

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

Interaktion zwischen vaskulären glatten Muskelzellen und der
dezellularisierten extrazellulären Matrix aortaler Herzklappen

Dissertation

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

vorgelegt von
Daniela Zouikova
2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Hug Aubin

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Stephan Urs Sixt

Meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

Herzklappenerkrankungen sind häufig und haben eine hohe klinische Relevanz. Da vor allem bei der Aortenklappenstenose ein Herzklappenersatz die einzige definitive Therapieoption darstellt und die konventionellen biologischen bzw. mechanischen Prothesen erhebliche Nachteile aufweisen, entstand das Konzept von *Tissue-engineered Heart Valves* (TEHV). Besonders interessant sind hierbei dezellularisierte Herzklappenprothesen (DHP), welche auf dezellularisierter extrazellulärer Matrix (dEZM) basieren. Neben einer geringeren Immunogenität ist eine Rezellularisierung durch empfängereigene Zellen mit EZM-Produktion und somit stetiger Selbst-Regeneration möglich. In zahlreichen klinischen Studien zeigten sich vielversprechende Ergebnisse, wobei es in einigen Fällen dennoch zu einer Degeneration der DHP kam. Deshalb ist deren weitere Erforschung von hoher klinischer Bedeutung. Es ist bekannt, dass vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) ihren Phänotyp wechseln und Merkmale von z. B. Makrophagen-, Fibroblasten- und Osteoblasten-ähnlichen Zellen annehmen können. Sie sind auf diese Weise in die Pathogenese der Atherosklerose und der Aortenklappenstenose involviert. Es wird angenommen, dass VSMCs auch eine Rolle bei der Degeneration von DHP spielen könnten. Ziel der vorliegenden Arbeit war somit die Untersuchung, ob und wie VSMCs *in vitro* auf dEZM reagieren und welchen Phänotyp sie hierbei annehmen. Hierfür wurden aortale VSMCs aus adulten männlichen Wistar-Ratten isoliert und für 48 Stunden in Gegenwart von aus Schafsherzen isolierten, durch Detergenzien (0,5 % SDS, 0,5 % DCA) dezellularisierten Aortenklappenbiopsien kultiviert. Als Polarisierungskontrollen dienten für 24 Stunden mit LPS bzw. IL-4 behandelte VSMCs. Als *Baseline*-Kontrollen wurden unbehandelte Zellen verwendet. Anschließend erfolgte die Analyse der VSMC-dEZM-Interaktion mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie eine Untersuchung phänotypspezifischer Marker mittels quantitativer RT-PCR und eines Multiplex-*Immunoassays*. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine Migration von glatten Muskelzellen zu der dEZM-Biopsie. In der RT-PCR konnte nach dEZM-Kontakt eine Herunterregulierung der kontraktile Gene nachgewiesen werden. Zudem war der osteoblastische Marker *BMP2* tendenziell hochreguliert. Während die inflammatorischen Gene in der RT-PCR nicht reguliert waren, zeigte sich im Multiplex-Assay die vermehrte Produktion einiger proinflammatorischer Zytokine. Durch dEZM-Kontakt de-differenzieren glatte Muskelzellen, schütten zu Beginn proinflammatorische Zytokine aus und exprimieren vermehrt *BMP2*. Sie könnten somit in die *in vivo*-Degeneration von DHP involviert sein, indem sie eine immunvermittelte Kalzifizierung fördern. Es sind weitere Experimente notwendig, um die Bedeutung dieser Ergebnisse einordnen zu können.

Abstract

Heart valve diseases are very common and therefore very relevant in the clinical field. As a heart valve replacement remains the only definitive therapy option in aortic valve stenosis and conventional prostheses have many disadvantages, the concept of tissue-engineered heart valves (TEHV) has been developed. Especially decellularized heart valves (DHV), a subtype of TEHV, are increasingly used in patients. Due to their lack of cellular components, they are less immunogenic. Also, DHV can be repopulated by patient cells, which facilitates a self-regeneration and remodeling. Although many clinical trials have yielded promising results, there still have been some cases of implant degeneration. Hence, it is important to comprehend the underlying mechanisms. It is known that vascular smooth muscle cells (VSMCs) can change their phenotype towards macrophage-, fibroblast-, osteoblast-like and other cells and are crucial in the pathogenesis of atherosclerosis and aortic valve stenosis. Possibly, they could also play a role in the degeneration of heart valve prostheses. The goal of this work was to investigate if VSMCs interact with decellularized extracellular matrix (dECM) of aortic valves *in vitro* and if they change their phenotype during this process. Therefore, aortic vascular smooth muscle cells were isolated from adult male Wistar rats and cultivated for 48 hours with detergent decellularized (0,5 % SDS, 0,5 % DCA) ovine aortic valve biopsies. VSMCs stimulated for 24 hours with LPS or IL-4 served as polarization controls while untreated cells were used as baseline controls. Afterwards, fluorescence imaging of the dECM biopsies, RT-PCR, and a multiplex immunoassay have been performed. In fluorescence microscopy, a migration of VSMCs towards the dECM and an interaction between cells and dECM were visible. In the RT-PCR, there has been a downregulation of contractile markers after contact with the dECM. Additionally, there was a tendency to upregulation of the osteoblastic gene *BMP2* in the dECM group. While inflammatory genes were not regulated in the RT-PCR, there has been an increased amount of proinflammatory cytokines in the multiplex immunoassay. After contact with dECM, VSMCs de-differentiate and change their phenotype. They lose their contractile markers, secrete proinflammatory cytokines and acquire osteoblastic characteristics. Therefore, they could be involved in the degeneration of decellularized heart valve prostheses and promote an immune-mediated calcification of the implant. Further experiments, e. g. a further analysis of the acquired VSMC phenotype by flow cytometry, will be necessary to confirm these results.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ACTA2	<i>Smooth Muscle α-Actin</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp. B	Amphotericin B
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
BIO	Biologisches Dezellularisierungsprotokoll
BMP2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
cm²	Quadratzenimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
CXR	<i>Carboxy-X-Rhodamine</i>
DAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DCA	Natriumdesoxycholat
dECM	<i>Decellularized extracellular matrix</i>
DET	Detergens-basiertes Dezellularisierungsprotokoll
dEZM	dezellularisierte extrazelluläre Matrix
DHP	Dezellularisierte Herzklappenprothesen
DHV	<i>Decellularized heart valves</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBGC	<i>Foreign-body giant cell</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Gramm

G	<i>gauge</i>
gDNA	genomische DNA
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN-γ	Interferon γ
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-12p70	Interleukin 12p70
IL-17A	Interleukin 17A
IL-18	Interleukin 18
IL-1α	Interleukin 1α
IL-1β	Interleukin 1β
IL-33	Interleukin 33
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IRC	<i>Inter run calibration</i>
IκBα	<i>Inhibitor of NFκB-α</i>
KC	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
Ktrl.	Kontrolle
kU	Kilounit
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MYH11	<i>Smooth Muscle Myosin Heavy Chain 11</i>
MYOCD	Myocardin
NaN3	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NFKB1	<i>Nuclear Factor Kappa B subunit 1</i>

nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	<i>Optical density</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
qPCR	quantitative PCR
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPL13A	<i>Ribosomal Protein L13a</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RQN	<i>RNA quality number</i>
RT-PCR	<i>Realtime-PCR</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMCs	<i>Smooth muscle cells</i>
TAGLN	Transgelin
TEHV	<i>Tissue-engineered Heart Valves</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
U	<i>Unit</i>
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VECs	<i>Valvular endothelial cells</i>
VICs	<i>Valvular interstitial cells</i>
VSMCs	<i>Vascular smooth muscle cells</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Klinischer Hintergrund.....	1
1.2	Möglichkeiten des Herzklappenersatzes.....	1
1.2.1	Mechanische Herzklappenprothesen.....	1
1.2.2	Biologische Herzklappenprothesen.....	2
1.2.3	Tissue-Engineered Heart Valves.....	2
1.3	Dezellularisierung.....	4
1.4	Rolle des Immunsystems.....	5
1.4.1	Reaktion des Immunsystems auf biologische Herzklappenprothesen.....	5
1.4.2	Konstruktives und maladaptives <i>Remodeling</i> als Reaktion auf TEHV.....	8
1.5	Vaskuläre glatte Muskelzellen und ihre Bedeutung.....	9
1.5.1	Phänotypen glatter Muskelzellen und ihre Marker.....	11
1.5.2	Exkurs: Glatte Muskelzellen und Atherosklerose.....	12
1.5.3	Glatte Muskelzellen und Aortenklappensklerose.....	13
1.6	Ziele der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Materialien.....	15
2.1.1	Versuchstiere und Organe.....	15
2.1.2	Chemikalien und Lösungen.....	15
2.1.3	Stock- und Arbeitslösungen.....	16
2.1.4	Kits und Assays.....	19
2.1.5	<i>Primer</i>	20
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.7	Geräte und Instrumente.....	22
2.1.8	Software.....	24
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Isolation von vaskulären glatten Muskelzellen.....	24
2.2.2	Weitere Kultivierung der VSMCs.....	25
2.2.3	Präparation und Dezellularisierung von Schafs-Aortenklappen.....	25
2.2.4	Qualitätskontrolle der Dezellularisierung.....	28
2.2.5	<i>In vitro</i> Kultivierung der VSMCs in Gegenwart von dEZM.....	29

2.2.6	Nachweis der Interaktion von VSMCs und dEZM.....	30
2.2.7	RNA-Isolation.....	30
2.2.8	RNA-Qualitätskontrolle.....	31
2.2.9	cDNA-Synthese.....	31
2.2.10	Quantitative RT-PCR-Analyse.....	32
2.2.11	Multiplex- <i>Immunoassay</i>	32
2.2.12	ALP-Assay.....	33
2.2.13	Statistik.....	33
2.2.14	Graphiken.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Erfolgreiche Kultivierung glatter Muskelzellen aus Rattenaorten.....	34
3.2	Effektive Dezellularisierung von Aortenklappenbiopsien.....	34
3.3	Nachgewiesene Interaktion zwischen VSMCs und dEZM.....	35
3.4	Suffiziente RNA-Qualität.....	37
3.5	Regulation der Genexpression nach 48-stündigem dEZM-Kontakt.....	37
3.6	Vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach 48-stündigem dEZM-Kontakt.....	40
3.7	ALP-Assay ohne Aussagewert.....	41
4	Diskussion.....	42
4.1	Bedeutung der DET-Dezellularisierung.....	42
4.2	Interaktion zwischen glatten Muskelzellen und dEZM.....	43
4.3	Spezifischer dEZM-VSMC-Phänotyp.....	43
4.4	Limitationen der Studie.....	46
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	48
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	50
6	Danksagung.....	

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen im Allgemeinen sind häufig und sorgten im Jahr 2020 für 19 Millionen Todesfälle (1), wobei Erkrankungen der Herzklappen eine wichtige Unterkategorie darstellen. Der Anteil der Betroffenen steigt mit zunehmendem Alter (2), es gibt jedoch auch angeborene Herzklappenfehler (3). Am häufigsten sind die Mitralklappe und die Aortenklappe betroffen. Während bei einer Mitralklappeninsuffizienz, der häufigsten valvulären Erkrankung, meist eine Reparatur durchgeführt werden kann, ist bei der Aortenklappenstenose ein chirurgischer oder interventioneller Klappenersatz die einzige Therapiemöglichkeit (3, 4). Vor allem die Aortenklappenstenose hat aufgrund ihrer hohen Mortalität, die bei symptomatischen Patienten innerhalb der folgenden zwei Jahre 50 % beträgt, eine hohe klinische Relevanz (5). Aus diesem Grund lohnt es sich, näher auf die Möglichkeiten des Aortenklappen- bzw. des Herzklappenersatzes im Allgemeinen einzugehen.

1.2 Möglichkeiten des Herzklappenersatzes

Betrachtet man Herzklappenprothesen, so sind drei wichtige Typen zu nennen: 1. mechanische, 2. biologische und 3. *in vitro* hergestellte Prothesen, sogenannte *Tissue-engineered Heart Valves*, TEHV (6). Diese werden im Folgenden beschrieben.

1.2.1 Mechanische Herzklappenprothesen

Mechanische Herzklappenprothesen werden aus verschiedenen Materialien hergestellt. Vorteilhaft ist die lange Haltbarkeit von bis zu 25 Jahren (7, 8). Betroffene Patienten sind jedoch durch die thrombogene Wirkung der künstlichen Oberflächen auf eine lebenslange Einnahme von Antikoagulanzen angewiesen, was mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergeht. Auch besteht im Vergleich zu nativen Klappen die erhöhte Gefahr einer Endokarditis sowie einer mechanischen hämolytischen Anämie. Außerdem sind bei Kindern Re-Operationen erforderlich, da sich die Prothesen nicht an das Wachstum des Körpers anpassen können (6).

1.2.2 Biologische Herzklappenprothesen

Biologische Herzklappenprothesen existieren ebenfalls in unterschiedlichen Formen. Es gibt hierbei *Homografts*, d. h. menschliche Spenderklappen, und *Xenografts* tierischen Ursprungs (7). Biologische Prothesen haben eine bessere Hämodynamik sowie ein geringeres Thromboserisiko (3). Letzteres liegt unter anderem an der Quervernetzung der Kollagenfasern bei Fixierung des Gewebes mithilfe von Glutaraldehyd mit damit verbundener erschwelter Aktivierung der primären Gerinnung über den von-Willebrand-Faktor (9, 10). Somit entfällt die Notwendigkeit einer lebenslangen Antikoagulation mit dem damit verbundenen Blutungsrisiko. Mit der Zeit degenerieren die biologischen Prothesen jedoch, sodass nach ca. 10 bis 15 Jahren Re-Operationen notwendig werden. Dies liegt u. a. daran, dass eine Immunantwort aktiviert wird und es zu einer progressiven Kalzifikation des fremden Gewebes kommt (3, 11). Zudem ist auch bei dieser Prothesenart das Endokarditis-Risiko deutlich erhöht (12).

1.2.3 Tissue-Engineered Heart Valves

Da sowohl mechanische als auch biologische Herzklappenprothesen ihre Grenzen haben, werden zunehmend *in vitro*-Herzklappen, sog. *Tissue-engineered Heart Valves* (TEHV), entwickelt. Ziel ist ein der nativen Klappe ähnliches, nicht immunogenes und nicht thrombogenes Gewebe. Zudem sollten TEHV die Fähigkeit zum Wachstum und *Remodeling*, also zum Umbau und Ersatz durch körpereigenes Gewebe, besitzen, um Reoperationen bei jungen Patienten zu vermeiden (3, 13). Im Idealfall findet nach Implantation eine Wiederbesiedlung der Prothese mit einwandernden körpereigenen Zellen statt, was als Repopulation oder Rezellularisierung bezeichnet wird (13, 14). Auch bei den TEHV gibt es verschiedene Ansätze (Abb. 1). Zum einen nutzt man frische oder kryokonservierte biologische Herzklappen von Menschen oder Tieren und dezellularisiert diese. Es resultieren dezellularisierte Herzklappenprothesen (DHP). Zum anderen synthetisiert man künstliche Prothesen aus unterschiedlichen Polymeren. Auch ist eine Funktionalisierung mit bioaktiven Substanzen für eine vereinfachte Rezellularisierung oder eine *in vitro*-Besiedlung mit patienteneigenen Zellen möglich (3, 13, 15).

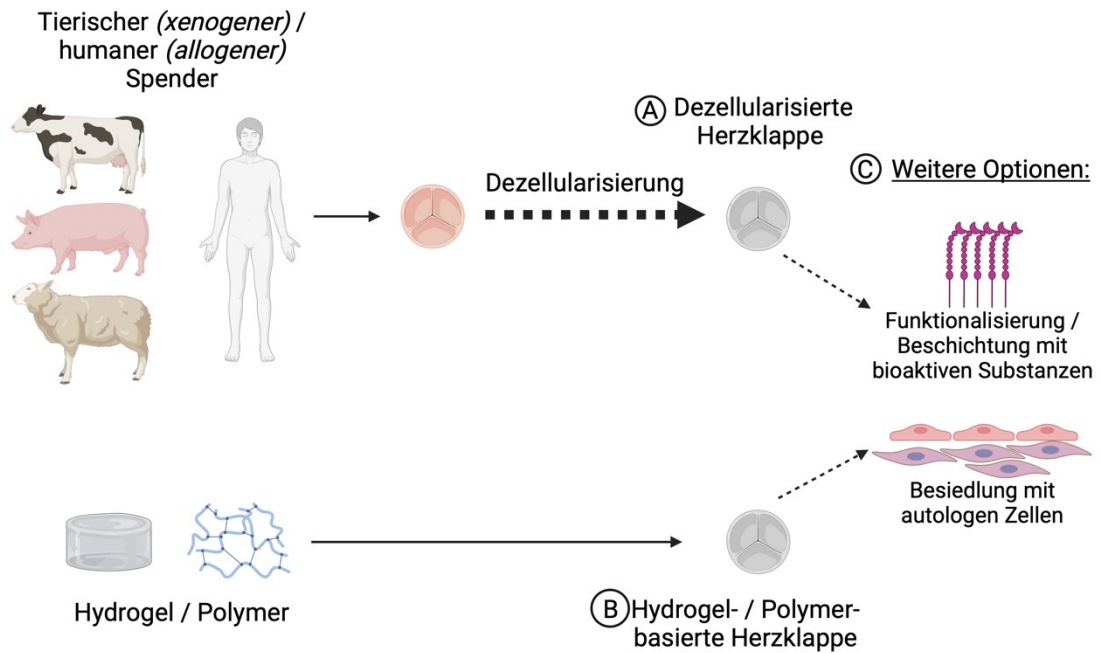


Abb. 1: Optionen von TEHV

Als eine Option werden native Herzklappen von tierischen oder menschlichen Spendern entnommen und dezellularisiert (A). Alternativ können Herzklappen aus Hydrogelen oder Polymeren künstlich geformt werden (B). Weiterhin kann die Prothesenfunktion durch weitere Methoden wie Beschichtung mit bioaktiven Substanzen oder Besiedlung mit autologen Zellen optimiert werden (C). Erstellt in Biorender.com

DHP sind noch nicht breit in der Klinik etabliert, es gibt jedoch bereits zahlreiche vielversprechende präklinische Ergebnisse. In einem pädiatrischen Schafsmodell zeigte sich bei Implantation von mit autologen Zellen besiedelten dezellularisierten Pulmonalklappen mittelfristig eine gute Prothesenfunktion mit zufriedenstellender Rezellularisierung und *Remodeling* ohne Hinweise auf eine erhöhte Thromboseneigung (16). Auch bei Ersatz der Aortenklappe in juvenilen Schafen durch porcine DHP war mittelfristig keine Degeneration oder Kalzifizierung nachweisbar. Eine Zunahme des Anulusdurchmessers könnte zudem auf ein mögliches Wachstumspotential hindeuten (17).

Viele klinische Studien zeigen ebenfalls das große Potential der DHP auf. Vor allem dezellularisierte *Homografts* haben gute mittelfristige Ergebnisse und geringere Re-Operationsraten (3, 18). Erste Ergebnisse der europäischen ESPOIR-Studie zur Verwendung dezellularisierter Pulmonalklappenprothesen wiesen ebenfalls auf eine geringere Degenerationsrate im Vergleich zu üblichen *Homografts* hin (19). Darüber hinaus erwies sich der Einsatz dezellularisierter Aortenklappen in der multizentrischen

ARISE-Studie als gute Option für junge Patienten (20). In einer weiteren Studie konnte außerdem eine *in vivo*-Rezellularisierung mit Endothelzellen und Matrix-produzierenden Zellen nachgewiesen werden, die innerhalb des ersten Jahres erfolgte (21). Dezellularisierte *Homografts* sind somit sehr vielversprechend. Ihre Haltbarkeit ist jedoch stark von der individuellen Immunantwort des Empfängers abhängig (21). Während die klinischen Ergebnisse insgesamt positiv ausfielen, kam es in einigen Fällen auf lange Sicht zu einer Degeneration (19, 21). Da die genauen Hintergründe bisher nicht bekannt sind, muss weiterhin daran geforscht werden.

Zusätzlich sind aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von humanem Spendergewebe Alternativen wichtig. Deshalb wurden auch Versuche der Implantation von *Xenograft*-DHP und von Polymer-basierten TEHV unternommen (3). Bei den *Xenograft*-DHP gibt es einige Daten zu klinischen Anwendungen mit guten kurz- bis mittelfristigen Ergebnissen (22, 23), andere Studien berichten jedoch von Inflammation, Degeneration und fehlendem *Remodeling* (3). Als wichtiges Beispiel ist die Implantation von SYNERGRAFT-Herzklappen bei pädiatrischen Patienten zu nennen. Hierbei kam es zu einer beschleunigten Fibrosierung und Kalzifizierung mit rapidem Versagen der Prothesen, was durch eine unvollständige Dezellularisierung und eventuell auch durch andere immunogene Bestandteile der *xenogenen* extrazellulären Matrix, wie z. B. alpha-Galactose, bedingt war (3, 24). Zu den Polymer-basierten TEHV gibt es noch keine ausreichenden Daten. Sie können die hämodynamischen Eigenschaften nativer Klappen jedoch nur eingeschränkt simulieren (3, 13).

Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist es sehr wichtig, mehr über TEHV im Allgemeinen und die durch sie ausgelöste Reaktion des Immunsystems zu erfahren.

