

# **Der Einfluss der Exozytose und der endosomalen Reifung auf die vesikel-vermittelte vaskuläre Kalzifizierung**

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Joel Simon

aus Essen

Berichterinnen: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. Claudia Göttisch  
Privatdozentin Dr. Heidi Noels, Ph.D.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

# I Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Chronische Gefäßerkrankung als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse	1
1.2	Chronische Nierenerkrankung als Komorbidität der chronischen Gefäßerkrankung	3
1.3	Die Pathophysiologie der chronischen Gefäßerkrankung – Kalzifizierung als Risikofaktor	5
1.4	Vaskuläre Kalzifizierung – Extrazelluläre Vesikel als Vermittler der Gefäßverkalkung	8
1.4.1	Endozytose, endosomale Reifung und Exozytose als humanbiologische Basisprinzipien	10
1.4.2	Rab-Proteine als Regulatoren der Exozytose und endosomalen Reifung	14
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	Materialliste	20
3.2	Puffer und Lösungen	26
3.3	Methoden	27
3.3.1	Zellbiologische Methoden	27
3.3.1.1	Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen	27
3.3.1.2	Subkultivierung von Zellen	27
3.3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	28
3.3.1.4	In vitro Modelle der Gefäßverkalkung	29
3.3.1.5	Inhibition von Rab7 und Rab27	29
3.3.1.6	Konditioniertes Medium zur Analyse extrazellulärer Vesikel	30
3.3.1.7	Bestimmung der Zellvitalität mittels Resazurin-Reduktion	30
3.3.1.8	Bestimmung der Zellvitalität mittels Fluoreszeindiacetat-Propidiumiodid-Färbung	31
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	32
3.3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure Assay	32
3.3.2.2	Isolation der Ribonukleinsäure mittels TRIzol™	33

3.3.2.3	Synthese komplementärer DNA durch reverse Transkription	33
3.3.2.4	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	35
3.3.3.	Methoden zur Detektion der Gefäßverkalkung	37
3.3.3.1	Bestimmung der Matrixmineralisierung mittels Alizarin Rot Färbung	37
3.3.3.2	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase	37
3.3.4	Methoden zur Quantifikation von extrazellulären Vesikeln	39
3.3.4.1	Bestimmung der Anzahl und Größe extrazellulärer Vesikel anhand der Nanopartikel Tracking-Analyse	39
3.3.4.2	Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Mineralbeladung von extrazellulären Vesikeln	39
3.3.4.3	Analyse der Mineralisierung extrazellulärer Vesikel anhand des Aggregationassays	40
3.3.5	Statistische Analyse	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1	In-vitro Kalzifizierungsmodell – Osteogenes Medium	43
4.1.1	Analyse der Kalzifikation auf zellulärer Ebene	43
4.1.2	Analyse mineralpositiver extrazellulärer Vesikel	45
4.2	In-vitro Kalzifizierungsmodell – Kalziumphosphat Medium	47
4.2.1	Analyse der Kalzifikation auf zellulärer Ebene	47
4.2.2	Analyse mineralpositiver extrazellulärer Vesikel	48
4.3.	Einfluss der Inhibition der Exozytose	50
4.3.1	Analyse der Inhibition im osteogenem Medium	50
4.3.2	Analyse der Inhibition im Kalziumphosphat Medium	54
4.4	Einfluss der Inhibition der endosomalen Reifung	57
4.5	Ergebniszusammenfassung	58
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1	Einflüsse auf zellulärer Ebene auf die kardiovaskuläre Kalzifizierung	59
5.1.1	Unterschiede und Limitationen der Zellkulturmodelle	59
5.1.2	Die Rolle der alkalischen Phosphatase in osteogenen und kalziumphosphatreichen Konditionen	63
5.2	Limitationen der Inhibition von Rab27 in der Exozytose	64
5.2.1	Interaktion von Rab27 mit JFC1	64

5.2.2 Rab27a reduziert die Sekretion von Vesikeln in der ossären Mineralisierung	65
5.2.3 Rab27b reduziert Kollagen I in Osteoblasten	67
5.3 Limitationen der Inhibition von Rab7 in der endosomalen Reifung	67
5.3.1 Rab7 als Marker der endosomalen Reifung	68
5.3.2 CID-1067700 als Inhibitor der endosomalen Reifung	69
<b>6 Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>70</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>81</b>
<b>10 Danksagung</b>	<b>88</b>
<b>11 Erklärung zur Datenaufbewahrung</b>	<b>89</b>
<b>12 Erklärung über den Eigenanteil</b>	<b>90</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

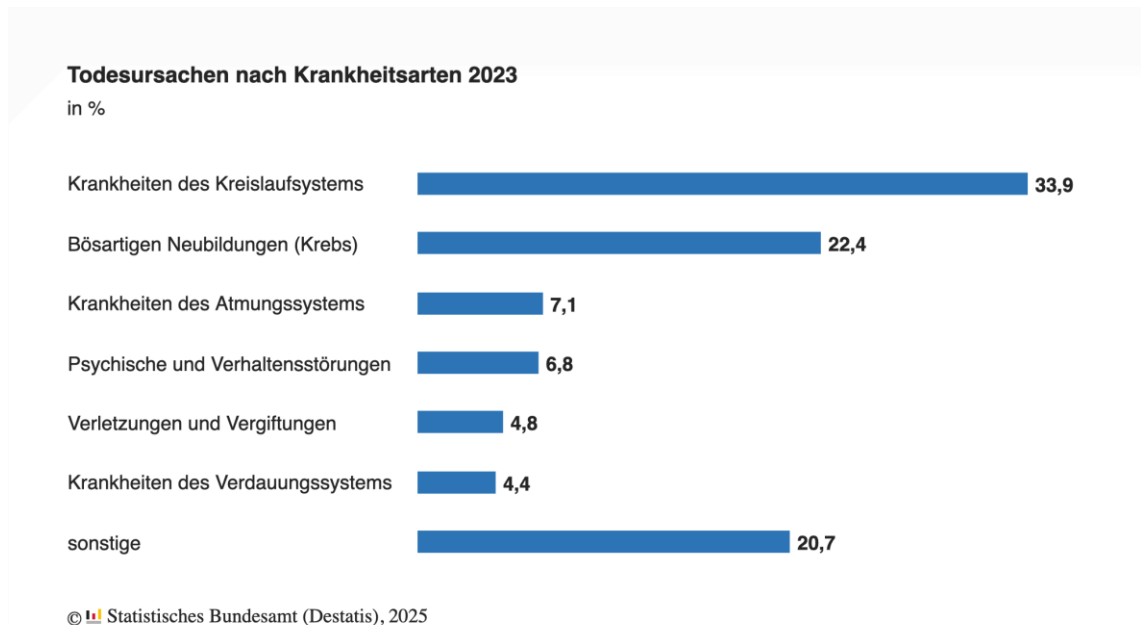
Abkürzung	Bedeutung
ALPL	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BCA	Bicinchoninsäure
BMP2	Knochenmorphogenes Protein 2
CaP	Kalziumphosphat Medium
cDNA	Komplementäre DNA
CKD	Chronische Nierenerkrankung
CM	Kontrollmedium
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CTG	Cell Tracker Green
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Frühes Endosom
EV	Extrazelluläres Vesikel
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Kälberserum
FDA	Fluoreszeindiacetat
FSC	Vorwärtsstreuung
FYCO1	FYVE und Coiled-Coil-Domäne enthaltendes Protein 1
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosin-Austauschfaktor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
imSMC	Immortalisierte glatte Gefäßmuskelzellen
KHK	Koronare Herzkrankheit

LE	Spätes Endosom
MGP	Matrix Gla Protein
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MVB	Multivesikulärer Körper
MW	Mittelwert
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analyse
OM	Osteogenes Medium
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepuffertes Saline
PDLSC	Parodontale Ligamentstammzellen
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential des Wasserstoffs
PI	Propiumiodid
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PTCA	Perkutane, transluminale Koronarangioplastie
PTH	Parathormon
qPCR	Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rab	Ras-ähnliches Protein im Gehirn
RANKL	Rezeptor Aktivator des NF- $\kappa$ B Ligand
RE	Recycling-Endosom
RILP	Rab interagierendes lysosomales Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPLP0	Ribosomenprotein Seitenstrang-Untereinheit P0
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2
SD	Standardabweichung
SMC	Glatte Gefäßmuskelzelle
SSC	Seitenstreuung
TAGLN	Transgelin
TNAP	Gewebsunspezifische alkalische Phosphatase
VSMC	Vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen
VSSC	Violette Seitenstreuung

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Gefäßerkrankung als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse

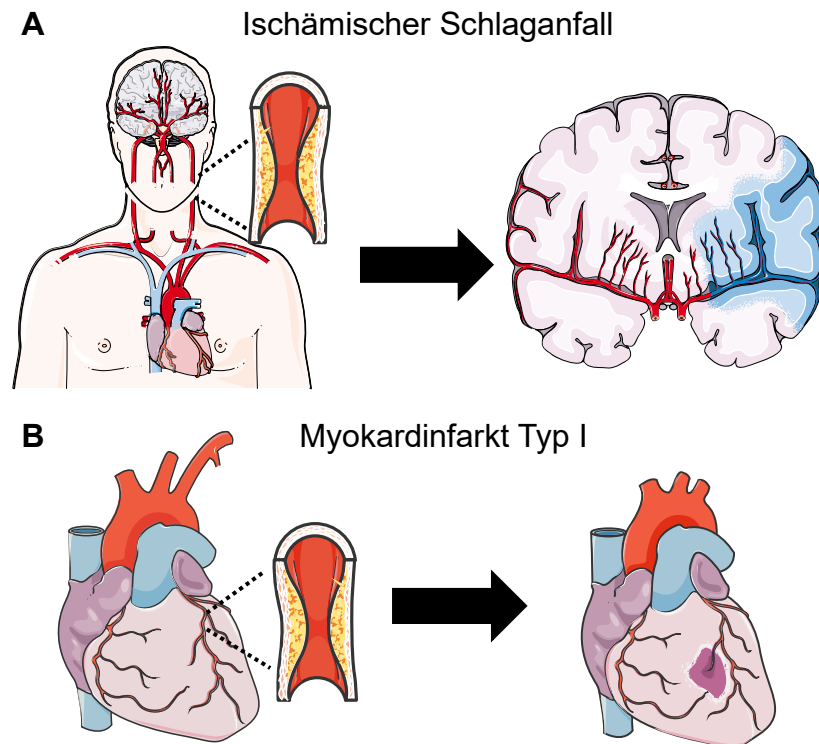
Bei kardiovaskulären Erkrankungen handelt es sich um eine Vielzahl an Krankheitsbildern, welche das Herz-Kreislaufsystem und die Blutgefäße betreffen. Sie sind differenzierbar in chronische Erkrankungen wie arterielle Hypertonie und akute Erkrankungen wie ein Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache weltweit dar (Fuster, 2010). Allein in Deutschland waren die Krankheiten des Kreislaufsystems mit 33,9 % die häufigste Ursache für Todesfälle und sind es seit 1990 stetig gewesen (Abbildung 1). Hierbei entstehen auf Grund der chronischen Gefäßerkrankung Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK), Schlaganfälle und rheumatische Herzerkrankungen (Krieg et al., 2022). Epidemiologisch ist der Tod bedingt durch die kardiovaskuläre Erkrankung (CVD) weltweit von 1990 bis 2019 um 53,81 % gestiegen und nimmt somit einen relevanten Stellenwert in der globalen Gesundheitsversorgung ein (Li et al., 2023).



**Abbildung 1. Todesursachen nach Krankheitsarten 2023.** Erkrankungen des Kreislaufsystems, folglich kardiovaskuläre Erkrankungen, bilden den Großteil der Todesursachen in Deutschland 2023 (Bundesamt, 2025).

Die Gesamtheit an kardiovaskulären Erkrankungen wird hierbei durch Risikofaktoren wie Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie beeinflusst (Brown et al., 2023). Als besonders relevanter

Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist die kardiovaskuläre Gefäßverkalkung hervorzuheben (Rennenberg et al., 2009). Bei dieser handelt es sich um eine Kristallisation von Kalzium und Phosphat in Form von Hydroxyapatit, welches in der arteriellen Gefäßwand oder in den Herzklappen akkumuliert. Die Akkumulation von Kalzifizierungen und Lipiden kann zu einer Plaque im Rahmen der Atherosklerose führen, welche zur Induktion einer Ischämie führen kann. Daraus resultierend kann es zu einer Organminderperfusion auftreten (Chen et al., 2017). Diese manifestiert sich unter anderem als ischämischer Schlaganfall. Pathophysiologisch wird dieser Zustand häufig durch makroangiopathische arterioarterielle Embolien verursacht, die insbesondere in der Karotidgabel entstehen (Abbildung 2A). Nach einer Plaqueruptur gelangt ein Thrombus über die Arteria carotis interna in die Zerebralarterien, wo er die charakteristische Minderperfusion auslöst, die für den ischämischen Schlaganfall verantwortlich ist. Klinisch äußert sich dies durch neurologische Defizite wie Hemiparesen, Hypästhesien, verwaschene Sprache und Hemianopsie (Banerjee & Chimowitz, 2017). Darüber hinaus kann sich eine Atherosklerose klinisch als Myokardinfarkt vom Typ I manifestieren, der durch einen plaquebedingten thrombotischen Verschluss der Herzkranzgefäße entsteht (Abbildung 2B). Dieser wird weiter in ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) unterteilt (Smit et al., 2020). Ab einer höhergradigen Stenose von  $\geq 70\%$  treten pektanginöse Beschwerden auf, die charakteristisch für den Myokardinfarkt sind. Zu den weiteren typischen Symptomen zählen Todesangst, Übelkeit, Dyspnoe sowie ausstrahlende Schmerzen (Smit et al., 2020). Die hohe klinische Relevanz dieser Folgeerkrankungen unterstreicht die Notwendigkeit, chronische Gefäßerkrankungen und Gefäßverkalkungen als bedeutende Risikofaktoren detailliert zu analysieren.



**Abbildung 2. Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls und Myokardinfarkt Typ I.** Sowohl der ischämische Schlaganfall als auch der Myokardinfarkt sind pathophysiologisch eng mit Atherosklerose und vaskulärer Kalzifizierung verbunden. Die Akkumulation atherosklerotischer Ablagerungen führt zur Bildung von Plaques. Besonders in der Karotisgabel kann die Ablösung solcher Plaques einen ischämischen Schlaganfall auslösen (A). Ebenso kann die Loslösung einer arterioarteriellen Plaque zu einer Ischämie der Koronararterien führen und damit einen Myokardinfarkt vom Typ I induzieren (B). Die Abbildung wurde mit Bildern vom Servier Medical Art erstellt. Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 1.2 Chronische Nierenerkrankung als Komorbidität der chronischen Gefäßerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) stellt eine wichtige Komorbidität der CVD dar. Bei der CKD handelt es sich um eine irreversible Abnahme der exkretorischen und inkretorischen Nierenfunktion. Die Diagnosestellung und Stadieneinteilung erfolgt anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Hierbei lässt sich die CKD in fünf Stadien (Tabelle 1) unterteilen (Hashmi et al., 2023; Kalantar-Zadeh et al., 2021).

**Tabelle 1. Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung (CKD) anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Nephrology, 2024).**

Stadium	Glomeruläre Filtrationsrate [ml/min/m <sup>2</sup> ]
G1	≥ 90
G2	60 – 89
G3a	45 – 59
G3b	30 – 44

G4

15 – 29

G5

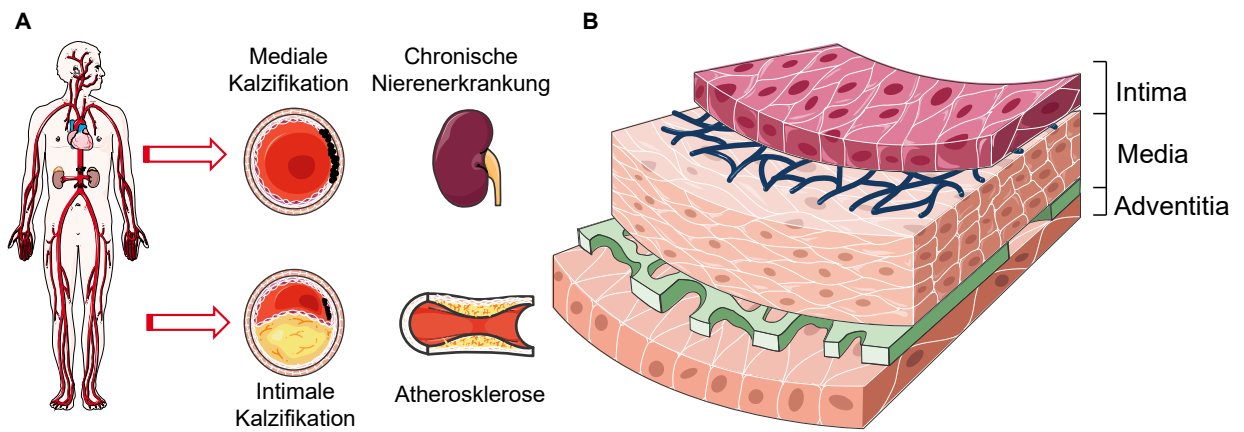
< 15

Die unterschiedlichen GFR-Stadien spiegeln unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome der CKD wider. Die Stadien G1 und G2 weisen noch eine hohe Funktionalität auf und verlaufen meist symptomlos und äußern sich höchstens in Form einer Proteinurie. Mit abnehmender renaler Funktion in Stadium G3a und G3b nehmen die Symptome der Patient:innen zu. Hierzu zählen typische Symptome wie arterielle Hypertonie, Ödeme und renale Osteopathie durch Störung des Mineralmetabolismus. Mit Stadium G4 und G5 nimmt die Nierenfunktion zunehmend ab und resultiert in einer Dialysepflichtigkeit beziehungsweise der Notwendigkeit einer Nierentransplantation (Hashmi et al., 2023). Die wichtigsten Faktoren für die Regulation des Mineralmetabolismus stellen Kalzium, Phosphat, Parathormon (PTH), Vitamin D und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23) dar (Palit & Kendrick, 2014). Aufgrund der reduzierten Sekretionsfähigkeit der Niere bei CKD entsteht ein Ungleichgewicht des Kalziummetabolismus und des Phosphatmetabolismus, woraus eine Hyperphosphatämie resultiert. Diese trägt zur vaskulären Kalzifizierung in der Tunica media der Arterien bei. Aufgrund des Transportes des Phosphats mittels Endozytose und Exozytose in die Gefäßwand akkumulieren diese dort und es entstehen Mikrokalzifizierungen und Makrokalzifizierungen (Palit & Kendrick, 2014). Die Therapie der CKD erfolgt zunächst medikamentös zur Aufrechterhaltung des Säuren-Basen-Haushaltes und des Elektrolythaushaltes (Kavelak, 2022; Kim, 2021). Sollte diese nicht ausreichend sein benötigen Patient:innen eine Nierenersatztherapie. Hierfür kommen diverse Dialyseverfahren, wie die Hämodialyse, Hämofiltration, Hämodiafiltration oder auch die Peritonealdialyse in Frage (Chuasuwana et al., 2020). Als ultima ratio erfolgt eine Nierentransplantation (Ghanta & Jim, 2016). Im klinischen Kontext spielt die chronische Gefäßerkrankung für viele weitere Erkrankungen eine wichtige Rolle. Denn CVD kann zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen führen, unter anderem koronarer Herzkrankheit (KHK), Schlaganfälle, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Aortenaneurysmen. Insbesondere die KHK basiert auf Symptomen, welche aufgrund einer Minderperfusion durch CVD entstehen (Boudoulas et al., 2022). Zu diesen Symptomen zählen typischerweise Angina Pectoris und Dyspnoe, welche sich aufgrund der Minderperfusion bis zum

Vollbild eines Myokardinfarktes ausbilden können (Aguilar-Ballester et al., 2021). Hierbei lässt sich beobachten, dass 50 % der Patient:innen im CKD-Stadium 4 bis 5 eine CVD aufweisen und dementsprechend sich die kardiovaskuläre Mortalität erhöht. Diese liegt zwischen 40 und 50 % in Relation zu 26 % bei physiologischer Nierenfunktion (Jankowski et al., 2021). Insbesondere bei fortgeschrittener CKD führen die Herzinsuffizienz oder Arrhythmien zum kardiovaskulären Tod (Jankowski et al., 2021). Sowohl traditionelle als auch nicht-traditionelle Risikofaktoren haben einen erheblichen Einfluss auf die CVD bei CKD. Zu den traditionellen Risikofaktoren zählen unter anderem arterielle Hypertonie, Dyslipidämie und Rauchen. Die nicht-traditionellen Risikofaktoren umfassend die vaskuläre Kalzifizierung, Inflammation und Proteinurie (Jankowski et al., 2021; Major et al., 2018). Insbesondere ist die vaskuläre Kalzifizierung als nicht-traditioneller Risikofaktor von Relevanz für die CVD und CKD.

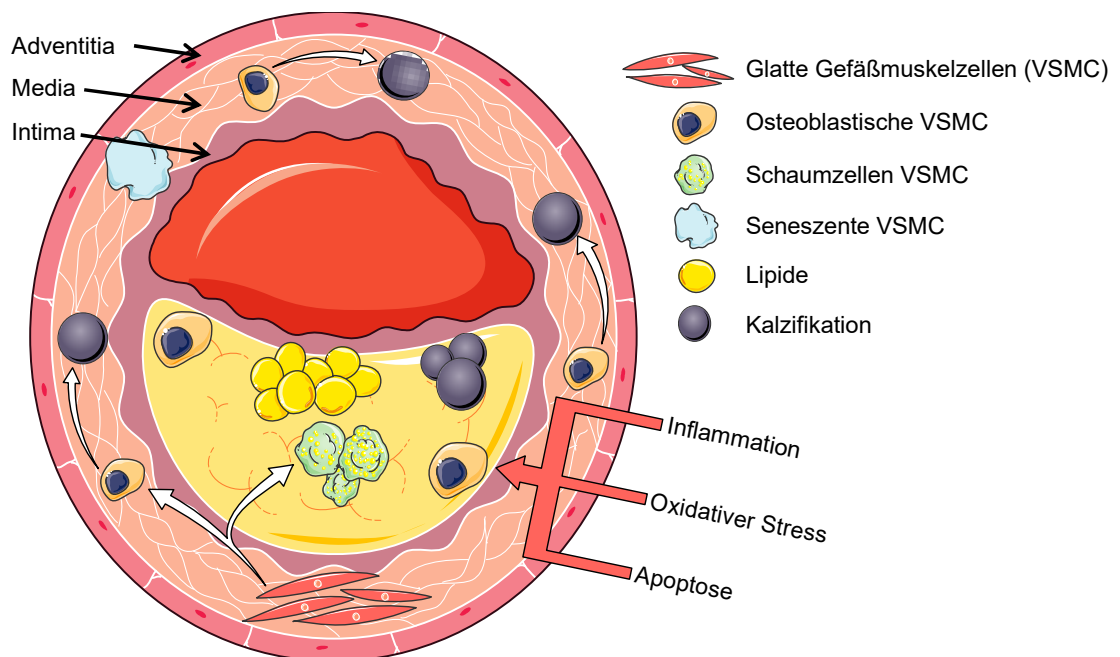
### **1.3 Die Pathophysiologie der chronischen Gefäßerkrankung – Kalzifizierung als Risikofaktor**

Bei der kardiovaskulären Kalzifizierung handelt es sich um die pathologische Akkumulation von Kalziumphosphat in den Gefäßwänden und den Herzklappen. Durch die Kalzifizierung kommt es zu einer Veränderung der Biomechanik, welche zu Komplikationen wie einem Myokardinfarkt oder einem Schlaganfall führen kann (Hutcheson & Goettsch, 2023). Dementsprechend stellt die kardiovaskuläre Kalzifizierung einen relevanten Faktor in der Pathophysiologie diverser Krankheitsbilder dar. Durch Messungen des Knöchel-Arm-Indexes konnte eine Prävalenz von 24,4 % von vaskulären Kalzifizierungen ermittelt werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Prävalenz in Männern höher ist als bei Frauen (Chen et al., 2022). Für die Gefäßverkalkungen werden unterschiedliche Lokalisationen differenziert. Einerseits ist eine Kalzifizierung in den Herzklappen, insbesondere in der Aortenklappe, zu beobachten (Hutcheson & Goettsch, 2023; Karwowski et al., 2012). Andererseits lagern sich die Kalzifizierungen in den Gefäßwänden der Arterie ab. Es erfolgt eine Klassifizierung in die intimale und mediale Gefäßkalzifizierung (Abbildung 3).



