bedingungslosen Rückhalt zu jedem Zeitpunkt meines Werdeganges.