1.3 Dezellularisierung

Durch das Verfahren der Dezellularisierung werden die *Homo*- oder *Xenografts* von allen zellulären Bestandteilen befreit, um die Immunogenität des Implantats zu senken. Im Idealfall wandern nach Implantation *in vivo* körpereigene Zellen des Patienten in die Herzklappe ein und produzieren extrazelluläre Matrix (EZM), welche das fremde Prothesengewebe ersetzen und eine unbegrenzte Haltbarkeit der Herzklappe ermöglichen soll (13). Bei einer dreischichtig aufgebauten Herzklappe, bestehend aus 1. *Fibrosa* mit Kollagenfasern, 2. *Spongiosa* mit Glykosaminoglykanen und 3. *Ventricularis* mit Elastinfasern, werden durch die Dezellularisierung die Endothelzellen

(*Valvular endothelial cells*, VECs) und die unterschiedlichen interstitiellen Zellen entfernt (25, 26). Diese heterogenen *Valvular interstitial cells* (VICs) weisen Eigenschaften von Fibroblasten und glatten Muskelzellen auf und spielen bei der Pathogenese der degenerativen Aortenklappenstenose eine wichtige Rolle. Unter dem Einfluss von Immunzellen können sie sich zu Myofibroblasten und Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren. Dadurch wird überschüssige EZM gebildet und es kommt zu einer progressiven Verkalkung (27, 28).

Es gibt unterschiedliche Verfahren der Dezellularisierung. Als wichtige Beispiele sind das Detergens-basierte Dezellularisierungsprotokoll (DET) und das biologische Dezellularisierungsprotokoll (BIO) zu nennen (29). Während das DET-Verfahren Zellmembranen, damit assoziierte Proteine und Nukleinsäuren effektiv entfernt, kann es mit der Gefahr der übermäßigen Zerstörung der EZM einhergehen. Das BIO-Protokoll ist schonender, eine komplette Dezellularisierung kann damit jedoch nicht gewährleistet werden (29). Für die Herstellung von DHP für die klinische Anwendung wie z. B. in der ARISE- und der ESPOIR-Studie (19, 20) hat sich ein Detergens-basiertes Dezellularisierungsprotokoll etabliert (30), welches leicht abgewandelt auch für diese Forschungsarbeit verwendet wird. Dieses enthält mehrere Schritte, in denen zunächst die Lyse der Zellen mithilfe von Detergenzien erfolgt. Anschließend werden die Herzklappen mehrfach gewaschen, um restliche Chemikalien und Zellreste zu entfernen (30). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass nach Anwendung dieses Protokolls eine zellfreie, keine bis kaum DNA enthaltende Herzklappe mit erhaltener EZM-Struktur resultiert. Auch die für eine Wiederbesiedlung mit Endothelzellen wichtige Basalmembran bleibt bestehen (14, 30, 31).

1.4 Rolle des Immunsystems

1.4.1 Reaktion des Immunsystems auf biologische Herzklappenprothesen

Trotz der oben beschriebenen vielversprechenden Ansätze des *Tissue Engineering* kann es dennoch zu einem Verschleiß der TEHV kommen. Es werden deshalb zunächst die biologischen Herzklappenprothesen betrachtet, um die Grundzüge ihrer Degeneration zu verstehen und diese auf die für dieses Forschungsprojekt interessanten DHP anwenden zu können. Hierbei kommt es, wie oben beschrieben, zu einer im Vergleich zum nativen Gewebe beschleunigten Degeneration. Dabei spielen sowohl

chemische und mechanische als auch immunologische Faktoren eine Rolle (9), (Abb. 2).

Zum einen werden vor allem die *xenogenen* biologischen Herzklappen chemisch mithilfe von Glutaraldehyd fixiert. Somit erhöht sich durch eine Kollagen-Quervernetzung zwar ihre Stabilität, ein *Remodeling* ist jedoch aufgrund des resultierenden Vitalitätsverlusts der EZM-bildenden VICs nicht mehr möglich. Zum anderen haben die fixierten Prothesen eine starre Struktur und degenerieren schneller unter mechanischer Belastung (9, 32). Darüber hinaus verlieren die avitalen VICs die Fähigkeit zur energieabhängigen Eliminierung von Calcium aus dem Zellinneren, wodurch eine von ihnen ausgehende Kalzifizierung begünstigt wird (33). Kryokonservierte Prothesen enthalten zwar noch vitale Zellen, diese stellen dann aber aus immunologischer Sicht ein Problem dar (34).

Betrachtet man die Antwort des angeborenen und des erworbenen Immunsystems auf biologische Herzklappenprothesen, so lassen sich einige wichtige Phasen unterscheiden (Abb. 2): Innerhalb der ersten Stunden nach Implantation lagern sich Blutproteine und Thrombozyten an die Oberfläche der Prothese an (13). In diesem Stadium kann es zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion kommen. Diese entsteht durch im Blut vorhandene präformierte Antikörper gegen fremde Antigene, wie z. B. die bereits oben erwähnte alpha-Galactose oder den *Major histocompatibility complex* (MHC)-Zelloberflächenmarker (13, 35). Bei der alpha-Galactose handelt es sich um ein Kohlenhydrat, das vor allem in Zellmembranen, aber auch an extrazellulären Proteinen und Lipiden zu finden ist. Es kommt in allen Säugetieren vor, jedoch nicht beim Menschen oder anderen Primaten (36). Der MHC-Komplex der Klasse I unterscheidet sich aufgrund seiner hohen genetischen Variabilität nicht nur zwischen den Spezies, sondern variiert auch innerhalb derselben Spezies (37). Deshalb ist eine hyperakute Abstoßung sowohl bei *Xeno*- als auch bei *Homografts* denkbar. In einem Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen wandern dann zunächst Neutrophile Granulozyten und später Monozyten zum Implantat. Der Phänotyp der sich aus diesen Monozyten entwickelnden Makrophagen bestimmt über das langfristige Schicksal des Implantats (13). In diesem Zeitfenster werden auch Zellen des adaptiven Immunsystems aktiv. T-Zellen können hierbei die fremden MHC-Antigene erkennen und eine akute Abstoßungsreaktion auslösen (35). Langfristig kann durch Präsentation verschiedener fremder Peptide über MHC-Klasse-II-Proteine auf Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen (APC) eine chronische Inflammation aufrechterhalten werden (35). Auch eine durch proinflammatorische Makrophagen vorangetriebene *Foreign body rejection* mit zunehmender Fibrosierung ist möglich (13).

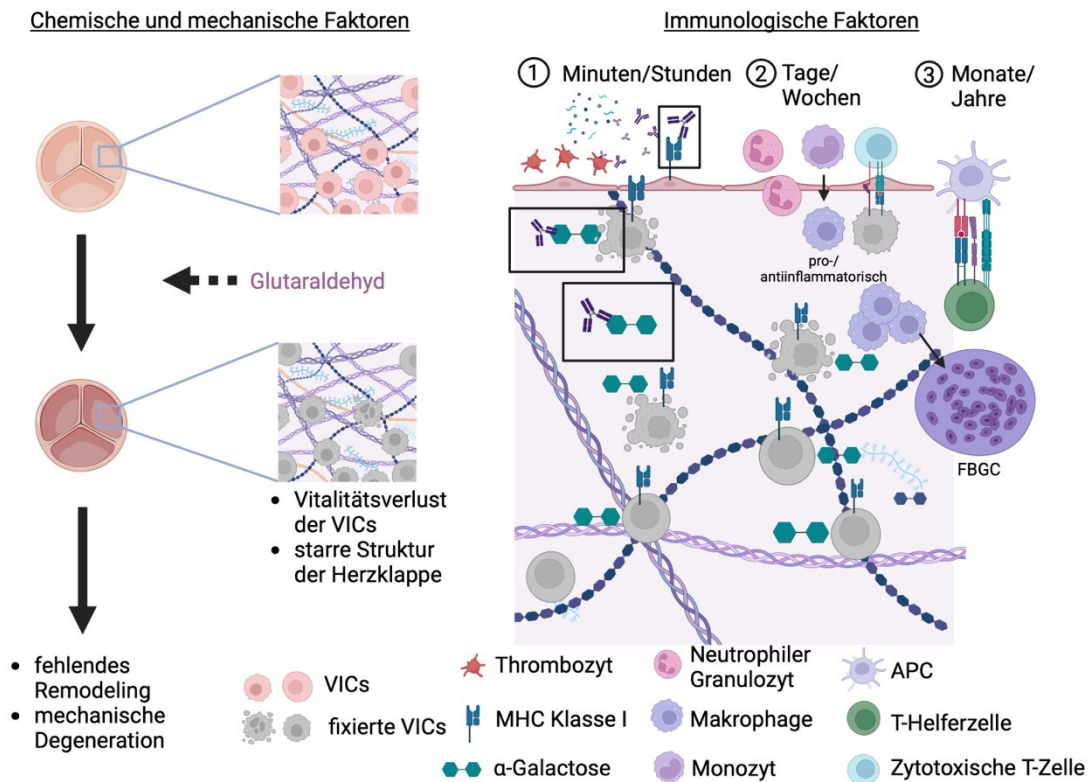


Abb. 2: Degeneration konventioneller biologischer Herzklappenprothesen

Durch die Glutaraldehyd-Fixierung verlieren die Valvular interstitial cells (VICs) die Fähigkeit zur Regeneration der extrazellulären Matrix. Zudem wird die Herzklappe insgesamt starrer und degeneriert somit schneller. Zusätzlich sind immunologische Faktoren relevant. Während sich innerhalb der ersten Minuten bis Stunden Proteine und u. a. auch präformierte Antikörper an die Prothese anlagern können (1), sind im Zeitraum von Tagen bis Wochen nach Implantation vor allem Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und zytotoxische T-Zellen an der Immunantwort beteiligt (2). Die langfristige Immunreaktion wird durch zu Foreign-body giant cells (FBGCs) fusionierenden proinflammatorischen Makrophagen und durch T-Helferzellen getragen, welche auf die fremden Antigene reagieren können (3). APC: Antigen-presenting cell, FBGC: Foreign body giant cell, MHC: Major histocompatibility complex. Erstellt in Biorender.com

Aus diesen Gründen entstand der Ansatz einer Dezellularisierung der Herzklappen. Zum einen ist hierbei keine Fixierung mittels Glutaraldehyd üblich (38, 39), wodurch die mechanischen und chemischen Faktoren der Herzklappenprothesen-Degeneration entfallen. Zum anderen werden alle Zellen aus dem Implantat entfernt. Dadurch verschwinden auch die MHC-Klasse-I-Zelloberflächenproteine, andere zelluläre Antigene und der membrangebundene Anteil der alpha-Galactose. Ob durch die Dezellularisierung auch die in der EZM vorhandene alpha-Galactose in ihrer Menge reduziert werden kann, ist in der Literatur umstritten (35, 36, 40). Die Entfernung der Zellen hat somit zur Folge, dass das Risiko einer hyperakuten Abstoßung durch präformierte Antikörper und auch die Wahrscheinlichkeit einer akuten Rejektion durch zytotoxische T-Zellen minimiert wird. Auch die langfristige Präsentation fremder

Antigene sollte vermindert sein. Die einzige Komponente der Immunantwort, die nicht direkt durch die Dezellularisierung beeinflusst werden kann, ist somit das angeborene Immunsystem. Dieses spielt daher eine Schlüsselrolle in der immunvermittelten Degeneration von TEHV und es ist besonders wichtig, die zugrundeliegenden Prozesse zu verstehen.

1.4.2 Konstruktives und maladaptives *Remodeling* als Reaktion auf TEHV

Es ist individuell unterschiedlich, ob die TEHV und andere Bioimplantate gut in den Organismus integriert werden oder ob es zu einer Immunreaktion mit langfristiger Degeneration kommt (13). Es ist bekannt, dass die Art der Immunantwort stark das bereits oben erwähnte *Remodeling* des Implantats beeinflusst (21). Dieser Prozess kann entweder konstruktiv mit guter Integration und Produktion neuer extrazellulärer Matrix (EZM) oder maladaptiv mit zunehmender Fibrosierung ablaufen (13), (Abb. 3). Während, wie oben beschrieben, das erworbene Immunsystem bei der Erkennung von fremden Antigenen relevant ist, ist das angeborene Immunsystem der Haupteffektor des langfristigen *Remodeling*. Letzteres wird maßgeblich durch den Phänotyp der einwandernden Makrophagen beeinflusst (13).

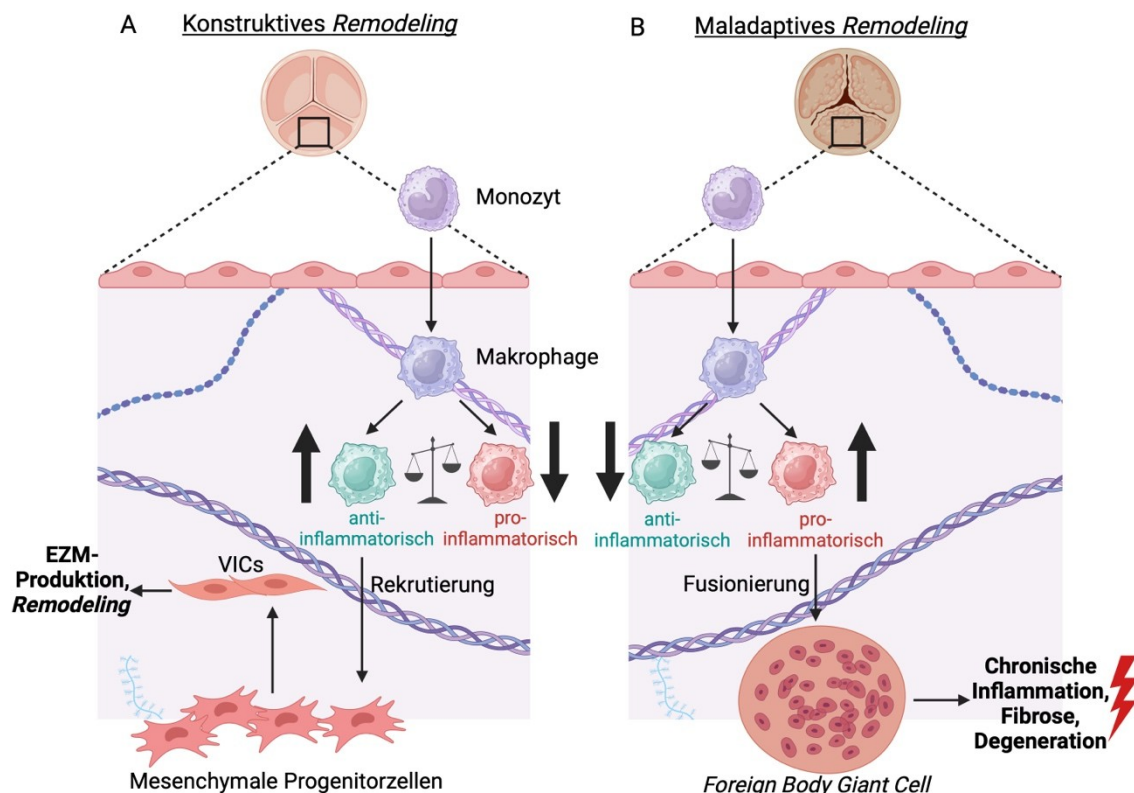


Abb. 3: Konstruktives und maladaptives *Remodeling*

Nach Implantation der Herzklappenprothese wandern Monozyten aus dem Blut in das Gewebe ein und werden zu Makrophagen. Bei einem konstruktiven Verlauf überwiegt die Polarisierung zu

antiinflammatorischen Makrophagen, welche dann mesenchymale Progenitorzellen rekrutieren. Diese differenzieren sich zu Valvular interstitial cells (VICs) und produzieren extrazelluläre Matrix (A). Beim maladaptiven Remodeling dominieren proinflammatorische Makrophagen. Sie können zu Foreign Body Giant Cells fusionieren, die eine chronische Inflammation und eine Degeneration der Herzklappe fördern (B). EZM: Extrazelluläre Matrix. Erstellt in Biorender.com

Bei einem günstigen, konstruktiven Verlauf nimmt die zu Beginn überwiegende proinflammatorische Antwort später zugunsten einer antiinflammatorischen Reaktion ab (13). Antiinflammatorische Makrophagen rekrutieren mesenchymale Progenitorzellen, die sich dann zu VICs weiterentwickeln und neue EZM produzieren. Somit wird die Herzklappe kontrolliert umgebaut und mit der Zeit durch körpereigenes Gewebe ersetzt (13, 41). Auch kommt es zu einer Re-Endothelialisierung (3). Die bei einem negativen Verlauf mit maladaptivem *Remodeling* persistierenden proinflammatorischen Makrophagen fusionieren zu *Foreign Body Giant Cells* (FBGCs), welche proinflammatorische Zytokine und EZM-degradierende Substanzen freisetzen. Dies bewirkt eine chronische Entzündung mit unkontrollierter EZM-Produktion, Fibrosierung und folglich Degeneration der Herzklappe (3, 13).

Da jedoch nicht nur Makrophagen zum angeborenen Immunsystem gehören, stellt sich die Frage, welche weiteren Komponenten relevant sein könnten. Zudem befinden sich in direkter Nachbarschaft zu einer implantierten Aortenklappenprothese noch weitere Zellen in der Aortenwand: Endothelzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten, Immunzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen (engl. *Vascular smooth muscle cells*, VSMCs) (42). Der Schwerpunkt dieses Projekts liegt bei den glatten Muskelzellen. Im folgenden Kapitel wird erläutert, warum auch sie eine wichtige Rolle im langfristigen *Remodeling* und Outcome von TEHV spielen könnten.

1.5 Vaskuläre glatte Muskelzellen und ihre Bedeutung

Ein anderer möglicher Ansatz, um die Degeneration von Herzklappenprothesen zu erklären, ist die Fokussierung auf die Rolle der vaskulären glatten Muskelzellen. VSMCs liegen in der Media der Aortenwand (42) und somit in enger Nachbarschaft zur Aortenklappe. Im *in vivo*-Schafsmodell konnte gezeigt werden, dass bei TEHV zunächst nur in Aortenwand-nahen Anteilen eingewanderte Zellen, darunter auch glatte Muskelzellen, zu finden sind, die erst später auch wandferne Anteile der Herzklappe besiedeln (43). Folglich findet die Rezellularisierung durch Einwandern aortaler Zellen statt, welche dann mit der implantierten Prothese interagieren können (Abb. 4).

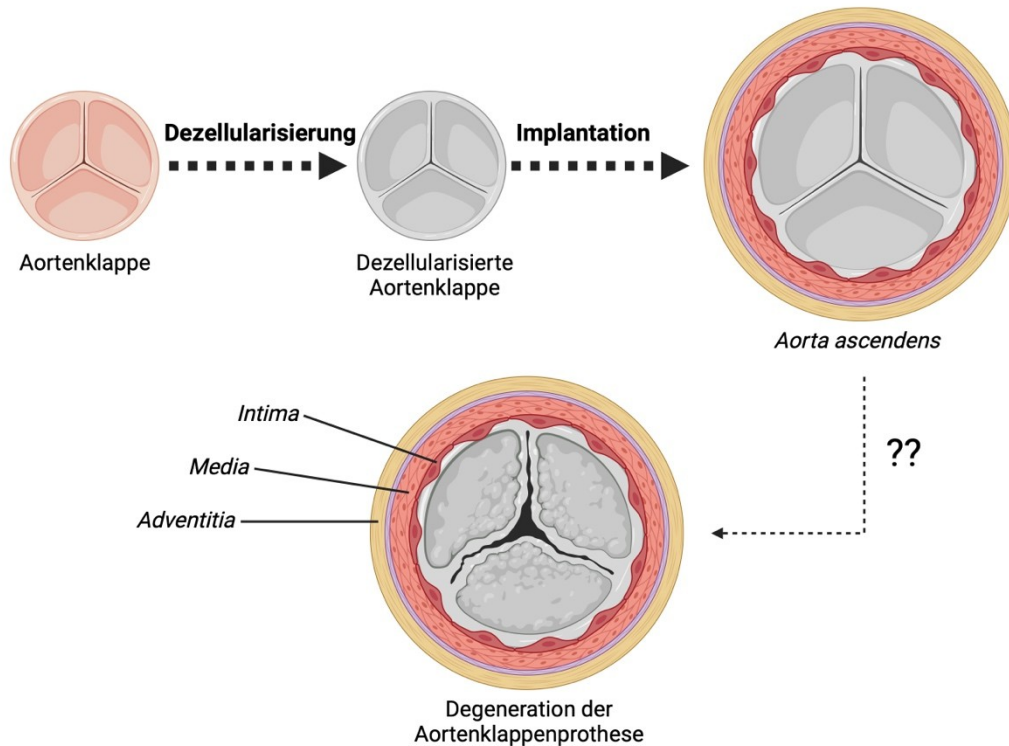


Abb. 4: Interaktion zwischen VSMCs und Aortenklappenprothese

Aortenklappenprothesen werden orthotop in die Aortenwurzel implantiert. Somit haben sie direkten Kontakt zu der Aortenwand mit den in ihr enthaltenen Zellen, wobei es sich bei den VSMCs (Vascular smooth muscle cells) um die größte Zellpopulation handelt. Diese Zellen könnten somit in die Herzklappe einwandern und über bisher nicht vollständig verstandene Mechanismen an der Prothesendegeneration beteiligt sein. Erstellt in Biorender.com

Zusätzlich sind VSMCs sehr plastische Zellen und haben die Fähigkeit, unter unterschiedlichen Bedingungen ihren Phänotyp zu ändern (Abb. 5). Dabei können sie unter anderem auch zu Makrophagen-ähnlichen Zellen werden (44). Somit wäre ihre Beteiligung an dem oben beschriebenen *Remodeling* denkbar. Es ist zudem bekannt, dass glatten Muskelzellen eine zentrale Bedeutung bei der Pathogenese der Atherosklerose zukommt (44). Da es hierbei Parallelen zum Pathomechanismus der kalzifizierenden Aortenklappenstenose gibt (45), lohnt es sich, näher auf diese Zellen einzugehen. Es wäre denkbar, dass sie auch auf diesem Wege bei der Degeneration implantierter Herzklappen eine relevante Bedeutung haben könnten.