**Abbildung 3. Schema der unterschiedlichen Arten der Gefäßverkalkung.** (A) Die mediale Gefäßverkalkung betrifft die Tunica media und tritt insbesondere bei chronischer Nierenerkrankung (CKD) und Diabetes mellitus auf, während die intimale Gefäßverkalkung in der Tunica intima vermehrt bei Atherosklerose auftritt. (B) Der Aufbau der arteriellen Gefäßwand ermöglicht die Visualisierung der Unterschiede in den Akkumulationsorten der Verkalkung. Die Abbildung wurde mit Bildern vom Servier Medical Art erstellt. Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

Beide Kalzifizierungsarten werden durch unterschiedliche Pathomechanismen reguliert. Jedoch existieren auch gemeinsame Induktoren der Kalzifikation. Zu diesen zählen unter anderem die Apoptose, Seneszenz, Autophagie, Inflammation und extrazelluläre Vesikel (EVs). Durch die Pathomechanismen kommt es zu einer Differenzierung der glatten Gefäßmuskellzellen (VSMC) zu osteoblastischen VSMC in der Tunica media, welche eine Kalzifizierung induzieren. Lipidablagerungen in der Tunica intima führen zur Makrophageninfiltration und Differenzierung von VSMC zu Schaumzellen und osteoblastischen VSMC, welche eine Kalzifizierung der Tunica intima initiieren (Abbildung 4) (Durham et al., 2018).



**Abbildung 4. Pathomechanismen der medialen und intimalen vaskulären Kalzifizierung.**

Darstellung einer Arterie und dessen pathophysiologische Mechanismen zur Entstehung vaskulärer Kalzifizierung. Durch pathologische Auslöser wie Inflammation, oxidativer Stress und Apoptose kommt es zu einer Differenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) zu osteoblastischen VSMC. Durch diese kommt es zu Kalzifizierungen in der Tunica media. Durch Lipidablagerungen in der Tunica intima kommt es zur Makrophageninfiltration und Differenzierung von VSMC zu Schaumzellen. Inflammation, oxidativen Stress und Apoptose führen zur Differenzierung von osteoblastischen VSMC und die daraus resultierende Kalzifizierung der Tunica intima. Die Abbildung wurde mit Bildern vom Servier Medical Art erstellt und modifiziert nach (Durham et al., 2018). Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). (Durham et al., 2018) ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Mehrere verschiedene Pathomechanismen, wie der Verlust von Inhibitoren, die Seneszenz, oxidativer Stress, Apoptose und Inflammation begünstigen die Differenzierung der kontraktilen VSMC zur osteoblastischen VSMC und die vaskuläre Kalzifizierung. Durch den Verlust von Inhibitoren der Kalzifizierung wie Matrix Gla Protein (MGP), Osteopontin und Fetuin-A kommt es zu einer Erhöhung osteogener Marker wie Runx2-Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2) und Knochenmorphogenes Protein 2 (BMP2). Reduzierte Konzentrationen von MGP und Fetuin-A können unter anderem bei Patient:innen mit CKD oder Diabetes mellitus gefunden werden und haben somit vor allem einen Einfluss auf die intimale Kalzifikation und nur einen geringen Einfluss auf die Kalzifikation der Tunica media (Durham et al., 2018; Westenfeld et al., 2009). Die Seneszenz ist ein relevanter Faktor für die Kalzifizierung. In VSMC, welche sich in Seneszenz befinden, konnte in vitro in der Literatur bereits eine Erhöhung der Kalzifizierung und erhöhte osteogene Marker wie ALPL und RUNX2 nachgewiesen werden (Nakano-Kurimoto et al., 2009). Oxidativer Stress, wie die reaktive Sauerstoffspezies (ROS), sind auch beteiligt an der vaskulären Kalzifizierung. Diese treten in höherer Konzentration im Alter und bei CKD auf und führen zur Erhöhung des osteogenen Markers RUNX2. Dies führt zu einer vermehrten Differenzierung von VSMC zu osteogenen VSMC. Als weiterer relevanter Faktor hat sich die Apoptose herausgestellt. In der Literatur konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der Apoptose die Kalzifizierung und die Menge an kalzifizierenden EVs reduziert (Reynolds et al., 2004). Durch die Apoptose kommt es zur Freisetzung von Apoptoskörpern, welche einen hohen Kalziumgehalt aufweisen, welches final in der EZM akkumuliert und zur Kalzifizierung führt (Proudfoot et al., 2000). Die Inflammation als Risikofaktor für die Kalzifizierung ist schon länger bekannt. Hierbei migrieren Makrophagen, Lymphozyten und dendritische Zellen in die atherosklerotische

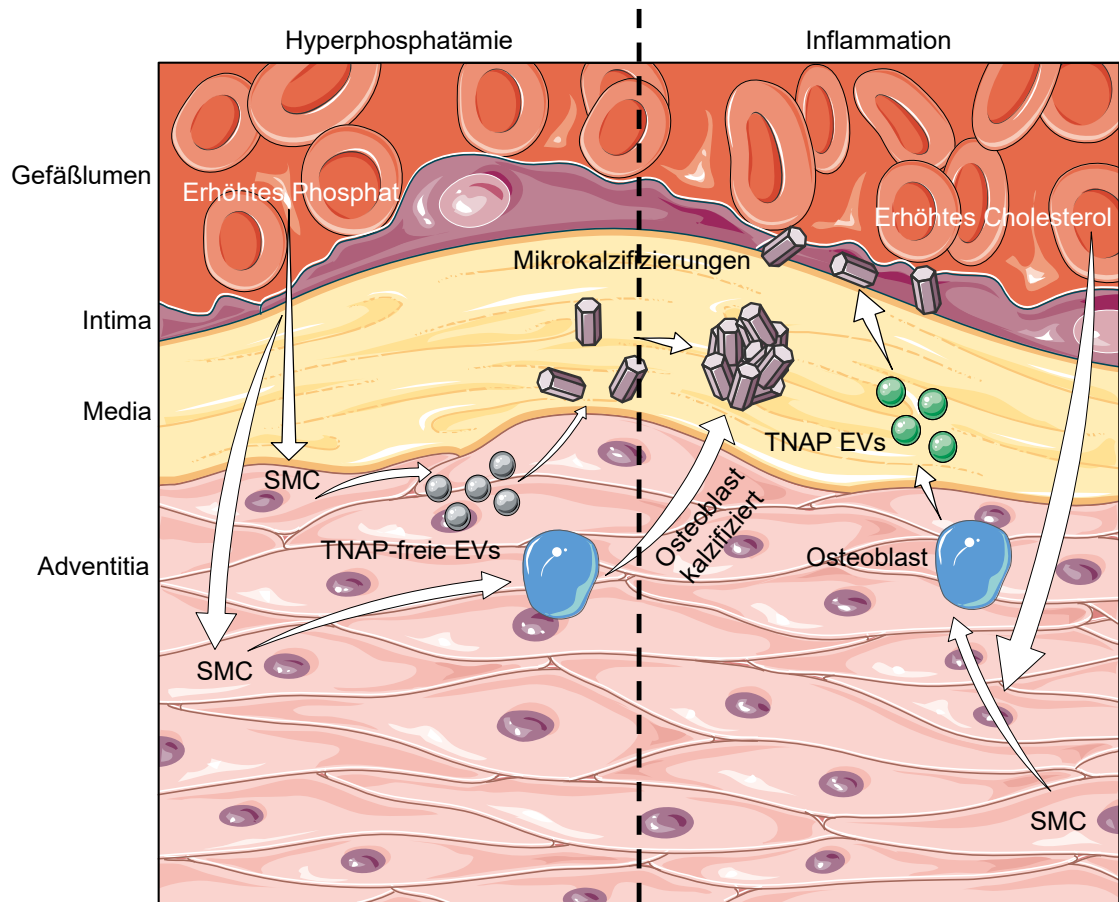
Läsion. Dadurch kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6. Diese induzieren die Differenzierung von VSMC zu osteoblastischen VSMC und die Apoptose (Al-Aly et al., 2007). Neben den gemeinsamen Induktoren der Kalzifizierung der Tunica intima und media weisen diese jedoch auch separate Pathomechanismen auf. Die Mineralablagerungen in der Tunica intima treten vermehrt bei Erkrankungen mit kardiovaskulärer Beteiligung, wie Diabetes und Herzinsuffizienz auf. Die Plaque der intimalen Kalzifizierung setzt sich aus unterschiedlichen Zelltypen, Lipiden und Mineralien zusammen. Zu den zellulären Bestandteilen zählen Thrombozyten, Monozyten und Leukozyten. Die beteiligten Mineralien sind vor allem Kalzium und Phosphat. Bei der Atherosklerose trägt die Kalzifizierung durch Kalzium- und Phosphatablagerungen in den späteren Stadien wesentlich zur Versteifung der Arterienwand bei. Durch diese kommt es zu einer Beeinträchtigung der Hämodynamik und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskulärer Komplikationen. (Frak et al., 2022; Karwowski et al., 2012). Die Kalzifizierung beginnt als Mikrokalzifizierung, welche wahrscheinlich durch nekrotische oder apoptotische Zellen induziert wird. Durch vermehrte Mikrokalzifizierungen entstehen Makrokalzifizierungen in der Tunica intima (Lee et al., 2020). Die Mineralablagerungen der Tunica media treten hauptsächlich bei Patient:innen mit chronischen Niereninsuffizienz (CKD) auf, induziert durch die begleitende Hyperphosphatämie (Heuschkel et al., 2022). Im Gegensatz zu der intimalen Kalzifikation führt bei der medialen Kalzifikation das erhöhte Serumphosphat dazu, dass es in der Gefäßwand eingelagert wird, wodurch sich zunächst Mikrokalzifizierungen bilden. Diese akkumulieren im Verlauf zu Makrokalzifizierungen (Blaser & Aikawa, 2018). Beide Kalzifizierungsarten weisen gemeinsame Pathomechanismen auf und werden jedoch auch teilweise auf unterschiedliche Arten reguliert, jedoch sind EVs von zentraler Rolle für den Mineraltransport sowohl in die Tunica intima als auch in der Tunica media.

#### **1.4 Vaskuläre Kalzifizierung – Extrazelluläre Vesikel als Vermittler der Gefäßverkalkung**

Bei EVs handelt es sich um Membranpartikel, welche von Zellen sezerniert werden. Diese können diverse Moleküle transportieren, wie beispielsweise RNA und Proteine. EVs lassen sich in drei Subidentitäten anhand der Biogenese differenzieren (Ginini et al., 2022; Yu et al., 2023). Es gibt Exosomen, die eine

Größe von etwa 50 bis 150 nm aufweisen. Bei diesen handelt es sich um intraluminale Vesikel, die durch die Fusion von multivesikulären Körpern (MVB) mit der Plasmamembran entstehen (Busatto et al., 2021). Mikrovesikel hingegen haben eine Größe von circa 100 bis 1000 nm und entstehen durch die Knospung und Ablösung von der Plasmamembran (Han et al., 2022). Als letzte Gruppe lassen sich noch apoptotische Körperchen abgrenzen, welche eine Größe bis zu 5000 nm aufweisen können und beim regulierten Zelltod freigesetzt werden (Nagata, 2018). Für die EVs stellen die Endozytose und Exozytose zentrale Prinzipien dar, denn dadurch werden unter anderem der physiologische Stofftransport und die Zell-Zell-Interaktion reguliert (Yates et al., 2022). Pathophysiologisch tragen EVs einen erheblichen Teil zu der intimalen und medialen Gefäßverkalkung bei (Blaser & Aikawa, 2018; Li et al., 2022; Zazzeroni et al., 2018). Für die unterschiedlichen pathophysiologischen Funktionen von EVs muss zunächst zwischen einer Umgebung mit Hyperphosphatämie und einer inflammatorischen Umgebung unterschieden werden (Abbildung 5). Bei der Kalzifikation der Tunica media liegt in der Regel eine Hyperphosphatämie vor, welche zu einer schnellen Kalzifizierung der glatten Gefäßmuskelzellen führen kann (Blaser & Aikawa, 2018; Heuschkel et al., 2022). Die Kalzifikation der Tunica media bei Hyperphosphatämie entsteht durch die Aufnahme des Phosphats in die VSMC und deren Bindung an intrazelluläre Proteinmediatoren. Durch die Bindung an die Proteinmediatoren werden Mineralien durch EVs mittels Exozytose aus der VSMC heraustransportiert (Krohn et al., 2016). Dieser Prozess erfolgt unabhängig von der gewebenspezifischen alkalischen Phosphatase (TNAP), wodurch es, aufgrund der Nukleation von mineralbeladenen EVs mit niedrigem TNAP-Gehalt, zur schnellen Gefäßkalzifizierung kommt (Blaser & Aikawa, 2018). Es folgt eine Akkumulation der mineralbeladenen EVs in der Tunica media. Initial entstehen hierbei Mikrokalzifizierungen, welche sich aufgrund der Akkumulation dieser zu Makrokalzifizierungen entwickeln (Bakhshian Nik et al., 2017). Die Kalzifikation der Tunica intima hingegen ist von der TNAP-Aktivität abhängig. TNAP ist physiologisch an der Biomineralisation im Knochen und pathophysiologisch an der Gefäßverkalkung beteiligt. TNAP hydrolysiert Phosphatester in alkalischen Puffer, welches zur Bildung von organischen Radikalen und anorganischen Phosphat führt. Durch die Freisetzung des anorganischen Phosphats entsteht ein Konzentrationsgradient zwischen dem intravesikulären und extravasikulären

Raum, wodurch ein Einstrom von Kalzium und Phosphat in das EV zustande kommt (New & Aikawa, 2013). Durch die Freisetzung dieser EVs, mit hohem TNAP- und Mineralgehalt entstehen Kalzifizierungen der Tunica intima, welche durch eine Reduktion des Kollagenetzes unterstützt, werden (Goettsch et al., 2016; Zwakenberg et al., 2020).

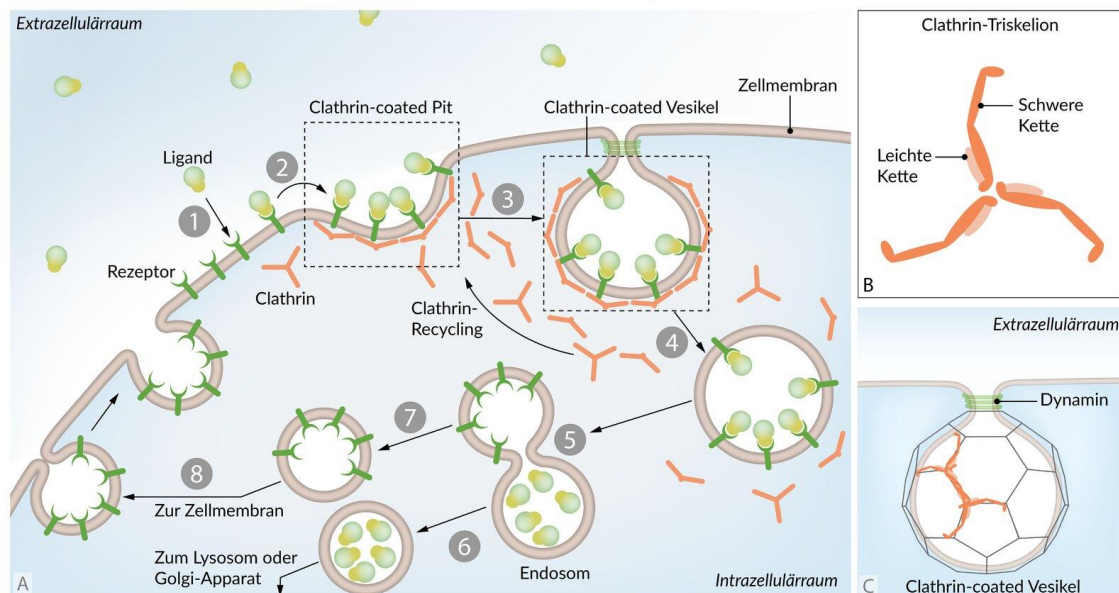


**Abbildung 5. Einfluss der extrazellulären Vesikel auf die Gefäßverkalkung.** Bei der Gefäßverkalkung spielen extrazelluläre Vesikel (EVs) eine besonders relevante Rolle. Durch Endozytose und Exozytose induzieren diese Mikrokalzifizierungen, welche durch Akkumulation zur Makrokalzifizierungen führen. Dies ist einerseits induzierbar durch eine Hyperphosphatämie wie in der chronischen Nierenerkrankung und andererseits durch Inflammation, welche die osteogene Differenzierung induziert. Diese führt im weiteren Verlauf durch die Freisetzung von mineralbeladenen extrazellulären Vesikeln zur Kalzifikation der Tunica intima. Die Abbildung wurde mit Bildern von Servier Medical Art erstellt und nach (Hutcheson et al., 2017) modifiziert. Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). (Hutcheson et al., 2017) ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### 1.4.1 Endozytose, endosomale Reifung und Exozytose als humanbiologische Basisprinzipien

Bei der Endozytose, endosomalen Reifung und Exozytose handelt es sich um humanbiologische Basisprinzipien, die für unzählige Prozesse im menschlichen Körper relevant sind. Es handelt sich bei diesen Prinzipien um

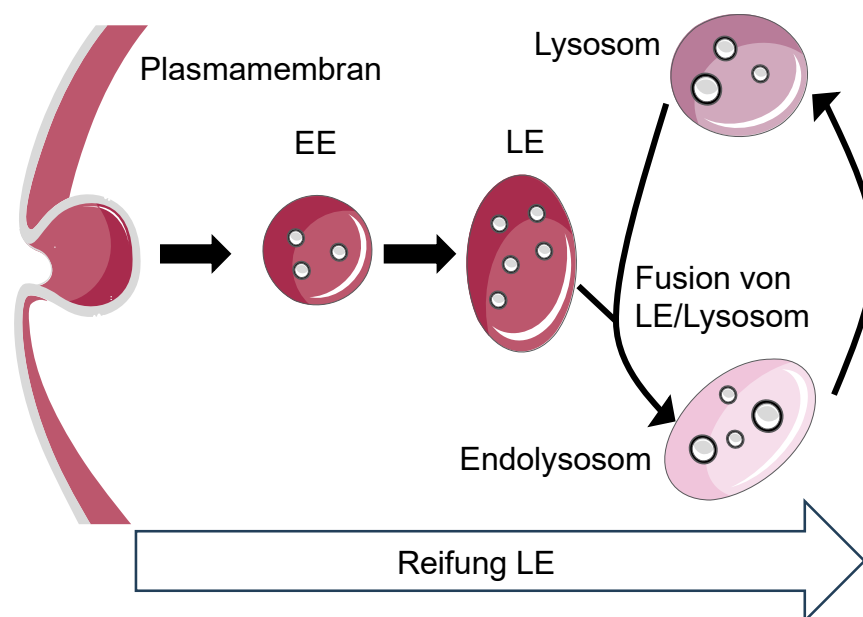
membranverlagernde Transporte. Hierbei kommt es zur Abschnürung eines Stücks der Membran. Diese Abschnürung enthält Moleküle, welche transportiert werden. Bei der Endozytose handelt es sich um den Transport von Molekülen von extrazellulär nach intrazellulär. Hierbei wird zwischen der Phagozytose, Pinozytose und rezeptorvermittelten Endozytose differenziert (Doherty & McMahon, 2009) (Abbildung 6). Als einer der wichtigsten Endozytose Mechanismen gilt die rezeptorvermittelte Endozytose. Hierbei werden kleine bis mittelgroße Moleküle durch die Signalkaskade eines membranständigen Rezeptors nach intrazellulär aufgenommen (Saito et al., 2010). Durch diese Signalkaskade erfolgt die intrazelluläre Akkumulation von Clathrinmolekülen, wodurch die Membran einstülpt und sich das Vesikel formt. Die Abschnürung des Vesikels von der Zellmembran erfolgt mittels Dynamin. Vesikel, die durch Endozytose von der Plasmamembran nach intrazellulär gelangen, fusionieren anschließend mit den frühen Endosomen und werden dann in der Zelle weiter prozessiert und verteilt (Saito et al., 2010). Bei der Phagozytose handelt es sich um die Aufnahme von größeren Molekülen durch phagozytische Zellen, wie beispielweise Makrophagen, die Opsonin-Rezeptoren enthalten (Aderem & Underhill, 1999). Die Pinozytose ist das Prinzip der Aufnahme mittelgroßer gelöster Moleküle. Dies unterliegt keiner Regulation, sondern verläuft spontan unter Beteiligung von Aktin (Kay, 2021).



**Abbildung 6. Die Endozytose als relevantes physiologisches Prinzip.** Die rezeptorvermittelte Endozytose unterliegt vielen Regulationsmechanismen und Signalkaskaden. Besonders das Protein Clathrin ist von besonderer Relevanz für die Formung von Vesikeln bei der Endozytose. (1) Liganden aus dem Extrazellulärraum binden an die Membranrezeptoren. (2) Ligand-Rezeptor-Komplex vermittelt die Bildung eines Clathrin-coated Pit. (3) Im Verlauf erfolgt die Anlagerung weiterer Clathrinmoleküle, bis sich ein Vesikel nach intrazellulär abschnürt. (4) Abdiffundieren der

Clathrinmoleküle vom Vesikel. (5) Abgabe der Liganden von Rezeptoren ins Vesikelinnere und Aufteilung des Vesikels in ein Endosom. (6) Neben der Aufteilung in ein Endosom erfolgt auch die Aufteilung in ein leeres Vesikel (7,8) Recycling der Vesikel/Rezeptoren über Verschmelzung mit der Zellmembran. (Amboss, 2024a)

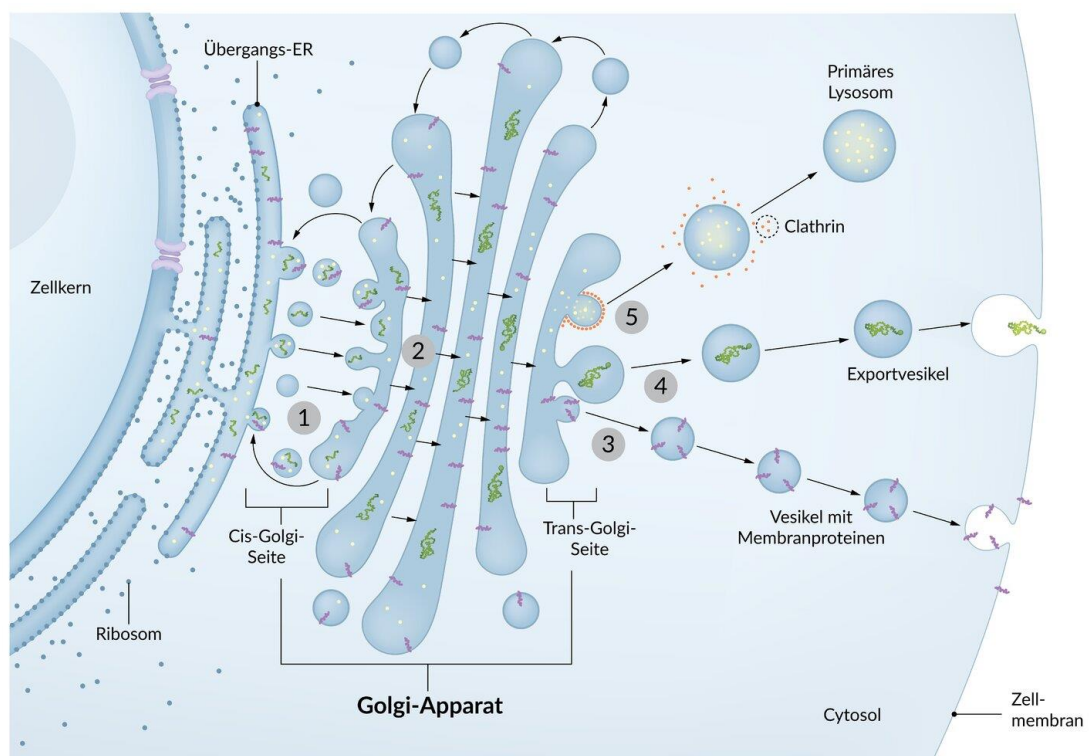
Bei der endosomalen Reifung handelt es sich um den Prozess, der Reifung des frühen Endosoms (EE) zum späten Endosom (LE) über viele Regulationsmechanismen (Abbildung 7). Die Vesikel werden zunächst von dem Golgi-Apparat abgeschnürt. Dieser lässt sich unterteilen in eine Cis-Golgi-Seite und eine Trans-Golgi-Seite. Die Cis-Golgi-Seite ist verantwortlich für den Empfang proteinbeladener Membranvesikel. Anschließend werden die aufgenommenen Membranvesikel unterschiedlich modifiziert (Mohan et al., 2023). Der Golgi-Apparat ist unter anderem verantwortlich für die Modifikation von Glykoproteinen, Hormonaktivierung und Adressierung sekretorischer Proteine. An der Trans-Golgi-Seite erfolgt die Vesikelabschnürung. Diese werden dann in Richtung der Zellmembran oder des Lysosoms geschickt (Mohan et al., 2023). Nach der Abschnürung der Vesikel vom Golgi-Apparat schließt sich der endosomale Reifungsprozess an. Während des Reifungsprozess kommt es zu einer morphologischen Änderung des EE, zu einer Zunahme der lysosomalen Komponenten, einer Änderung des pH-Wertes und zu einem Austausch der Membrankomponenten (Huotari & Helenius, 2011). Nachdem die Reifung des EE zum LE abgeschlossen ist, kann das LE noch mit einem Lysosom zu einem Endolysosom fusionieren, worauf ein weiterer Reifungsprozess folgt (Abbildung 7).