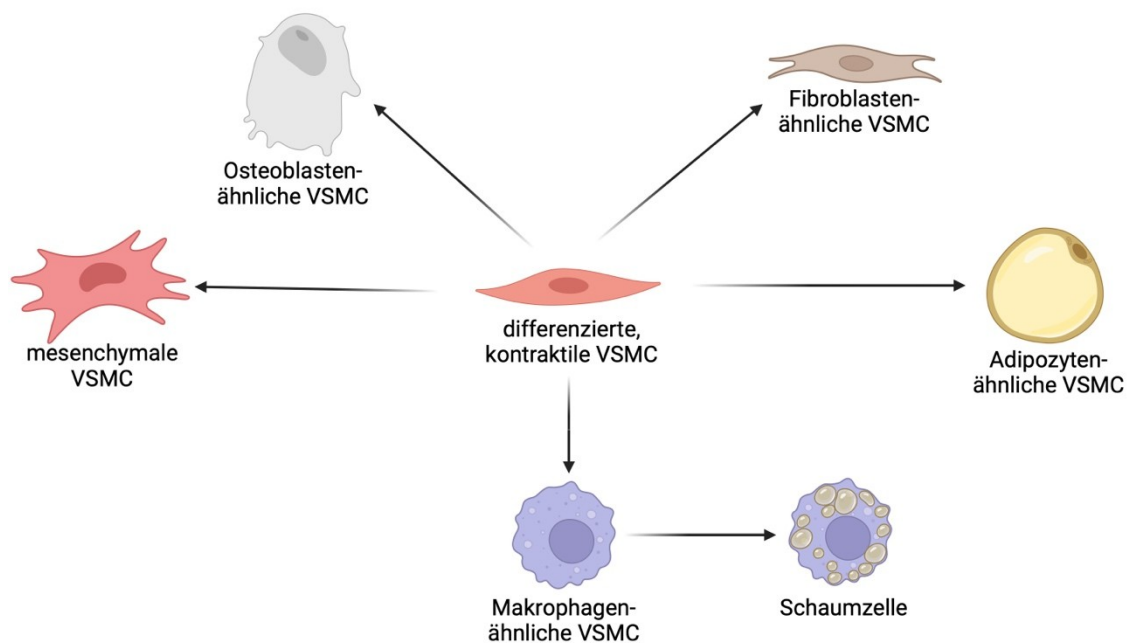


Abb. 5: VSMC-Plastizität

Bei den vaskulären glatten Muskelzellen handelt es sich um sehr plastische Zellen, die ihren Phänotyp abhängig von Umweltbedingungen und Stimuli reversibel ändern können. Dieser Phänotypswitch ist vor allem im Rahmen der Atherosklerose gut erforscht. Hier spielen Osteoblasten-, Fibroblasten-, Makrophagen-ähnliche VSMCs und Schaumzellen eine tragende Rolle für die Pathogenese der Erkrankung. Zusätzlich können VSMCs auch Eigenschaften von Adipozyten und von mesenchymalen Zellen erwerben. VSMC: Vascular smooth muscle cell. Erstellt in Biorender.com

1.5.1 Phänotypen glatter Muskelzellen und ihre Marker

Vaskuläre glatte Muskelzellen können abhängig von ihren Umweltbedingungen die Expression ihrer Marker und Proteine regulieren und somit unterschiedliche Phänotypen annehmen (44). Zu nennen sind hierbei differenzierte kontraktile VSMCs sowie de-differenzierte Makrophagen-, Osteoblasten-, Fibroblasten-, Adipozyten-ähnliche und mesenchymale VSMCs (44, 46, 47). Der physiologisch in Gefäßwänden vorkommende ausdifferenzierte kontraktile Phänotyp ermöglicht die Regulation des vaskulären Widerstands und des Blutdrucks (47). Wichtige Marker sind u.a. *Smooth Muscle α -Actin* (ACTA2), *SM-22 α /Transgelin* (TAGLN) und *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain 11* (MYH11) (44, 47, 48). Bei einem Phänotyp-Wechsel kommt es zu einer Herunterregulierung dieser kontraktilen Marker (48).

Die De-Differenzierung von VSMCs zu anderen Zelltypen geht nicht nur mit einem Verlust von Markern, sondern auch mit dem Erwerb zusätzlicher Kennzeichen einher.

Unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF- α entstehen Makrophagen-ähnliche VSMCs, die eine ineffektive Phagozytose betreiben, sowie Zytokine, Chemokine und Matrix-Metalloproteinasen freisetzen (44). Weitere Stimuli wie *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), zu denen das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) gehört, oder oxidiertes LDL können ebenfalls einen solchen Phänotyp begünstigen (44, 49). Darüber hinaus wichtig zu erwähnen sind *Osteoblast-like* VSMCs. Diese Zellen sind assoziiert mit Kalzifikation in atherosklerotischen Läsionen und zeichnen sich durch eine Produktion von Proteinen wie BMP2 und den Transkriptionsfaktoren Sox-9, Runx-2 und Msx-2 aus (44, 50, 51). Da vor allem den *Osteoblast-like* und *Macrophage-like* VSMCs eine große Bedeutung bei der Pathogenese der Atherosklerose zugesprochen wird (44, 47) und es Parallelen zwischen der Atherosklerose und der Aortenklappenstenose gibt (45, 52), wurde vorwiegend auf diese zwei Phänotypen eingegangen.

Aufgrund der erwähnten Parallelen in der Pathogenese wird im folgenden Kapitel kurz auf die Atherosklerose eingegangen.

1.5.2 Exkurs: Glatte Muskelzellen und Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der arteriellen Gefäße, welche mit einer Ablagerung von Lipiden in der Wand und einer Einengung des Lumens einhergeht. Durch die schlechtere Durchblutung der betroffenen Organe entstehen Folgeerkrankungen (z. B. Koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit) und deren Komplikationen, weshalb die atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Todesursache weltweit darstellen (47, 53).

Die Erkrankung beginnt mit einer endothelialen Dysfunktion, wobei das Endothel mithilfe von Zelladhäsionsmolekülen und Zytokinen Immunzellen rekrutiert. Die entstehende proinflammatorische Umgebung bewegt die glatten Muskelzellen in der Arterien-*Media* zur Migration in die *Intima* und einer Entwicklung zu Makrophagen-ähnlichen VSMCs, welche oxidiertes LDL-Cholesterin aufnehmen und dadurch zu Schaumzellen werden. Diese akkumulieren in der Gefäßwand und tragen zur Plaque-Bildung bei. Zudem wird durch die Makrophagen-ähnlichen VSMCs eine chronische Inflammation aufrechterhalten. Weitere in die atherosklerotische Läsion einwandernde glatte Muskelzellen verändern sich zu Fibroblasten und bilden überschüssige EZM. Zusätzlich

sorgen zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen transformierte VSMCs für eine progressive Verkalkung des Gefäßes (44). Tritt im Verlauf der Erkrankung eine Plaque-Ruptur mit folgender Thrombosierung des Gefäßlumens auf, kann es je nach Lokalisation zu ernstzunehmenden Folgen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall kommen (53).

1.5.3 Glatte Muskelzellen und Aortenklappensklerose

Es gibt Hinweise darauf, dass bei der Aortenklappensklerose, also dem Vorläufer der Aortenklappenstenose, vor allem im Frühstadium ähnliche Prozesse wie bei der Atherosklerose ablaufen und die Risikofaktoren sich ebenfalls überschneiden (45, 52, 54). Es kommt auch hier zur Intimaläsion, Akkumulation von Lipiden, chronischer Entzündung, Fibrose und Kalzifikation (54). Die VICs könnten hierbei eine zentrale Rolle spielen (52). In gesunden Herzklappen sind nur wenige glatte Muskelzellen in der *Ventricularis* enthalten. Bei der Mehrheit der VICs handelt es sich hier um Fibroblasten-ähnliche Zellen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass VICs in der Nähe von Verkalkungsherden in kalzifizierten Herzklappen vermehrt SMC-Marker exprimieren. Zudem konnten Schaumzellen von SMC-Ursprung in den Läsionen nachgewiesen werden. Während es bei der Atherosklerose auch zu einer De-Differenzierung der SMCs zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen kommt, ist bei der Aortenklappensklerose v.a. der *Osteoblast-like* SMC-Phänotyp zusätzlich relevant (45). Darüber hinaus sind auch in explantierten biologischen Herzklappenprothesen Lipidablagerungen und Schaumzellen zu finden (55). Es liegt daher nahe, dass SMCs auch in die Degeneration des Herzklappenersatzes involviert sein könnten.

1.6 Ziele der Arbeit

DHP könnten in Zukunft eine sehr gute Alternative zu konventionellen Herzklappenprothesen darstellen (3). Um sie jedoch sicher in Patienten anwenden zu können und ihre Langlebigkeit zu verbessern, ist es wichtig, mehr Forschung auf diesem Gebiet zu betreiben. Angesichts der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Hintergründe und des trotz Dezellularisierung in manchen Fällen auftretenden Implantat-Versagens verbleiben viele offene Fragen (3, 19, 21). Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Fragestellung, inwiefern Zellen des angeborenen Immunsystems sowie auch weitere Zellen in die Degeneration von DHP involviert sind. Übergeordnetes langfristiges Ziel war es, diese Zellen als mögliche therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, um eine maladaptive Reaktion auf dEZM zukünftig zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Rolle der vaskulären glatten Muskelzellen gelegt. Da sie eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der Atherosklerose und auch der Aortenklappenstenose haben (44, 52), sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese Zellen im Zusammenhang mit der DHP-Degeneration relevant sind. Konkret sollte erforscht werden, ob die VSMCs auf dEZM reagieren und inwieweit sie dabei ihren Phänotyp wechseln. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die Phänotypen kontraktile, Osteoblasten- und Makrophagen-ähnlich gelegt, da insbesondere die zwei Letztgenannten auch in der Atherosklerose und der Aortenklappensklerose bedeutsam sind (44, 45, 47).

Es wurde angenommen, dass die glatten Muskelzellen über ähnliche Prozesse bei der Degradation der DHP mitwirken. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden aus Rattenaorten isolierte VSMCs für 48 Stunden in Gegenwart von aus Schafsherzen stammenden dezellularisierten Aortenklappenbiopsien kultiviert. Für die anschließende Analyse wurden unterschiedliche Methoden wie RT-PCR, Multiplex-*Immunoassay* und Mikroskopie angewendet. Als Polarisierungskontrollen dienten mit LPS bzw. IL-4 stimulierte Zellen (Abb. 6). Während LPS die Umwandlung zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp fördert (49), bewirkt IL-4 die VSMC-Proliferation und induziert so den synthetischen, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp (56). In der Literatur wurde die Interaktion zwischen vaskulären glatten Muskelzellen und DHP bisher nicht untersucht.

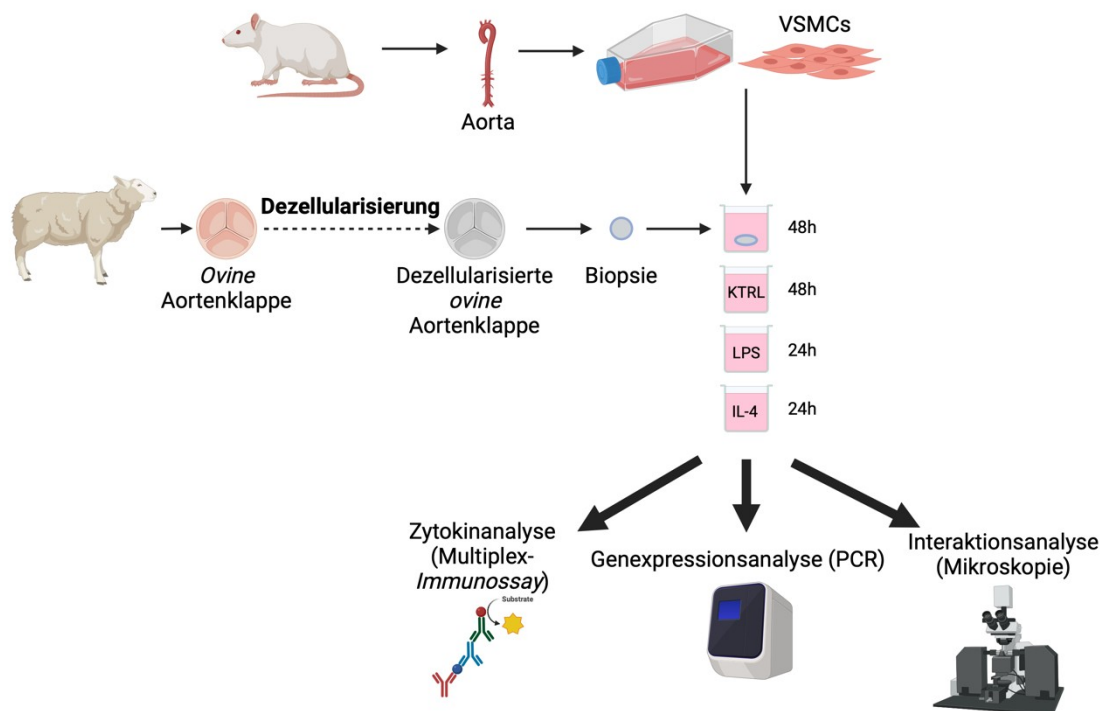


Abb. 6: Projektplan

Aus Rattenaorten isolierte VSMCs wurden jeweils 1. mit dezellularisierten Aortenklappenbiopsien vom Schaf, 2. als Kontrollen in normalem Kulturmedium, 3. in LPS- oder 4. in IL-4-Aktivierungsmedium für 48 Stunden (1. und 2.) bzw. für 24 Stunden (3. und 4.) inkubiert. Anschließend wurden die in den Überständen enthaltenen Zytokine per Multiplex-Assay gemessen. Die Zellen wurden zudem lysiert und für eine PCR-Analyse verwendet. Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen VSMCs und dezellularisierter extrazellulärer Matrix mikroskopisch untersucht. KTRL: Kontrolle, PCR: Polymerase chain reaction, VSMCs: Vascular smooth muscle cells. Erstellt in Biorender.com

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere und Organe

Für die Isolation der VSMCs wurden Aorten aus männlichen Wistar-Ratten aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf entnommen. Für die Organentnahme lag eine Genehmigung der ZETT mit dem Aktenzeichen O 89/12 (Antragsteller: Payam Akhyari, Datum der Zustimmung: 08.11.2012) vor. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme zwischen 5 und 12 Wochen alt.

Für die Isolation der Aortenklappen wurden Schafsherzen beim Schlachthof Laame GmbH & Co. KG (Wuppertal) erworben.

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller, Ort	Referenznummer
0,25 % Trypsin - EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	25200056
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)	Merck KGaA, Darmstadt	32670-5MG-F
Amphotericin B 250 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	15290026
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe	1088811
Chromasolv® Ethanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt	34852-1L
CV Ultra Eindeckmedium	Leica Biosystems, Wetzlar	14070937891
Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken	18880
Desoxyribonuclease I aus Rinderpankreas 10 mg/ml Stock	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	D5025
Dithiothreitol (DTT) 154,25 g/mol	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	R0862
DMEM 4,5 g/l Glucose	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	31966047

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	14190169
ECOLAB Incidin® Liquid	Ecolab, Langenfeld	141978
Ethanol 70 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken	27667
Ethanol 80 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken	27696
Flüssiger Stickstoff	Linde plc, Dublin	
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	F7524
Fraction V (BSA)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe	8076.3
Iodlösung	Honeywell International Inc., Morristown (USA)	319007
Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O111:B4	Merck KGaA, Darmstadt	L4391-1MG
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe	K305.2
Natriumdesoxycholat (DCA)	Merck KGaA, Darmstadt	D6750-500G
Natriumdithionit (Sodium hydroxysulfite 85 %)	Merck KGaA, Darmstadt	157953-1KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe	CN30.4
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe	6771.3
Nuclease-free water	Qiagen, Venlo (NL)	129114
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	15140122
Phosphate Buffered Saline (PBS), eigene Herstellung		
Recombinant Rat IL-4	BioLegend, San Diego (USA)	776902
RNase AWAY®	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe	A998.3
ROTI® Histofix	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe	2213.5
Trypan-Blue	VWR International, Radnor (USA)	K940-100ML

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen

2.1.3 Stock- und Arbeitslösungen

Zellkultur-Lösungen:

Medium (10 % FCS, 1 % P/S, 1 % Amp. B)	
Lösung	Volumen
DMEM 4,5 g/l Glucose	500 ml
Fötale Kälberserum	50 ml
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml	5 ml
Amphotericin B 250 µg/ml	5 ml

Tabelle 2: Amphotericin-B-haltiges Zellkulturmedium

Medium (10 % FCS, 1 % P/S)	
Lösung	Volumen
DMEM 4,5 g/l Glucose	500 ml
Fötale Kälberserum	50 ml
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml	5 ml

Tabelle 3: Zellkulturmedium ohne Amphotericin B

DPBS (1 % P/S, 1 % Amp. B)	
Lösung	Volumen
DPBS	500 ml
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml	5 ml
Amphotericin B 250 µg/ml	5 ml

Tabelle 4: Spüllösung für die Zellkultur

Dezellularisierungslösungen:

DPBS (2 % P/S, 1 % Amp. B)	
Bestandteil	Volumen
DPBS	500 ml
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml	10 ml
Amphotericin B 250 µg/ml	5 ml

Tabelle 5: Spüllösung für die Dezellularisierung

10X DET (5 % SDS, 5 % DCA)	
Bestandteil	Volumen/Masse
Natriumdodecylsulfat (SDS)	50 g
Natriumdesoxycholat (DCA)	50 g
Ampuwa® Spüllösung (hiermit auf 1 l auffüllen)	ca. 1000 ml

Tabelle 6: 10X Stocklösung für die Dezellularisierung

1X DET (0,5 % SDS, 0,5 % DCA, 0,05 % NaN3)	
Bestandteil	Volumen/Masse
10X DET	100 ml
Natriumazid	0,5 g
Ampuwa® Spüllösung (hiermit auf 1 l auffüllen)	ca. 900 ml

Tabelle 7: 1X Arbeitslösung für die Dezellularisierung

0,05 % Natriumazid-Lösung	
Bestandteil	Volumen/Masse
Natriumazid	0,05 g
Ampuwa® Spüllösung	100 ml

Tabelle 8: Natriumazid-Lösung

DAPI-Verdünnung:

Lösung A (1. Vorverdünnung 1:500)	
Lösung	Volumen
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)	1 µl
PBS	500 µl

Tabelle 9: DAPI-Vorverdünnung

Lösung B (Arbeitslösung, 2. Verdünnung 1:50 000)	
Lösung	Volumen
Lösung A	10 µl
PBS	990 µl

Tabelle 10: DAPI-Arbeitslösung

Zellkultur-Experiment:

LPS-Aktivierungsmedium 100 ng/ml	
Bestandteil	Volumen
Medium (10 % FCS, 1 % P/S)	10 ml
Lipopolysaccharid-Stocklösung 1 mg/ml	1 µl

Tabelle 11: LPS-Aktivierungsmedium

IL-4-Aktivierungsmedium 20 ng/ml	
Bestandteil	Volumen
Medium (10 % FCS, 1 % P/S)	5 ml
IL-4-Stocklösung 100 µg/ml	1 µl

Tabelle 12: IL-4-Aktivierungsmedium

RNA-Isolation:

Zellysepuffer	
Bestandteil	Volumen
RLT-Puffer (aus RNeasy® Micro Kit)	9,8 ml
Dithiothreitol (DTT) Stocklösung	200 µl

Tabelle 13: Zellysepuffer

PCR:

PCR-Mastermix	
Bestandteil	Volumen (pro Well)
GoTaq-Arbeitslösung	10 µl
Nuclease-free water	7,4 µl
<i>Forward-Primer-Arbeitslösung</i>	0,3 µl
<i>Reverse-Primer-Arbeitslösung</i>	0,3 µl

Tabelle 14: PCR-Mastermix

ALP-Assay:

NaOH-Stopplösung	
Bestandteil	Volumen/Masse
Natriumhydroxid	8 g
Demi-Wasser	100 ml

Tabelle 15: Natriumhydroxid-Stopplösung

Diethanolamin (1X)	
Bestandteil	Volumen/Masse
Diethanolamin-Substrat-Puffer (5X)	20 ml
Demi-Wasser	80 ml

Tabelle 16: 1X-Diethanolamin-Lösung

2.1.4 Kits und Assays

Produkt	Hersteller, Ort	Referenznummer
GoTaq®qPCR System	Promega, Fitchburg (USA)	A6002
LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit, Rat Inflammation Panel	BioLegend®, San Diego (USA)	41395
Phosphatase Substrate Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	37620
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Venlo (NL)	51306

QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Venlo (NL)	205313
RNeasy® Micro Kit	Qiagen, Venlo (NL)	74004

Tabelle 17: Kits und Assays

2.1.5 Primer

Gen	Forward-Primer-Sequenz (5')	Reverse-Primer-Sequenz (3')	Hersteller, Ort
<i>ACTA2</i>	GCTCTGGTGTGTGACAAT GG	CCCCACATAGCTGTCCTT TT	Invitrogen AG, Carlsbad (USA)
<i>BMP2</i>	GCTCAGCTTCCATCACGA A	AAGAAGCGTCGGGAAGTT TT	Invitrogen AG, Carlsbad (USA)
<i>CCL2</i>	CTGTAGCATCCACGTGCT GT	GGTGCTGAAGTCCTTAGG GT	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<i>CXCL1</i>	AGACAGTGGCAGGGATTC AC	CGCGACCATTCTTGAGTG T	Eurofins Genomics, Luxemburg
<i>MYH1 1</i>	AACCTGAGGGAGCGGTA CTT	AGGTGCTTGTAGGGGTTG AC	Eurofins Genomics, Luxemburg
<i>NFKB1</i>	CCACTGTCAACAGATGGC CC	GCACACGTAGCGGAATCG AA	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<i>RPL13 A</i>	GAAAGGTGGTGGTTGTAC GC	GAGACGGGTTGGTGTTC TC	Eurofins Genomics, Luxemburg
<i>TAGL N</i>	CGGCTAGTGGAGTGGATT GT	CTGTTACCAACTTGCTCA GA	Eurofins Genomics, Luxemburg
<i>VCAM 1</i>	TGGGAAACTGGAAAGAG GAA	CAGGAGCCAAACACTTGA CC	Invitrogen AG, Carlsbad (USA)