**Abbildung 7. Überblick über die endosomale Reifung.** Nach der Ablösung vom Golgi-Apparat erfolgt die Reifung des frühen Endosoms (EE) über mehrere Regulationsschritte zum späten Endosom (LE). Das LE kann anschließend noch mit einem Lysosom fusionieren und wird so zum

Endolysosom. Die Abbildung wurde mit Bildern von Servier Medical Art erstellt und modifiziert nach (Huotari & Helenius, 2011). Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) (Huotari & Helenius, 2011) ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Bei der Exozytose handelt es sich um die Abgabe von mittelgroßen bis großen Molekülen an die Zellumgebung durch Membranfusion (Sugita, 2008) (Abbildung 8). Bei den multivesikulären Körpern (MVB) werden intraluminal Vesikel geformt durch die Einwärtsknospung der endosomalen Membran. MVB fusionieren anschließend Rab-abhängig mit der Plasmamembran und sezernieren ihre Exosomen nach extrazellulär (Blaser & Aikawa, 2018). Neben dem klassischen Weg kann ein Recyclingendosom (RE) gebildet werden. Der Reaktionsweg bestimmt, ob die Exozytose des RE langsam oder schnell abläuft. Die Vesikel besitzen typischerweise eine Lipiddoppelschicht, welche spezifische Mantelproteine enthält für den jeweiligen Exozytose-Pathway (Sugita, 2008). Anschließend erfolgt die Fusion des Vesikels mit der Zellmembran und daraus resultiert die Sekretion der Moleküle nach extrazellulär. Die Regulation dieser Prozesse erfolgt häufig mittels der intrazellulären Kalziumkonzentration oder mit Hilfe von Rezeptoren.



**Abbildung 8. Überblick über die Exozytose.** Die Exozytose stellt eines der wichtigsten Prinzipien in der Humanbiologie dar. Insbesondere für den Stofftransport ist sie besonders relevant und Störungen dieser äußern sich klinisch. (1) Die cis-Seite erhält Transportvesikel mit Syntheseprodukten aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum (rER). Die Vesikel enthalten zum einen Proteine des rER und zum anderen nicht-zytosolische Proteine. Nicht-zytosolische Proteine sind lysosomale, sekretorische und Transmembranproteine, wobei letztere bereits im

rER in die Membran eingelagert wurden. (2) Die nicht-zytosolischen Proteine werden von Zisterne zu Zisterne weitergeschickt und im Verlauf modifiziert. (3 - 5) An der trans-Golgi-Seite werden dann Vesikel mit Membranproteinen, Exportvesikel oder Lysosomen abgeschnürt, die zur Zellmembran gelangen und mit dieser verschmelzen und zum Zielort gelangen. Modifiziert nach (Amboss, 2024b).

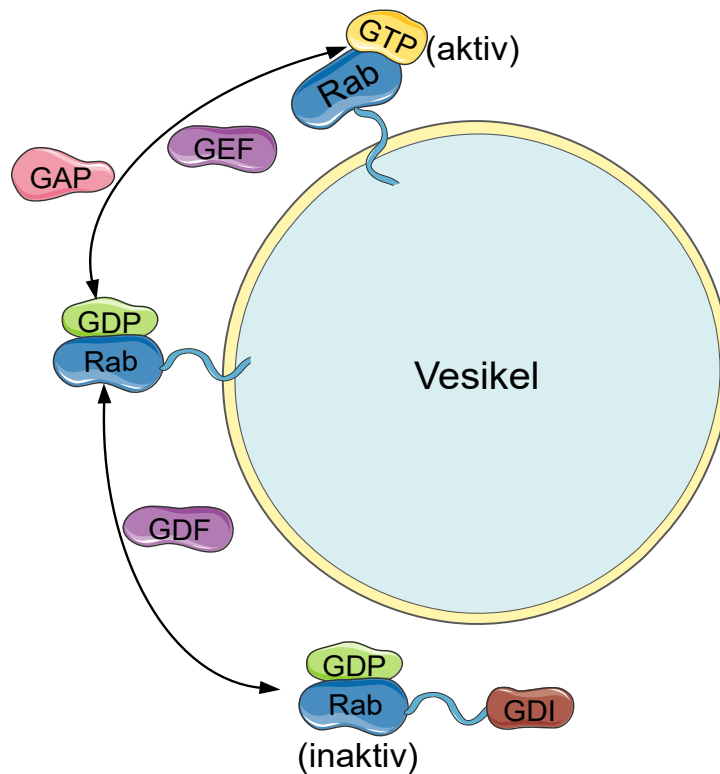
### 1.4.2 Rab-Proteine als Regulatoren der Exozytose und endosomalen Reifung

Bei Rab-Proteinen handelt es sich um kleine GTPasen, die insbesondere für den intrazellulären Transport von Vesikeln von Bedeutung sind. Rab5 ist verantwortlich für die Endozytose und Fusion der Vesikel. Rab11 und Rab25 regulieren das langsame Recycling mittels Recycling-Endosomen und Rab4 das schnelle Recycling. Rab7 ist für die endosomale Reifung und die Fusion mit Lysosomen verantwortlich. Rab1 und Rab2 spielen bei der Regulation des Transports vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat eine Rolle (Martinez-Arroyo et al., 2021). Somit sind Rab-GTPasen von besonderer Bedeutung für die intrazelluläre Regulation (Tabelle 2).

**Tabelle 2. Übersicht über die Funktionen der Rab-Proteine (Martinez-Arroyo et al., 2021).**

<b>Rab</b>	<b>Funktion</b>
1 / 2	Transportregulation vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat
4	Schnelles Recycling der Endosomen
5	Endozytose und Vesikelfusion
7	Endosomale Reifung und Fusion mit Lysosomen
11 / 25	Langsames Recycling mittels Recycling-Endosomen
27a	Vesikelfusion in der Exozytose
27b	Vesikelmotilität in der Exozytose

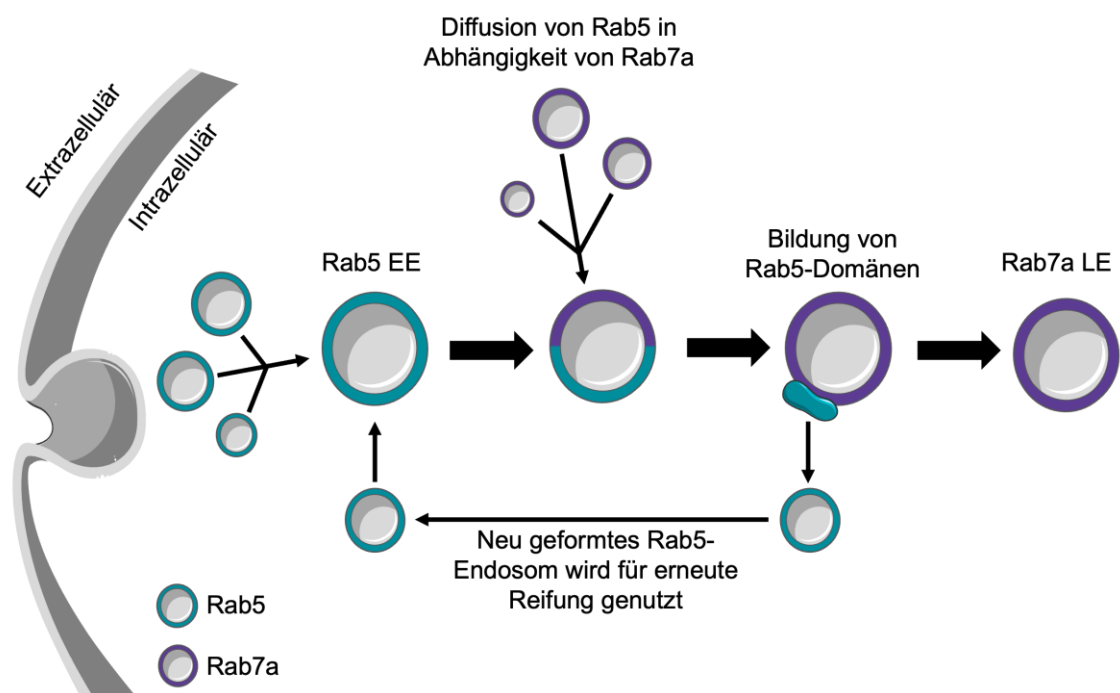
Die Aktivierung beziehungsweise Deaktivierung dieser GTPasen erfolgt in Abhängigkeit von Guanosintriphosphat (GTP). Durch den GTP-Austauschfaktor (GEF) erfolgt die Freisetzung von gebundenem Guanosindiphosphat (GDP). Daraufhin erfolgt die Bindung des im Zytosol höher konzentrierten GTPs an das Rab-Protein. Hierdurch erfolgt die Aktivierung des Rab-Proteins. Die Inaktivierung erfolgt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP mittels des GTPase-aktivierenden Proteins (GAP) (Li & Marlin, 2015) (Abbildung 9).



**Abbildung 9. GTPase Regulation der Rab-Proteine.** Die Regulation der Rab-Proteine erfolgt in Abhängigkeit von Guanosin triphosphat (GTP). Rab-Proteine liegen bei einer Bindung von GTP aktiv vor. Bei einer Bindung von Guanosindiphosphat (GDP) liegen sie inaktiv vor. Die Hydrolyse wird durch das GTPase-aktivierende Protein (GAP) unterstützt und die Aktivierung durch den GTP-Austauschfaktor (GEF). Die Abbildung wurde mit Bildern vom Servier Medical Art erstellt. Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Die GTPase Rab7 ist verantwortlich für die endosomale Reifung und die lysosomale Fusion. Rab7 ist unterteilbar in Rab7a und Rab7b, welche sich in ihrer Funktion und Lokalisation unterscheiden (Guerra & Bucci, 2016). Rab7a ist hauptsächlich im späten Endosom (LE) vorhanden und nur wenig ausgeprägt im frühen Endosom (EE). Rab7b ist lokalisiert im Trans-Golgi-Netzwerk und im LE und reguliert den retrograden Transport des Endosoms zum Trans-Golgi-Apparat (Progida et al., 2010). Die geringe Ausprägung von Rab7a im EE ist bedingt durch die endosomale Reifung von EE zum LE. Dort erfolgt die Rab-Konversion von Rab5 zu Rab7, sodass beim LE nur noch Rab7 vorhanden ist (Abbildung 10). Die Rab-Konversion erfolgt durch die Unterbrechung der Aktivierung von Rab5 mit Rabex-5 und die Rekrutierung und Aktivierung von Rab7. Beides wird durch SAND-1/Mon1 und Ccz1 reguliert (Kinchen & Ravichandran, 2010; Poteryaev et al., 2010). Die hauptsächlichste Funktion von Rab7a ist die Regulation des Transports vom EE zum LE und dessen Transport zum Lysosom mittels Dynein- und Kinesin-Motoren (Guerra & Bucci, 2016; Zhang et al., 2009). Für den

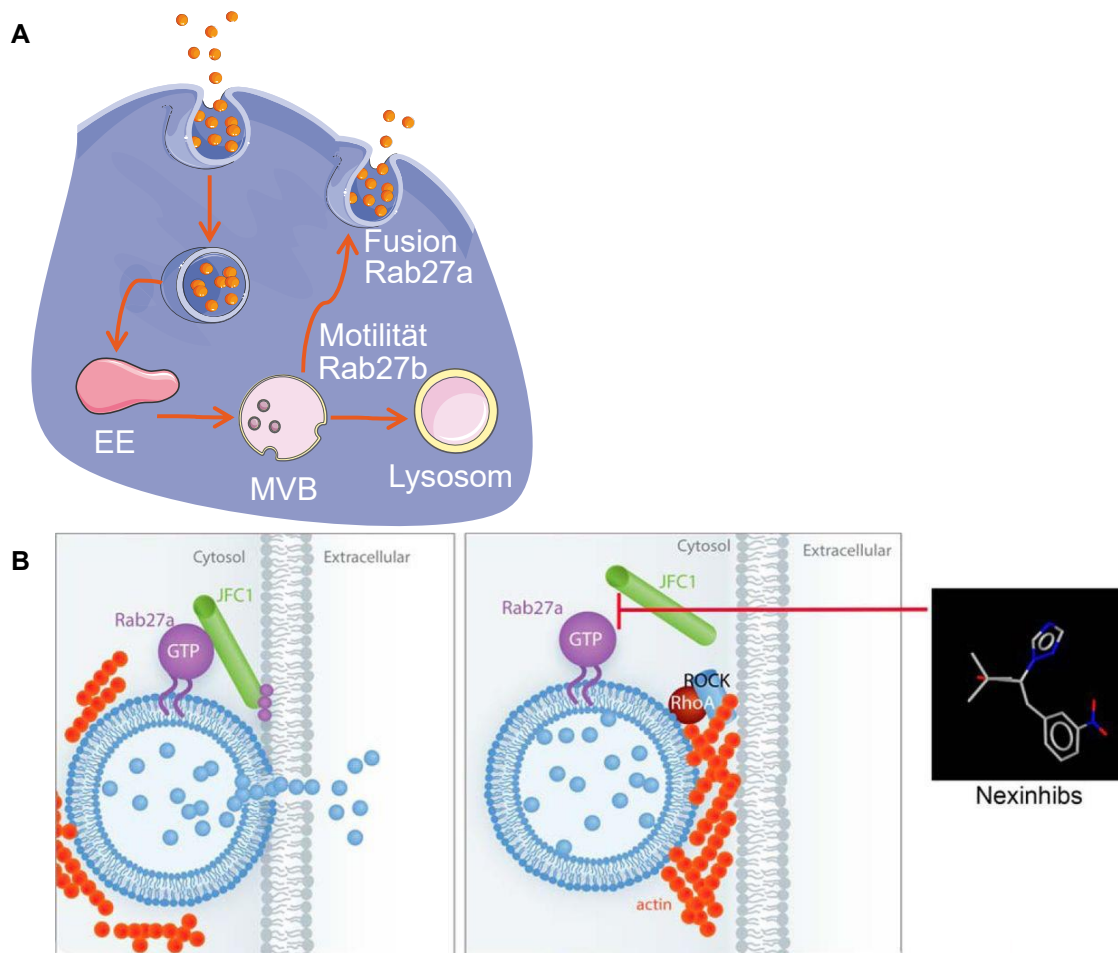
Transport mittels Dynein erfolgt die Rekrutierung eines Rab interagierenden lysosomalen Proteins (RILP) durch Rab7 in der GTP-gebundenen Form. Dadurch kommt es zur Aktivierung eines Dynein-Dynaktin-Komplexes (Cantalupo et al., 2001; Jordens et al., 2001). Für die Aktivierung der Kinesin-Motoren erfolgte eine Interaktion zwischen Rab7 und FYVE und einem Coiled-Coil-Domäne enthaltendes Protein 1 (FYCO1) (Pankiv et al., 2010). Die Regulation der Fusion des LE mit dem Lysosom ist noch nicht abschließend geklärt. Als Hypothesen wurden aufgestellt, dass es zu einem vesikulären Trafficking kommen könnte, eine kontinuierliche Fusion stattfinden könnte oder zunächst die Bildung eines Endolysosom mit anschließendem Remodeling stattfinden könnte (Guerra & Bucci, 2016). Mutationen von Rab7 sind assoziiert mit der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit IIB. Diese äußert sich durch langsam progrediente motorische und später motorisch-sensible Polyneuropathie mit Atrophie der Wadenmuskulatur (Saveri et al., 2020). Die Inhibition der endosomalen Reifung durch Hemmung von Rab7 kann durch den Inhibitor CID-1067700 erfolgen. Hierbei erfolgt eine unspezifische Inhibition von Rab7a und Rab7b.



**Abbildung 10. Die endosomale Reifung vom frühen zum späten Endosom unterliegt der Rab-Konversion von Rab5 zu Rab7.** Nach der Endozytose erfolgt am frühen Endosom (EE) durch Einfluss der Rab-Proteine die Regulation der weiteren Verwertung. Durch den Austausch von Rab5 durch Rab7 entsteht aus dem EE ein spätes Endosom (LE). Der Austausch erfolgt progredient bis Rab5 komplett durch Rab7a im späten Endosom (LE) ausgetauscht wurde. Die ausgetauschten Rab5-Domänen konvergieren und bilden am Ende ein funktionelles Rab5-positives Endosom. Die Abbildung wurde mit Bildern vom Servier Medical Art erstellt und modifiziert nach (Skjeldal et al., 2021). Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

(Skjeldal et al., 2021) ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Neben der Regulation der endosomalen Reifung sind Rab-Proteine auch an der Steuerung der Exozytose beteiligt (Izumi, 2021). Eine zentrale Rolle bei der Induktion der Exozytose spielt Rab27 (Abbildung 11). Dieses Protein wird in die Isoformen Rab27a und Rab27b unterteilt, die beide in sekretorischen Zellen an der Trans-Golgi-Seite, sowie in Endosomen lokalisiert sind, jedoch unterschiedliche Funktionen erfüllen (Gomi et al., 2007; Ostrowski et al., 2010; Pfeffer, 2010). Rab27b ist in der Literatur mit der Regulation der Vesikelmotilität in Verbindung gebracht worden, insbesondere in Zusammenarbeit mit dem Effektorprotein Slac2b (Ostrowski et al., 2010). Experimente mit Rab27b-Knockout-Modellen deuteten darauf hin, dass Rab27b den Transfer von Vesikeln von Mikrotubuli zum aktinreichen Kortex sowie deren Verbleib in der Zellperipherie reguliert (Ostrowski et al., 2010). Zudem konnte in der Literatur beobachtet werden, dass Endosomen in der Elektronenmikroskopie bei Rab27b-Knockouts verkleinert waren. Dies legt nahe, dass Rab27b beim Transfer von Membranen vom Golgi-Apparat zu den Endosomen eine Rolle spielt (Ostrowski et al., 2010; Savina et al., 2002). Rab27a hingegen ist zusammen mit Slp4-a und dem Effektor JFC1 an dem Andocken und der Fusion des Vesikels mit der Zellmembran beteiligt (Abbildung 11A-B) (Huang et al., 2023; Pfeffer, 2010). Rab27a-Silencing hat eine reduzierte Fusion und Vergrößerung der Vesikel zur Folge (Ostrowski et al., 2010). Die Rab27a-JFC1-Interaktion kann mittels Nexinhib20 inhibiert werden, welches folglich zur Hemmung der Exozytose führt (Abbildung 11B) (Johnson et al., 2016). Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Regulation der Vesikelmotilität und die Membranfusion über denselben Signalweg oder unabhängig voneinander reguliert werden (Ostrowski et al., 2010). Mutationen in Rab27a führen zum Griscelli Syndroms Typ II, welches sich klinisch durch Hypopigmentierung und Immundefizienz äußert (Ohishi et al., 2020). Insbesondere unter Berücksichtigung der klinischen Konsequenzen ergibt sich eine hohe Relevanz von Rab27 in der Exozytose und von Rab7 in der endosomalen Reifung.



**Abbildung 11. Die Exozytose und die Relevanz von Rab27.** (A) Regulation der Exozytose unterliegt vielen Mechanismen. Die Regulation erfolgt unter anderem durch die GTPase Rab27, die sich funktionell noch in Rab27a und Rab27b unterteilen lässt. Rab27A ist hierbei mit Snc18a verantwortlich für die Membranfusion und Rab27B mit Slac2-b für die Vesikelmotilität. Die Abbildung wurde mit Bildern vom Servier Medical Art erstellt. Servier Medical Art by Servier ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Abbildung modifiziert nach (Pfeffer, 2010) (B). Rab27A interagiert mit JFC1 für die Induktion der Exozytose. An dieser Interaktion setzt Nexinhib20 an und inhibiert so die Rab27A-JFC1-Interaktion. (Johnson et al., 2016) ist lizenziert mit der Creative Commons Attribution 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 2 Zielsetzung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen weisen die höchste Mortalität weltweit auf. Dennoch stehen nur wenige Therapieoptionen der Atherosklerose und Gefäßkalzifizierung zur Verfügung, weshalb eine weitere Erforschung der zugrundeliegenden Pathophysiologie notwendig ist. Durch vorhandene Daten der AG Göttsch und Literatur ist bereits bekannt, dass EVs an der Initiation der vaskulären Kalzifikation der Tunica media, als auch der Tunica intima von Arterien beteiligt sind. Für die Kalzifikation der Tunica intima wurde ein Zellkulturmodell mit osteogenem Medium und für die Tunica media ein Kalziumphosphat-angereichertes Medium genutzt (Heuschkel et al., 2022). Diese Dissertation unterliegt der Hypothese, dass die Hemmung der endosomalen Reifung und der Exozytose, die EV-vermittelte Gefäßverkalkung reduziert.

Die Zielsetzung wurde mittels in vitro Kalzifizierung mit zwei Modellen an SMC untersucht. Die Inhibition erfolgte mittels zweier Moleküle. Nexinhib20 inhibiert die Rab27a-JFC1-Interaktion und dementsprechend die Exozytose. CID-1067700 ist ein Inhibitor der BODIPY-GTP-Bindung an Rab7 und hat dementsprechend Einfluss auf die endosomale Reifung. Es folgte eine Untersuchung der Zellvitalität mittels Messung der metabolischen Aktivität und direkter Darstellung lebender und toter Zellen durch eine Fluoreszenz-Färbung. Zur Visualisierung der Matrixmineralisierung wurde eine Alizarin-Rot-Färbung durchgeführt, welche per Elution und Bildanalyse quantifiziert wurde. Durch die Nanotracking-Analyse erfolgte die Bestimmung der EV-Menge auf Grundlage der Brownschen Molekularbewegung. Die Durchflusszytometrie diente der Bestimmung der Mineralbeladung basierend auf einer CellTracker Green/Osteosense-Doppelfärbung. Es erfolgte die Messung der enzymatischen Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase. Final erfolgte die Bestimmung der mineralisierungsassoziierten Genen ALPL, BMP2 und TAGLN per Polymerase-Kettenreaktion.

### 3 Material & Methoden

#### 3.1 Materialliste

Tabelle 3. Reagenzien und Chemikalien

Substanz	Firma
2-Propanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
alamarBlue® – Zellvitalitäts-Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Alizarin Rot	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Celltracker Grün (CTG)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
CID-1067700	Biozol, Eching, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego, Kalifornien, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 4.5 g/l D-Glucose + L-Glutamine; (-) Pyruvate	Gibco - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Phosphat-gepuffertes Saline (modifiziert, ohne Kalzium und Magnesiumchlorid) (PBS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA

Fluoreszeindiacetat (FDA) (1,0 mg/ml in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
FluoroBrite™ DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Nexinhib20	Bio-Techne GmbH – Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Venlo, Niederlande
OsteoSense 680EX	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Propiumiodid (PI) (25 mg/ml in Aceton)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
RNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego, Kalifornien, USA
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan Fast Advanced Master Mix 2x	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan Gene Expression Assays 20x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
TRIzol RNA Isolationsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypan Blau (0.4%)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA

Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung (0,5%)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA

**Tabelle 4. Kits**

Kit	Firma
Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit	Biovision, Zürich, Schweiz
Bicinchoninsäure Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
High-Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA

**Tabelle 5. Taqman Proben**

Gen	Name	ID	Firma
ALPL	Alkaline phosphatase	HS01029144_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TAGLN	Transgelin	HS01038777-g1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RPLP0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0	HS99999902_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2	Hs00154192_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

**Tabelle 6. Verbrauchsmaterial**

Verbrauchsmaterial	Firma
10 mL Stripette™ serologische Pipette	Corning, Corning, New York, USA

12-Well-Platten	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
25 mL Stripette™ serologische Pipette	Corning, Corning, New York, USA
Corning® Sterile 5 mL Stripette Serological Pipets	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glas-Pasteurpipetten	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes – Reaktionsgefäß, 2 ml	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Falcon® 24-well Clear Flat Bottom	Corning, Corning, New York, USA
Falcon® 96-well Clear Flat Bottom	Corning, Corning, New York, USA
Pipettenspitzen, 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, 50 – 1000 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Schraubröhre, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritze, 1 ml	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Spritze, 10 ml	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
TipOne® Filter Pipettenspitzen, 10 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne® Filter Pipettenspitzen, 1000 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne® Filter Pipettenspitzen, 200 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 48 Well	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
0.2 ml 8-Strip Non-Flex PCR Tubes	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Corning® 25 mm Diameter Syringe Filters, 0.2 µm Pore RC Membrane	Corning, Corning, New York, USA

Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Multi® SafeSeal, 0.5 ml, farblos	
Minisart® High Flow	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, 0,1 µm	
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well-	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
Reaktionsplatte, 0,1 ml	Massachusetts, USA
Pipettenspitzen, 0,5 – 10 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim,
	Deutschland
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ROTILABO® 1,5 ml schwarz	
SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
	Deutschland

**Tabelle 7. Technische Geräte und Equipment**

<b>Equipment</b>	<b>Firma</b>
BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader	BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
BioTek EL808 Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
BioTek ELx808 Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
CytoFLEX S Durchflusszytometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Digital dry bath	Labnet International Inc., Edison, New Jersey, USA
Eppendorf Research® plus pipette set	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
EVOS® FL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Grant Instruments™ PV-1 Personal Vortexmischer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heracell™ 150i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Heraeus Fresco Mikrozentrifuge	21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Megafuge Zentrifuge	40R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Trockenschrank T5042		Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Leica DMI6000		Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Leica DMIL LED		Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Milli-Q® Advantage A10		Merck, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop® Spectrophotometer ND- 1000		WR, Radnor, Pennsylvania, USA
NanoSight NS300		Malvern Panalytical, Malvern, Großbritannien
Pipetierhilfe accu-jet® S		BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipetierhilfe Integra Pipetboy 2		INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipetierhilfe Pippetus		Hirschmann GmbH, Eberstadt, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge Mini Star		VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Veriti 96-Well Thermocycler		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad		Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellkulturbank HeraSAFEks		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

**Tabelle 8. Programme**

Programm	Firma
BioRender ( <a href="https://www.biorender.com">https://www.biorender.com</a> )	BioRender, Toronto, Kanada
BioTek Gen5 (Version 3.12)	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA

Fiji (ImageJ) (Version 2.9.0)	Wayne Rasband, National Institutes of Health
Graph Pad Prism (Version 10.0.3)	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
i-control (Version 3.08.01)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office 365 (Version 16.74)	Microsoft, Albuquerque, New Mexico, USA
NanoDrop® ND-1000 (Version 3.8.1)	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
NanoSight NTA (Version 3.2)	Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, Vereinigtes Königreich
SMART – Sevier Medical Art ( <a href="https://smart.servier.com">https://smart.servier.com</a> )	Elsevier, Amsterdam, Niederlande
StepOnePlus™ Software (Version 2.0)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

### 3.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 9. Puffer und Lösungen**

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	4% (w/v) PFA in PBS (pH 7,4)
Wachstumsmedium (CM)	DMEM + 4.5 g/L D-Glucose, L-Glutamine; (-) Pyruvate 10% fetales Kälberserum (FBS) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Kalziumphosphathaltiges Medium (CaP)	Wachstumsmedium 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> (finale Konzentration: 3,0 mM) 1,09 mM Phosphatpuffer (81% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 19% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (finale Konzentration 2,0 mM)
Dexamethason	25 µM Dexamethason Ethanol (EtOH)
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	10 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

	Destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)
Osteogenes Medium (OM)	Wachstumsmedium 10 mM $\beta$ -Glycerolphosphat 100 $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 10 nM Dexamethason
$\beta$ -Glycerolphosphat	1 M $\beta$ -Glycerolphosphat Destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Zellbiologische Methoden

Im Folgenden werden die zellbiologischen Methoden zur Kultivierung und Vitalitätsmessung der immortalisierten koronar-arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen (imSMC) beschrieben. Die Immortalisierung von SMC erfolgte mittels Simian Virus 40 large T Antigen (SV40LT) und menschlicher Telomerase Reversetranskriptase (HTERT) (Heuschkel et al., 2022). Die Durchführung der folgenden Methoden erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank.