Tabelle 18: PCR-Primer

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller, Ort	Referenznummer
Autoklavier-Indikatorband	neo Lab®, Heidelberg	27012
CELLSTAR® 6-Well Plate	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	657160
CELLSTAR® Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	188271-N
CELLSTAR® Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	210261
CELLSTAR® Tissue Culture Plates 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	655180
CELLSTAR® Zellkultur-Schale 100/20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	664160
CELLSTAR® Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	658175
CELLSTAR® Zellkulturflasche, 50 ml, 25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	690175
CELLSTAR® Zellkulturflasche, 550 ml, 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	660175

CLEAR-LOCK Microtubes ClearLine® 1,5 ml	Biosigma S.r.l., Cona (IT)	CL15.004.0050S
CLEAR-LOCK Microtubes ClearLine® 2,0 ml	Biosigma S.r.l., Cona (IT)	CL20.004.0050S
Collection Tubes 2 ml	Qiagen, Venlo (NL)	19201
Costar® 10 ml Stripette®	Corning Incorporated, Corning (USA)	CLS4488
Costar® 25 ml Stripette®	Corning Incorporated, Corning (USA)	CLS4489
Costar® 5 ml Stripette®	Corning Incorporated, Corning (USA)	CLS4487
Cryotube ClearLine® 2 ml	Biosigma S.r.l., Cona (IT)	CL2ARBEPSTS/B
Cryovials 2 ml	Simport Scientific Inc., Saint-Mathieu-de-Beloil (CA)	T311-2
DAKO-Pen	DAKO Denmark A/S, Glostrup (DK)	S2002
Deckgläser 18 x 18 mm	Menzel-Gläser®, Braunschweig	624284
Deckgläser 24 x 50 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde	k12450
Dermagrip® Nitrile Examination Gloves Ultra	REMESCO Handelsges.m.b.H, Wien (A)	D1501-18
Disposable Biopsy Punch 5 mm	Kai Industries Co. Ltd., Gifu (JPN)	48501
EASYstrainer™ Cell Sieves, 100 µm	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (A)	542000
Entsorgungsbeutel 200 x 300 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	E706.1
Glass Pasteur Pipettes 225 mm	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim	747720
Glass Pasteur Pipettes 225 mm	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim	747715
Histology tissue molds PVC 17 x 17 x 5 mm	Medite GmbH, Burgdorf	48-6302-00
IceGrip® Handschuhe	KCL GmbH, Eichenzell	691
MicroAmp™ Fast Optical 96 Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	4346906
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	4311971
Objektträger mit Vertiefung	Bresser, Rhede	5916600
Objektträger ohne Vertiefung	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	810000
Patientenunterlagen 40 x 60 cm	Teqler, Wecker (LUX)	T-130666
PCR tubes 0,2 ml	Sorenson™ Bioscience Inc., Salt Lake City (USA)	16950
Petrischale 35 x 10 mm	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht	833.900
QIAshredder®	Qiagen, Venlo (NL)	79656
Raucodrope® OP-Abdecksystem 50 x 50 cm	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf	33010
SafeSeal SurPhob® Spitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	VT0210
SafeSeal SurPhob® Spitzen 1250 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	VT0270
SafeSeal SurPhob® Spitzen 20 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	VT0220
SafeSeal SurPhob® Spitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	VT0280
SafeSeal tube 1,5 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht	72.706
Safeshield™-Einmalskalpell Nr. 10	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka (JPN)	02.001.40.010
Sekuroka® Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	0384.1

Sterican® 0,5 x 25 mm, 25 G x 1	B. Braun SE, Melsungen	9186158
SuperFrost™ Plus Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	Langenbrinck GmbH Labor- und Medizintechnik, Emmendingen	03-0060
TipOne® Pipettenspitzen 10/20 µl XL Graduated, Filter	Starlab International GmbH, Hamburg	S1120-3810
TipOne® Pipettenspitzen 20 µl Bevelled, Filter	Starlab International GmbH, Hamburg	S1120-1810
TipOne® Pipettenspitzen 200 µl Graduated, Filter	Starlab International GmbH, Hamburg	S1120-8810
VWR®Labormarker	VWR International, Radnor (USA)	811-0065
Wägeschälchen 44x44 mm	Fagron GmbH & Co. KG, Glinde	800631

Tabelle 19: Verbrauchsmaterialien

2.1.7 Geräte und Instrumente

Produkt	Hersteller, Ort	Referenznummer
accujet® pro	BRAND®, Wertheim	26303
Applied Biosystems™ MicroAmp™ 96- Well Support Base	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	43-795-90
Autoklav	Systec GmbH, Linden	VX-95
Centrifuge 5425 R Mikrozentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg	5406000313
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg	5804000010
chirurgisches Instrumentarium AESCULAP®	B. Braun SE, Melsungen	
chirurgisches Instrumentarium Peha®- Instrument	Hartmann Gruppe, Heidenheim an der Brenz	
Color Sprout® Plus Mini-Zentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf	552031
Dewar-Transportgefäß Typ 28 B	KGW Isotherm, Karlsruhe	1213
Duran® Laborflasche 1000 ml	DWK Life Sciences, Wertheim	Z305200
Duran® Laborflasche 250 ml	DWK Life Sciences, Wertheim	Z305189
Duran® Laborflasche 500 ml	DWK Life Sciences, Wertheim	Z305197
Eismaschine CoolNat	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen	202066
Eppendorf Research® Plus Multikanalpipette 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3125000052
Eppendorf Research® Plus Pipette 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123000020
Eppendorf Research® Plus Pipette 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123000047
Eppendorf Research® Plus Pipette 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123000063
Eppendorf Research® Plus Pipette 2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123000012
Eppendorf Research® Plus Pipette 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123000039
Eppendorf Research® Plus Pipette 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123000055

Eppendorf Xplorer® Plus Pipette 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg	EP4861000783
Färbeküvette nach Hellendahl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	H550.1
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen	BP 110 S
Flexacam C3 Mikroskopkamera	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar	
GasDocUnit® GDU-2021	medres – medical research GmbH, Köln	BLR 0122 0034
HERAcell 240i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	51032876
HERAfreeze™ HFU T Serie -86 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	
INFINITE Plate Reader M1000Pro	Tecan Group AG, Männedorf (CH)	30064852
Keyence BZ-X Series	Keyence Corporation, Osaka (JPN)	BZ-X
Kryostat	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar	CM1950
Kühlschrank	Tintometer GmbH, Dortmund	
Kühlschrank + 4°C	Revco Technologies, Inc., Vero Beach (USA)	
Kühlschrank ProfiLine -20°C	Liebherr, Bulle	
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach	2761
Magnetrührstäbchen, versch. Größen	BRAND®, Wertheim	
Maxxima® Abzug	wrt Laborbau GmbH & Co. KG, Stadtlohn	17840
Messzylinder 250 ml	BRAND®, Wertheim	32148
Mikroskop	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar	Typ11090137002
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	640110
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences, Hudson (USA)	155023
PLATEFUGE™ Microplate Microcentrifuge	Benchmark Scientific, Sayreville (USA)	C2000
Präparatekasten	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)	HD15994A
Reagenzglasschüttler RS-VA 10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen	PX88.1
Rollenmischer	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen	RS-TR 05
Schüttler KS-15 control	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen	L490.1
Schutzbrille	Uvex Winter Holding GmbH & Co. KG, Fürth	
Spülmaschine Miele PG 8583	Miele & Cie. KG, Gütersloh	62858303D
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	4376600
Sterilbank HERAsafe™ 2030i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	51032676
Sterilbank HERAsafe™ KS 18	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	41172502
SuperFrost™ Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen	03-0060

T3000 Thermocycler	Biometra®, Göttingen	T3000
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg	5436
Thermomixer F2.0	Eppendorf AG, Hamburg	VB-1815
TRIAFLEX OP-Leuchte	Dr. Mach GmbH & Co. KG, Grafing bei München	1561LHF
Vacusaft TM Vacuum Aspiration System	INTEGRA Biosciences, Hudson (USA)	158320
Waage	Mettler-Toledo, Bochum	PB1502-S
Wasserbad Typ 1092	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel	10204201C

Tabelle 20: Geräte und Instrumente

2.1.8 Software

Produkt	Hersteller, Ort
EndNote 20	Clarivate Analytics, London (GB)
Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
Keyence BZ-X800 Analyzer	Keyence Corporation, Osaka (JPN)
LEGENDplex TM Data Analysis Software	Qognit Inc., San Carlos (USA)
Prism 8, 9	GraphPad Software Inc., La Jolla (USA)
StepOne Software Version 2.3	Applied Biosystems TM , Waltham (USA)
Tecan-i-control Software	Tecan Group AG, Männedorf (CH)
Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

Tabelle 21: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von vaskulären glatten Muskelzellen

Vor der Zellisolation wurden Zellkulturmedium (Tab. 2) und Waschlösung (Tab. 4) angesetzt und auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Ratten wurden in der GasDocUnit® mittels CO₂-Gabe euthanasiert. Nach Verifizierung eines Fehlens des Kornealreflexes des Tieres wurde die Aorta entnommen und auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte

erfolgten unter der Sterilwerkbank. Die Aorta wurde zunächst in einer 10 cm-Petrischale von ihrem umgebenden Fettgewebe befreit und in Ringe von ca. 1 mm Höhe geschnitten, welche dann mit Amphotericin-B-haltigem Medium in eine 6-Well-Platte überführt wurden. Diese wurde dann in den Inkubator platziert (37 °C und 5 % CO₂). Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 48 bis 72 Stunden, wobei das Zellwachstum regelmäßig unter dem Lichtmikroskop begutachtet wurde.

2.2.2 Weitere Kultivierung der VSMCs

Sobald sich ein größerer Zellrasen bildete (ca. am Tag zehn), konnten die Ringe entfernt werden. Ab diesem Zeitpunkt wurde Medium ohne Amphotericin B (Tab. 3) genutzt. Sobald die Zellen in den Wells jeweils eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten, wurden sie je nach Zellmenge in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größen (25 cm² oder 75 cm²) überführt. Nach einem Waschschrift wurden hierfür in jedes Well 500 µl vorgewärmtes 0,25 % Trypsin-EDTA gegeben und die Platte anschließend für zwei Minuten in den Inkubator gestellt. Nach Beurteilung der Ablösung unter dem Lichtmikroskop wurde die Reaktion durch Hinzugabe der dreifachen Menge Medium abgestoppt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen gesammelt und bei 600 rcf und 22 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zellpellet in Medium re-suspendiert und in die Zellkulturflasche gegeben. Bei gutem Zellwachstum wurden die Zellen in die nächstgrößere Flasche überführt. Dies erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben, mit angepassten Trypsin- und Medium-Volumina.

Bei ausreichender Zellzahl konnten die VMSCs für das Experiment verwendet werden, was bei einer zu ca. 80 % konfluenten 75 cm²-Flasche der Fall war. Die Zellen durften laut Laborvorgabe maximal bis zur Passage sechs für die Experimente verwendet werden. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig fotografisch dokumentiert.

2.2.3 Präparation und Dezellularisierung von Schafs-Aortenklappen

Es handelt sich um ein Detergens-basiertes Dezellularisierungsverfahren, welches sich grob an das Hannoveraner Protokoll von Lichtenberg et al. anlehnt (31). Für die Präparation und die anschließende Dezellularisierung wurden die PBS-Spüllösung (Tab. 5) und die Zehnfach konzentrierte (10X) DET-Stocklösung (Tab. 6) angesetzt.

Die Schafsherzen wurden zunächst gewogen. Klappen aus Herzen, deren Massen um mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Gewichte abwichen, wurden als unbehandelte Kontrollen verwendet. Zunächst wurden jeweils die Herzspitzen mittels eines Skalpell entfernt, um den linken Ventrikel quer zu eröffnen. Durch das Platzieren einer langen Pinzette über den linken Ventrikel in die Aorta konnte die Lage der Aortenklappe nachvollzogen werden. Das Herz wurde entlang der einliegenden Pinzette längs eröffnet und die Klappenebene aufgesucht. Anschließend wurden die Aortenklappentaschen identifiziert und einzeln herauspräpariert (Abb. 7) und in PBS-Spüllösung gegeben. Die Aortenklappen aus den Kontrollherzen wurden in ein separates Behältnis überführt. Danach wurden die Aortenklappen für eine Stunde bei 160 rpm auf dem Schüttler bzw. Rollenmischer gewaschen. Nach dem Austauschen der Lösungen durch frisches PBS wurden die Aortenklappen bis zum Beginn der Dezellularisierung für einige Stunden bei + 4 °C gelagert.

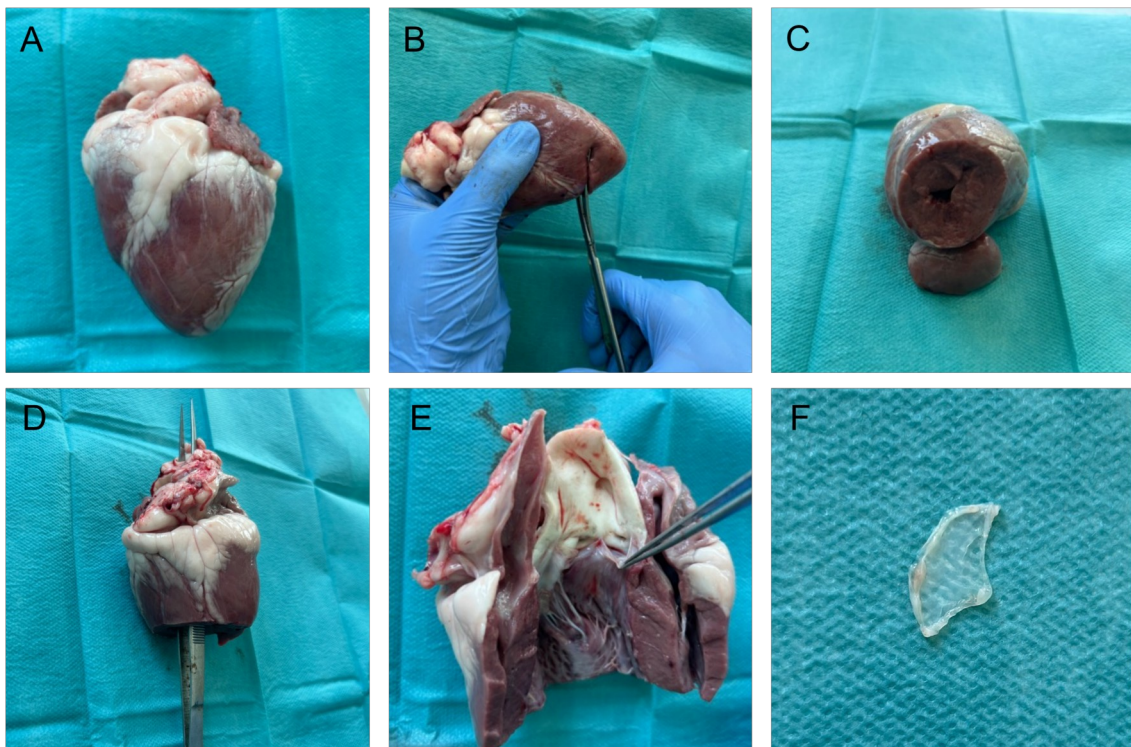


Abb. 7: Isolation der Schafs-Aortenklappen

A: Blick auf das Herz von anterior. Zunächst wurde die Herzspitze entfernt (B), wodurch der linke Ventrikel quer eröffnet wurde (C). Durch Platzieren einer Pinzette über den linken Ventrikel in die Aorta (D) konnte die ungefähre Schnittrichtung identifiziert werden, um die Kammer längs zu eröffnen und somit die Aortenklappenebene zu erreichen (E). Die drei Aortenklappentaschen wurden anschließend identifiziert (E) und einzeln herauspräpariert (F).

Unmittelbar vor der Dezellularisierung wurden dann die einfach konzentrierte (1X) DET-Lösung (Tab. 7) und für die Kontrollen die 0,05 % Natriumazid-Lösung (Tab. 8) vorbereitet, die beide jeweils für 24 Stunden haltbar waren. Die Klappen wurden dann

auf dem Schüttler bei 160 rpm und Raumtemperatur über 48 Stunden mit 1X-DET-Lösung behandelt, welche alle zwölf Stunden (Spielraum maximal zwei Stunden) gewechselt wurde. Währenddessen wurden die Kontrollen mit 0,05 % Natriumazid gewaschen, der Wechsel erfolgte ebenfalls alle zwölf Stunden. Anschließend wurden die DET- und die Kontroll-Herzklappen zur Desinfektion für weitere 24 Stunden mit 0,05 % Natriumazid behandelt. Nach diesem Schritt galten sie als steril, weshalb alle weiteren Lösungswechsel unter der Sterilbank durchgeführt werden mussten. Die Herzklappen wurden zu Biopsien mit einem Durchmesser von 5 mm gestanzt und für weitere 24 Stunden in 0,05 % Natriumazid gewaschen. Danach erfolgte ein insgesamt 144 Stunden dauernder Waschschrift mit steriler PBS-Spüllösung, wobei ein Lösungswechsel alle 48 Stunden durchgeführt wurde. Dann wurden die Herzklappen für zwei Stunden mit DNase I inkubiert, um verbleibende freie DNA-Reste aus dem Gewebe zu entfernen. Die DNase I wurde mit einer Zielkonzentration von 1 kU/ml in PBS verdünnt angesetzt. Einige Biopsien aus der DET-Gruppe wurden nicht mit DNase I verdaut, um sie später für eine Qualitätskontrolle zu nutzen. Die Klappen aus der Kontrollgruppe wurden ebenfalls nicht mit DNase I behandelt. Zum Schluss wurden die Biopsien für 15 Minuten in der Spüllösung gewaschen und in frischem DPBS + 2 % Penicillin-Streptomycin + 1 % Amphotericin B bei + 4 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Alle Schritte wurden protokolliert (Tab. 22).

Schritt	Zeitdauer	Datum	Zeit, Anfang	Datum	Zeit, Ende
0. PBS + 2 % P/S + 1 % AmpB	1h				
1. SDS 0.5 %, DCA 0.5 %, NaN3 0.05 %	Insg. 48 h				
Wechsel 1	12 h				
Wechsel 2	12 h				
Wechsel 3	12 h				
Wechsel 4	12 h				
2. NaN3 0.05 %	24 h				
3. Stanzen der Klappen					
4. NaN3 0.05 %	24 h				
5. PBS + 2 % P/S + 1 % AmpB	Insg. 144 h				
Wechsel 1	48 h				
Wechsel 2	48 h				
Wechsel 3	48 h				
6. DNase	2 h				
5. PBS + 2 % P/S + 1 % AmpB	15 min				

Tabelle 22: Dezellularisierungsprotokoll

2.2.4 Qualitätskontrolle der Dezellularisierung

Zur Überprüfung des Dezellularisierungserfolges wurden eine qualitative und eine quantitative Qualitätskontrolle durchgeführt. Es wurden folgende Biopsien getestet:

1. DET-dezellularisiert, DNase-verdaut
2. DET-dezellularisiert, nicht DNase-verdaut
3. Nicht DET-dezellularisiert, nicht DNase-verdaut

Qualitative Qualitätskontrolle

Für die qualitative Qualitätskontrolle wurden die Biopsien mit dem sich an DNA anlagernden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt (57). Hierfür wurde DAPI zunächst in PBS auf 1:500 vorverdünnt (Tab. 9). Anschließend erfolgte die Herstellung der DAPI-Arbeitslösung, indem die DAPI-Vorverdünnung zusätzlich auf 1:100 in PBS verdünnt wurde. Somit resultierte eine Zielverdünnung von 1:50 000 (Tab. 10). Zu jeder Biopsie wurden ca. 150 µl der Arbeitslösung hinzugegeben. Danach erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Biopsien für jeweils fünf Minuten in PBS und in destilliertem Wasser gewaschen, auf einen Objektträger mit Vertiefung platziert und nach Hinzugabe von einigen Tropfen CV Ultra Eindeckmedium mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach zwei Stunden Trocknungszeit im Dunkeln konnten die Proben im DAPI-Kanal (Exzitation bei 359 nm, Absorption bei 461 nm) des Keyence-Fluoreszenzmikroskops betrachtet und fotografiert werden.

Quantitative Qualitätskontrolle

Für die quantitative Qualitätskontrolle wurde aus den Biopsien DNA isoliert, deren Konzentration dann photometrisch gemessen wurde. Hierfür wurde nach dem Quick Start Protocol des QIAamp® DNA Mini Kits vorgegangen (58, 59). Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor Beginn des Protokolls mussten die Puffer AW1 und AW2 mit Ethanol (100 %) verdünnt werden.

Jede Biopsie wurde jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gelegt, in das anschließend 180 µl Puffer ATL und 20 µl Proteinase K pipettiert wurden. Die Proben wurden kurz auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt und im Thermomixer bei 56 °C für ca. zwei Stunden bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Nach Hinzugabe von 200 µl Puffer AL und Durchmischung wurden die Proben für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert, kurz

zentrifugiert und mit jeweils 200 µl Ethanol (100 %) versetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Inhalt jeder Probe auf eine QIAamp Mini Spin Säule gegeben, für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und das *Collection-Tube* mit der darin gesammelten Flüssigkeit verworfen. Nach dem Platzieren jeder QIAamp Mini Spin Säule auf ein neues *Collection-Tube* und Hinzugabe von 500 µl Puffer AW1 erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt mit den gleichen Einstellungen. Dann wurden zu jeder Probe 500 µl Puffer AW2 pipettiert und die Röhrchen für drei Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert. Nach Austausch des *Collection-Tube* wurde für eine weitere Minute bei 14 000 rpm zentrifugiert. Dann wurden die QIAamp Mini Spin Säulen in je ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gelegt und nach Hinzufügen von 200 µl Puffer AE und einer Inkubation bei Raumtemperatur für eine Minute erfolgte eine letzte Zentrifugation bei 8 000 rpm für eine Minute, um die extrahierte DNA in Lösung zu bringen. Anschließend wurde für die quantitative Bestimmung der dsDNA am Tecan INFINITE Plate Reader in technischen Duplikaten die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen.

2.2.5 *In vitro* Kultivierung der VSMCs in Gegenwart von dEZM

Für das Experiment wurden Zellen unter vier unterschiedlichen Bedingungen kultiviert:

1. mit dEZM-Biopsie (48 h)
2. mit LPS stimuliert (24 h)
3. mit IL-4 stimuliert (24 h)
4. unbehandelte Kontrollen (48 h)

Zunächst wurden die Zellen gewaschen und mithilfe von 0,25 % Trypsin-EDTA aus der Flasche gelöst. Nach Zentrifugation und Re-suspension in Medium wurden die Zellen in 1:1-Verdünnung mit Trypanblau gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Dann wurden in einer 96-Well-Platte pro Kondition 50 000 Zellen pro Well in drei technischen Replikaten ausgesät. Die Zellen wuchsen für ca. 24 Stunden an und wurden dann zwei Mal gewaschen. Zu den einzelnen Konditionen wurden dann dEZM-Biopsien bzw. LPS- oder IL-4 enthaltendes Aktivierungsmedium (Tab. 11, 12) hinzugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wurden aus den LPS- und IL-4-Wells die Überstände entnommen und auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation bei 900 rcf und + 4 °C für fünf Minuten wurden die Überstände in Kryoröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff gefroren. Parallel dazu wurden die Zellen gewaschen und in die geleerten Wells je 200 µl RLT-DTT-Zelllysepuffer (Tab. 13) pipettiert. Nach einer zehnminütigen Einwirkzeit wurde das Zelllysate aus jedem Well in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Nach 48 Stunden

erfolgte die Abnahme der Überstände und Zelllysate in den dEZM- und Kontroll-Wellen nach dem gleichen Verfahren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei - 80 °C.

2.2.6 Nachweis der Interaktion von VSMCs und dEZM

Um zu prüfen, ob die VSMCs mit der dEZM-Biopsie interagieren, wurde diese nach 48-stündiger Inkubation in Gegenwart der Zellen mit DAPI gefärbt und mikroskopiert. Hierfür wurden 50 000 VSMCs pro Well ausgesät und mit der dEZM kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Biopsie entnommen und für fünf Minuten mit DPBS gewaschen. Nach einer zehnminütigen Fixierung in 4 % PFA (ROTI® Histofix) und einem erneuten Waschschrift wurde die Biopsie bis zur Färbung bei + 4 °C gelagert. Nach Färbung mit der angesetzten DAPI-Arbeitslösung (Tab. 10) und Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur für eine Stunde wurde die dEZM in DPBS und destilliertem Wasser gewaschen und im DAPI-Kanal des Keyence-Mikroskops fotografiert.

2.2.7 RNA-Isolation

Für die PCR musste aus den Zelllysaten zunächst die mRNA isoliert werden. Hierfür wurde das RNeasy® Micro Kit von Qiagen benutzt (60). Alle Schritte erfolgten nach einer auf dem im Kit enthaltenen *Quick Start Protocol* basierenden SOP und wurden auf Eis durchgeführt. Der DNase I Stock wurde im Voraus in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst und aliquotiert gelagert.

Nach Vorbereiten des DNase-Mastermixes (10 µl DNase-Stock und 70 µl RDD-Puffer pro Probe) und Verdünnen des RPE-Puffers auf 1:5 mit Ethanol (100 %) wurden alle Lysatröhrchen für zehn Sekunden auf dem Schüttler durchmischt und das Volumen mit Zellysepuffer (Tab. 13) jeweils auf 350 µl adjustiert. Nach erneuter Durchmischung und Übertragung der Lysate auf QIAshredder® Säulen erfolgte eine Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit (21 300 rcf) und Raumtemperatur für eine Minute. Die Lösung wurde dann im Verhältnis 1:1 mit Ethanol (70 %) verdünnt und auf die RNeasy MinElute® Spin Säulen pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 8 000 rcf für 15 Sekunden wurde die Lösung verworfen und auf jede Säule 350 µl RW1-Puffer pipettiert. Die RNA war schließlich an die Silikamembran der Säulen gebunden, nachdem erneut für 15 Sekunden bei 8 000 rcf zentrifugiert und die verbleibende Flüssigkeit verworfen wurde. Anschließend fand nach Hinzufügen von 80 µl DNase-Mastermix ein 15-minütiger

DNase-Verdau bei Raumtemperatur statt. Dann wurden erneut 350 µl RW1-Puffer hinzupipettiert und die Säulen zentrifugiert. Für die Bereinigung der RNA wurden 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben und nach einer Zentrifugation und Pipettieren von 500 µl Ethanol (80 %) erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8 000 rcf für zwei Minuten. Die Säulen wurden dann in ein neues *Collection-Tube* platziert und bei maximaler Geschwindigkeit für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der *Collection-Tubes* wurden die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gestellt und 14 µl RNase-freien Wassers auf die Membranen pipettiert, um die RNA zu lösen. Anschließend konnte die RNA-Konzentration am Tecan INFINITE Plate Reader durch eine Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt werden. Die Proben wurden bei - 80°C gelagert.

2.2.8 RNA-Qualitätskontrolle

Für die Testung der Gesamt-RNA-Qualität vor Durchführung der PCR wurde aus mit dEZM kultivierten VSMCs und unbehandelten Kontrollen isolierte RNA mit einer Mindestkonzentration von 10 ng/µl an das Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geschickt und dort die RNA-Integrität mittels Kapillar-Gelelektrophorese bestimmt. So konnte vor Durchführung der PCR getestet werden, ob die RNA nicht durch eine Verunreinigung mit Nukleasen zu stark fragmentiert war. Es wurden das Verhältnis von 28S- zu 18S-rRNA und die *RNA quality number* (RQN) bestimmt (61).

2.2.9 cDNA-Synthese

Um die Proben für die PCR zu verwenden, musste die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das QuantiTect®Reverse Transcription Kit verwendet (62). Es wurde zunächst das Volumen berechnet, in dem sich die aus jeder Probe maximal zu erhaltende RNA-Menge befindet. Das berechnete Volumen wurde dann in 200 µl Reaktionsgefäße überführt und mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Nach Hinzufügen von 2 µl gDNA *Wipeout Buffer* wurden die Proben in den Thermocycler gestellt und für zwei Minuten auf 40 °C erhitzt. Dann wurden zu jeder Probe 4 µl RT-Puffer, 1 µl RT-*Primer-Mix* und 1 µl Reverse Transkriptase pipettiert. Die Proben wurden wieder in den Thermocycler gestellt, wo sie für 30 Minuten auf 42 °C und für weitere drei Minuten auf 95 °C erhitzt wurden. Am Ende des Programms wurde jede Probe mit RNase-freiem Wasser auf eine für die PCR notwendige Zielkonzentration von 5 ng/µl verdünnt und bei - 20 °C gelagert.

2.2.10 Quantitative RT-PCR-Analyse

Für die quantitative PCR wurde das GoTaq®qPCR System-Kit benutzt (63). Es wurden die Gene *TAGLN*, *ACTA2*, *MYH11*, *NFKB1*, *CCL2*, *VCAM1*, *BMP2* und *CXCL1* jeweils in Messduplikaten gemessen. Die Messung erfolgte für insgesamt vier biologische Replikate ($n = 4$) mit jeweils drei technischen Replikaten pro Kulturbedingung.

Die cDNA und die *Primer* wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und die *Forward*- und *Reverse-Primer* anschließend im Verhältnis 1:10 mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt. Dann wurde 1 ml GoTaq® qPCR Master Mix mit 20 μ l CXR *Reference Dye* gemischt und somit die Arbeitslösung hergestellt. Für jeden *Primer* wurde ein Mastermix aus der GoTaq-Arbeitslösung, Nuclease-freiem Wasser, *Forward-Primer*-Arbeitslösung und *Reverse-Primer*-Arbeitslösung unter Berücksichtigung der benötigten Well-Menge angesetzt (Tab. 14). Somit ergab sich ein Mastermixvolumen von 18 μ l pro Well, welches mithilfe einer automatischen Pipette auf die PCR-Platte gegeben wurde. Anschließend wurden in jedes Well 2 μ l der Proben pipettiert, jeweils in Messduplikaten. Für jeden *Primer* wurden zudem als Negativkontrolle statt cDNA 2 μ l Nuclease-freien Wassers hinzugefügt. Für die *Inter Run Calibration* (IRC) wurden eine humane cDNA-Probe und GAPDH als *Primer* verwendet. *RPL13A* diene als *Housekeeping*-Gen. Die PCR-Platte wurde mit einer Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und anschließend in die PCR-Maschine gestellt. Nach Ende jedes PCR-Laufs wurden die Schmelzkurven überprüft und die Qualität des PCR-Durchgangs bewertet. Die maximal tolerierte Abweichung zwischen den Ct-Werten eines Messduplikats wurde hierbei als 1,0 definiert. Bei der Auswertung wurde eine $\Delta\Delta C_t$ -Analyse durchgeführt.

2.2.11 Multiplex-Immunoassay

Die im Experiment generierten und eingefrorenen Medium-Überstände für vier biologische Replikate ($n = 4$) mit jeweils drei technischen Replikaten pro Kondition wurden an das Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn geschickt. Dort erfolgte die Messung eines proinflammatorischen Ratten-Zytokin-*Panels* als Multiplex-Immunoassay. Es wurden CCL2 (MCP1), CXCL1 (KC), IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-17A und IL-12p70 gemessen. Hierfür wurden ein Durchflusszytometer, das LEGENDplex™ Kit und die LEGENDplex™ Analysesoftware verwendet.

2.2.12 ALP-Assay

Es ist bekannt, dass VSMCs in kalzifizierenden Gefäßen Alkalische Phosphatase (ALP) produzieren (64). Um zu testen, ob die VSMCs nach 48 Stunden Kontakt mit der dEZM bereits einen Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp annehmen, wurde die ALP-Aktivität in den eingefrorenen Medium-Überständen aus einem Tier mit je drei technischen Replikaten pro Bedingung gemessen. Für den ALP-Assay wurde das *Phosphatase Substrate Kit* genutzt.

Zunächst wurden die NaOH-Stopplösung (Tab. 15) und die 1X-Diethanolamin-Lösung (Tab. 16) hergestellt. Anschließend wurden zwei PNPP-Tabletten in 10 ml 1X-Diethanolamin gelöst. 20 µl der jeweiligen Probe wurden in Duplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 20 µl PNPP-Lösung versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 µl Stopplösung hinzugegeben. Als *Background*-Kontrollen dienten Überstände unbehandelter VSMCs, bei denen die Reaktion unmittelbar abgestoppt wurde. Zusätzlich wurde einfaches Zellkulturmedium als Kontrolle genutzt. Es erfolgte eine Messung der Absorption bei 405 nm am Tecan INFINITE Plate Reader.

2.2.13 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Excel und Graph Pad Prism 8. Die RT-PCR- und Multiplex-Daten wurden dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler (*Mean* +/- SEM). Es erfolgte ein Vergleich der Interventionsgruppen mit der unstimulierten Kontrollgruppe. Für die Beurteilung von Unterschieden zwischen den Bedingungen wurde der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei $p < 0,05$ wurden Ergebnisse als signifikant betrachtet.

2.2.14 Graphiken

Die Schaubilder in der Einleitung und in der Diskussion wurden mithilfe der Website www.biorender.com erstellt. Hierfür lag dem Labor eine Lizenz vor.

3 Ergebnisse

3.1 Erfolgreiche Kultivierung glatter Muskelzellen aus Rattenaorten

Die Zellisolierung und primäre Kultivierung waren erfolgreich. Es zeigte sich, dass bereits nach ca. vier Tagen erste Zellen aus den Aortenringen herauswuchsen und am Well-Boden anhafteten. Am ca. zehnten Kultivierungstag war bereits ein etwas dichter Zellrasen zu erkennen. Die Zellen hatten eine längliche, spindelförmige Morphologie (Abb. 8).

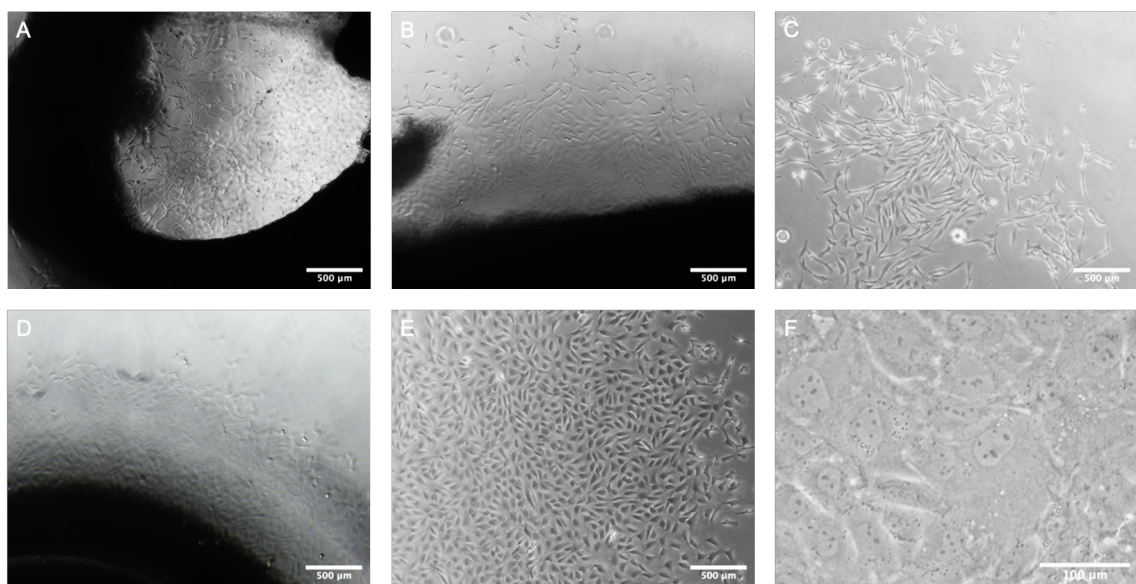


Abb. 8: Wachstum der glatten Muskelzellen

VSMCs am Tag sechs (A-C) bzw. Tag zehn (D-F) nach Isolation. In A, B und D sind Anteile der Aortenringe zu erkennen. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit fünffacher (A-E) bzw. 40-facher Vergrößerung (F). Maßstab 500 µm bzw. 100 µm (F). Zur besseren Übersicht Darstellung in schwarz-weiß.

3.2 Effektive Dezellularisierung von Aortenklappenbiopsien

Sowohl die qualitative als auch die quantitative Qualitätskontrolle ergaben eine erfolgreiche Dezellularisierung. Nach Anfärben der Biopsien mit DAPI konnten in den doppelt behandelten Biopsien (dezellularisiert und DNase-verdaut) keine Zellkerne nachgewiesen werden. In den einfach behandelten Kontrollen (dezellularisiert) waren vereinzelt Zellkerne sichtbar, während die unbehandelten Kontrollen stark mit Zellen besiedelt waren. Der DNA-Gehalt war in den dezellularisierten Biopsien mit und ohne DNase-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen deutlich reduziert (Abb. 9).

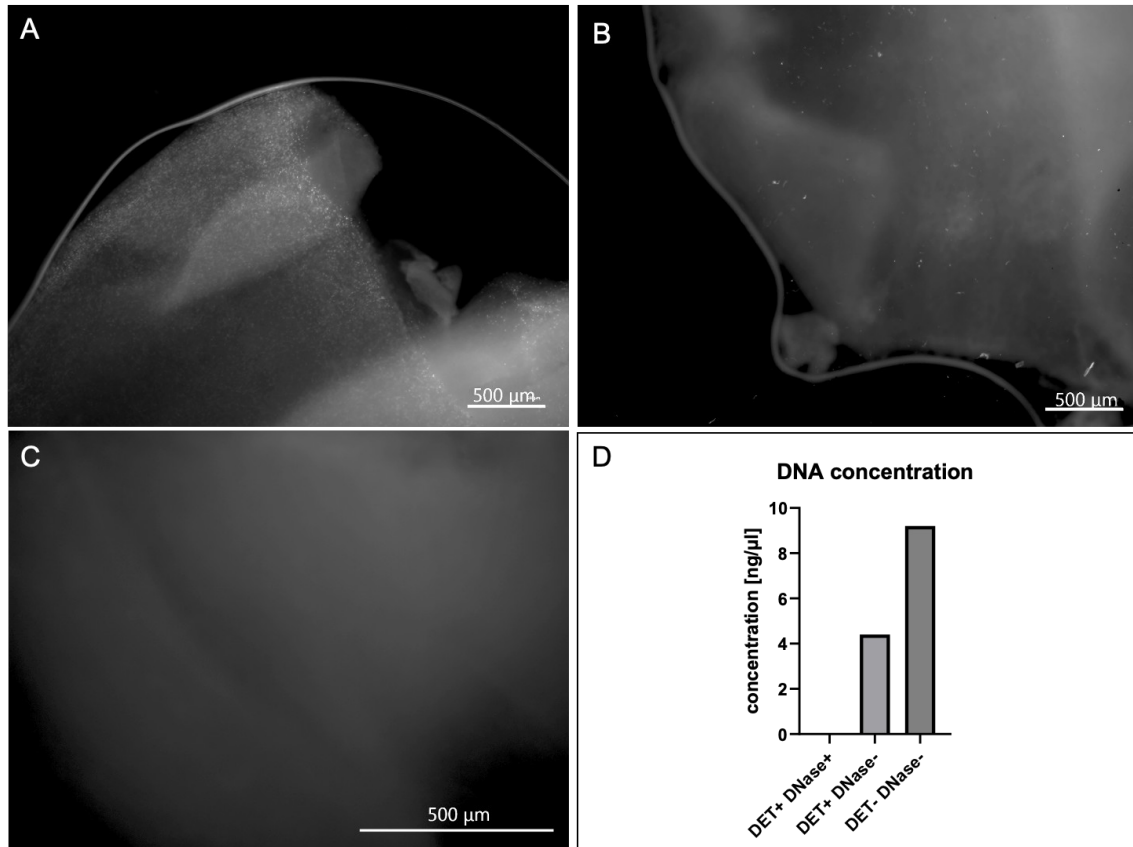


Abb. 9: Qualitative und quantitative Qualitätskontrolle der Dezellularisierung

Biopsien wurden mittels DAPI angefärbt und im Keyence-Mikroskop betrachtet. In der nicht-dezellularisierten und nicht-DNase-verdauten Kontrolle sind viele Zellkerne sichtbar (A). In der nicht-DNase-verdauten dEZM-Biopsie sind vereinzelte Zellkerne vorhanden (B). In der DNase-behandelten dEZM ist kein DAPI-Signal nachweisbar (C). Maßstab entspricht 500 μm. Vierfache (A, B) bzw. zehnfache Vergrößerung (C). Aus den Biopsien wurde zusätzlich jeweils die DNA extrahiert und deren Konzentration photometrisch bestimmt. In der DNase-behandelten dEZM war keine DNA messbar, während unter den anderen beiden Bedingungen weiterhin DNA nachweisbar war (D). Zur besseren Sichtbarkeit der Zellkerne wurden die Bilder in Power Point in schwarz-weiß umgewandelt und mit verstärktem Kontrast versehen.

3.3 Nachgewiesene Interaktion zwischen VSMCs und dEZM

Lichtmikroskopisch blieben die Zellen im Stimulationsexperiment zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit LPS und IL-4 und auch bei Kontakt mit der dEZM vital (Abb. 10). Diese wirkt somit nicht toxisch auf die Zellen. Zudem konnten in der initial zellfreien, für 48 Stunden mit VSMCs kultivierten dEZM-Biopsie Zellkerne in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden, was auf eine Migration der glatten Muskelzellen in Richtung der dEZM hindeutet (Abb. 11).

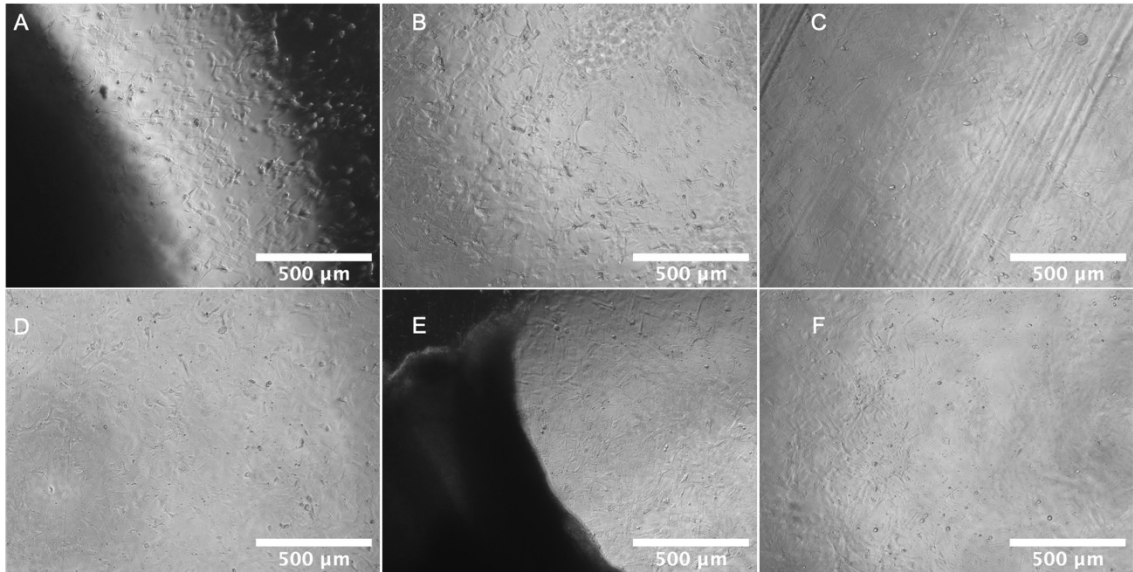


Abb. 10: Fotodokumentation des Zellkultur-Experiments

VSMCs 24 Stunden nach dem Aussäen mit dEZM (A) und ohne dEZM (B). LPS- (C) und IL-4-stimulierte VSMCs (D) nach 24 Stunden. VSMCs mit dEZM (E) und ohne dEZM (F) nach 48 Stunden. In A und E sind Anteile der Aortenklappenbiopsien zu erkennen. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit fünffacher Vergrößerung. Maßstab entspricht 500 µm. Zur besseren Übersicht Darstellung in schwarz-weiß.