##### 3.3.1.1 Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen

ImSMC sind adhärenente Zellen und wurden in T75-Flaschen in 10 ml Wachstumsmedium (DMEM + 4.5 g/L D-Glucose, L-Glutamine; (-) Pyruvate 10% (v/v) fetales Kälberserum (FBS), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) (CM) im Inkubator bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid kultiviert. Hierbei dient FBS zur Aufrechterhaltung der Zellvitalität, sowie zur Anregung des Zellmetabolismus und der Zellteilung. Penicillin/Streptomycin dient zur Vermeidung der Kontamination der Zellkultur mit Pilzen und Bakterien. Alle Medien und Puffer wurden im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

##### 3.3.1.2 Subkultivierung von Zellen

Sobald die Zellen eine Dichte zwischen 80 % und 90% Konfluenz erreicht haben, welches durch Mikroskopieren überprüft wurde, wurden diese subkultiviert. Für die Subkultivierung wird das Enzym Trypsin verwendet. Trypsin ist eine Serinprotease, welche die Adhäsionsmembranproteine spaltet. Dadurch werden adhärenente Zellen, die an der Kulturflasche haften, in Suspension freigesetzt. Die

Zellen wurden zunächst zweimal mit vorgewärmter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (Phosphate-buffered saline; PBS) gewaschen, um das Medium und fetale Kälberserum (FBS) vollständig zu entfernen. Anschließend wurde vorgewärmte 0,5%-ige Trypsin-EDTA Lösung (3 ml/75 cm<sup>2</sup>) hinzugegeben und im Inkubator bei 37°C für 1 min inkubiert, um eine optimale Enzymaktivität zu gewährleisten. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob sich die Zellen von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes gelöst haben. Anschließend wurden 7 ml CM hinzugegeben, um die Trypsin-Reaktion durch das Enzym  $\alpha$ 1-Antitrypsin, welches sich im FBS befindet, zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 300 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 9 ml Wachstumsmedium resuspendiert.

### 3.3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer und Trypanblau bestimmt. Trypanblau ist ein Farbstoff zur Bestimmung der Zellvitalität. Dieser dringt in tote Zellen ein und ermöglicht so einen Rückschluss auf die Zellvitalität. Die Zellsuspension und eine 0,4%ige Trypanblau-Lösung wurden im Verhältnis 1:2 in einem Reaktionsgefäß gemischt und die Neubauer-Zählkammer wurde mit der angefärbten Zellsuspension beladen. Anschließend wurden die Zellen, welche nicht blau gefärbt sind, unter dem Mikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer in vier Eckquadranten gezählt. Die Zellsuspension wird zuvor so verdünnt, sodass maximal 50 Zellen pro Quadrat gezählt werden. Die Zellzahl pro ml berechnet sich durch Formel 1.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4 \text{ (Anzahl an Quadranten)}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

**Formel 1. Berechnung der Zellzahl pro ml mittels Neubauerzählkammer.**

Diese Formel basiert auf dem Kammerfaktor der Neubauerzählkammer. Denn aufgrund der Fläche von 1 mm<sup>2</sup> der Quadrate, einer Kammerhöhe von 0,1 mm und vier Quadranten ergibt sich der Faktor 10<sup>4</sup>. Der Verdünnungsfaktor basiert auf der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:2. Die Zellen wurden anschließend mit einer Zelldichte von 26 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 12-Well-Platten für qPCR und 24-Well-Platten für die restlichen Analysen ausgesät. Hierbei wurde die Ziel-Zellzahl mit Formel 2 berechnet.

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Ziel-Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{gezählte Zellzahl}}$$

**Formel 2. Berechnung der gewünschten Zellzahl.**

#### **3.3.1.4 In vitro Modelle der Gefäßverkalkung**

Es wurden zwei in vitro Gefäßverkalkungsmodelle in imSMCs verwendet. Diese Modelle dienen zur Imitation der Gefäßverkalkung der Tunica intima und der Tunica media. Das osteogene Medium (OM) stellt ein Modell für die intimale Gefäßverkalkung dar (Heuschkel et al., 2022). ImSMCs wurden für bis zu 14 Tage in osteogenem Medium (OM; CM supplementiert mit 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 100  $\mu$ M L-Ascorbinsäure und 10 nM Dexamethason) kultiviert.  $\beta$ -Glycerolphosphat dient als Phosphatquelle und induziert die Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (TNAP). L-Ascorbinsäure ist verantwortlich für die Erhöhung der Kollagenproduktion und Dexamethason induziert osteogene Gene. Als Kontrolle diente CM. Das Medium wurde alle drei Tage erneuert. Im Gegensatz dazu, stellt das mit Kalzium und Phosphat angereicherte Medium (CaP) ein Modell für die mediale Gefäßverkalkung dar (Heuschkel et al., 2022). Hierfür wurden imSMCs bis zu sieben Tage in CaP Medium (CM supplementiert mit 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1,09 Phosphatpuffer (Tabelle 9) kultiviert. Durch die Hinzugabe von Kalziumchlorid und Phosphatpuffer wurde eine Endkonzentration von 3 mM Kalzium und 2 mM Phosphat im Medium erreicht. Das Medium wurde alle drei Tage erneuert.

#### **3.3.1.5 Inhibition von Rab7 und Rab27**

Die Inhibition der GTPase Rab7, welche für die endosomale Reifung von Relevanz ist, erfolgte mittels CID-1067700 in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10  $\mu$ M. Für die Inhibition von Rab27 wurde Nexinhib20 in den Konzentrationen 0,5, 0,75, 1 und 2  $\mu$ M genutzt. Durch die Inhibition von Rab27 wird die Exozytose beeinflusst. Die Zellen wurden in kalzifizierendem Medium, welches mit den Inhibitoren supplementiert wurde, kultiviert. Die Inhibitoren wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, sodass CM und OM supplementiert mit DMSO im Verhältnis 1:1000 als Kontrolle fungierten.

### **3.3.1.6 Konditioniertes Medium zur Analyse extrazellulärer Vesikel**

Nach sieben (CaP) und nach 10 (OM) Tagen wurden Zellen zur Analyse von EVs für 24 h in Wachstumsmedium mit 0,1% FBS kultiviert. Die Reduktion des FBS dient der Reduktion der Partikelhintergrundes (Haraszi et al., 2019). Anschließend wurde zur weiteren Analyse von EVs das konditionierte Medium abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei 1000 xg für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um Zellreste aus dem konditionierten Medium zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die gesammelten EVs wurden anhand des Aggregationsassays, Durchflusszytometrie und NTA analysiert.

### **3.3.1.7 Bestimmung der Zellvitalität mittels Resazurin-Reduktion**

Bei der Resazurin-Reduktion erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität mittels Resazurin, welches initial blau, nicht-fluoreszierend und zellpermeabel ist. Bei Zelleintritt in lebende Zellen wird Resazurin zu Resorufin, durch Enzyme mit Diaphorase-Aktivität in den Mitochondrien reduziert, das rot-fluoreszierend ist. Somit findet bei der Methode der Resazurin-Reduktion eine Messung der metabolischen Aktivität statt. Als Methode für die Resazurin-Reduktion wurde alamarBlue genutzt. Die Zellvitalität wird bei der CaP-induzierten Kalzifizierung nach sieben und bei OM nach vierzehn Tagen bestimmt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit dem alamarBlue Reagenz 1:10 in CM verdünnt für vier Stunden im Zellkulturinkubator inkubiert. Je 100 µl des Überstandes wurden in eine transparente und in eine schwarze 96-well Platte überführt. Die Bestimmung der Absorption erfolgte in der transparenten Platte, mit dem Cytation5 der Firma BioTek Instruments. Die Messung erfolgte mit einer Wellenlänge von 570 nm und der Referenzwellenlänge 600 nm. Die Messung bei 570 nm diente hierbei zur Messung der Substratumsetzung und 600 nm zur Bestimmung des Hintergrundes. Parallel wurde in der schwarzen Platte die Fluoreszenz bei einer Extinktion von 550 nm und einer Emission von 590 nm mittels BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader bestimmt. Die Messung der Fluoreszenz und der Absorption erfolgte zum Vergleich beider Methoden.

### 3.3.1.8 Bestimmung der Zellvitalität mittels Fluoreszeindiacetat-Propiumiodid-Färbung

Weiterhin wurde die Fluoreszeindiacetat (FDA)-Propiumiodid (PI)-Färbung zur Messung der Zellvitalität genutzt, die unabhängig von der metabolischen Aktivität ist. Lebenden Zellen nehmen den nicht fluoreszierenden Farbstoff FDA auf. In lebenden Zellen findet eine Umsetzung in den grün fluoreszierenden Metaboliten Fluoreszein durch unspezifische membranständige Esterasen statt. Damit ist das grüne Fluoreszenzsignal repräsentativ für lebende Zellen. Dahingegen kann der rot fluoreszierende Farbstoff PI nur in tote Zellen eindringen, da durch den Zelltod die Zellmembran permeabel wird. PI interkaliert in die DNA im Zellkern. Tote Zellen fluoreszieren nach der Färbung rot. Für die Positivkontrolle der PI-Färbung wurde ein Well mit Triton-X-100 (1:5000 verdünnt in PBS), welches den Zelltod durch die Zerstörung der Lipiddoppelmembran fördert, für 2 min inkubiert. Für die FDA-PI Färbung wurden FDA (5 mg/ml in H<sub>2</sub>O) 1:110 und PI (0,5 mg/ml in Azeton) 1:100 in PBS verdünnt. Dies erfolgte lichtgeschützt in schwarzen Reaktionsgefäßen. Die Zellen wurden für 30 Sekunden mit der FDA-PI-Lösung lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zuvor wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und nach der Färbung wurde die FDA/PI-Lösung durch PBS ersetzt. Die Zellvitalität mittels FDA-PI-Färbung wurde bei der CaP-induzierter Verkalkung an Tag sieben und bei OM-induzierter Verkalkung an Tag vierzehn durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000 in dem grünen und roten Kanal mikroskopiert (Tabelle 10). Es wurden pro Well Bilder in Triplikaten mit einer zehnfachen Vergrößerung (Objektivnummer 506259) angefertigt. Die Quantifizierung der FDA-PI-Bilder erfolgte mittels Fiji (Version 2.9.0). Dafür wurden die Bilder in den grünen und roten Kanal separiert und mittels Watershed Separation die einzelnen Zellen voneinander unterschieden. Anschließend wurden die Zellen bei einem Threshold für die FDA-Bilder von 43 und für PI mit einem Threshold von 31 analysiert (Anhang Abbildung 1A & 1B).

**Tabelle 10. Filtereinstellungen des Fluoreszenzmikroskopes.**

Filter	Kanal	Exzitation [nm]	Emission [nm]
L5 (FDA)	Grün	440 - 520	505
N2.1 (PI)	Rot	515 - 560	580

### 3.3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure Assay

Der Bicinchoninsäure Assay (BCA) dient zur Quantifizierung der Proteinmenge in einer Probe. Dieser basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine im alkalischen Medium und dem kolorimetrischen Nachweis von  $\text{Cu}^{1+}$  mittels Bicinchoninsäure. Zunächst erfolgt die Chelatbildung von Proteinen mit den Kupferkationen im alkalischen Milieu. Anschließend erfolgt eine Farbentwicklungsreaktion der Bicinchoninsäure mit den reduzierten Kupferkationen, sodass ein violettes Reaktionsprodukt entsteht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve von 25  $\mu\text{l}$  Albumin in den Konzentrationen 0, 12,5, 25, 62,5, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/ml}$  Albumin (Tabelle 11). Die Proben mit einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  wurden 1:2 in  $\text{dH}_2\text{O}$  verdünnt und in technischen Replikaten auf eine transparente 96 Well Platte pipettiert. Es folgte die Hinzugabe von 200  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung, welche zu 50 Teilen aus Reagenz A und zu 1 Teil aus Reagenz B besteht. Die Platte wurde anschließend bei  $37^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm mittels BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader gemessen. Die Berechnung der Proteinmenge [mg] erfolgte in Microsoft Excel anhand der linearen Regression unter Berücksichtigung des Probenvolumens und des Verdünnungsfaktors.

**Tabelle 11. Pipettierschema der Standardkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA).**

	Wasser [ $\mu\text{l}$ ]	Albumin Standard [ $\mu\text{l}$ ]	Finale Konzentration des Albuminstandards [ $\mu\text{g/ml}$ ]
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 von B	750
E	325	325 von C	500
F	325	325 von E	250
G	325	325 von F	125
H	200	200 von G	62,5
I	400	100 von G	25

J	175	175 von I	12,5
K	400	0	0

---

### 3.3.2.2 Isolation der Ribonukleinsäure mittels TRIzol™

Für die Analyse der mRNA-Expression erfolgte die Ribonukleinsäure-Isolation (RNA-Isolation) mittels TRIzol™. Die Inkubation der Zellen in 12-Well Platten erfolgte mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/ml. Die Zellen wurden zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Um die Zellen direkt in den Wells zu lysieren erfolgte die Inkubation für 5 min mit 500 µl TRIzol™ pro Well einer 12-Well-Platte. Anschließend wurden die Platten bei -20°C bis zur weiteren Nutzung gelagert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde an speziellen RNA-Arbeitsplätzen mit gefilterten Pipettenspitzen gearbeitet. Dieser wurden zuvor mit Isopropanol, DNA AWAY und RNase AWAY gereinigt. Es erfolgte die Homogenisierung des Lysats und eine Überführung in Reaktionsgefäße. Anschließend wurde 0,1 ml Chloroform pro 0,5 ml TRIzol für die Phasentrennung hinzugegeben, gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trennung der Phasen erfolgte mittels Zentrifugation für 15 min bei 12000 xg und 4°C. In der unteren roten Phenol-Chloroform-Phase befinden sich die Proteine, in der Interphase, die DNA und die oberste farblose Phase enthält die RNA. Die oberste RNA-Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, Anschließend erfolgte die Hinzugabe von Isopropanol zur TRIzol™ Reagenz im Verhältnis 1:2 und eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur für das Ausfällen der RNA. Durch die Zentrifugation für 10 min bei 12000 xg bei 4°C bildet die RNA ein Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes. Nach Entfernung des Überstandes erfolgten drei Waschschrte mit je 1 ml 75 % Ethanol und Zentrifugation bei 12000 xg für 10 min bei 4°C. Dies diente zur Entfernung von restlichen Salzen, die noch in der akkumulierten RNA vorhanden waren. Das Präzipitat wurde danach bei 60°C in einem Heizblocke getrocknet, um restliches Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und 5 min bei 60°C im Heizblock inkubiert.

### 3.3.2.3 Synthese komplementärer DNA durch reverse Transkription

Bei der reversen Transkription handelt es sich um die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) anhand der RNA. Hierbei werden die Nukleinsäuren der RNA in die der DNA transkribiert und Ribose durch

Desoxyribose mittels reversen Transkriptasen ausgetauscht. Die isolierte RNA wurde mithilfe des NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 mit der Software ND-1000 (Version 3.8.1) quantifiziert. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgt mit einem modifiziertem Lambert-beersches-Gesetz unter Einbezug des Extinktions-Koeffizients (Formel 3) (ThermoFisher, 2010). Die Berechnung der benötigten RNA für die reverse Transkription erfolgte durch die Formel 4. Es erfolgte die Überprüfung der RNA-Reinheit. Eine Probe wurde als rein deklariert, sofern die Absorptionsratio  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  zwischen 1,7 und 2,0 lagen und  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} > 1,8$  lagen.

$$\text{RNA} \left[ \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right] = \frac{A \times e}{b}$$

**Formel 3. Berechnung der RNA-Menge im NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000.** A = Absorption in Absorptions-Einheiten bei Wellenlänge 260 nm (AU); e = Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit von der Wellenlänge (RNA = 40 ng-cm/ul); b = Strecke in cm

$$\frac{1000 \text{ ng}}{\text{RNA-Konzentration im NanoDrop}} = \text{Benötigte RNA-Menge } [\mu\text{l}]$$

**Formel 4. Berechnung der benötigten RNA-Menge für die cDNA-Synthese.**

Die mithilfe von Formel 4 berechnete RNA wurde auf 10 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Für die reverse Transkription erfolgte die Herstellung eines Mastermixes (Tabelle 12).

**Tabelle 12. Herstellung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.**

Substanz	Menge pro Probe [µl]	Finale Konzentration
10 x Reverse Transkriptase Puffer	2	1x
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) Mix (100 mM)	0,8	4 mM
10 x Reverse Transkriptase zufällige Primer	2	1x
MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1	2,5 U/µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	1	1 U/µl
Nuclease-freies Waser	3,2	

RNA-Probe (1000 ng)	10
Insgesamt	20

Die Proben wurden zusammen mit dem Mastermix im Verhältnis 1:2 gemischt. Die Transkription erfolgte mittels des Veriti 96-well Thermocyclers. Die cDNA-Synthese erfolgte in mehreren Erhitzungsschritten (Tabelle 13). Zunächst erfolgte eine Erhitzung auf 25°C, um ein Gleichgewicht in der Probe herzustellen. Danach erfolgte für 120 min bei 37°C die cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase. Hierbei erfolgt der Abbau von RNA zu cDNA basierend auf der RNase-H-Aktivität des Enzyms. Nun erfolgte die Erhitzung auf 85°C für 5 min zur Deaktivierung der Enzyme. Zuletzt wurden die Proben auf 4°C abgekühlt, sodass die cDNA bis zur weiteren Verwendung stabil gelagert werden konnte. Anschließend wurde die Proben verdünnt, sodass eine finale Konzentration von 10 ng/µl vorlag. Die Proben wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

**Tabelle 13. Zyklen des Thermocyclers für die cDNA-Synthese.**

Temperatur [°C]	Zeit [min]
25	10
37	120
85	5
4	Bis zur Abkühlung

#### 3.3.2.4 Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgt die Analyse der mRNA-Expression bestimmter Gene auf Basis der Amplifikation der synthetisierten cDNA. Die PCR wurde mittels TaqMan® durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Echtzeit-PCR-Methode, welche Nukleinsäuren komplementär zu der Ziel-DNA nutzt. Die TaqMan®-Probe besitzt sowohl an ihrem 5´-, als auch an ihrem 3´-Ende Fluoreszenzfarbstoffe. TaqMan®-Proben sind so designt, dass diese an eine spezifische DNA-Region hinter einem Primer binden. Mittels der Taq-Polymerase wird der Primer verlängert. Aufgrund der 5´-3´-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die TaqMan®-Probe abgebaut. Durch den Abbau kommt es zur Freisetzung von Fluorophor, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann. Die gemessene Menge an Fluorophor ist hierbei direkt

proportional zur Fluoreszenz und der vorhandenen DNA. Die PCR erfolgte in MicroAMP Fast Optical 96-well Reaktionsplatten. Es erfolgte für die PCR eine Herstellung des Mastermixes (Tabelle 14). Für die Analyse wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit dem Mastermix in die Reaktionsplatte überführt, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µl vorliegt. Die 96-Well-Platte wurde mit MicroAmp™ Optical Adhesive Folie versiegelt. Anschließend wurde die Platte bei 1000 x g und 20°C für 1 min zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich die Probe am Boden der Reaktionsplatte befindet und keine Luftblasen mehr vorhanden sind. Die Messung erfolgte mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System mit der StepOnePlus™ Software (Version 2.0) mit mehreren Heizschritten (Tabelle 15). Zunächst erfolgte das Aufheizen bei 50°C für 2 min und anschließend die Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 2 min. Nun erfolgte die Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei 95°C für je 1 s mit 50 Zyklen. Anschließend folgte bei 60°C je 20 s mit 50 Zyklen die Anlagerung des Primers und der TaqMan®-Probe, welche zur Elongation führt. RPLP0 wurde als Haushaltsgen für die Normalisierung verwendet und die Analyse erfolgte über die  $\Delta C_t$ -Methode (Formel 5).

**Tabelle 14. Zusammensetzung des Mastermixes für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).**

Substanz	Menge pro Probe [µl]
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)	5
TaqMan® Assay Primer (20x)	0,5
cDNA-Probe (10 ng/µl)	1
Nuclease-freies Wasser	3,5
Insgesamte Menge pro Probe	10

**Tabelle 15. Zyklen der Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion.**

Methode	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
Aufheizen	1	50	2 min
Polymerase Aktivierung	1	95	2 min
Denaturierung	50	95	1 s
Extension	50	60	20 s

$$\text{Relative mRNA-Expression des Zielgens} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

Formel 5. Berechnung der mRNA-Expression anhand der  $\Delta\text{Ct}$ -Methode.

### 3.3.3. Methoden zur Detektion der Gefäßverkalkung

#### 3.3.3.1 Bestimmung der Matrixmineralisierung mittels Alizarin Rot Färbung

Bei der Alizarin Rot Färbung werden Kalziumablagerungen durch eine rote bis orangene Farbe visualisiert. Diese entsteht durch die Chelatbildung von Kalzium mit Alizarin Rot bei pH 4,2. Bei diesem pH-Wert weist Alizarin Rot die höchste Sensitivität für Kalzium auf. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) (pH = 7,4) für 15 min bei RT fixiert und anschließend dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die fixierten Zellen wurden mit 2% (w/v) Alizarin Rot-Lösung (pH = 4,2) für 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt, bis sich keine Farbe mehr löst. Final wurden die Zellen getrocknet und mit dem EVOS® FL Cell Imaging System bei vierfacher und zehnfacher Vergrößerung mikroskopiert. Zur Quantifizierung der Kalziumablagerungen erfolgte die Elution des interkalierten Alizarin Rot mittels 100 mM Cetylpyridinium-Lösung (pH 4,3). Dafür wurde 1 ml der 100 mM Cetylpyridinium-Lösung (pH = 4,3) auf die gefärbten Zellen in einer 24-well Platte gegeben und für etwa eine Stunde bei 37°C inkubiert, bis sich der Farbstoff komplett löste. Anschließend wurde 100 µl des Überstandes in eine transparente 96-well Platte überführt und die Absorption bei 570 nm mit dem Cytation5 ermittelt. Die mit dem Mikroskop angefertigten Bilder wurden mittels Bildanalyse quantifiziert. Dafür wurden die Bilder in ein 8-bit-Format konvertiert und die Rotfärbung der Zellen mit einem Threshold von 100 gemessen (Anhang Abbildung 1).

#### 3.3.3.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase

Die gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP) ist ein früher Marker der SMC-Verkalkung. Das genutzte Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit von Biovision basiert auf der Dephosphorylierung des Substrats para-Nitrophenylphosphat (pNPP) durch die alkalische Phosphatase (AP). Dadurch entsteht das gelbe Produkt para-Nitrophenyl, welches durch eine Absorptionsmessung bei 405 nm nachgewiesen werden kann. Dafür wurden die

Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 80 µl Assay Puffer lysiert. Die Lösung des Zell-Monolayers erfolgte mit einem Schaber und es erfolgte eine Überführung in ein kaltes Reaktionsgefäß. Das Zelllysate wurden bei 14 800 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Für die Quantifizierung der TNAP-Aktivität wurden die Proben in einem Verhältnis 1:5 mit Assay Puffer in eine transparente 96-well Platte pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 80 µl vorlag. Zu diesen wurde 50 µl 5 mM para-Nitrophenylphosphat-Lösung (pNPP) gegeben. Für diese Lösung erfolgte die Lösung einer Tablette pNPP-Substrattablette in 2,7 ml Assay Puffer. Für die Quantifizierung der TNAP-Konzentration erfolgte die Bestimmung einer Standardkurve bei 0, 2, 4, 8 und 16 nmol pNPP (Tabelle 16). Anschließend wurde 10 µl alkalische Phosphatase in die Wells für die Standardkurve gegeben. Es erfolgte die Inkubation lichtgeschützt für 60 min bei Raumtemperatur. Der Assay wurde mit 20 µl Stopp-Lösung gestoppt und es erfolgte die Messung der Absorption mit einer Wellenlänge von 405 nm am Cytation5. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte anhand der Standardkurve und unter Berücksichtigung der Verdünnung. Durch die Division mit der Inkubationszeit und des Probenvolumens ergab sich die TNAP-Aktivität [U/ml]. Es erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge mit Hilfe des Bicinchoninsäure Assay (BCA). Anschließend erfolgte die Normalisierung der Enzymaktivität auf die Proteinkonzentration, sodass sich eine TNAP-Aktivität [U/g Protein] ergibt (Formel 6).

**Tabelle 16. Pipettierschema der Standardkurve zur Bestimmung der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (TNAP).**

Standard [nmol]	1 mM pNPP [µl]	Assay Puffer [µl]
0	0	120
2	2	118
4	4	116
6	6	114
8	8	112
16	16	104

$$\text{TNAP-Aktivität [U/g Protein]} = \frac{\frac{a}{v \times t} \times d}{p}$$

**Formel 6. Berechnung der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (TNAP) Aktivität und Normierung auf die Proteinmenge.** a = Menge pNP [ $\mu\text{mol}$ ]; v = Probenvolumen [ $\mu\text{l}$ ]; t = Reaktionszeit [min]; d = Verdünnungsfaktor; p = Proteinkonzentration [g/ml]

### **3.3.4 Methoden zur Quantifikation von extrazellulären Vesikeln**

#### **3.3.4.1 Bestimmung der Anzahl und Größe extrazellulärer Vesikel anhand der Nanopartikel Tracking-Analyse**

Die Analyse der Partikelgröße und Partikelanzahl von EVs erfolgte mit der Nanopartikel Tracking Analyse (NTA) von Malvern Panalytical, die auf der Brownschen Molekularbewegung beruht. Die Molekularbewegung steht in Abhängigkeit von der Viskosität und Temperatur, wird aber nicht von der Partikeldichte beeinflusst. Durch die Analyse der Partikel und unter Berücksichtigung der Einstein-Smoluchowski-Beziehung erfolgt die Berechnung der Partikeldurchmesser. Die Detektionsreichweite des Gerätes, in der Partikel beziehungsweise EVs gemessen werden können, reicht von 10 nm bis 1000 nm. Zunächst wurde konditioniertes Medium 1:2 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in eine 1 ml Spritze aufgezogen. Diese wurde dann in die Spritzenpumpe eingesetzt und die Probenkammer befüllt. Die Messungen wurden mit fünf Replikatmessungen pro Probe mit je 60 s pro Messung durchgeführt. Zwischen den Replikaten wurde neue Probe aus der Spritze in die Kammer eingespült. Die Messungen fanden mit dem blauen Laser (488 nm), Kameralevel 14 und Threshold 5 bei 25°C statt.

#### **3.3.4.2 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Mineralbeladung von extrazellulären Vesikeln**

Die Durchflusszytometrie basiert auf dem Prinzip der Emission von optischen Signalen von Partikeln, wie Zellen oder EVs, wenn diese einen Laser passieren. Das hierbei entstandene Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird detektiert. Das Streulicht lässt sich unterteilen in Vorwärtsstreulicht (engl. Forward scatter (FSC)) und Seitwärtsstreulicht (engl. Side scatter (SSC)). FSC ist hierbei Maß für das Zellvolumen und SSC für die Granularität. Um Rückschlüsse auf die Anwesenheit von EVs zu ermöglichen, wurden diese mit 5-Chlormethylfluoresceindiacetat (CellTracker™ Grün (CTG)) gefärbt. Bei 5-Chlormethylfluoresceindiacetat handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der ein Tracking der EVs ermöglicht. Hierbei ist 5-Chlormethylfluoresceindiacetat

membranpermeabel und wird intrazellulär in ein impermeables Fluoreszenzprodukt umgewandelt. Die Färbung von 100 µl des EV-reichen Überstandes erfolgte bei 37°C für 15 min mit 5 µM CTG (1 mg gelöst in 10 µl DMSO). Durch eine Färbung mit Osteosense sind Rückschlüsse auf die Mineralbeladung der EVs möglich. Bei Osteosense handelt es sich um ein Fluoreszenz-gekoppeltes Bisphosphonat, welches mit hoher Affinität an Hydroxyapatit bindet. Dies ermöglicht die Quantifizierung der Mineralbeladung der EVs. 100 µl des EV-haltigen Überstandes wurden auf Eis für 30 min mit Osteosense in einer Verdünnung 1:100 gefärbt, sodass eine finale Konzentration von 200 nmol erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Messung der gefärbten Proben 1:10 verdünnt in FluoroBrite™ DMEM am CytoFlexS der Firma Beckman Coulter mit den Einstellungen aus Tabelle 17. Für die Auswertung wurde die gefärbte Population von der ungefärbten im FITC-Kanal in CM durch ein Gate voneinander getrennt. In Vesikeln von kalzifizierenden Zellen zeigten sich im Osteosense-Kanal zwei Populationen. Von diesen wurde eine stärker mit Osteosense gefärbt und als positive Population markiert. Die Trennung der beiden Populationen erfolgte ebenfalls durch ein Gate.

**Tabelle 17. Einstellungen für die Messungen am Durchflusszytometer.**

<b>Gain / Trigger</b>	<b>Einstellungen</b>	<b>Wert</b>
Gain	Vorwärtsstreulicht (FCS)	106
	Violette Seitenstreuung (VSSC)	1
	Seitenstreuung (SSC)	91
	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	750
	Osteosense	500
Trigger	Violette Seitenstreuung (VSSC)	2000

### **3.3.4.3 Analyse der Mineralisierung extrazellulärer Vesikel anhand des Aggregationassays**

Bei dem Aggregationsassay handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung des Aggregationsverhaltens und des Mineralgehaltes von EVs. Dieser basiert darauf, dass die zuvor isolierten EVs mit einem mineralhaltiger Reaktionspuffer (Tabelle 17) und β-Glycerolphosphat versetzt werden. Das β-Glycerolphosphat fungiert als TNAP-abhängige Phosphatquelle. Kalzifizierende EVs enthalten im Gegensatz zu nicht kalzifizierenden EVs das Enzym TNAP. Dieses Enzym

wandelt  $\beta$ -Glycerolphosphat in Phosphat um, wodurch Mineralien ausfallen und die EVs aggregieren. Der Kalzium- und Phosphatgehalt der EVs verstärkt diesen Aggregationsprozess zusätzlich. Daher hängt der Grad der Aggregation und Mineralpräzipitation der EVs von ihrem TNAP- und Mineralgehalt ab. Die Quantifizierung erfolgte mittels Absorptionsmessung, denn in Abhängigkeit vom TNAP- und Mineralgehalt entstand eine unterschiedlich stark ausgeprägte Trübung. Somit ermöglicht der Aggregationsassay einen Rückschluss auf das Kalzifizierungspotential der EVs. Die zuvor gesammelten EVs von CaP und OM wurden auf Eis aufgetaut und im Verhältnis 1:2 im Reaktionspuffer (pH = 8,0) (Tabelle 18) verdünnt. In die verdünnte Probe wurden dann 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat pipettiert. Die Messung erfolgte von Triplikaten je 200  $\mu$ l in einer 96-Well Platte. Für die Minimierung der Verdunstung der Proben wurden die Wells am Rand frei gelassen und die Wells um die Proben herum mit Wasser befüllt. Es erfolgte die Versiegelung der Platte mit Parafilm und die Präinkubation für fünf Stunden bei 37°C. Für die finale Messung wurde die Platte in den auf 37°C vorgeheizten Reader überführt. Die Messung der Absorption erfolgte alle fünf Minuten bei 340 nm für 30 Minuten bei 37°C am Tecan Plate Reader. Für die Auswertung wurde der niedrigste Wert von den restlichen Werten subtrahiert. Aus dem daraus gebildeten Graphen wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) mittels GraphPad Prism (Prism Software Inc., Version 10.0.3) bestimmt.

**Tabelle 18. Zusammensetzung des Reaktionspuffers für den Aggregationsassay.**

Substanz	Massenkonzentration	Stoffmengenkonzentration
	[g/l]	[mol/l]
Saccharose	21,73	0,064
Glukose	1,0	0,006
MgSO <sub>4</sub>	0,14	0,001
MOPS	20,9	0,099
CaCl <sub>2</sub>	0,222	0,002
NaHCO <sub>3</sub>	0,154	0,002
NaCl	6,0	0,102

### 3.3.5 Statistische Analyse

Die Daten werden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Für die Analyse von zwei Gruppen wurde ein t-test verwendet. Die Welch-

Korrektur wurde angewandt bei unterschiedlichen Varianzen, die mithilfe eines F-Tests ermittelt wurden. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine One-way-analysis of variance (ANOVA) durchgeführt. P Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant eingestuft. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (Prism Software Inc., Version 10.0.3) und R (Version 4.3.1).

## 4 Ergebnisse

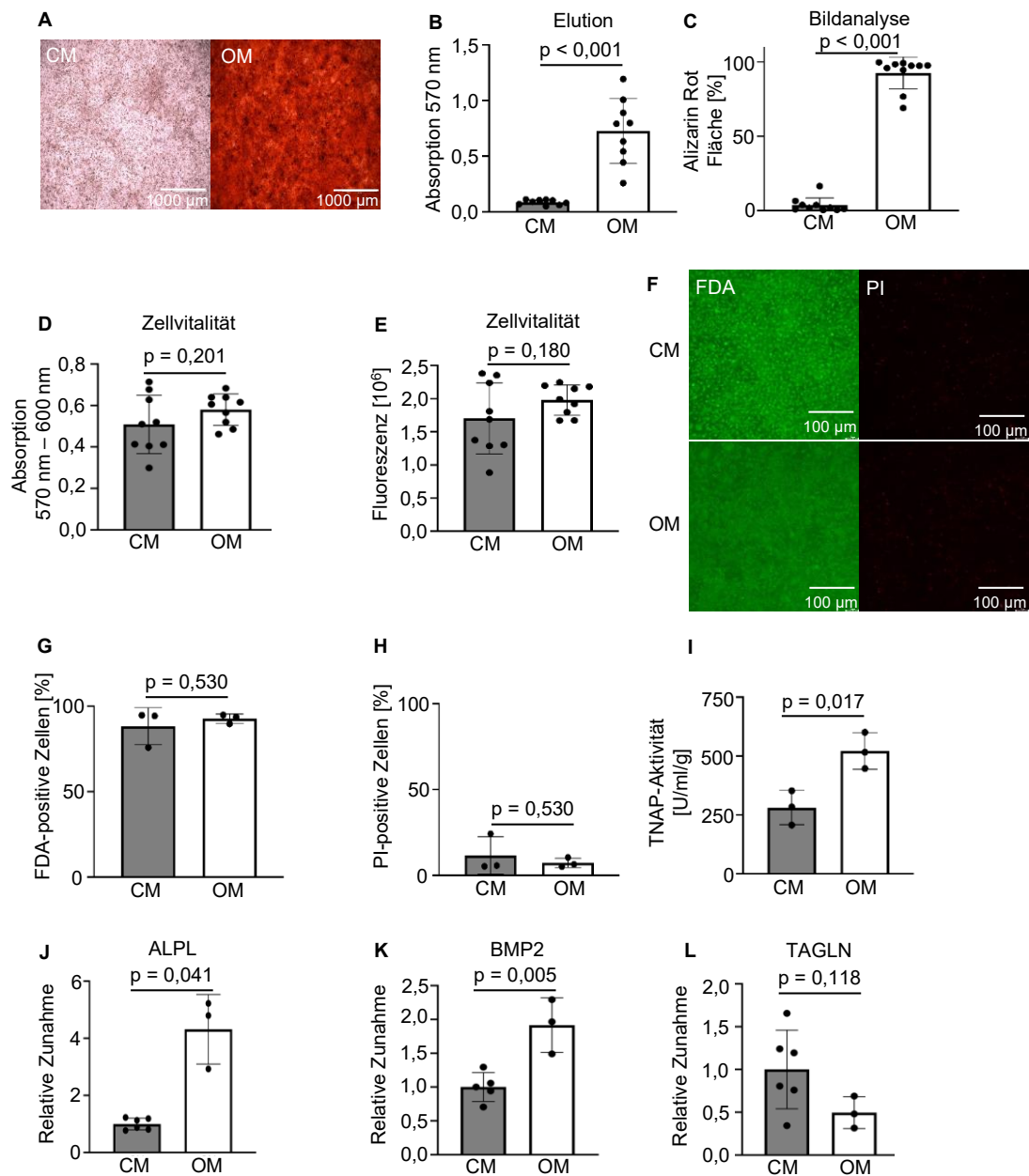
### 4.1 In-vitro Kalzifizierungsmodell – Osteogenes Medium

#### 4.1.1 Analyse der Kalzifikation auf zellulärer Ebene

Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für vierzehn Tage mit osteogenem Medium (OM) kultiviert, um die Mineralablagerung in die extrazelluläre Matrix zu induzieren, die durch Alizarin Rot Färbung im Lichtmikroskop dokumentiert wurde (Abbildung 12A). Die Quantifizierung der mineralisierten Matrix erfolgte durch zwei Methoden. Die Elution des Alizarin-Rot zeigte 8,3-fache mehr mineralisierte Matrix im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,001$ , Abbildung 12B), während eine Bildanalyse eine 24,8-fache Erhöhung zeigte ( $p < 0,001$ , Abbildung 12C). Aufgrund der höheren Konsistenz der Werte der Bildanalyse wurde für weitere Analysen diese Methode für die Quantifizierung der mineralisierten Matrix genutzt.

Die Zellviabilität wurde mittels Resazurin-vermittelter Methode bestimmt, die durch Absorptionmessung und Fluoreszenzmessung ausgewertet werden kann. Beide Methoden zeigen keinen Einfluss des osteogenen Mediums auf die Viabilität der SMCs im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12D, E). Da die Fluoreszenzmessung vom Hersteller als sensitiver eingestuft wird, wurde für weitere Experimente dieser Arbeit nur noch diese gemessen (ThermoFisher, 2024). Neben der Resazurin-Reduktion wurde die Zellvitalität mittels FDA-PI-Fluoreszenzmessung bestimmt. FDA-positive Zellen sind grün-fluoreszierend und lebend und PI-positive Zellen sind rot-fluoreszierend und tot. Die Fluoreszenzbilder zeigen einen hohen Anteil an lebenden SMCs und nur wenige PI-positive SMCs in CM und OM (Abbildung 12F). Die Quantifizierung zeigte, keinen Einfluss von OM auf den Anteil FDA- ( $p = 0,530$ ) und PI-positiver ( $p = 0,530$ ) Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12G, H).

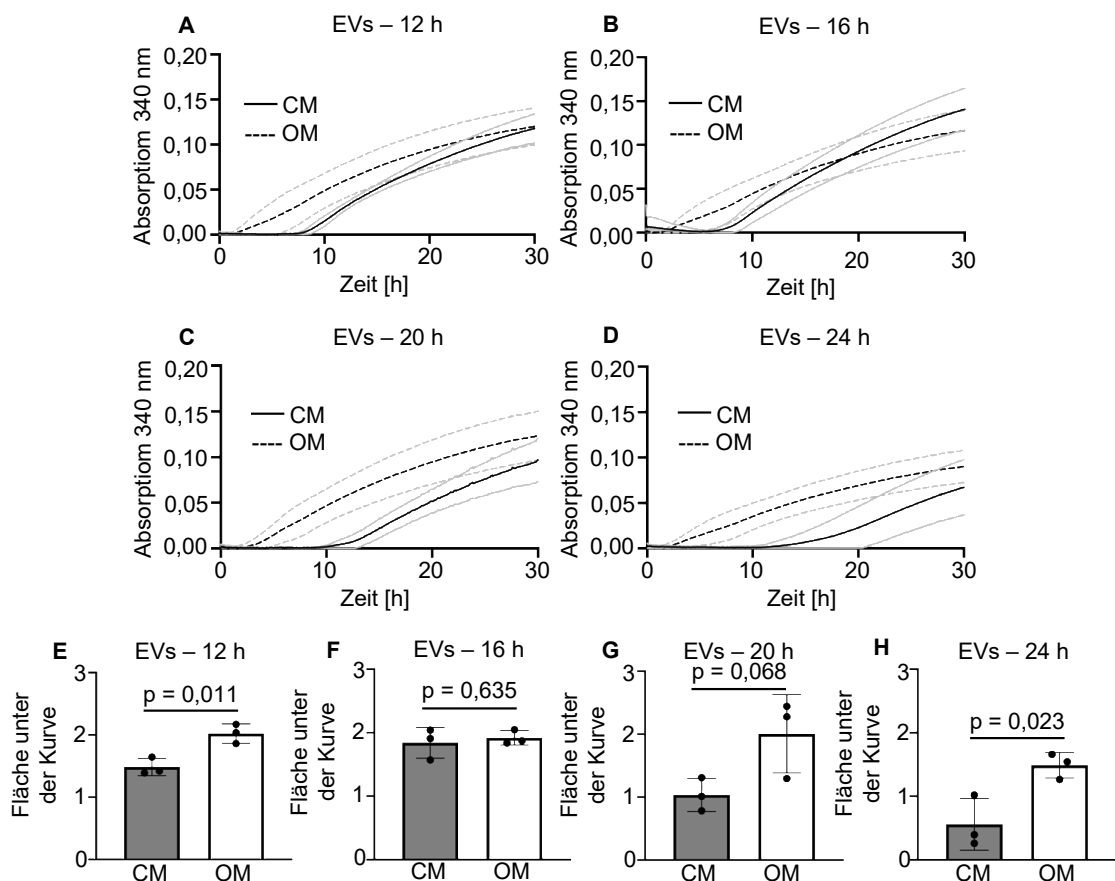
Als nächstes wurde die TNAP-Aktivität, als früher Marker der SMC Kalzifizierung bestimmt. Kalzifizierte SMCs zeigen eine 2-fach erhöhte TNAP-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,017$ , Abbildung 12I). Weiterhin erhöhte OM die ALPL mRNA-Expression 2,1-fach ( $p = 0,041$ , Abbildung 12J) und die BMP2 mRNA-Expression 1,7-fach ( $p = 0,005$ , Abbildung 12K). Die TAGLN mRNA-Expression wurde in kalzifizierten SMCs nicht verändert ( $p = 0,118$ ) (Abbildung 12L).



**Abbildung 12. Osteogenes Medium (OM) induziert die Kalzifikation in glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) ohne Einfluss auf die Zellvitalität.** (A) SMC wurden für 14 Tage in OM kultiviert und die Matrixmineralisierung wurde im Vergleich zum Kontrollmedium (CM) durch Alizarin Rot Färbung dargestellt. Maßstab 1000  $\mu\text{m}$ . (B – C) Die Quantifizierung der Matrixmineralisierung erfolgte mittels (B) Elution und (C) Fiji-Bildanalyse. (D – E) Zur Überprüfung der Zellvitalität erfolgte die Messung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin-Reduktion. Es erfolgte die Messung der (D) Absorption und (E) Fluoreszenz. (F) Zur weiteren Bestimmung der Zellvitalität erfolgte eine Fluoreszeindiacetat-Propidiumiodid-Färbung (FDA-PI), welche im Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurden. Lebende Zellen erscheinen hierbei grün fluoreszierend und tote Zellen rot. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . (G – H) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji, wobei die lebenden Zellen durch FDA dargestellt werden und die toten durch PI. (I) Die TNAP-Aktivität wurde nach sieben Tagen bestimmt und auf die Proteinmenge normalisiert. (J – L) Die Durchführung einer Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion (qPCR) erfolgte mittels TaqMan-Assays. Bestimmt wurden die Gene ALPL, BMP2 und TAGLN nach 14 Tagen. Kontrollmedium (CM) wird als Duplikt dargestellt.  $n = 3 - 10$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , t-Test ggf. mit Welch-Korrektur bei signifikantem F-test.

#### 4.1.2 Analyse mineralpositiver extrazellulärer Vesikel

SMC wurden mit OM kultiviert und nach neun Tagen für bis zu 24 Stunden mit serum-reduzierten Medium (DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 0,1 % FBS) kultiviert. Dies dient der Bestimmung des optimalen Zeitpunktes zur EV-Probengewinnung. Konditioniertes Medium wurde nach 12, 16, 20 und 24 Stunden mittels Aggregationsassay analysiert (Abbildung 13A-D). Die Quantifizierung der Aggregationskurve erfolgte mittels Bestimmung der Fläche unter der Kurve. Diese zeigt, dass EVs aus 12 Stunden konditioniertem Medium ein 1,4-fach erhöhtes Aggregationsverhalten im Vergleich zu CM aufweisen ( $p = 0,011$ , Abbildung 13E). Nach 24 Stunden ist das Aggregationsverhalten von OM zu CM 2,4-fach erhöht ( $p = 0,023$ , Abbildung 13H). Nach 16 und 20 Stunden lässt sich kein Unterschied in der EV-Aggregation beobachten (Abbildung 13F-G). Dementsprechend erfolgte die Probengewinnung der EVs für weitere Experimente dieser Arbeit nach 24 Stunden.

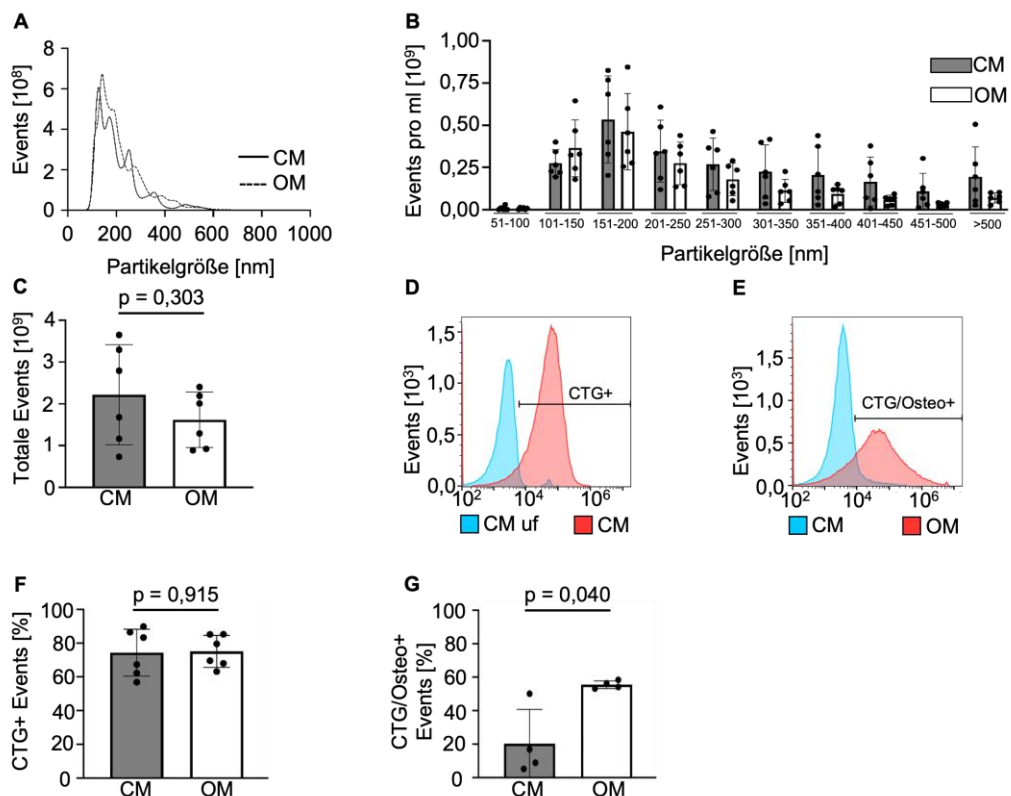


**Abbildung 13. Extrazelluläre Vesikel (EV) unter osteogenen Bedingungen inkubiert mit serum-reduziertem Medium sind in ihrem Aggregationsverhalten nach 24 Stunden Inkubation im Vergleich zum Kontrollmedium (CM) verändert.** (A – D) Glatte Gefäßmuskellzellen (SMC) wurden nach neun Tagen für bis zu 24 Stunden in FBS-reduziertem Medium (DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 0,1 % fetales Kälberserum (FBS)) kultiviert. Nach 12, 16, 20 und 24 Stunden wurde der EV-haltige Überstand gewonnen. Das Aggregationsverhalten wurde mit dem Aggregationsassay analysiert. Es fand eine Messung der

Absorption bei 340 nm alle 5 min für 30 h bei 37°C statt. Darstellung von repräsentativen Graphen des Aggregationsverhalten von CM im Vergleich zu osteogenem Medium (OM) an unterschiedlichen Zeitpunkten. (E – H) Es erfolgte die Quantifizierung der Graphen durch die Analyse der Fläche unter der Kurve. n = 3, MW (schwarze Linie)  $\pm$  SD (gestrichelte Linie), Area under the curve (AUC), t-Test.