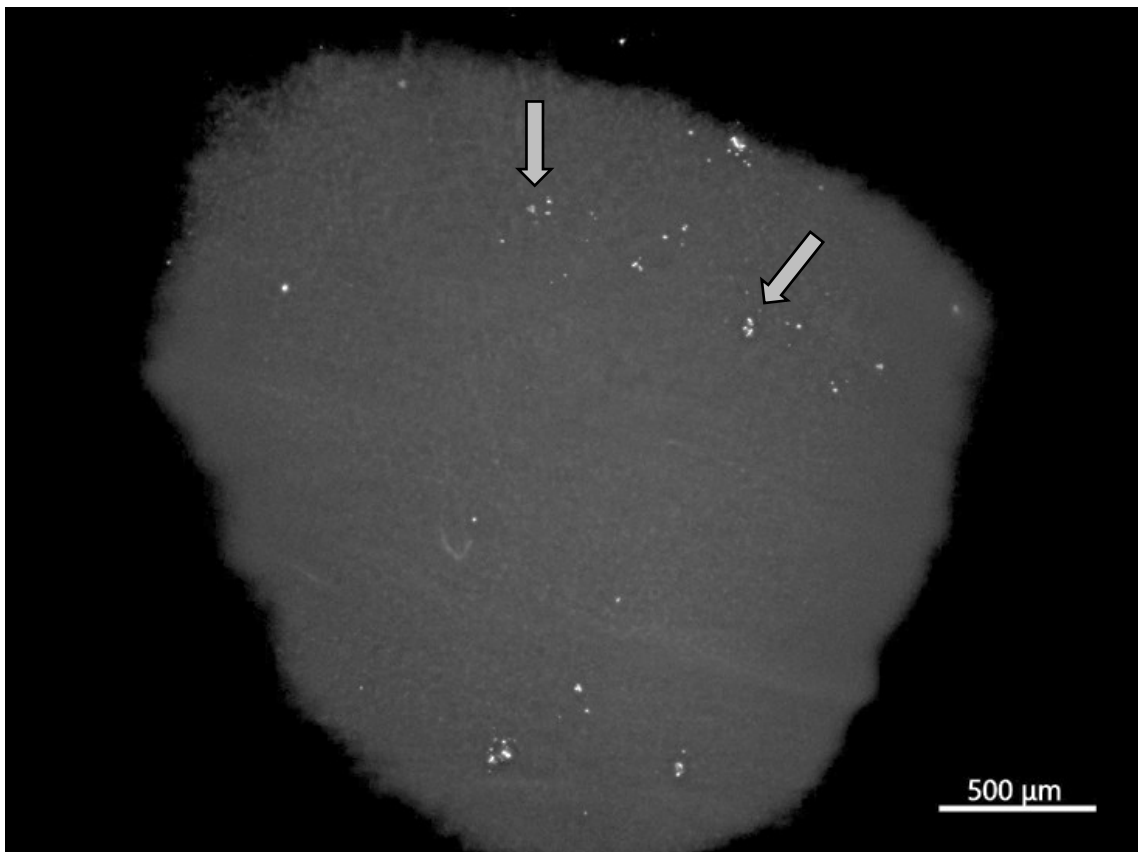


Abb. 11: VSMCs interagieren mit der dEZM (Fluoreszenzmikroskopie)

dEZM-Aortenklappenbiopsien wurden für 48 Stunden mit VSMCs inkubiert, mit 4 % PFA fixiert und mit DAPI angefärbt. Auf diesem fluoreszenzmikroskopischen Bild sind innerhalb der dargestellten Biopsie einzelne Zellkerne erkennbar (beispielhaft mit Pfeilen markiert). Maßstab entspricht 500 µm, vierfache Vergrößerung, Belichtungszeit 1/12 s. Darstellung in schwarz-weiß und mit vermehrtem Kontrast zur besseren Sichtbarkeit der Zellkerne.

3.4 Suffiziente RNA-Qualität

Die RNA-Qualitätskontrolle ergab eine intakte RNA (Abb. 12) aus mit dEZM kultivierten VSMCs und unbehandelten Kontrollen bei einem 28S/18S-rRNA-Verhältnis von 2,0 sowie einer *RNA quality number* (RQN) von 10,0 (61). Die Qualität der RNA war somit gut für eine anschließende RT-PCR geeignet.

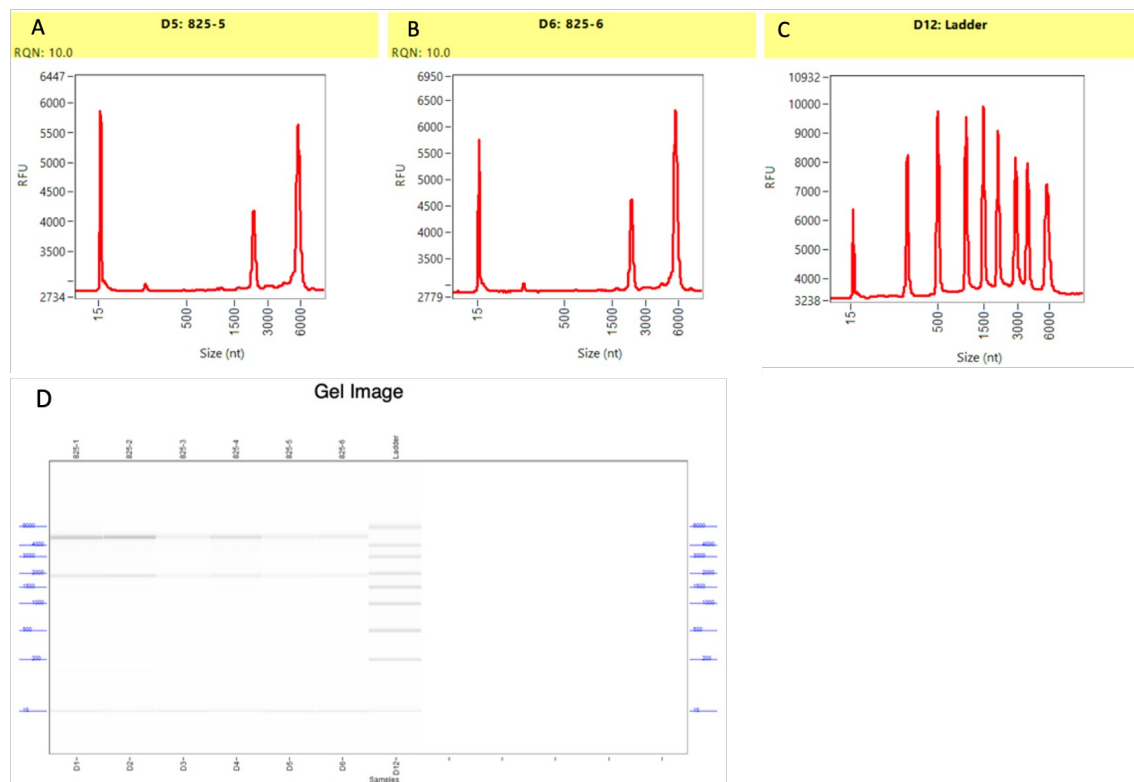


Abb. 12: Ergebnisse der RNA-Qualitätskontrolle

Die Integrität der RNA wurde für Proben aus nicht-stimulierten VSMCs (825-5) und aus VSMCs nach dEZM-Kontakt (825-6) mittels Kapillar-Gelelektrophorese bestimmt. Unter A und B sind die Fluoreszenzpeaks der einzelnen unterschiedlich großen RNA-Fractionen dargestellt, während unter C die Werte einer Referenzprobe (Ladder) zu sehen sind. D zeigt die Gelelektrophorese-Banden. RQN: *RNA quality number*, RFU: *Relative fluorescence units*, nt: *Nukleotide*. ©Genomics & Transcriptomics Labor (GTL), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

3.5 Regulation der Genexpression nach 48-stündigem dEZM-Kontakt

Es wurde die relative mRNA-Expression (engl.: *fold change*) der Gene unter den verschiedenen Kulturbedingungen betrachtet. In den VSMCs der dEZM-Gruppe konnte eine Tendenz zur Herunterregulierung der kontraktilen Marker *TAGLN* ($p=0,2212$, *fold change* 0,65), *ACTA2* ($p=0,0945$, *fold change* 0,70) und *MYH11* ($p < 0,01$, *fold change* 0,46) nachgewiesen werden, wobei das Ergebnis bei *MYH11* signifikant war (Kruskal-

Wallis-Test). Auch die LPS-Stimulation bewirkte eine signifikant verringerte Expression von *MYH11* ($p < 0,05$), (Abb. 13).

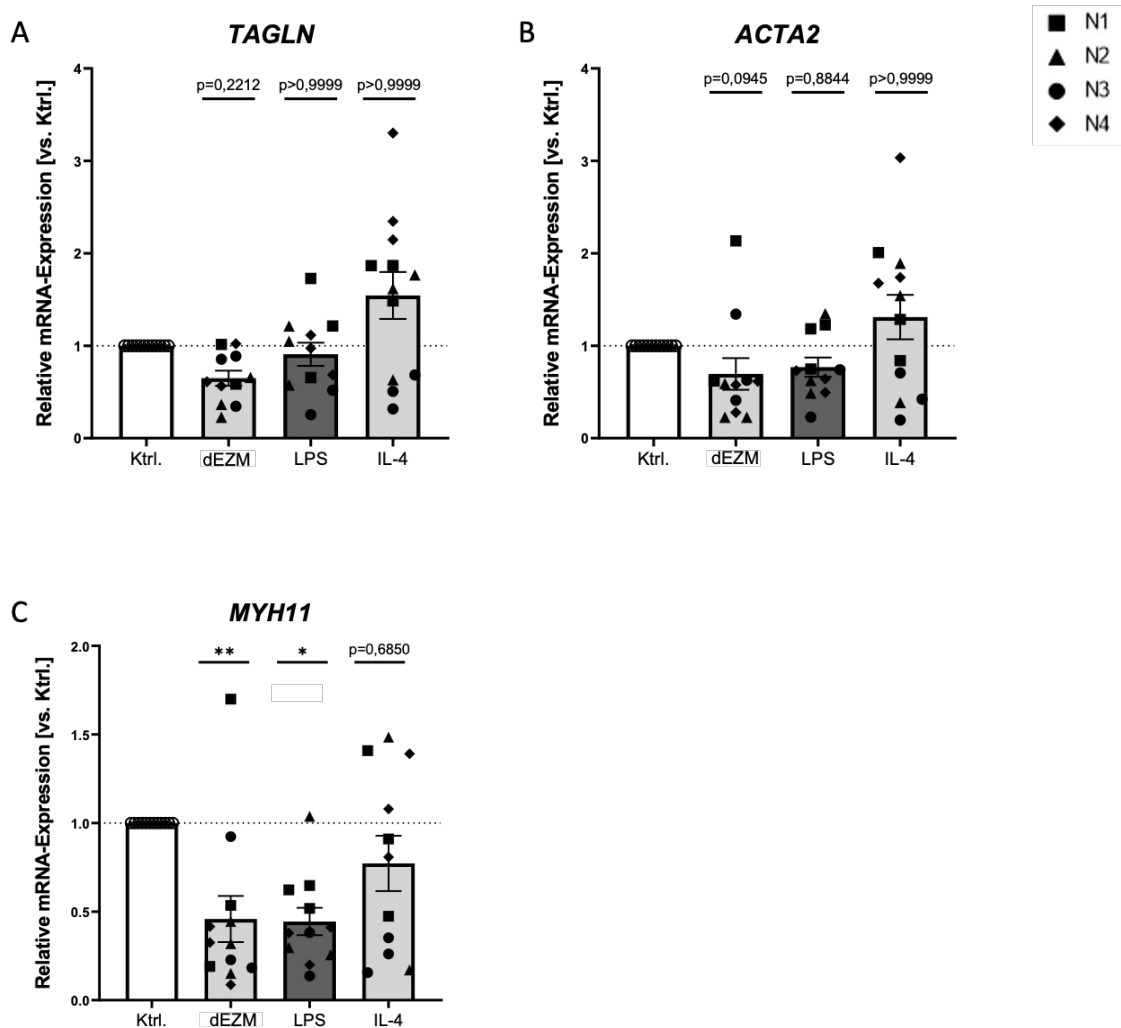


Abb. 13: Herunterregulierung kontraktile Marker nach 48 Stunden dEZM-Kontakt
Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (y-Achse) in Abhängigkeit von der jeweiligen Kultivierungsbedingung (x-Achse). Transgelin (A) und Smooth Muscle α -Actin (B) waren durch dEZM-Kontakt tendenziell herunterreguliert im Vergleich zur Kontrolle (TAGLN: $p=0,2212$, fold change 0,65; ACTA2: $p=0,0945$, fold change 0,70). Myosin Heavy Chain 11 (C) war signifikant herunterreguliert in der dEZM- ($p < 0,01$, fold change 0,46) und der LPS-Gruppe ($p < 0,05$). Balken dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler (Mean $\pm$ SEM), $n = 4$. * entspricht $p < 0,05$ ** entspricht $p < 0,01$. Die Legende oben rechts zeigt die zu den unterschiedlichen biologischen Replikaten (N1-N4) gehörenden Datenpunkte an. Es wurden vier biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten gemessen. dEZM: dezellularisierte extrazelluläre Matrix, IL-4: Interleukin 4, Ktrl: Kontrolle, LPS: Lipopolysaccharid.

Die Gene, welche für die proinflammatorischen Chemokine CCL2 und CXCL1 sowie das Adhäsionsmolekül VCAM1 codieren, waren nur in der LPS-Gruppe signifikant hochreguliert ($p < 0,01$ für CCL2 und $p < 0,001$ für CXCL1), während der Kontakt mit der dEZM nicht zu einer erhöhten Expression dieser Gene führte (Abb. 14). Bei VCAM1 und CXCL1 gab es zudem signifikante Unterschiede zwischen der LPS- und der dEZM-

Gruppe sowie zwischen der LPS- und der IL-4-Gruppe (Abb. 14, 15). Dies unterstreicht die nur nach LPS-Stimulation erfolgte Hochregulierung der Gene. Zudem gab es keine Regulation des für den Transkriptionsfaktor NF- κ B1 codierenden Gens *NFKB1* in der dEZM- und der LPS-Gruppe, während das Gen bei IL-4-Stimulation tendenziell herunterreguliert war (Abb. 15). Zusätzlich war in der dEZM-Gruppe eine Tendenz zur Hochregulierung des für den Osteoblasten-Marker *Bone Morphogenetic Protein 2* codierenden Gens *BMP2* nachweisbar ($p=0,0633$, *fold change* 3,94), während *BMP2* in der LPS-Kontrollgruppe signifikant überexprimiert war ($p < 0,01$). Bei diesem Gen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dEZM- und LPS-Gruppe (Abb. 15).

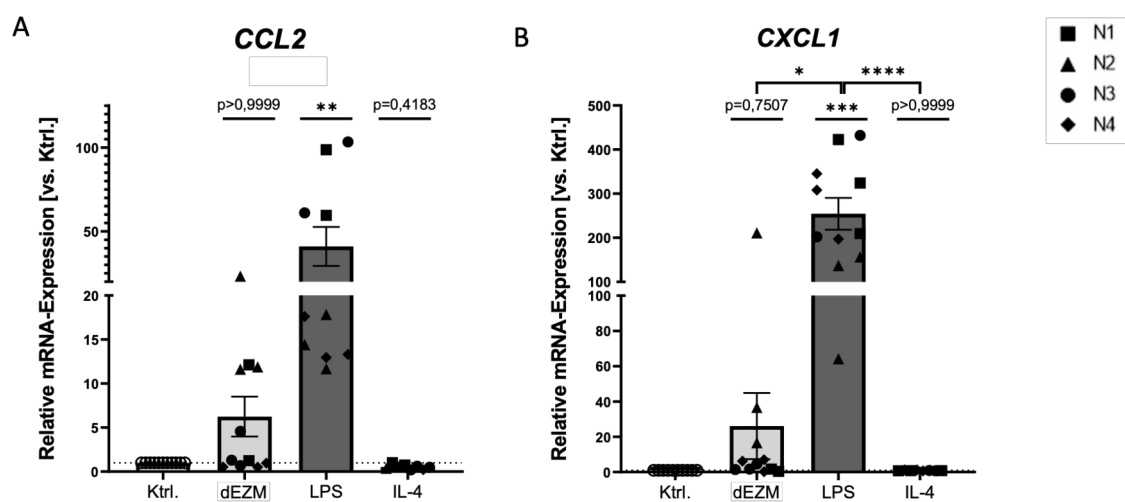


Abb. 14: Unveränderte Expression proinflammatorischer Chemokine nach 48 Stunden dEZM-Kontakt

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (y-Achse) in Abhängigkeit von der jeweiligen Kultivierungsbedingung (x-Achse). *CCL2* (A) und *CXCL1* (B) waren signifikant hochreguliert in der LPS-Polarisierungskontrollgruppe im Vergleich zur Kontrolle. In der dEZM-Gruppe zeigte sich kein Hinweis auf vermehrte Expression dieser Gene. Balken dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler (Mean $\pm$ SEM), $n = 4$. * entspricht $p < 0,05$ ** entspricht $p < 0,01$ *** entspricht $p < 0,001$. Die Legende oben rechts zeigt die zu den unterschiedlichen biologischen Replikaten (N1-N4) gehörenden Datenpunkte an. Es wurden vier biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten gemessen. dEZM: dezellularisierte extrazelluläre Matrix, IL-4: Interleukin 4, Ktrl: Kontrolle, LPS: Lipopolysaccharid.

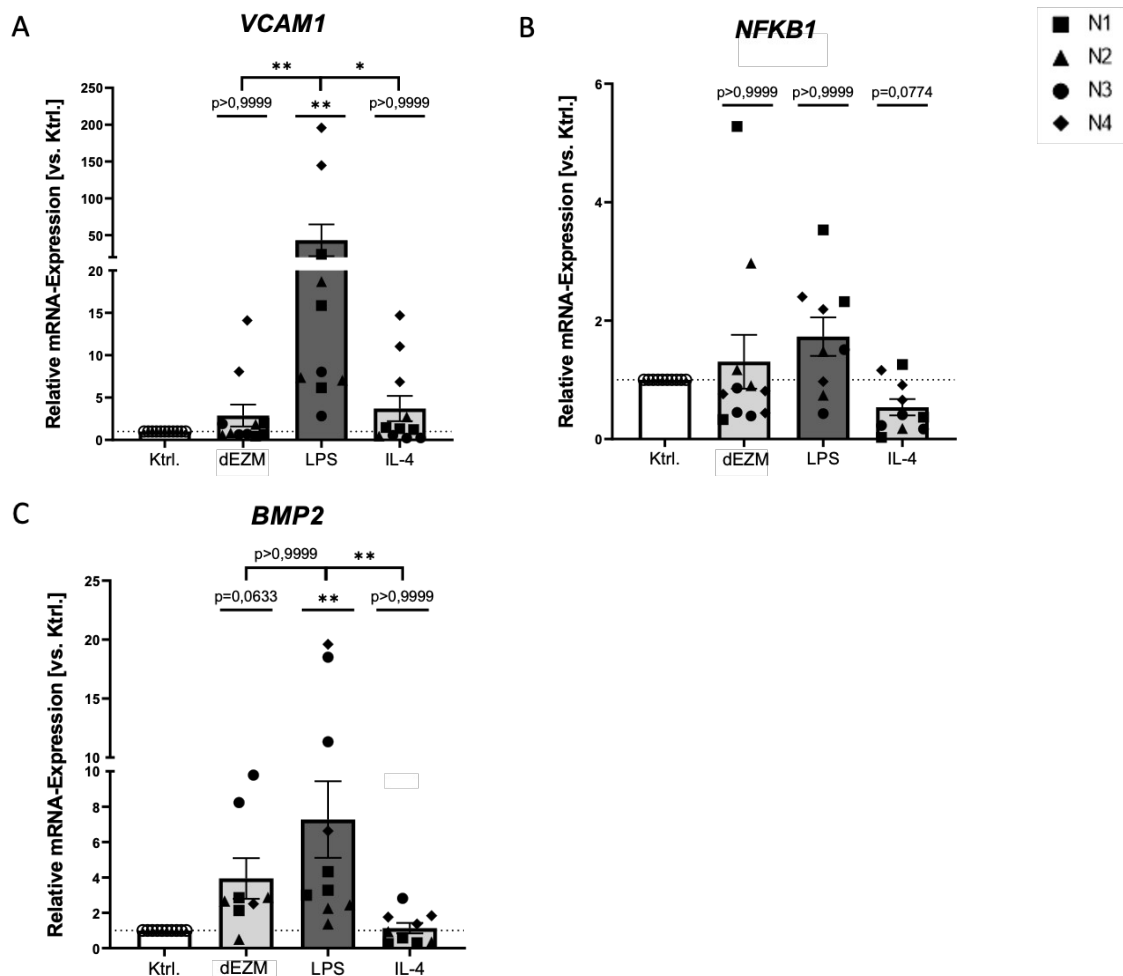


Abb. 15: Unveränderte Expression inflammatorischer Gene und Hochregulierung des Osteoblasten-Markers BMP2 nach 48 Stunden dEZM-Kontakt

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (y-Achse) in Abhängigkeit von der jeweiligen Kultivierungsbedingung (x-Achse). VCAM1 war signifikant hochreguliert in der LPS-Polarisierungs-kontrollgruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$). In der dEZM-Gruppe bestand kein Hinweis auf vermehrte Expression (A). NFKB1 war in keiner Gruppe hochreguliert und bei IL-4-Stimulation tendenziell herunterreguliert (B). Der Osteoblasten-Marker BMP2 war signifikant hochreguliert nach 24-stündiger LPS-Stimulation ($p < 0,01$) und es zeigte sich eine Tendenz zur vermehrten Expression in der dEZM-Gruppe ($p = 0,0633$, fold change 3,94), (C). Balken dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler (Mean $\pm$ SEM), $n = 4$. * entspricht $p < 0,05$ ** entspricht $p < 0,01$ *** entspricht $p < 0,001$. Die Legende oben rechts zeigt die zu den unterschiedlichen biologischen Replikaten (N1-N4) gehörenden Datenpunkte an. Es wurden vier biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten gemessen. dEZM: dezellularisierte extrazelluläre Matrix, IL-4: Interleukin 4, Ktrl: Kontrolle, LPS: Lipopolysaccharid.