Für die weitere Analyse der EVs erfolgte die Messung der Menge an Events differenziert nach Partikelgröße mittels NTA. In der graphischen Darstellung ist kein Unterschied in den Events aufgeteilt nach Partikelgröße zwischen OM und der Kontrolle nachweisbar (Abbildung 14A). In der Klassifizierung der Events per Partikelgröße und in der Darstellung der totalen Events ist kein Unterschied von OM zu CM messbar (Abbildung 14B, C).

Als nächstes erfolgte die Analyse der Mineralbeladung der EVs durch Durchflusszytometrie. In der Darstellung der repräsentativen Messungen sind mehr CTG-positive Events in der gefärbten Kontrolle als in der ungefärbten Kontrolle detektierbar (Abbildung 14D). In der CTG/Osteosense-Doppelfärbung sind mehr positive Events von OM im Vergleich zur Kontrolle messbar (Abbildung 14E). Die Quantifizierung der CTG-positiven Events zeigte keinen Unterschied von OM zur Kontrolle (Abbildung 14F). Die Quantifizierung der CTG/Osteosense-Doppelfärbung zeigte eine 4,0-fache Erhöhung der detektieren Events in OM im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,040, Abbildung 14G).



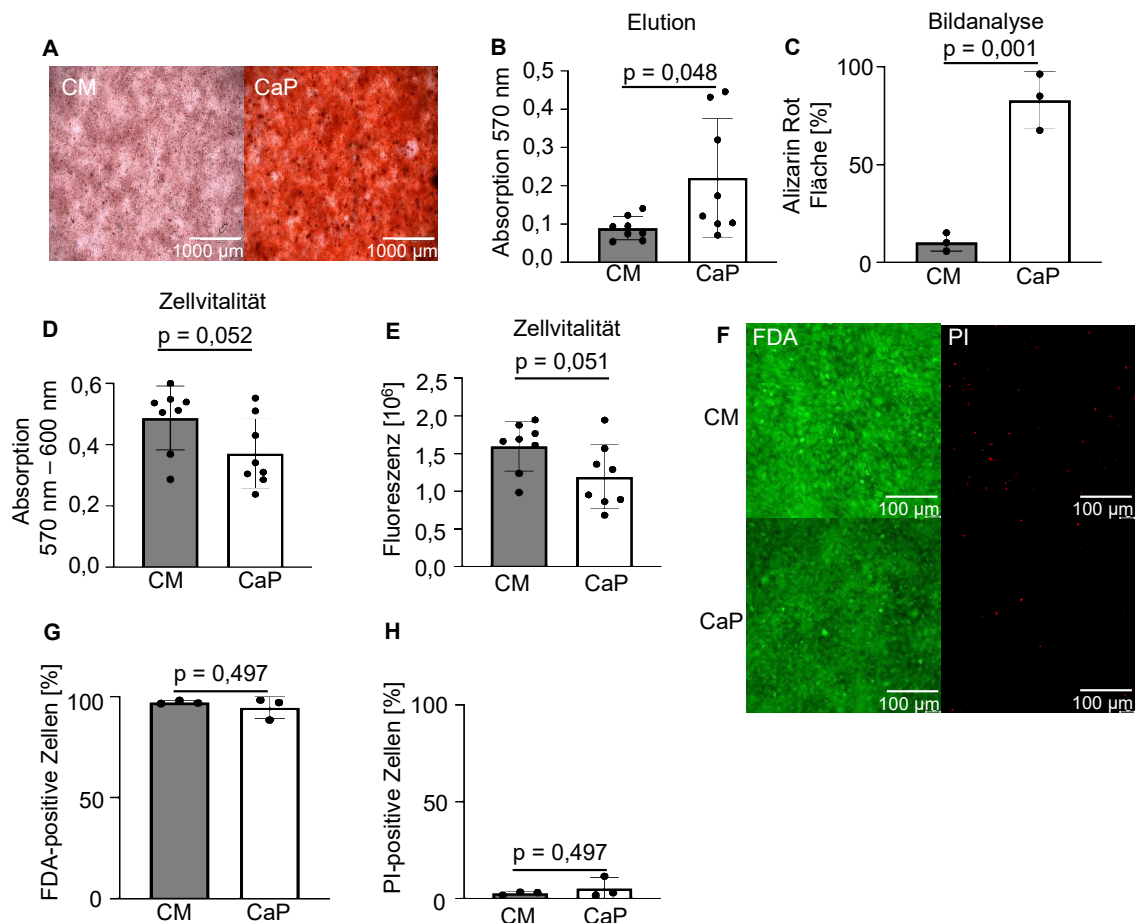
**Abbildung 14. Extrazelluläre Vesikel (EVs) haben eine höhere Mineralbeladung unter osteogenen Konditionen.** (A – C) EVs, die nach 24 Stunden gesammelt wurden, wurden mithilfe der Nanopartikeltracking Analyse (NTA) analysiert. Es wurden fünf Videos je 60 s pro Probe aufgenommen und analysiert. Darstellung einer (A) repräsentativen Kurve und Quantifizierung mit (B) Aufteilung nach Partikelgröße und (C) Gesamtevents im NTA. (D – G) Die EVs wurden in der Durchflusszytometrie analysiert. Es erfolgte die Messung der vorhandenen Events mittels grünem CellTracker™ (CTG). Die Messung der Mineralbeladung erfolgte durch Osteosense (Osteo). Darstellung von repräsentativen Kurven von (D) CTG und (E) Osteosense und (F – G) Quantifizierung. n = 3 – 6, MW ± SD, t-Test.

## **4.2 In-vitro Kalzifizierungsmodell – Kalziumphosphat Medium**

### **4.2.1 Analyse der Kalzifikation auf zellulärer Ebene**

SMC wurden für sieben Tage mit CaP kultiviert, um die Mineralablagerung der extrazellulären Matrix zu induzieren, die durch Alizarin Rot Färbung im Lichtmikroskop dokumentiert wurde (Abbildung 15A). Die Quantifizierung der mineralisierten Matrix erfolgte durch zwei Methoden. Die Elution der Alizarin-Rot-Färbung zeigte 2,5-fache mehr mineralisierte Matrix im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,048$ , Abbildung 15B), während eine Analyse der Bilder eine 8,0-fache Erhöhung zeigte ( $p = 0,001$ , Abbildung 15C). Aufgrund der höheren Konsistenz der Werte der Bildanalyse wurde für weitere Analysen diese Methode für die Quantifizierung der mineralisierten Matrix genutzt.

Bei CaP erfolgte ebenfalls die Messung der Zellviabilität mittels der Resazurin-vermittelten Methode. Hierbei zeigten weder die Absorptions- noch die Fluoreszenzmessung einen Einfluss auf die Viabilität der SMCs im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15D-E). Im weiteren Verlauf erfolgte wegen der höheren Sensitivität hierbei nur die Fluoreszenzbestimmung (ThermoFisher, 2024). Ebenso erfolgte die Messung der Zellvitalität mittels FDA-PI-Fluoreszenzmessung bestimmt. Die Fluoreszenzbilder zeigen einen hohen Anteil an lebenden SMCs und nur wenige PI-positive SMCs in CM und CaP (Abbildung 15F). Die Quantifizierung zeigte, keinen Einfluss von CaP auf den Anteil FDA- ( $p = 0,497$ ) und PI-positiver ( $p = 0,497$ ) Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15G-H).

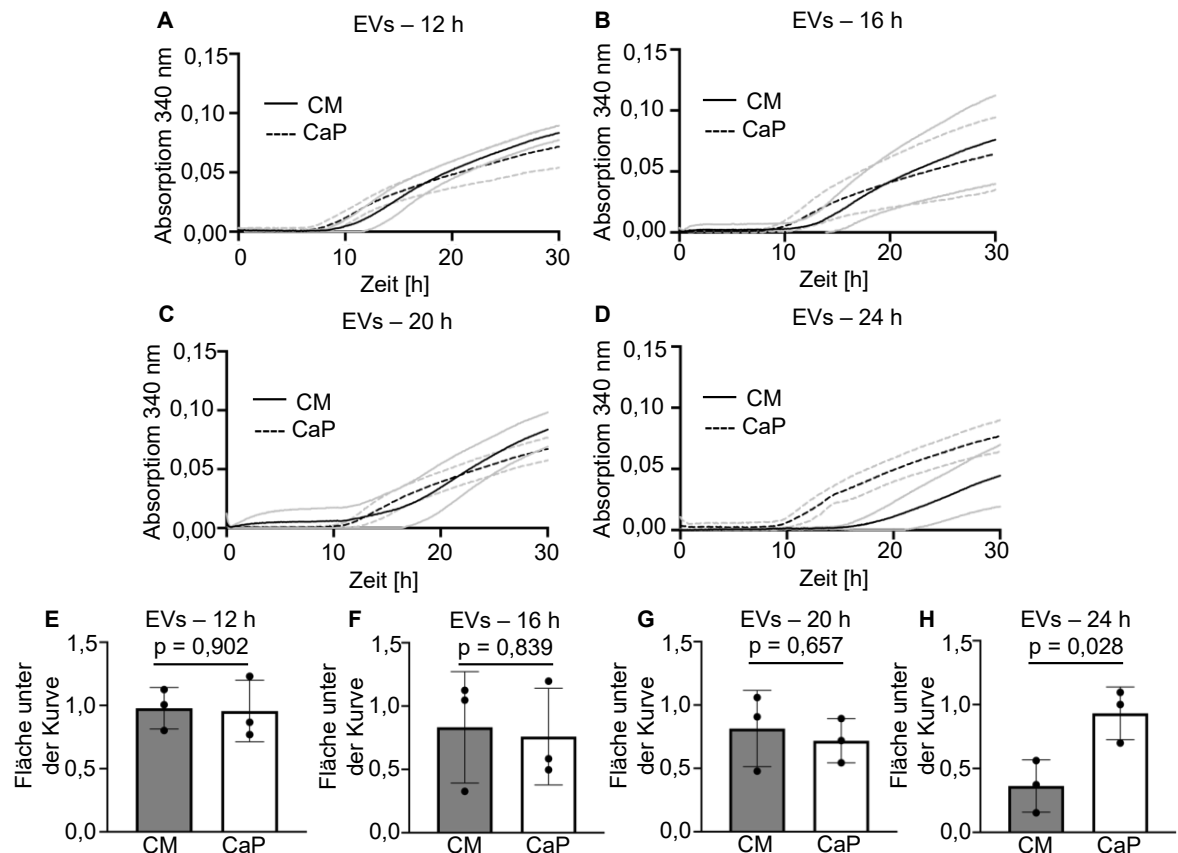


**Abbildung 15. Kalziumphosphat (CaP) induziert die Kalzifikation in glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) ohne Einfluss auf die Zellvitalität.** (A) SMC wurden für 7 Tage mit CaP kultiviert und die Matrixmineralisierung wurde im Vergleich zum Kontrollmedium (CM) durch Alizarin Rot Färbung dargestellt. Maßstab 1000  $\mu\text{m}$ . (B – C) Die Quantifizierung erfolgte mittels (B) Elution und (C) Bildanalyse mittels Fiji. (D – E) Zur Überprüfung der Zellvitalität erfolgte die Messung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin-Reduktion. Es erfolgte die Messung der (D) Absorption (E) und Fluoreszenz. (F) Zur weiteren Überprüfung erfolgte eine Fluoreszeindiacetat-Propiumiodid-Färbung (FDA-PI), welche im Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurden. Lebende Zellen erscheinen hierbei grün fluoreszierend und tote Zellen rot. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . (G – H) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji, wobei die lebenden Zellen durch FDA dargestellt werden und die toten durch PI.  $n = 3 - 9$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , t-Test ggf. mit Welch-Korrektur bei signifikantem F-test.

#### 4.2.2 Analyse mineralpositiver extrazellulärer Vesikel

SMC wurden mit CaP kultiviert und nach sechs Tagen für bis zu 24 Stunden mit serum-reduzierten Medium (DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 0,1 % FBS) kultiviert. Dies diente der Bestimmung des optimalen Zeitpunktes zur EV-Probengewinnung. Konditioniertes Medium wurde nach 12, 16, 20 und 24 Stunden mittels Aggregationsassay analysiert (Abbildung 16A–D). Die Quantifizierung der Aggregationskurve, mittels Bestimmung der Fläche unter der Kurve, zeigt kein Unterschied im Aggregationsverhalten nach 12, 16 und 20 Stunden (Abbildung 16E–G). Nach 24 Stunden weisen EVs unter CaP ein 2,6-fach erhöhtes Aggregationsverhalten im Vergleich zu CM auf ( $p = 0,028$ ,

Abbildung 16H). Dementsprechend erfolgte die Probengewinnung der EVs für weitere Experimente mit CaP nach 24 Stunden.

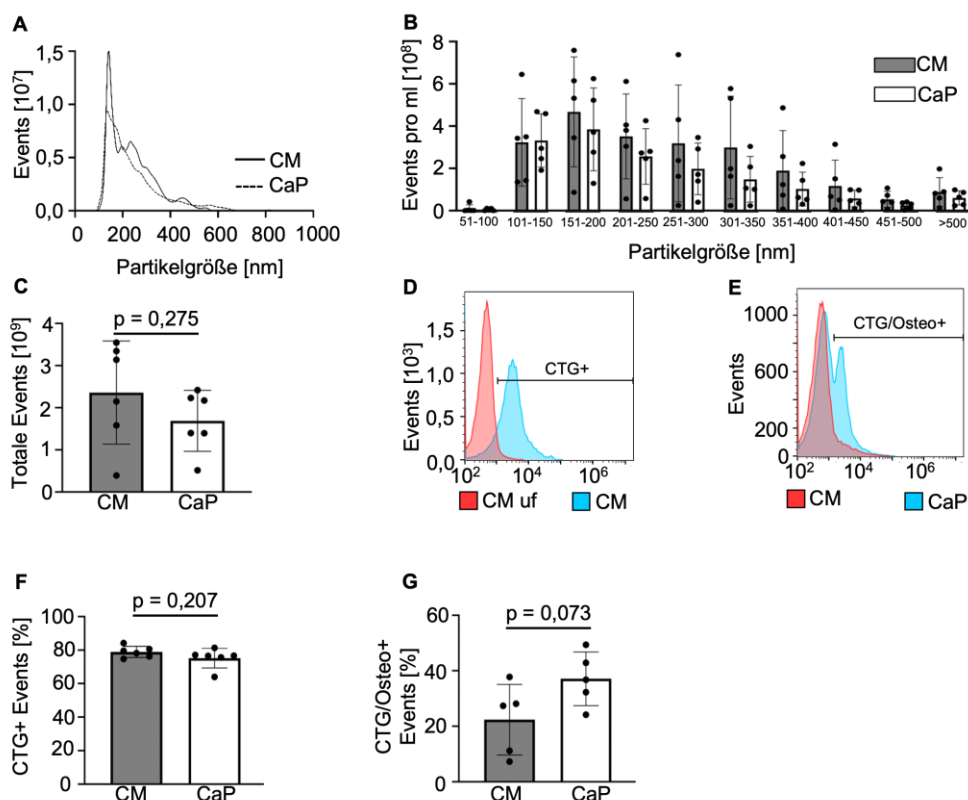


**Abbildung 16. Extrazelluläre Vesikel (EV) inkubiert mit FBS-reduziertem Medium sind in ihrem Aggregationsverhalten nach 24 Stunden Inkubation verändert.** (A – D) Glatte Gefäßmuskellzellen (SMC) wurden nach sieben Tagen für bis zu 24 Stunden in FBS-reduziertem Medium (DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 0,1 % fetales Kälberserum (FBS)) kultiviert. Nach 12, 16, 20 und 24 Stunden wurde der EV-haltige Überstand gewonnen. Das Aggregationsverhalten wurde mit dem Aggregationsassay analysiert. Es fand eine Messung der Absorption bei 340 nm alle 5 min für 30 h bei 37°C statt. Darstellung von repräsentativen Graphen des Aggregationsverhalten von CM im Vergleich zum kalziumphosphatreichen Medium (CaP) an unterschiedlichen Zeitpunkten. (E – H) Es erfolgte die Quantifizierung der Graphen durch die Analyse der Fläche unter der Kurve. n = 3, MW (schwarze Linie) ± SD (gestrichelte Linie), Area under the curve (AUC), t-Test.

Unter Kalziumphosphat Konditionen erfolgte die weitere Analyse der EVs. Zunächst erfolgte die Messung der Menge an Events differenziert nach Partikelgröße mittels NTA. In der graphischen Darstellung ist kein Unterschied in den Events aufgeteilt nach Partikelgröße zwischen CaP und der Kontrolle nachweisbar (Abbildung 17A). Nach der genaueren Aufteilung der Events pro ml und der Darstellung der totalen Events ist kein Unterschied von CaP im Vergleich zur Kontrolle messbar (Abbildung 17B-C).

Die Mineralbeladung der EVs wurde mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert. In den repräsentativen Messergebnissen zeigt die gefärbte Kontrolle ein

stärkeres Signal der CTG-positiven Ereignisse im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle (Abbildung 17D). Bei der CTG/Osteosense-Doppelfärbung wurde ein intensiveres Signal von CaP-positiven Ereignissen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Abbildung 17E). Die Quantifizierung der CTG-positiven Ereignisse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen CaP und der Kontrolle (Abbildung 17F). Auch bei der Quantifizierung der CTG/Osteosense-Doppelfärbung konnte kein signifikanter Unterschied der detektierten Ereignisse zwischen CaP und der Kontrolle nachgewiesen werden ( $p = 0,073$ , Abbildung 17G).



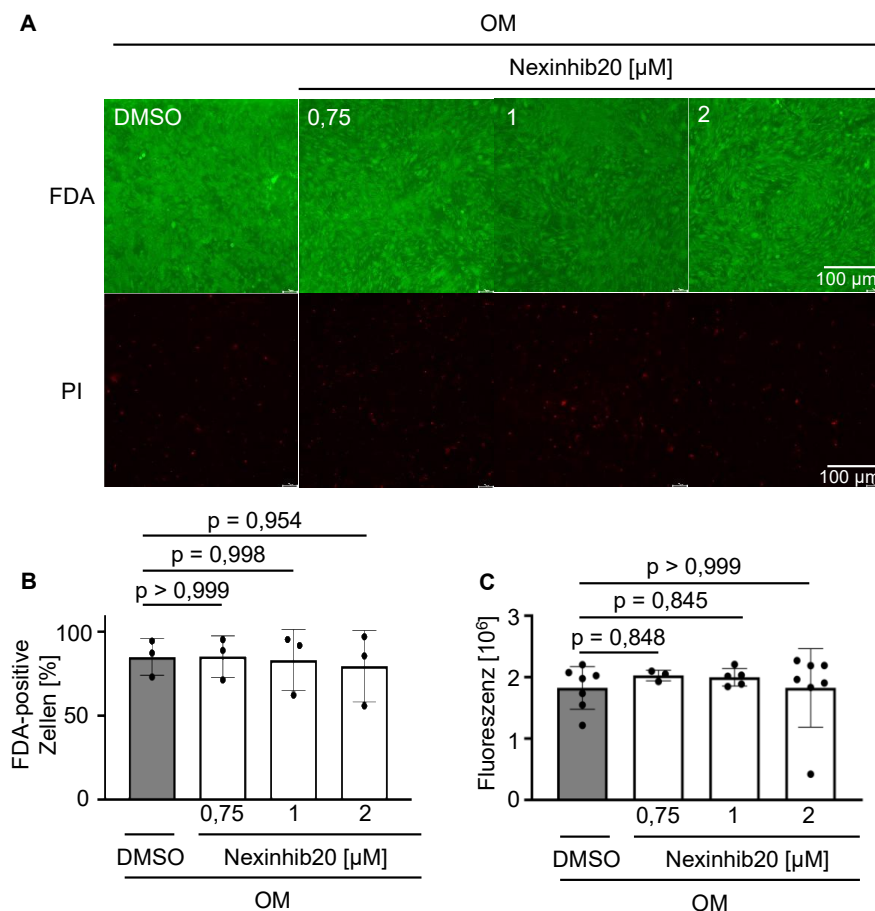
**Abbildung 17. Extrazelluläre Vesikel (EVs) weisen durch Kultivierung in kalziumphosphat-angereicherten Medium (CaP) keine Änderung in der Anzahl mineralpositiver Events auf.** EVs, die nach 24 Stunden gesammelt wurden, wurden mithilfe der Nanopartikeltracking Analyse (NTA) analysiert. Es wurden fünf Videos je 60 s pro Probe aufgenommen und analysiert. (A) Darstellung einer repräsentativen Kurve und (B) Quantifizierung nach Partikelgröße und (C) Gesamtevents im NTA. Die EVs wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es erfolgte die Messung der vorhandenen Events durch Tracking der EVs mittels grünem CellTracker™ (CTG). Die Messung der Mineralbeladung erfolgte durch Osteosense (Osteo). (D) Darstellung von repräsentativen Kurven von CTG und (E) Osteosense und (F – G) Quantifizierung.  $n = 3 - 6$ ,  $MW \pm SD$ , t-Test.

### 4.3. Einfluss der Inhibition der Exozytose

#### 4.3.1 Analyse der Inhibition im osteogenem Medium

SMC wurden für vierzehn Tage mit osteogenem Medium (OM) kultiviert, und stimuliert mit dem Exozytose-Inhibitor Nexinhib20, um die Mineralablagerung in die extrazelluläre Matrix zu induzieren und den Einfluss der Inhibition der

Exozytose zu analysieren. Es wurden die Konzentrationen 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  genutzt und zunächst der Einfluss auf die Zellviabilität, mittels FDA-PI-Fluoreszenzmessung und Resazurin-vermittelter Methode, bestimmt. Die Fluoreszenzbilder und die Quantifizierung zeigte keinen Einfluss von Nexinhib20 auf den Anteil FDA- und PI-positiver Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 18A, B, Anhang Abbildung 3A). Auch die Resazurin-vermittelte Methode zeigte keinen Einfluss des Nexinhib20 auf die Viabilität der SMCs im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 18C).

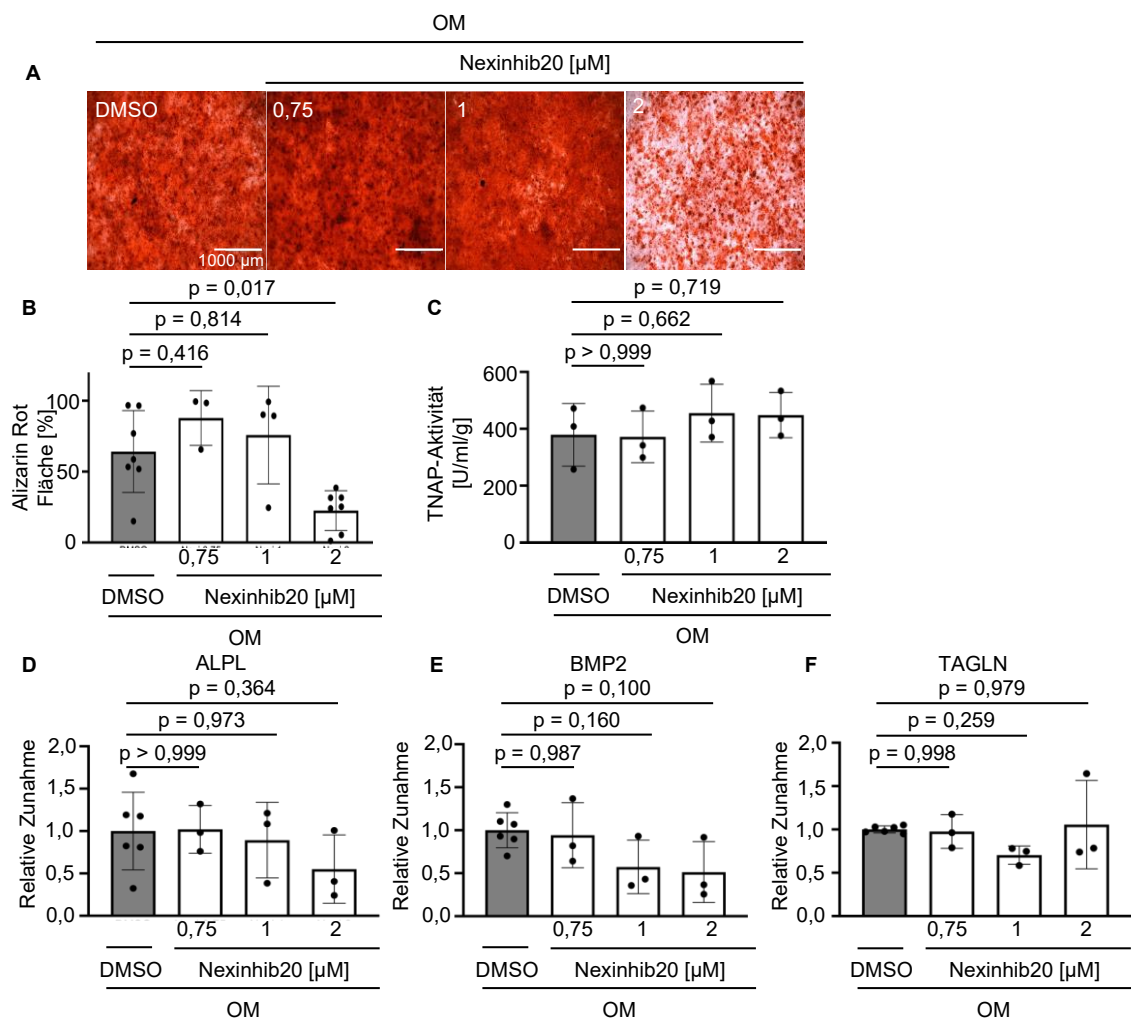


**Abbildung 18. Die Inhibition von Rab27 durch Nexinhib20 beeinflusst die Zellvitalität nicht.**

Glatte Gefäßmuskelnzellen (SMCs) wurden für 14 Tage in osteogenem Medium (OM) kultiviert und mit Nexinhib20 in den Konzentrationen 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. (A) Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels einer Fluoreszeindiacetat-Propidiumiodid-Färbung (FDA-PI), welche im Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurden. Lebende Zellen erscheinen hierbei grün fluoreszierend und tote Zellen rot. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji, wobei die lebenden Zellen durch FDA dargestellt werden und die toten durch PI (Anhang Abbildung 3A). (C) Zur weiteren Überprüfung der Zellvitalität erfolgte die Messung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin-Reduktion nach 14 Tagen.  $n = 3 - 7$ .  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . One-way-ANOVA.

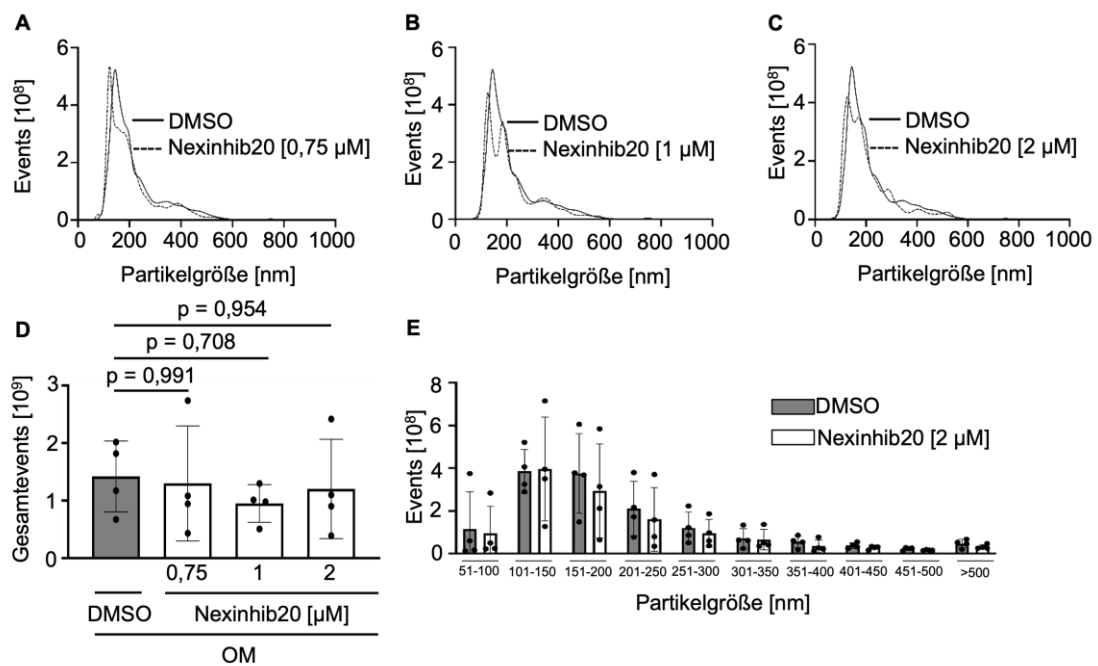
Der Einfluss der Inhibition der Exozytose auf die Matrixmineralisierung erfolgte durch die Alizarin Rot Färbung, welche im Lichtmikroskop dokumentiert, und durch Bildanalyse quantifiziert wurde (Abbildung 19A, B). 0,75 und 1  $\mu\text{M}$

Nexinhib20 beeinflussen die Matrixmineralisierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht. 2  $\mu\text{M}$  Nexinhib20 reduzierte die Matrixmineralisierung um 64,83 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ( $p = 0,044$ , Abbildung 19B). Als nächstes wurde die TNAP-Aktivität, als früher Marker der SMC Kalzifizierung bestimmt. Nexinhib20 hatte keinen Einfluss auf die TNAP-Aktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 19C). Weiterhin veränderte Nexinhib20 die ALPL, BMP2 und TAGLN mRNA-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht (Abbildung 19D-F).



**Abbildung 19. Die Inhibition von Rab27 durch Nexinhib20 reduziert die Matrixmineralisierung.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 14 Tage in osteogenem Medium (OM) kultiviert und mit 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  Nexinhib20 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. (A) Die Matrixmineralisierung wurde Alizarin Rot Färbung dargestellt. Maßstab: 1000  $\mu\text{m}$ . (B) Die Quantifizierung von (A) erfolgte durch Bildanalyse. (C) Die TNAP-Aktivität wurde nach sieben Tagen bestimmt und auf die Proteinmenge normalisiert. (D – F) Die Durchführung einer Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion (qPCR) erfolgte mittels TaqMan-Assays. Bestimmt wurden die Gene alkalische Phosphatase (ALPL), knochenmorphogenetisches Protein 2 (BMP2) und Transgelin (TAGLN) nach 14 Tagen. Kontrollmedium (CM) wird als Duplikat dargestellt.  $n = 3 - 7$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , One-way-ANOVA.

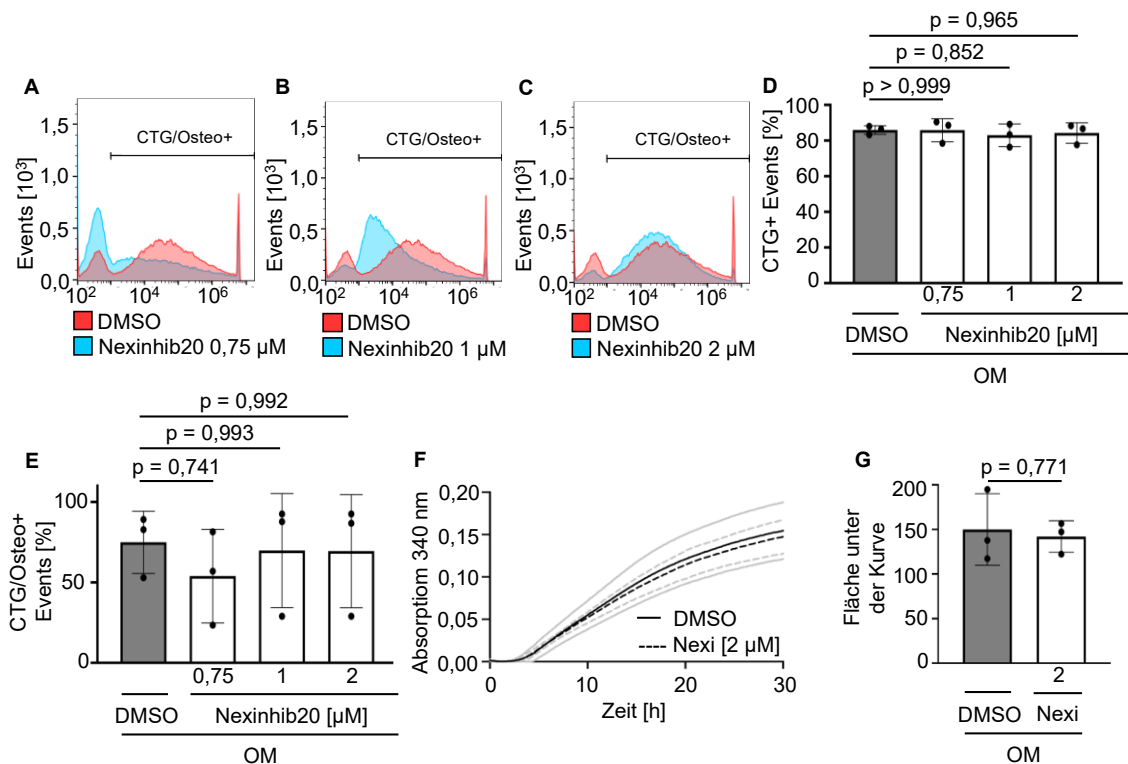
Als nächstes wurde der Einfluss auf die EVs-Menge und Größenverteilung mittels NTA untersucht (Abbildung 20A-C). Die Quantifizierung der Gesamtevents zeigte kein Einfluss von Nexinhib20 auf die EV-Zahl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 20D). Die Differenzierung nach Partikelgröße erfolgte zwischen 50 bis 500 nm in 50 nm Schritten und anschließend die Darstellung der Events > 500 nm. Dabei konnte bei keiner Partikelgröße ein Unterschied zwischen 2  $\mu\text{M}$  Nexinhib20 und der DMSO-Kontrolle detektiert werden (Abbildung 20E).



**Abbildung 20. Die Anzahl an extrazellulären Vesikeln (EVs) wird durch die Inhibition der Exozytose nicht beeinflusst.** Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 14 Tage in osteogenem Medium (OM) kultiviert und mit 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  Nexinhib20 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Die Analyse erfolgte mittels Nanopartikeltracking-Analyse. Es wurden fünf Videos je 60 s pro Probe aufgenommen und analysiert. (A – C) Darstellung repräsentativer Kurven pro Konzentration und (D) Quantifizierung mit Aufteilung nach Gesamtevents und (E) nach Partikelgröße.  $n = 4$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , One-way-ANOVA.

Zur weiteren Quantifizierung der EVs erfolgte die Analyse der Mineralbeladung mittels Durchflusszytometrie. Die Darstellung der repräsentativen Messungen zeigen keine Unterschiede in der CTG/Osteosense-Doppelfärbung zwischen den Nexinhib20-Konzentrationen 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 21A-C). Die Quantifizierung der CTG-positiven und CTG/Osteosense-Doppelpositiven Events zeigte keinen Unterschied zwischen Nexinhib20 und der DMSO-Kontrolle (Abbildung 21D, E).

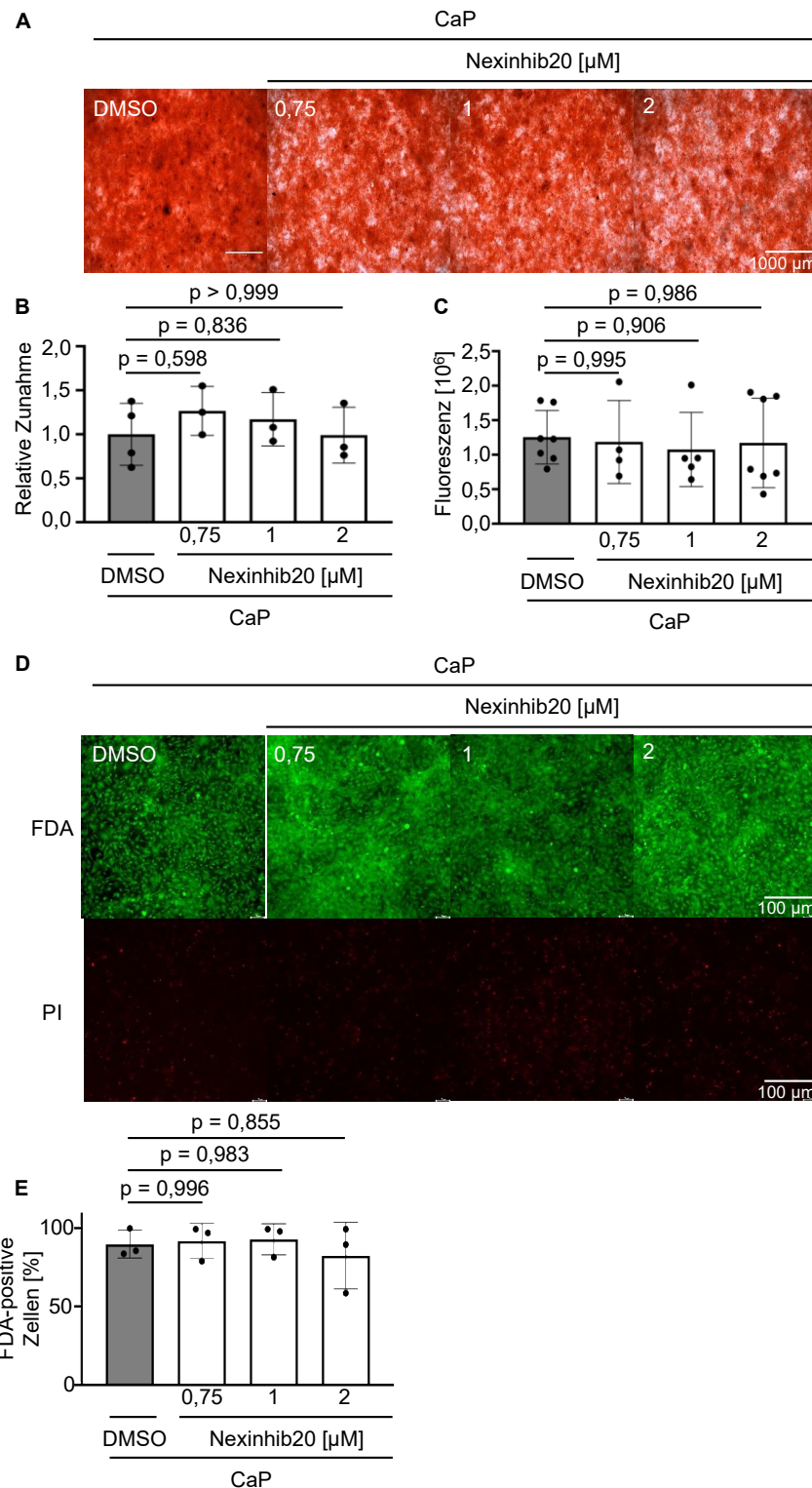
Als nächstes wurde das Aggregationsverhalten der EVs bestimmt. Nexinhib20 beeinflusst die Aggregation von EVs nicht (Abbildung 21F, G).



**Abbildung 21. Die Inhibition der Exozytose weist keinen Einfluss auf die Menge mineralpositiver Events in extrazellulären Vesikeln (EVs) auf.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 14 Tage in osteogenem Medium (OM) kultiviert und mit 0,75, 1 und 2 µM Nexinhib20 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Es erfolgte die Messung der vorhandenen Events durch Tracking der EVs mittels grünem CellTracker™ (CTG). Die Messung der Mineralbeladung erfolgte durch Osteosense (Osteo). Darstellung von repräsentativen Kurven aller Konzentrationen mit (A – C) Doppelfärbung CTG/Osteo und (D – E) Quantifizierung. Das Aggregationsverhalten wurde mittels des Aggregationsassays analysiert. Es fand die Messung einer Absorption bei 340 nm alle 5 min für 30 h bei 37°C statt. (F) Darstellung von repräsentativen Graphen des Aggregationsverhaltens von Nexinhib20 2 µM im Vergleich zu DMSO. (G) Es erfolgte die Quantifizierung der Graphen durch die Analyse der Fläche unter der Kurve.  $n = 3$ , MW (schwarze Linie)  $\pm$  SD (gestrichelte Linie), t-Test ggf. mit Welch-Korrektur bei signifikantem F-test, One-way-ANOVA.

### 4.3.2 Analyse der Inhibition im Kalziumphosphat Medium

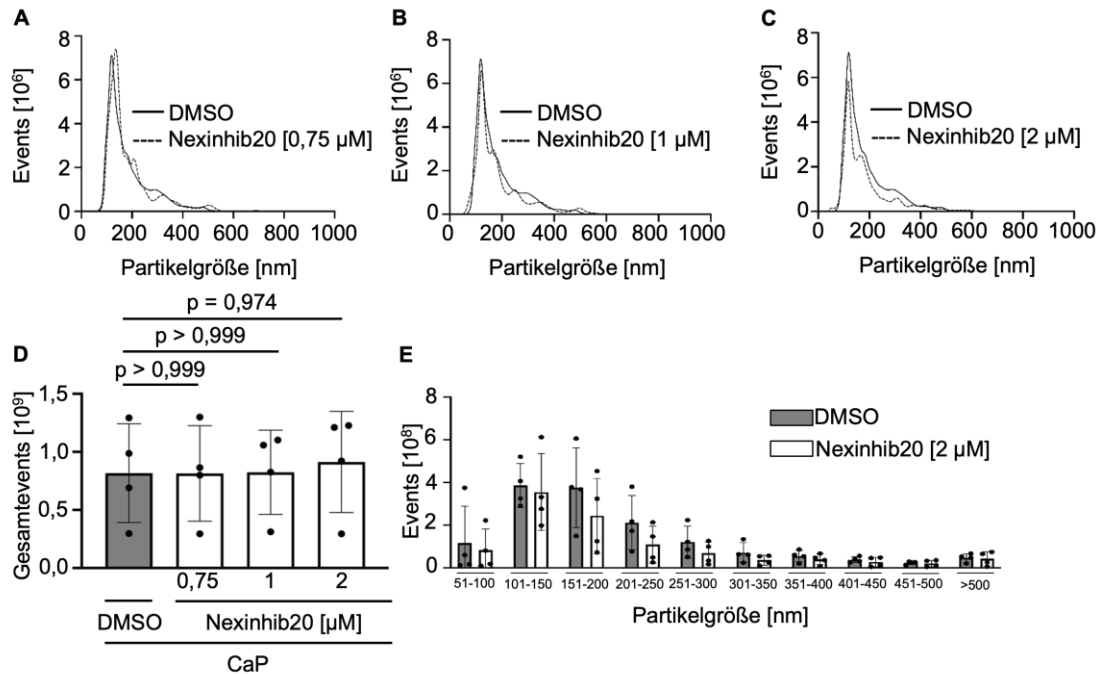
Die Analyse der Inhibition der Exozytose auf die Mineralablagerung erfolgte unter Kalziumphosphat Konditionen. Dafür wurden SMC für sieben Tage mit Kalziumphosphat Medium (CaP) kultiviert und mit dem Exozytose-Inhibitor Nexinhib20 stimuliert. Die Quantifizierung der Matrixmineralisierung erfolgte durch die Alizarin Rot Färbung, welche im Lichtmikroskop dokumentiert und mittels Bildanalyse quantifiziert wurde (Abbildung 22A, B). Nexinhib20 hat keinen Einfluss auf die Matrixmineralisierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 22B). Die Zellviabilität wurde mittels Resazurin-vermittelten Methode und FDA-PI-Fluoreszenzmessung bestimmt, welche beide kein Einfluss von Nexinhib20 zeigten (Abbildung 22C-E).



**Abbildung 22. Die Inhibition der Exozytose unter kalziumphosphatreichen Konditionen hat keinen Einfluss auf die Matrixmineralisierung und Zellvitalität.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 7 Tage in Kalziumphosphat Medium (CaP) kultiviert und mit 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  Nexinhib20 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. (A) Die Matrixmineralisierung wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durch Alizarin Rot Färbung dargestellt. Maßstab 1000  $\mu\text{m}$ . (B) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji in Relation zu DMSO. (C) Die Überprüfung der Zellvitalität erfolgte mittels Messung der metabolischen Aktivität durch Resazurin-Reduktion nach 7 Tagen. (D) Zur weiteren Überprüfung der Zellvitalität erfolgte eine Fluoreszeindiacetat-Propiumiodid-Färbung (FDA-PI), welche im Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurden. Lebende Zellen erscheinen hierbei grün fluoreszierend und tote Zellen rot. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . (E) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji, wobei die

lebenden Zellen durch FDA dargestellt werden und die toten durch PI (Anhang Abbildung 3B). n = 3 – 7, MW ± SD, One-way-ANOVA.

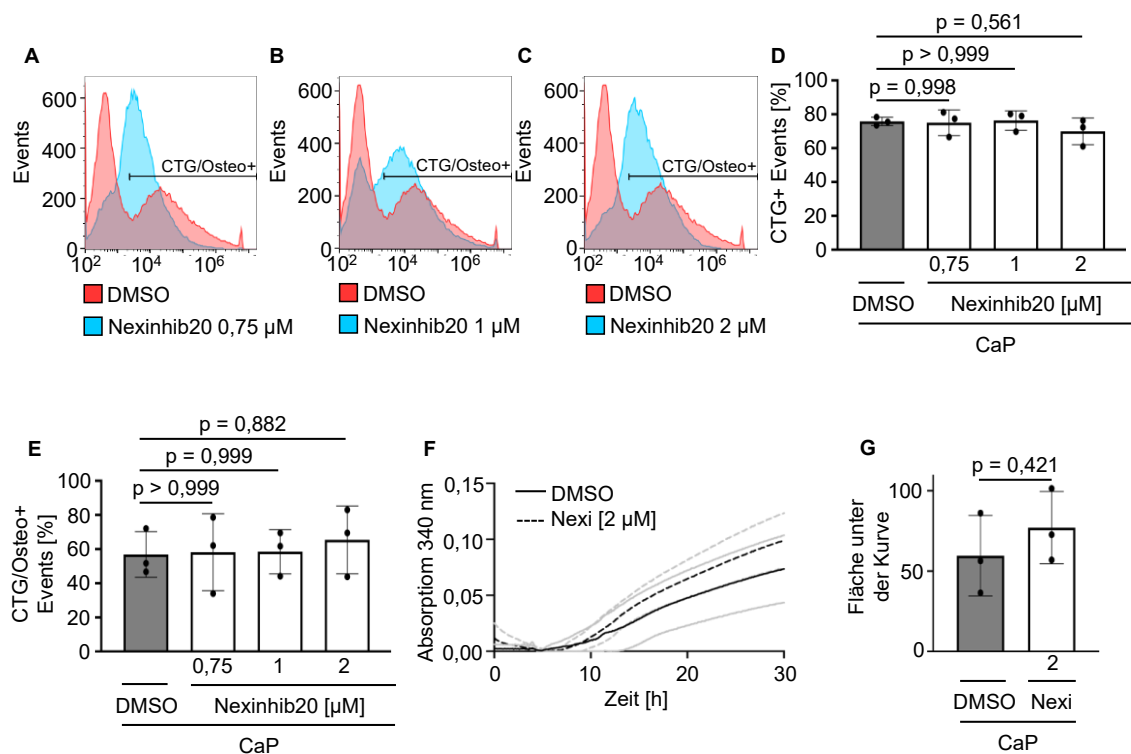
Nach der Inhibition der Exozytose unter Kalziumphosphat Konditionen, erfolgte die weitere Analyse der EVs mittels NTA. Nexinhib20 beeinflusst die EV-Menge und EV-Größenverteilung nicht (Abbildung 23A-E).



**Abbildung 23. Die Menge an extrazellulären Vesikeln (EVs) ist nicht beeinflusst durch die Inhibition der Exozytose in kalziumphosphatreichen Konditionen.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 7 Tage in Kalziumphosphat Medium (CaP) kultiviert und mit 0,75, 1 und 2 µM Nexinhib20 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Die Analyse erfolgte mittels Nanopartikeltracking-Analyse im Vergleich zu DMSO. Es wurden fünf Videos je 60 s pro Probe aufgenommen und analysiert. Darstellung (A – C) repräsentativer Kurven pro Konzentration und (D) Quantifizierung mit Aufteilung nach Gesamtevents und (E) Partikelgröße. n = 4, MW ± SD, One-way-ANOVA.

Zur weiteren Quantifizierung der EVs erfolgte als nächstes die Analyse der Mineralbeladung der EVs mittels Durchflusszytometrie. In der Darstellung der repräsentativen Messungen lassen sich keine Unterschiede in der CTG/Osteosense-Doppelfärbung zwischen CaP kultiviert mit den Nexinhib20-Konzentrationen 0,75, 1 und 2 µM im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektieren (Abbildung 24A-C). Die Quantifizierung der CTG-positiven Events zeigte keinen Unterschied der Nexinhib20-Konzentrationen unter Kalziumphosphat-Konditionen zur Kontrolle (Abbildung 24D). In der Quantifizierung der CTG/Osteosense-Doppelfärbung konnte kein Unterschied der detektieren Events in den analysierten Nexinhib20-Konzentrationen in Relation zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden. (Abbildung 24E).