3.6 Vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach 48-stündigem dEZM-Kontakt

Es wurde die absolute Sekretion der Zytokine in pg/ml betrachtet. Die Multiplex-Immunoassay-Messung der proinflammatorischen Zytokine ergab in VSMCs nach

dEZM-Kontakt eine vermehrte Ausschüttung von CXCL1 (194,69 pg/ml) und IL-6 (2090,67 pg/ml) im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe (89,2 pg/ml für CXCL1 bzw. 904,48 pg/ml für IL-6). Die Unterschiede waren für CXCL1 statistisch signifikant ($p < 0,05$). Bei CCL2 war eine Tendenz zur vermehrten Sekretion vorhanden (3650,38 pg/ml in dEZM-Gruppe vs. 1665,83 pg/ml in Kontrollgruppe). Die LPS-Stimulation führte bei allen drei Zytokinen zu einer signifikanten Erhöhung der Sekretion (14244,84 pg/ml für CXCL1, 38311,23 pg/ml für CCL2 bzw. 15396,53 pg/ml für IL-6), (Abb. 16). Der Assay wurde mit vier biologischen Replikaten durchgeführt. Aufgrund der hohen Streuung und Abweichung der Werte eines Tieres wurde dieses aus der Auswertung ausgeschlossen, sodass nur drei Tiere für die Auswertung betrachtet wurden. Die anderen im Assay gemessenen Zytokine waren in keiner der Gruppen erhöht und werden hier deshalb nicht aufgeführt.

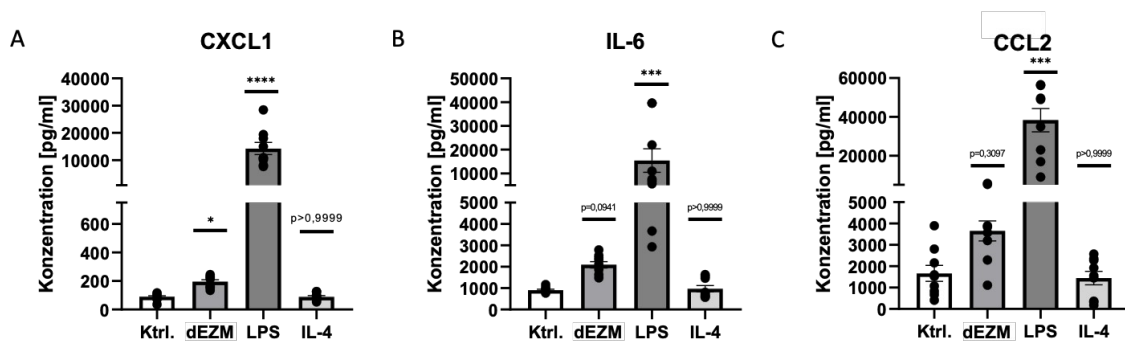


Abb. 16: Vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine nach 48 Stunden

Dargestellt ist die absolute Zytokinsekretion in pg/ml (y-Achse) in Relation zu der jeweiligen Kultivierungsbedingung (x-Achse). In der dEZM-Gruppe war CXCL1 signifikant hochreguliert (194,69 pg/ml, $p < 0,05$) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (89,2 pg/ml), (A). Bei IL-6 bestand eine Tendenz ($p=0,0941$) zur Hochregulierung (2090,67 pg/ml), (B). Bei CCL2 bestand in der dEZM-Gruppe ebenfalls eine Tendenz zur Hochregulierung (3650,38 pg/ml), (C). In der LPS-Polarisierungskontrollgruppe waren alle drei Zytokine signifikant hochreguliert (A-C). Bei IL-4-Stimulation bestand kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Balken dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler (Mean $\pm$ SEM), $n = 3$. * entspricht $p < 0,05$ *** entspricht $p < 0,001$ **** entspricht $p < 0,0001$. dEZM: dezellularisierte extrazelluläre Matrix, IL-4: Interleukin 4, Ktrl: Kontrolle, LPS: Lipopolysaccharid.

3.7 ALP-Assay ohne Aussagewert

Es wurde die Absorption, angegeben als *Optical Density* (OD) gemessen. In allen Bedingungen wurde als Nachweis einer ALP-Aktivität makroskopisch ein gelber Farbumschlag sichtbar. Es ergaben sich in der Absorptionsmessung keine relevanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konditionen. Während die *Background*-Kontrolle erfolgreich war und es zu keiner Farbreaktion kam, konnte im unstimulierten Medium jedoch ebenfalls eine vergleichbare bzw. höhere ALP-Aktivität (OD=1,34) als in

den Medium-Überständen der VSMCs (SMC-Kontrollgruppe: OD=1,3; dEZM-Gruppe: OD=0,77; LPS-Gruppe: OD=0,89; IL-4-Gruppe: OD=0,69) detektiert werden. Der Assay war aus diesem Grund nicht sinnvoll auswertbar und hatte keinen relevanten Aussagewert (Abb. 17).

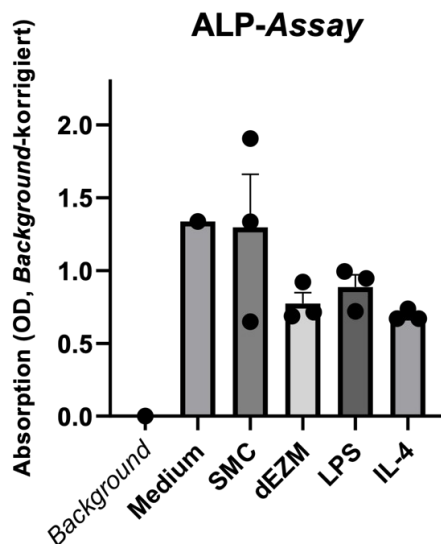


Abb. 17: ALP-Assay

Dargestellt ist die Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm in den unterschiedlichen Gruppen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Gruppen aufgeführt, auf der y-Achse stellt sich die Absorption, angegeben als Optical density (OD), dar. Es zeigt sich eine fehlende Absorption in der Background-Kontrolle. Alle anderen Gruppen und auch die Medium-Kontrollgruppe weisen eine vermehrte Absorption auf. Es bestehen keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Balken dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler (Mean $\pm$ SEM), $n = 1$. dEZM: dezellularisierte extrazelluläre Matrix, IL-4: Interleukin 4, LPS: Lipopolysaccharid, SMC: Smooth muscle cells (unbehandelte Kontrolle).

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der DET-Dezellularisierung

Die große Bedeutung einer effektiven Dezellularisierung wurde in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien erkannt. Obwohl Herzklappen zu den immunprivilegierten Geweben zählen und deshalb vor der Implantation von *Homografts* kein HLA- und AB0-Blutgruppen-Matching durchgeführt wird (65), korrelieren erhöhte Anti-HLA-Klasse-I-Titer mit einer vermehrten Prothesendegeneration bei Implantation konventioneller kryokonservierter *Homografts* (66). Bei dezellularisierten *Homografts* konnten keine erhöhten Antikörpertiter nachgewiesen werden (67), was die Bedeutung der Dezellularisierung unterstreicht. In den oben beschriebenen Dezellularisierungs-Qualitätskontrollen erwies sich die Detergens-basierte Dezellularisierung als effektive

Methode zur Elimination zellulärer Bestandteile. Eine nahezu vollständige DNA-Freiheit konnte durch einen zusätzlichen DNase-Verdau erzielt werden (Abb. 9). Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Versuche überein, in denen bei Anwendung dieser Methode histologisch keine Zellen detektiert werden konnten (31). Da nicht nur Zellen, sondern auch verbliebene DNA eine Immunantwort auslösen kann (13), ist somit eine Kombination zwischen DET-Dezellularisierung und DNase I-Verdau sinnvoll und effektiv.

4.2 Interaktion zwischen glatten Muskelzellen und dEZM

In dem Interaktionsexperiment konnte gezeigt werden, dass eine Bedingung für die weiteren Experimente, also das Vorhandensein eines direkten Kontaktes zwischen dEZM und VSMCs, erfüllt war (Abb. 11). Es lässt sich jedoch in der zweidimensionalen Abbildung nicht genau sagen, ob sich die Zellen nur an der Oberfläche festsetzten oder auch in die Tiefe einwanderten. In früheren präklinischen und klinischen Studien wurde nach Explantation von TEHV eine Wiederbesiedlung des Implantats mit Zellen, u. a. auch glatten Muskelzellen, beobachtet, die am ehesten durch eine Migration aus der Aortenwand bedingt war (16, 21, 43). In der vorliegenden Arbeit konnte die Annahme bestätigt werden, dass aortale glatte Muskelzellen *in vitro* zu der dezellularisierten Prothese wandern können. Somit ist es wahrscheinlich, dass VSMCs neben den mesenchymalen Stammzellen an Repopulation und *Remodeling* von TEHV beteiligt sind.

4.3 Spezifischer dEZM-VSMC-Phänotyp

Weiterhin wurde untersucht, welchen Phänotyp die VSMCs bei Kontakt mit der dEZM annehmen. Die Herunterregulierung der kontraktile Marker in der RT-PCR (Abb. 13) spricht dafür, dass es zu einer De-Differenzierung kam (48). Die Expression der kontraktile Gene wird durch den Transkriptionsfaktor Myocardin (*MYOCD*) gesteuert, welcher u. a. durch inflammatorische Signalwege wie den NF- κ B-*Pathway* hemmbar ist (47). Während es sich bei *Smooth Muscle α -Actin* (*ACTA2*) um einen Phänotypen-übergreifenden Marker handelt, ist der kontraktionsmodulierende Marker SM-22 α /Transgelin (*TAGLN*) am ehesten typisch für den kontraktile SMC-Phänotyp. Beide Proteine sind jedoch nicht auf glatte Muskelzellen beschränkt (48, 68). Ein besonders wichtiges Protein ist deshalb *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain 11* (*MYH11*). Dieses kommt nur in glatten Muskelzellen vor. Es handelt sich um den spezifischsten Marker für ausdifferenzierte kontraktile glatte Muskelzellen (48). Auch wenn *MYH11* rasch herunterreguliert wird, bleibt es nach einem Wechsel des Phänotyps

weiterhin exprimiert (44, 48). Dies konnte in der RT-PCR bestätigt werden und deutet auf einen Phänotyp-Wechsel hin.

Während im *Multiplex-Immunoassay* die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine CCL2, IL-6 und CXCL1 nach dEZM-Kontakt erhöht war (Abb. 16), zeigte sich dieser Effekt nicht auf Transkriptionsebene bei den in der RT-PCR gemessenen Genen *CXCL1* und *CCL2* (Abb. 14). Auch die weiteren mit Inflammation assoziierten Gene *VCAM1* und *NFKB1* (69, 70) waren nicht reguliert (Abb. 15). Es ist denkbar, dass es in den ersten Stunden zu einer kurzfristigen Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen kam. Eine längerfristige Synthese war nach 48 Stunden jedoch nicht mehr nachweisbar. Dies weist somit darauf hin, dass initial zwar eine kurzfristige proinflammatorische Antwort auf die dEZM auftritt, diese Reaktion jedoch nur von kurzer Dauer ist. Am ehesten erfolgt sowohl die Herunterregulierung der kontraktile Marker als auch die Synthese der proinflammatorischen Zytokine über den NF- κ B-Weg durch Erkennen von dEZM-Bestandteilen über *Pattern recognition receptors* (PRR), da es sich hierbei um einen zentralen Signalweg bei Inflammation handelt und auch eine negative Beeinflussung des für die Synthese der kontraktile Marker wichtigen Transkriptionsfaktors Myocardin bekannt ist (47, 70), (Abb. 18). Bei fehlender Stimulation ist NF- κ B an bestimmte Inhibitor-Proteine, u. a. den *Inhibitor of NF- κ B α* (I κ B α), gebunden. Bei Aktivierung des Signalwegs wird I κ B α durch eine Kinase (IKK) phosphoryliert und Ubiquitin-abhängig im Proteasom abgebaut, sodass NF- κ B freigesetzt wird und im Zellkern wirken kann (70). Somit wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B am ehesten nicht neu synthetisiert, sondern enthemmt. Dies erklärt die auch in der LPS-Gruppe fehlende Überexpression von NF- κ B auf Genebene (Abb. 15).

Die Polarisierungskontrolle mit LPS war erfolgreich und führte zu einer Expression Makrophagen-typischer Gene (Abb. 14, 15). Da dies nicht auf die SMCs nach dEZM-Kontakt zutraf, kann der Phänotypwechsel in Richtung Makrophagen-ähnlicher Zellen weitgehend ausgeschlossen werden. Die Stimulation mit IL-4, welches als antiinflammatorisches Zytokin bekannt ist (71) und bei VSMCs den synthetischen Phänotyp fördert (56), zeigte keine eindeutige Polarisierung. Dies lag daran, dass während der Experimente keine spezifischen synthetischen Marker betrachtet wurden, da dies nicht dem Fokus der vorliegenden Arbeit entsprach. Es zeigte sich jedoch, dass unter IL-4-Stimulation keine Hochregulierung der Expression proinflammatorischer Gene und keine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erfolgte. Somit fand hier durchaus eine antiinflammatorische Polarisierung statt. Da sich die dEZM- und die IL-4-Gruppe mehrheitlich in ihrer

Genexpression und Zytokinsekretion unterschieden haben, lässt sich festhalten, dass die SMCs nach dEZM-Kontakt keinen antiinflammatorischen Phänotyp annehmen. Interessant war zudem die frühe Tendenz zur Überexpression von *BMP2* (Abb. 15) als Marker des osteoblastischen Phänotyps, da das Auftreten von Kalzifizierung erst im Rahmen der fortgeschrittenen Atherosklerose und Aortenklappendegeneration beschrieben wird (72, 73). *BMP2* fördert zudem die De-Differenzierung weiterer VSMCs zu osteoblastischen Zellen (74). Die bereits nach 48 Stunden dEZM-Kontakt auf Gen-Ebene erhöhte Expression kann darauf hindeuten, dass VSMCs unmittelbar an der Verkalkung von TEHV-Prothesen beteiligt sind und diese einleiten. Andererseits wäre auch denkbar, dass es sich nur um eine kurzfristige Reaktion auf Transkriptionsebene handelt. Deshalb sind in Zukunft weitere Experimente notwendig, in denen die Auswirkungen eines längeren dEZM-Kontakts untersucht werden.

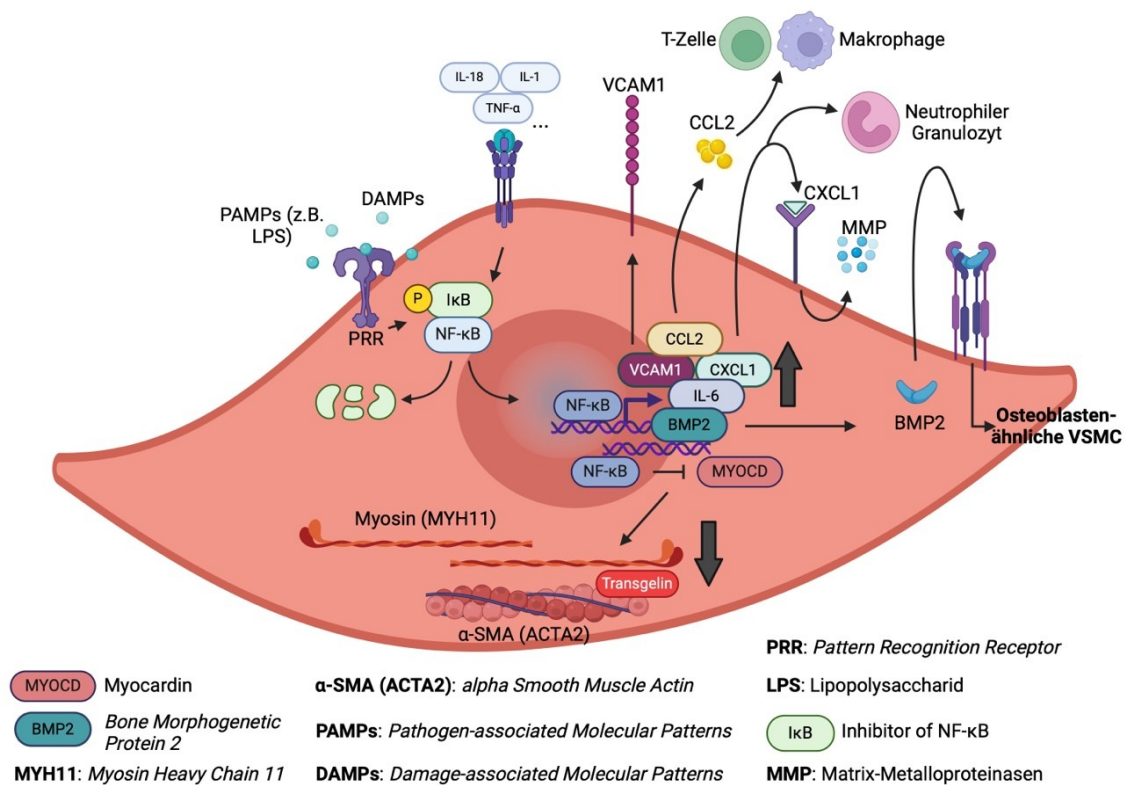


Abb. 18: Signalwege innerhalb der vaskulären glatten Muskelzelle

Durch proinflammatorische Zytokine, die an ihre Rezeptoren binden, löst sich der Inhibitor of NF-κB (IκB) von NF-κB, sodass dieser als Transkriptionsfaktor wirken kann. Andere Stimuli wie PAMPs (z.B. LPS) oder DAMPs (z.B. EZM-Trümmer) aktivieren den Pattern Recognition Receptor und enthemmen dadurch ebenfalls den NF-κB-Pathway. NF-κB bindet an seine Zielgene und bewirkt eine vermehrte Transkription von z.B. VCAM1, CCL2, CXCL1, IL-6 und BMP2. Während CCL2, CXCL1 und VCAM1 die Rekrutierung weiterer Immunzellen ermöglichen, fördert BMP2 die Entdifferenzierung der VSMCs zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Zusätzlich wird die Synthese des Transkriptionsfaktors Myocardin durch NF-κB gehemmt, sodass die kontraktile Proteine Myosin Heavy Chain 11, Alpha Smooth Muscle Actin und Transgelin vermindert produziert werden. Erstellt in Biorender.com

Um der Hypothese nachzugehen, ob sich VSMCs nach dEZM-Kontakt auch funktionell wie Osteoblasten-ähnliche Zellen verhalten, wurde der ALP-Assay durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass das für die Kultivierung der Zellen verwendete Medium, welches als Kontrolle diente, eine endogene ALP-Aktivität aufwies (Abb. 17). Dies war bedingt durch das dem Medium hinzugefügte, ALP-enthaltende FCS. Eine Auswertung des Assays war somit nicht möglich, da exogenes ALP in niedrigen Konzentrationen die endogene ALP-Aktivität der Zellen erhöht und in hohen Konzentrationen hemmt (75). Dadurch ließ sich nicht sagen, ob die gemessene, geringe ALP-Aktivität aus dem FCS oder von zellulär stammte. Bei einer stärkeren Erhöhung der zellulären ALP-Aktivität würde sich der Effekt des FCS möglicherweise relativieren. Nach 48 Stunden war die endogene ALP-Aktivität jedoch so niedrig bis nicht vorhanden, dass keine Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationsbedingungen detektiert werden konnten. Zudem war das Experiment nicht valide, weil die Medium-Überstände der unterschiedlichen Konditionen überwiegend eine geringere ALP-Aktivität aufwiesen als reines Medium. Um in künftigen Versuchen zu unterscheiden, ob es zu einer endogenen ALP-Produktion und somit osteoblastischen Differenzierung kommt oder ob der Effekt allein durch exogen zugeführtes FCS bedingt ist, könnte man die Zellen nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl vor Stimulationsbeginn für einige Tage in Medium ohne FCS kultivieren.

4.4 Limitationen der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Beteiligung von VSMCs an der TEHV-Degeneration. Bei Auswertung der Ergebnisse muss bedacht werden, dass es sich bei allen verwendeten Zellen nicht um eine reine VSMC-Kultur handelte, da die Aorta neben glatten Muskelzellen auch weitere Zelltypen enthält. In der primären Zellkultur waren somit initial u.a. auch Endothelzellen und Fibroblasten vorhanden. Da die Fibroblasten jedoch nach einigen Passagen nicht mehr nachweisbar sind (76) und die Endothelzellen spezielle Kulturbedingungen benötigen (77, 78), kann davon ausgegangen werden, dass die glatten Muskelzellen in der Kultur überwogen. Auch die typische Morphologie (Abb. 8) und die deutliche Expression vom *MYH11* als spezifischem SMC-Marker (48) in der RT-PCR (Abb. 13) belegt das Vorhandensein glatter Muskelzellen in dem Experiment. Für eine Reinkultur müsste der Zellisoliationsprozess modifiziert werden.

Bei der Betrachtung der PCR- und Multiplex-Daten zur Charakterisierung des SMC-Phänotyps muss zudem beachtet werden, dass SMCs in der *in vitro*-Zellkultur die

Expression ihrer kontraktilen Gene reduzieren und die Fähigkeit zur vermehrten Proliferation und Sekretion von EZM-Proteinen und Zytokinen erwerben (79, 80). Somit de-differenzieren sie auch ohne Stimulation zu einem synthetischen Phänotyp (44). Das dem Zellkulturmedium hinzugefügte FCS mit seinen enthaltenen Wachstumsfaktoren fördert hierbei diese De-Differenzierung (48). Für die vorliegende Arbeit spielt die De-Differenzierung jedoch zunächst eine untergeordnete Rolle, da hier ein relativer Vergleich zwischen den einzelnen Kulturbedingungen erfolgte. Um jedoch die Beibehaltung des kontraktilen Phänotyps vor Beginn des Experiments zu gewährleisten und in Zukunft die *in vivo*-Situation besser zu simulieren, könnte man auch hier die Zellen für einige Tage ohne FCS kultivieren. In einer früheren Studie an Atemwegs-SMCs zeigte sich, dass bei ausreichender Konfluenz und bei Verwendung von serumfreiem Medium zumindest eine Subpopulation ihre kontraktilen Marker zurückerlangen kann. Hierbei müsste jedoch ebenfalls bedacht werden, dass sich die kontraktilen SMCs *in vitro* dennoch funktionell von denen *in vivo* unterscheiden (81).

Zusätzlich besteht eine hohe Streuung der Datenpunkte in der PCR und im Multiplex-Assay. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass innerhalb der Aorta eine heterogene Verteilung der SMC-Phänotypen vorliegt, welche auch *in vitro* fortbesteht (81, 82).

Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit die zwei unterschiedlichen Spezies Schaf und Ratte betrachtet. Die im Multiplex-Assay gemessene initiale proinflammatorische Antwort (Abb. 16) könnte demnach durch eine Reaktion auf *xenogene* Bestandteile der Schafs-dEZM bedingt sein. Zum Teil ist dies mit der klinischen Situation vergleichbar, da *xenogene* TEHV aufgrund ihrer besseren Verfügbarkeit in Zukunft zunehmend an Bedeutung gewinnen könnten. Die Ergebnisse sind jedoch nur bedingt auf den Menschen übertragbar, da zum einen vor allem *porcine* oder *bovine* Gewebe als *Grafts* benutzt werden (7) und zum anderen Unterschiede zwischen Mensch und Ratte bestehen. Wichtig zu nennen ist hierbei das Fehlen von alpha-Galaktose in Menschen, während alle Nicht-Primaten-Säugetiere, darunter auch Nagetiere, das Molekül exprimieren (83). Dadurch konnte der Effekt von in TEHV nach Dezellularisierung verbleibender alpha-Galaktose auf VSMCs hier nicht untersucht werden.

Zudem handelt es sich um ein stark vereinfachtes Modell, da *in vivo* viele Faktoren bei der Integration und möglichen Degeneration von TEHV relevant sind. Zusätzlich zu den VSMCs sind auch z. B. Makrophagen und deren *Crosstalk* mit anderen Zellen von

Bedeutung (13). Außerdem wurden die Zellen in FCS-haltigem Medium kultiviert, was Einfluss auf deren Verhalten hatte (48, 75). Weitere *in vivo* relevante Faktoren wie Komorbiditäten, Alter und Besonderheiten des Immunsystems des Patienten, die eine Rolle bei der TEHV-Degeneration spielen können (3), konnten in dem Modell nicht berücksichtigt werden.

Für eine erste Einschätzung, ob glatte Muskelzellen ohne den Einfluss weiterer Faktoren bereits einen Effekt auf TEHV haben können, war das Modell dennoch gut geeignet. Zukünftig könnte man an eine realitätsnähere Ausarbeitung des Experiments mit zusätzlich größeren Replikatzahlen denken.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass glatte Muskelzellen bei Kontakt mit dezellularisierten Aortenklappenbiopsien de-differenzieren und ihren Phänotyp wechseln. Sie sind jedoch allein durch die PCR- und Multiplex-Daten nicht deutlich einem der beschriebenen Phänotypen zuzuordnen. Initial erfolgt eine kurzfristige proinflammatorische Antwort, jedoch keine Umwandlung zu Makrophagen-ähnlichen Zellen. Zudem gibt es Hinweise auf die Entwicklung in Richtung osteoblastischer Zellen. Hierbei muss untersucht werden, ob diese Antwort auch zu späteren Zeitpunkten nach Stimulationsbeginn nachweisbar ist und ob dies auch über die Transkriptionsebene hinausgeht. Hierfür wären weitere Methoden wie Durchflusszytometrie und eine Wiederholung des ALP-Assays hilfreich. Weiterhin sollte erforscht werden, welche dEZM-Komponenten ursächlich für die VSMC-De-Differenzierung sind. Das Annehmen eines osteoblastischen Phänotyps könnte bedeuten, dass vaskuläre glatte Muskelzellen an der Kalzifizierung von Aortenklappenprothesen beteiligt sind und dass der Prozess bereits nach 48 Stunden dEZM-Kontakt nachweisbar ist. Da bei der Prothesendegeneration die Kalzifizierung im Vordergrund steht (84) und diese wahrscheinlich von den glatten Muskelzellen ausgeht, ist eine weitere Fokussierung auf diese Zellen sinnvoll.

Für eine bessere Simulation der *in vivo*-Situation wäre die Verwendung humaner VSMCs in Kombination mit *porcinen* Herzklappen für vergleichbare Experimente möglich. Auch eine Messung der nach Dezellularisierung verbleibenden Xenoantigene kann erfolgen. Es wäre denkbar, dass VSMCs zukünftig als therapeutische Zielstrukturen dienen könnten, um einer TEHV-Verkalkung vorzubeugen und auf diese Weise die Verwendung *xenogener* TEHV als Alternative zu *Homografts* zu ermöglichen. Zusätzlich wäre es

wichtig, zu untersuchen, ob die zu der dEZM migrierenden VSMCs neue extrazelluläre Matrix produzieren und somit zu einem *Remodeling* der Prothese beitragen können.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153-e639.
2. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nature Reviews Cardiology*. 2011;8(3):162-72.
3. Fioretta ES, Motta SE, Lintas V, Loerakker S, Parker KK, Baaijens FPT, et al. Next-generation tissue-engineered heart valves with repair, remodelling and regeneration capacity. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(2):92-116.
4. Peters AS, Duggan JP, Trachiotis GD, Antevil JL. Epidemiology of Valvular Heart Disease. *Surgical Clinics of North America*. 2022;102(3):517-28.
5. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, et al. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med*. 2010;363(17):1597-607.
6. Gopal S, Hauser JM, Mahboobi SK. Mechanical Aortic Valve Replacement. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2022.
7. Rajput FA, Zeltser R. Aortic Valve Replacement. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2022.
8. Kostrzewa B, Rybak Z. [History, present and future of biomaterials used for artificial heart valves]. *Polim Med*. 2013;43(3):183-9.
9. Velho TR, Pereira RM, Fernandes F, Guerra NC, Ferreira R, Nobre Â. Bioprosthetic Aortic Valve Degeneration: a Review from a Basic Science Perspective. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2022;37(2):239-50.
10. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*. 2012;129(3):220-4.
11. Hellgren L, Granath F, Ekblom A, Ståhle E. Biological versus mechanical prosthesis in 3279 patients from the Swedish in-patients register. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. 2011;45(4):223-8.
12. Piper C, Körfer R, Horstkotte D. Prosthetic valve endocarditis. *Heart*. 2001;85(5):590-3.
13. Ground M, Waqanivavalagi S, Walker R, Milsom P, Cornish J. Models of immunogenicity in preclinical assessment of tissue engineered heart valves. *Acta Biomater*. 2021;133:102-13.
14. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, et al. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I559-65.
15. Dai J, Qiao W, Shi J, Liu C, Hu X, Dong N. Modifying decellularized aortic valve scaffolds with stromal cell-derived factor-1 α loaded proteolytically degradable hydrogel for recellularization and remodeling. *Acta Biomaterialia*. 2019;88:280-92.

16. Movileanu I, Harpa M, Al Hussein H, Harceaga L, Chertes A, Al Hussein H, et al. Preclinical Testing of Living Tissue-Engineered Heart Valves for Pediatric Patients, Challenges and Opportunities. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:707892.
17. Dohmen PM, Costa F, Yoshi S, Lopes SAV, Souza FPd, Vilani R, et al. An Experimental Study of Decellularized Xenografts Implanted Into the Aortic Position with 4 Months of Follow Up. *Journal of Clinical and Experimental Cardiology*. 2012;2013:0-.
18. Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A, Boethig D, Sarikouch S, Goerler A, et al. Use of Fresh Decellularized Allografts for Pulmonary Valve Replacement May Reduce the Reoperation Rate in Children and Young Adults. *Circulation*. 2011;124(11_suppl_1):S115-S23.
19. Bobylev D, Horke A, Boethig D, Hazekamp M, Meyns B, Rega F, et al. 5-Year results from the prospective European multi-centre study on decellularized homografts for pulmonary valve replacement ESPOIR Trial and ESPOIR Registry data. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2022;62(5).
20. Horke A, Tudorache I, Laufer G, Andreas M, Pomar JL, Pereda D, et al. Early results from a prospective, single-arm European trial on decellularized allografts for aortic valve replacement: the ARISE study and ARISE Registry data. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2020;58(5):1045-53.
21. Sarikouch S, Theodoridis K, Hilfiker A, Boethig D, Laufer G, Andreas M, et al. Early Insight Into In Vivo Recellularization of Cell-Free Allogenic Heart Valves. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2019;108(2):581-9.
22. Konertz W, Dohmen PM, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S, et al. Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(1):78-81.
23. Konertz W, Angeli E, Tarusinov G, Christ T, Kroll J, Dohmen PM, et al. Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease. *J Heart Valve Dis*. 2011;20(3):341-7.
24. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;23(6):1002-6; discussion 6.
25. Tao G, Kotick JD, Lincoln J. Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:203-32.
26. Jana S, Franchi F, Lerman A. Fibrous heart valve leaflet substrate with native-mimicked morphology. *Appl Mater Today*. 2021;24.
27. Mulholland DL, Gotlieb AI. Cell biology of valvular interstitial cells. *Can J Cardiol*. 1996;12(3):231-6.
28. Lee SH, Choi J-H. Involvement of Immune Cell Network in Aortic Valve Stenosis: Communication between Valvular Interstitial Cells and Immune Cells. *Immune Netw*. 2016;16(1):26-32.
29. Timchenko E, Timchenko P, Lichtenberg A, Assmann A, Aubin H, Akhyari P, et al. Assessment of decellularization of heart bioimplants using a Raman spectroscopy method. *Journal of Biomedical Optics*. 2017;22(9):091511.

30. Lichtenberg A, Cebotari S, Tudorache I, Sturz G, Winterhalter M, Hilfiker A, et al. Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2006;15(2):287-93; discussion 93-4.
31. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Ringes-Lichtenberg S, Sturz G, Hoeffler K, et al. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials.* 2006;27(23):4221-9.
32. Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: Current challenges and future research perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1999;47(4):439-65.
33. Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *Am J Pathol.* 1986;123(1):134-45.
34. Salomon RN, Friedman GB, Callow AD, Payne DD, Libby P. Cryopreserved aortic homografts contain viable smooth muscle cells capable of expressing transplantation antigens. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106(6):1173-80.
35. Bozso SJ, EL-Andari R, Al-Adra D, Moon MC, Freed DH, Nagendran J, et al. A review of the immune response stimulated by xenogenic tissue heart valves. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2021;93(4):e13018.
36. Kuravi KV, Sorrells LT, Nellis JR, Rahman F, Walters AH, Matheny RG, et al. Allergic response to medical products in patients with alpha-gal syndrome. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2022;164(6):e411-e24.
37. Kulski JK, Shiina T, Dijkstra JM. Genomic Diversity of the Major Histocompatibility Complex in Health and Disease. *Cells.* 2019;8(10).
38. van Steenberghe M, Schubert T, Gerelli S, Bouzin C, Guiot Y, Xhema D, et al. Porcine pulmonary valve decellularization with NaOH-based vs detergent process: preliminary in vitro and in vivo assessments. *Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2018;13(1):34.
39. Theodoridis K, Müller J, Ramm R, Findeisen K, Andrée B, Korossis S, et al. Effects of combined cryopreservation and decellularization on the biomechanical, structural and biochemical properties of porcine pulmonary heart valves. *Acta Biomaterialia.* 2016;43:71-7.
40. Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Weigel G, Simon P. Presence and Elimination of the Xenoantigen Gal (α 1, 3) Gal in Tissue-Engineered Heart Valves. *Tissue Engineering.* 2005;11(7-8):1274-80.
41. Badylak SF. Decellularized Allogeneic and Xenogeneic Tissue as a Bioscaffold for Regenerative Medicine: Factors that Influence the Host Response. *Annals of Biomedical Engineering.* 2014;42(7):1517-27.
42. Shen YH, LeMaire SA, Webb NR, Cassis LA, Daugherty A, Lu HS. Aortic Aneurysms and Dissections Series. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(3):e37-e46.
43. Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *The Annals of Thoracic Surgery.* 2000;70(6):1962-9.

44. Sorokin V, Vickneson K, Kofidis T, Woo CC, Lin XY, Foo R, et al. Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. *Front Immunol*. 2020;11:599415.
45. Latif N, Sarathchandra P, Chester AH, Yacoub MH. Expression of smooth muscle cell markers and co-activators in calcified aortic valves. *European Heart Journal*. 2015;36(21):1335-45.
46. Khachigian LM, Black BL, Ferdinandy P, De Caterina R, Madonna R, Geng Y-J. Transcriptional regulation of vascular smooth muscle cell proliferation, differentiation and senescence: Novel targets for therapy. *Vascular Pharmacology*. 2022;146:107091.
47. Grootaert MOJ, Bennett MR. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovascular Research*. 2021;117(11):2326-39.
48. Beamish JA, He P, Kottke-Marchant K, Marchant RE. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(5):467-91.
49. Yang X, Coriolan D, Murthy V, Schultz K, Golenbock DT, Beasley D. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(3):H1069-H76.
50. Hao N, Zhou Z, Zhang F, Li Y, Hu R, Zou J, et al. Interleukin-29 Accelerates Vascular Calcification via JAK2/STAT3/BMP2 Signaling. *J Am Heart Assoc*. 2023;12(1):e027222.
51. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993;91(4):1800-9.
52. Mehrabi MR, Sinzinger H, Ekmekcioglu C, Tamaddon F, Plesch K, Glogar HD, et al. Accumulation of oxidized LDL in human semilunar valves correlates with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45(4):874-82.
53. Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(8, Supplement):C7-C12.
54. Bian W, Wang Z, Sun C, Zhang D-M. Pathogenesis and Molecular Immune Mechanism of Calcified Aortic Valve Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;8.
55. Shetty R, Pibarot P, Audet A, Janvier R, Dagenais F, Perron J, et al. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009;39(6):471-80.
56. Wei LH, Yang Y, Wu G, Ignarro LJ. IL-4 and IL-13 upregulate ornithine decarboxylase expression by PI3K and MAP kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2008;294(5):C1198-C205.
57. Manzini G, Barcellona ML, Avitabile M, Quadrioglio F. Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Research*. 1983;11(24):8861-76.

58. Qiagen. Quick-Start Protocol. QIAamp® DNA Mini Kit 2018. p. 2.
59. Qiagen. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook [Manual] 2016.
60. Qiagen. RNeasy® Micro Handbook [Handbook] 2021.
61. Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *Biospektrum*. 2009;15:512-4.
62. Qiagen. QuantiTect® Reverse Transcription Handbook [Manual] 2009.
63. Promega. TECHNICAL MANUAL GoTaq® qPCR Master Mix [Manual]. Madison, WI 2018.
64. Haarhaus M, Arnqvist HJ, Magnusson P. Calcifying Human Aortic Smooth Muscle Cells Express Different Bone Alkaline Phosphatase Isoforms, Including the Novel B1x Isoform. *Journal of Vascular Research*. 2013;50(2):167-74.
65. Hill MA, Kwon JH, Gerry B, Hardy WA, Walkowiak OA, Kavarana MN, et al. Immune Privilege of Heart Valves. *Frontiers in Immunology*. 2021;12.
66. Welters MJP, Oei FBS, Witvliet MD, Vaessen LMB, Cromme-Dijkhuis AH, Bogers AdJJ, et al. A broad and strong humoral immune response to donor HLA after implantation of cryopreserved human heart valve allografts. *Human Immunology*. 2002;63(11):1019-25.
67. Coti I, Wenda S, Andreeva A, Kocher A, Laufer G, Fischer G, et al. Donor-specific HLA antibodies after fresh decellularized vs cryopreserved native allograft implantation. *HLA*. 2020;96(5):580-8.
68. Je HD, Sohn UD. SM22alpha is required for agonist-induced regulation of contractility: evidence from SM22alpha knockout mice. *Mol Cells*. 2007;23(2):175-81.
69. Troncoso MF, Díaz-Vesga MC, Sanhueza-Olivares F, Riquelme JA, Müller M, Garrido L, et al. Targeting VCAM-1: a therapeutic opportunity for vascular damage. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2023:1-17.
70. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2(1):17023.
71. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front Immunol*. 2014;5:253.
72. Trion A, van der Laarse A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *American Heart Journal*. 2004;147(5):808-14.
73. Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *European Cardiology Review* 2015;10(2):108–12. 2015.
74. Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):271-7.

75. Ansari S, Ito K, Hofmann S. Alkaline Phosphatase Activity of Serum Affects Osteogenic Differentiation Cultures. *ACS Omega*. 2022;7(15):12724-33.
76. Chi J, Meng L, Pan S, Lin H, Zhai X, Liu L, et al. Primary Culture of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells: A New Method. *Med Sci Monit*. 2017;23:4014-20.
77. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. *The Journal of Clinical Investigation*. 1973;52(11):2745-56.
78. Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *Journal of Immunological Methods*. 2001;254(1):183-90.
79. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):692-702.
80. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. *Annual Review of Physiology*. 2012;74(1):13-40.
81. Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, Vieira JE, Mitchell RW, Wylam ME, et al. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1999;276(1):L197-L206.
82. Halayko AJ, Solway J. Invited Review: Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology*. 2001;90(1):358-68.
83. Choudhary SK, Karim S, Iweala OI, Choudhary S, Crispell G, Sharma SR, et al. Tick salivary gland extract induces alpha-gal syndrome in alpha-gal deficient mice. *Immun Inflamm Dis*. 2021;9(3):984-90.
84. Human P, Bezuidenhout D, Aikawa E, Zilla P. Residual Bioprosthetic Valve Immunogenicity: Forgotten, Not Lost. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;8.

6 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hug Aubin für die sehr gute Betreuung, die Förderung und die Ermöglichung der Mitarbeit an diesem Projekt bedanken. Er nahm sich immer die Zeit, gab sehr hilfreiche Anregungen zu meiner Arbeit und unterstützte stets mein Interesse für die Herzchirurgie.

Ich bedanke mich zudem bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg, Leiter der Klinik für Herzchirurgie, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik durchzuführen und für die Unterstützung meines Projekts.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. Stephan Sixt aus der Klinik für Anästhesiologie für die Ko-Betreuung meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Frau Dr. rer. nat. Elvira Weber. Sie war während meines im Labor verbrachten Jahres und auch darüber hinaus immer für mich da und konnte mir bei all meinen fachlichen und nicht-fachlichen Fragen jederzeit weiterhelfen. Ich danke ihr für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Meinen großen Dank möchte ich Frau Dr. rer. nat. Vera Schmidt für ihre tatkräftige Unterstützung bei diesem Projekt ausdrücken. Sie teilte ihr umfassendes Wissen mit mir und konnte mich bei allen Fragen mit Rat und Tat unterstützen. Ich danke ihr auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und ihre vielen hilfreichen Tipps.

Ich danke auch dem gesamten Team des CURE 3D-Labors, insbesondere Roya, Melanie, Sarah, Kevin, Philipp, Sinje, Aleya, Leah, Lara und Oliver für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne gemeinsame Zeit. Sie waren für mich eine große Stütze.

Ich bedanke mich zudem bei der AG von Frau Prof. Dr. Eva Bartok aus Bonn für die Durchführung der Messung des Multiplex-Assay und die Bereitstellung der Messwerte.

Vielen Dank auch an das Genomics & Transcriptomics Labor der HHU für die Qualitätskontrolle der RNA und die Bereitstellung der Abbildungen.

Mein Dank gilt darüber hinaus der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung des Gesamtprojekts „TRR 259 – Aortic Disease“.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Freunden dafür bedanken, dass sie für mich da sind und mich immer unterstützen. Mein großer Dank geht auch an meine Familie, dafür dass sie immer hinter mir steht und mir bei allen Herausforderungen auf meinem Weg Rückhalt gibt. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.