Als nächstes erfolgte die Analyse des Aggregationsverhaltens der EVs. In der graphischen Darstellung ist kein Unterschied im Aggregationsverhalten der Nexinhib20-Konzentrationen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektierbar (Abbildung 24F). Die Quantifizierung der graphischen Darstellung erfolgte mittels Bestimmung der Fläche unter der Kurve. Diese zeigt, dass kein Unterschied im Aggregationsverhalten von Nexinhib20 2  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nachweisbar ist (Abbildung 24G).



**Abbildung 24. Die Inhibition der Exozytose in kalziumphosphatreichen Bedingungen hat keinen Einfluss auf die Menge mineralpositiver Events.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 7 Tage in Kalziumphosphat Medium (CaP) kultiviert und mit 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  Nexinhib20 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der extrazellulären Vesikel (EVs) wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Es erfolgte die Messung der vorhandenen Events durch Tracking der EVs mittels grünem CellTracker<sup>TM</sup> (CTG). Die Messung der Mineralbeladung erfolgte durch Osteosense (Osteo). Darstellung von repräsentativen Kurven aller Konzentrationen mit (A – C) Doppelfärbung CTG/Osteo und (D – E) Quantifizierung. Das Aggregationsverhalten wurde mittels des Aggregationsassays analysiert. Es fand die Messung einer Absorption bei 340 nm alle 5 min für 30 h bei 37°C statt. (F) Darstellung von repräsentativen Graphen des Aggregationsverhalten von Nexinhib20 2  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu DMSO. (G) Es erfolgte die Quantifizierung der Graphen durch die Analyse der Fläche unter der Kurve. n = 3, MW (schwarze Linie)  $\pm$  SD (gestrichelte Linie), t-Test ggf. mit Welch-Korrektur bei signifikantem F-test, One-way-ANOVA.

#### 4.4 Einfluss der Inhibition der endosomalen Reifung

Des Weiteren erfolgt die Analyse der Inhibition der endosomalen Reifung in OM und CaP. Hierfür wurden SMC für 14 Tage in OM und 7 Tage in CaP kultiviert und mit dem Inhibitor CID-1067700 in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$  stimuliert.

CID-1067700 hatte in beiden Zellkulturmodellen keinen Einfluss auf die Matrixmineralisierung (Anhang Abbildung 4A - B, Anhang Abbildung 5A - B), die Zellviabilität (Anhang Abbildung 4C - E, Anhang Abbildung 5C - E) sowie die EV-Menge, EV-Größenverteilung (Anhang Abbildung 6A - E, Anhang Abbildung 7A - E), mineralpositiver EVs (Anhang Abbildung 8A - E, Anhang Abbildung 9A - E) und das Aggregationsverhalten (Anhang Abbildung 8F - G, Anhang Abbildung 9F - G) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

#### **4.5 Ergebniszusammenfassung**

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die Inhibierung von Rab27 durch 2  $\mu$ M Nexinhib20 unter osteogenen Konditionen zu einer Reduktion der Matrixmineralisierung führte ohne dabei die EVs zu beeinflussen. In kalziumphosphatreichen Konditionen konnte kein Einfluss der Inhibition der Exozytose sowohl auf die Matrixmineralisierung, als auch auf die EVs, nachgewiesen werden. Die Inhibierung von Rab7 zeigte sowohl in osteogenen, als auch kalziumphosphatreichen Medium keinen Einfluss auf die Matrixmineralisierung.

## 5 Diskussion

EVs sind von zentraler Bedeutung, denn diese sind durch Exozytose und Endozytose an dem Stofftransport beteiligt. Durch den pathophysiologischen Transport von Kalzium und Phosphat in die Gefäßwände weisen diese eine hohe Relevanz in der Pathogenese auf (Krohn et al., 2016). Die exakte Pathophysiologie und die Biogenese der EVs in der vaskulären Kalzifizierung ist noch nicht abschließend geklärt. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der Exozytose durch Rab27-Inhibition und der endosomalen Reifung durch Rab7-Inhibition auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Rab27 zu einer Reduktion der Matrixmineralisierung im Modell der Tunica intima bei einer Konzentration von 2  $\mu$ M des Rab27 Inhibitors Nexinhib20 führt. Es konnte jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen der EV-Menge und des Mineralgehaltes der EV zu der Reduktion der Matrixmineralisierung nachgewiesen werden. Die Inhibition von Rab7 in osteogenem Medium zeigte keinen Einfluss auf die Matrixmineralisierung von SMC. Es konnte kein Einfluss der Rab7 und Rab27 Inhibition auf die Matrixmineralisierung im Kalziumphosphatmodell beobachtet werden.

### 5.1 Einflüsse auf zellulärer Ebene auf die kardiovaskuläre Kalzifizierung

Die Regulation der kardiovaskulären Kalzifizierung unterliegt vielen unterschiedlichen Prozessen und Regulationsmechanismen. Neben dem Einfluss von EVs auf die Kalzifizierung existieren auch Einflüsse und Limitationen auf zelluläre beziehungsweise molekularbiologischer Ebene, welche im Folgenden diskutiert werden sollen.

#### 5.1.1 Unterschiede und Limitationen der Zellkulturmodelle

Für die Analyse des Einflusses der Inhibition der Exozytose und der endosomalen Reifung wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche in vitro-Modelle genutzt. OM diente als Modell für die Kalzifizierung der Tunica intima und CaP als Modell für die Kalzifizierung der Tunica media. Im Folgenden sollen die genutzten in-vitro Modelle dieser Arbeit diskutiert werden. In den OM und CaP-kalzifizierten SMC konnte ein morphologischer Unterschied beobachtet werden. Bei der osteogenen Kalzifizierung ließ sich eher eine flächige homogene Kalzifizierung feststellen, während durch CaP eine eher punktförmige Kalzifizierung induziert wurde (Abbildung 12A & Abbildung 15A). Die genutzten

Zellkulturmodelle basieren auf bereits genutzten Modellen in der Literatur (Heuschkel et al., 2022; Holmar et al., 2020). Die Modelle für die CaP-Kalzifizierung der Tunica media unterscheiden sich häufig in der Kalzium- und Phosphatkonzentration. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von 3 mM Kalzium und 2 mM Phosphat gewählt (Heuschkel et al., 2022). Die genutzten Konzentrationen sollen so Ähnlichkeiten zu den Serumkonzentrationen zu CKD-Patient:innen simulieren. Klinisch zeigen sich Hyperphosphatämien bei der CKD mit Konzentration von  $\geq 4,5$  mg/dl ( $\geq 1,46$  mmol/l) (Hai et al., 2021; Holmar et al., 2020; Kim et al., 2014), bei welchen hauptsächlich mediale Kalzifizierungen auftreten (Gauthier-Bastien et al., 2014). Hierbei lässt sich diskutieren, inwieweit diese Konzentrationen repräsentativ für CKD-Patient:innen sind. Insbesondere die Unterschiede in den verschiedenen Stadien der CKD. Bei der Wahl der Konzentration ist von besonderer Relevanz das Verhältnis von Kalzium zu Phosphat, da diese einen wesentlichen Einfluss auf die Kalzifizierung haben. Es konnte bereits in der Literatur dargelegt werden, dass Erhöhungen in Kalzium und Phosphat die Kalzifizierung erhöhen. Jedoch ab einer Phosphatkonzentration von 2,8 mM der Anstieg der Kalziumkonzentration keinen Einfluss mehr auf die Kalzifizierung hatte (Holmar et al., 2020). Hierbei handelt es sich um Modelle, die Konditionen einer CKD etwa im Stadium III imitieren, da ab diesem eine Hyperphosphatämie vorliegt aufgrund der reduzierten Nierenfunktion. Somit bleiben die weiteren Stadien im genutzten Modell unbeachtet, da eine klinisch relevante Hyperphosphatämie in vivo erst ab Stadium III vorliegt. In Stadium I und II der CKD liegt nur eine leichte Nierenschädigung vor, sodass hier das Phosphat noch ausreichend ausgeschieden werden kann (Nephrology, 2024). Deshalb lässt sich insbesondere die klinische Übertragbarkeit des in vitro Modells kritisch hinterfragen. Da jedoch eine Imitation von mehreren Krankheitsstadien in einem zweidimensionalen Modell nicht realisierbar ist und aufgrund der in der Literatur präsentierten Daten zur Kalzifizierung und Zellviabilität, wurde das in dieser Arbeit präsentierte Modell für die Kalzifikation der Tunica media gewählt. Für die Induktion der intimalen Kalzifizierung wurde ein osteogenes Medium gewählt. OM setzt sich aus Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und  $\beta$ -Glycerolphosphat zusammen. Dexamethason induziert die Genexpression von osteoinduktiven Genen, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat erhöht die Kollagenproduktion und  $\beta$ -Glycerolphosphat dient als Phosphatquelle und führt

zur TNAP-Induktion. Diese Induktion konnte nachgewiesen werden, denn die TNAP-Aktivität und ALPL mRNA-Expression war in OM im Vergleich zu CM erhöht (Abbildung 12I – J). Eine der wichtigsten Funktionen der TNAP ist die Hydrolyse von Pyrophosphat in organisches Phosphat und die daraus resultierende Kalzifikation (Hoylaerts et al., 2015). In vorherigen Studien erfolgte die Analyse von  $\beta$ -Glycerolphosphat auf die TNAP-Aktivität in Osteoblasten (Orimo & Shimada, 2008). Hierbei konnte eine erhöhte TNAP-Aktivität zwischen 2 und 5 Tagen festgestellt werden. Das Maximum in diesem Zeitraum lässt sich vermuten aufgrund des Prozesses der Freisetzung von Phosphat von  $\beta$ -Glycerolphosphat (Orimo & Shimada, 2008). Dies bestätigen die, in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, in welchen nach 7 Tagen die TNAP-Aktivität in OM im Vergleich zu CM erhöht ist (Abbildung 12I). Dennoch ist basierend auf der Literatur diskutabel, ob womöglich eine frühere Bestimmung sinnvoll wäre, da in Osteoblasten das Maximum der TNAP-Aktivität zwischen 2 bis 5 Tagen lag. Jedoch ist bei den Ergebnissen dieser Arbeit zu beachten, dass es sich um SMC handelt, bei welchen eine Kalzifizierung induziert wird und nicht Osteoblasten. Eine direkte Übertragbarkeit ist nicht gegeben, da Osteoblasten an der physiologischen ossären Kalzifizierung beteiligt sind und es sich dementsprechend um physiologisch mineralisierende Zellen handelt, wohingegen SMC an der pathophysiologischen kardiovaskulären Kalzifikation beteiligt sind und die Mineralisierung in SMC somit einen pathologischen Prozess darstellt. Inwieweit die beiden Modelle, vor allem zeitlich, vergleichbar sind muss noch weiter untersucht werden. Basierend darauf ist ein längerer Zeitraum notwendig, bis die Kalzifizierung der SMC eingetreten ist und somit eine Erhöhung der TNAP-Aktivität nachweisbar ist. Die in der Literatur gewählten Modelle für OM variieren in den Konzentrationen der Komponenten und teilweise in der Inkubationszeit (Pustlauk et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wurden SMC für 14 Tage mit einer Konzentration von 10 nM Dexamethason, 100  $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat kultiviert, da vorherige Daten der AG Götsch bereits gute Kalzifizierung unter diesen Konditionen zeigten (Heuschkel et al., 2022). Bei dem Modell für die intimale Kalzifikation ist ein Transfer der Ergebnisse auf klinische Fragestellungen diskutabel, da es sich hierbei um ein in vitro Modell handelt. In der Literatur konnte, bei dem in dieser Arbeit gewählten Modell, gemeinsame Genexpressionen in dem in vitro und einem in vivo Mausmodell nachgewiesen

werden (Heuschkel et al., 2022). Hierbei erfolgte der Vergleich der Hoch- und Runterregulation von Genen der OM und CaP in vitro Modellen mit Apoe<sup>-/-</sup> und CKD Mäusen. Apoe<sup>-/-</sup> Mäuse fungierten als Model für die intimale Kalzifizierung und ein 5/6 Nephrektomie-induziertes CKD Modell für die mediale Kalzifizierung (Heuschkel et al., 2022). In der Literatur konnte dann festgestellt werden, dass bei dem in vitro OM Modell 42,7 % der Gene sich mit denen der Apoe<sup>-/-</sup> Mäusen überschneiden. Bei dem CaP Modell lag eine Überschneidung von 39,7 % mit den Genen der CKD Mäusen vor (Heuschkel et al., 2022). Darauf basierend lassen sich eingeschränkte Rückschlüsse auf die klinische Übertragbarkeit machen, sodass das Modell zumindest teilweise repräsentativ ist für die in vivo Situation. Als Limitation der Zellkulturmodelle ist die festzustellen, dass diese nur eingeschränkt die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die bei einer Kalzifizierung auftreten, widerspiegeln. Unter anderem kann die Differenzierung zwischen der Mikrokalzifizierung und Makrokalzifizierung in einem Zellkulturmodell nicht realisiert werden. Diese ist jedoch essenziell für die Pathophysiologie der vaskulären Kalzifizierung in humanen Konditionen. Es lassen sich die Einflüsse der Kalzifizierung auf die Hämodynamik in den Gefäßen nicht darstellen (Hutcheson et al., 2015), ebenso wenig erfolgt die Berücksichtigung der Zellinteraktionen in den Gefäßwänden, welche einen relevanten Einfluss auf humanbiologische Prozesse haben. Insbesondere proinflammatorische Zellen und Immunzellen stellen einen wesentlichen Faktor der Atherosklerose und vaskulären Kalzifizierung dar, insbesondere unter Berücksichtigung der Komorbiditäten (Cai et al., 2023). Als weitere Limitation lässt sich das überlappende Auftreten der intimalen und medialen Kalzifizierung im Menschen herausarbeiten (Durham et al., 2018). Dieses ist im Zellkulturmodell durch zwei unterschiedliche Zellkulturmodelle nicht realisierbar. In Zusammenfassung stellen OM und CaP trotz ihrer Limitationen geeignete Modelle der Zellkultur für die Kalzifikation der Tunica intima und media dar. Dennoch ist die Komplexität der kardiovaskulären Kalzifizierung, insbesondere unter Berücksichtigung der zahlreichen Komorbiditäten und Risikofaktoren nicht komplett dargestellt, welche komplexere Modelle unabdinglich macht.

### **5.1.2 Die Rolle der alkalischen Phosphatase in osteogenen und kalziumphosphatreichen Konditionen**

In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass bei CaP auf mRNA-Ebene die TNAP-Aktivität unbeeinflusst bleibt (Heuschkel et al., 2022) und von CaP behandelten Zellen isolierte EVs keine TNAP-Aktivität aufweisen (Hutcheson et al., 2017). Dies legt nahe, dass die CaP induzierte Kalzifizierung unabhängig von TNAP verläuft. Im Gegensatz dazu kann bei der osteogenen Kalzifizierung eine Erhöhung der TNAP-Aktivität auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 12I). Die Abhängigkeit der TNAP-Aktivität in OM könnte erklären, warum die Matrixmineralisierung durch die Inhibition der Exozytose in OM reduziert wird, bei CaP jedoch unbeeinflusst bleibt. Allerdings zeigte ein TNAP-Assay sowohl auf zellulärer als auch auf mRNA-Ebene, dass die Inhibition von Rab27 in OM keinen Einfluss auf die TNAP-Aktivität hat (Abbildung 19C). Ebenso kann der Unterschied in der Matrixmineralisierung nicht auf das Aggregationsverhalten der EVs zurückgeführt werden. Hierbei ist TNAP von besonderer Relevanz, da bei dieser Methode ein Nachweis der Aggregation nur in TNAP-haltigen EVs möglich ist.  $\beta$ -Glycerolphosphat wird als einzige Phosphatquelle zugeführt, welches durch TNAP zu Phosphat umgewandelt wird und so zur Mineralausfällung beitragen kann. Weder bei OM (Abbildung 21F-G) noch bei CaP (Abbildung 24F-G) zeigt die Inhibition der Exozytose im Vergleich zur DMSO-Kontrolle einen Unterschied im Aggregationsverhalten. Da es sich bei dem Aggregationsassay um eine Methode zur Messung des Mineralgehaltes, Kalzifizierungspotentials und Aggregationsverhaltens von EVs handelt, sind diese nicht zurückzuführen auf die Reduktion der Matrixmineralisierung (Genge et al., 2007). Jedoch muss der Aggregationsassay bei CaP kritisch betrachtet werden, da dieser auf der Hinzugabe der Minerallösung und  $\beta$ -Glycerolphosphat basiert. Dies induziert eine Aggregation und ein Ausfall der Partikel, wodurch die Trübung der Absorption gemessen werden kann.  $\beta$ -Glycerolphosphat fungiert in dem Assay als Phosphatquelle, jedoch benötigt es TNAP, um das Phosphat freizusetzen. Da nur bei OM  $\beta$ -Glycerolphosphat, welches als Substrat von TNAP fungiert, vorliegt und bei CaP nicht, ist der Assay bei CaP kritisch zu betrachten (Goettsch et al., 2022; Patel et al., 2019).

## **5.2 Limitationen der Inhibition von Rab27 in der Exozytose**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Rab27-JFC1-Interaktion durch Nexinhib20 in OM zu einer Reduktion der Matrixmineralisierung führt (Abbildung 19A). Diese Reduktion konnte nicht durch die Anzahl, Mineralbeladung oder das Aggregationsverhalten der EVs erklärt werden. Im Folgenden soll die Relevanz der Rab27-JFC1-Interaktion, die Rab27 Interaktionen in ossärer Mineralisierung und der Einfluss des Kollagens diskutiert werden.

### **5.2.1 Interaktion von Rab27 mit JFC1**

Bei der Exozytose handelt es sich um einen stark regulierten Prozess, welcher wesentlich durch Rab-Proteine beeinflusst wird. Aufgrund der Vielzahl an beteiligten Rab-Proteinen wäre denkbar, dass die Reduktion der Matrixmineralisierung durch eine unspezifische Inhibition durch Nexinhib20 hervorgerufen wird. Dies konnte jedoch bereits in der Literatur widerlegt werden. Hierbei erfolgte die Überprüfung der Spezifität des Inhibitors mittels eines TR-FRET-Assays (Johnson et al., 2016). Es wurde die Bindung zwischen Rab11 und seinem Effektor Munc13-4 analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass Nexinhib20 keinen Einfluss auf die Bindung anderer Rab-Proteine an ihre Effektoren hat. Es konnte gezeigt werden, dass neben Nexinhib20 auch Nexinhib1 und Nexinhib4 keinen Einfluss auf die Rab27-JFC1-Interaktion hatten (Johnson et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass die Rab-Interaktionen einen gemeinsamen Mechanismus aufweisen, jedoch eine sehr spezifische Partnerbindung haben (Johnson et al., 2016). Daraus resultierend lässt sich die Reduktion der Matrixmineralisierung nicht auf einer unspezifischen Hemmung anderer Rab-Interaktionen zurückführen. Als weiteren Einfluss auf die Vesikelfreisetzung wurde in der Literatur bereits der Einfluss von Rab27a und Rab27b in den RANKL-Prozess in Osteoblasten analysiert (Kariya et al., 2011). Bei RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) handelt es sich um ein Protein, das von Osteoblasten sezerniert wird und an der Differenzierung zu Osteoklasten beteiligt ist durch Bindung an Vorläuferzellen der Osteoklasten und Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Boyce & Xing, 2007). Durch die Suppression von Rab27a und Rab27b mittels RNA-Silencing konnte in der Literatur beschrieben werden, dass diese eine Reduktion der RANKL-Freisetzung in sekretorischen Lysosomen hervorruft (Kariya et al., 2011). Auf dieser Grundlage wurde die Analyse der Effektoren durchgeführt, über die

Rab27a und Rab27b die Exozytose regulieren. In der Literatur wurden insbesondere Slp1, Slp2-a, Slp4-a, Slp5 und Munc13-4 eingehend untersucht, da sie in Zusammenhang mit der Exozytose und ihrer Interaktion mit Rab-Proteinen stehen (Fukuda, 2008; Kariya et al., 2011). Insbesondere bei Slp4-a, Slp5 und Munc13-4 konnte eine relevante Reduktion der RANKL-Freisetzung beschrieben werden. Rab27a mit seinem Effektor Slp4-a wurde am wahrscheinlichsten die Regulation der Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran während der Exozytose zugeschrieben (Ostrowski et al., 2010). Daraus resultierend geht hervor, dass Rab27a und Rab27b zusammen mit ihren Effektoren einen erheblichen Einfluss auf die RANKL-Freisetzung haben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Inhibition der Rab27a-JFC1-Interaktion inhibiert. Basierend auf den beschriebenen Einfluss von Rab27a in Osteoblasten lässt sich diskutieren, inwiefern eine Inhibition dieser Interaktion einen Einfluss auf die Interaktion mit weiteren Effektoren wie Slp4-a hat.

### **5.2.2 Rab27a reduziert die Sekretion von Vesikeln in der ossären Mineralisierung**

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse des Einflusses der Inhibition der endosomalen Reifung und Exozytose. An diesen Prozess sind EVs maßgeblich beteiligt. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss auf die EV-Menge oder deren Mineralgehalt nachgewiesen werden. Durch Inhibition von Rab27a konnte in dieser Arbeit eine Reduktion der Matrixmineralisierung beobachtet werden (Abbildung 19A). Jedoch hatte dies keinen Einfluss auf die EVs in VSMC. In der Literatur konnte bereits beschrieben werden, dass ein Silencing von Rab27a und Rab27b einen Einfluss auf die EV-Größe in HeLa-Zellen habe. Durch Silencing von Rab27a wurde die Sekretion von größeren EVs beobachtet. Das Silencing von Rab27b hingegen bewirkte eine perinukleäre Akkumulation von EVs (Ostrowski et al., 2010). Durch die Inhibition von Rab27 konnte in dieser Arbeit jedoch keine Änderung in der EV-Größe beobachtet werden (Abbildung 20E). Des Weiteren konnte in der Literatur bereits beschrieben werden, dass die Herunterregulation von Rab27a eine Reduktion von EVs in parodontalen Ligamentstammzellen (PDLSC) induziert (Lu et al., 2023). Durch Nutzung von siRNA wurde die Rab27a-Expression in PDLSC herunterreguliert (Lu et al., 2023). Durch das Silencing konnte so eine Reduktion der EV-Menge im NTA und der Proteinmenge durch BCA nachgewiesen werden

(Lu et al., 2023). Durch weitere Experimente konnte eine Beteiligung der von PDLSC sezernierten EVs an der Osteogenese von mesenchymalen Knochenmarkstammzellen nachgewiesen werden (Lu et al., 2023). EVs sind neben der kardiovaskulären Kalzifizierung folglich auch in der ossären Kalzifizierung von besonderer Relevanz (Ansari et al., 2021; Kobayashi-Sun et al., 2020). Des Weiteren ist die Regulation von Rab-Proteinen von besonderer Relevanz in der ossären Kalzifikation. Für diese sind Osteoblasten maßgeblich an der Knochenmineralisierung beteiligt. Besonders durch die Produktion von Kollagen Typ I stellen diese ein Netz für die Nukleation und das Wachstum der Mineralien dar (Kim et al., 2018). Die Mineralisierung durch Osteoblasten kann direkt und indirekt reguliert werden. Der indirekte Mechanismus inkludiert die Synthese von nicht-kollagen Proteinen und der direkte Mechanismus ist assoziiert mit der EV-Sekretion durch Osteoblasten (Boonrunsiman et al., 2012; Nudelman et al., 2010). EVs in der ossären Mineralisierung weisen, analog zur kardiovaskulären Kalzifizierung, erhöhte Kalzium- und Phosphatkonzentrationen auf. Diese können dann im Verlauf zu Hydroxyapatit akkumulieren (Ansari et al., 2021). Außerdem weisen die EVs osteoinduktive Eigenschaften auf (Wei et al., 2019). Aufgrund der Ähnlichkeit der ossären und kardiovaskulären Kalzifizierung und der ähnlichen Beteiligung von EVs erfolgte die Analyse dieser. Die EV-regulierte ossäre Kalzifizierung unterliegt der Regulation von Rab-Proteinen. Dies betont erneut die Relevanz der EVs in der Kalzifizierung, sowohl ossären als auch kardiovaskulär. In der vorliegenden Arbeit konnte in der Inhibition von Rab27a keine Reduktion der EVs im NTA nachgewiesen werden (Abbildung 20). Eine weitere Möglichkeit der Überprüfung des Einflusses von Rab27a wäre das Silencing und eine Repetition der Experimente. Somit könnte eventuell der Trend der EV-Reduktion, welche im NTA bisher sichtbar ist, bestätigt werden und eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Matrixmineralisierung liefern. Nichtsdestotrotz ist eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse schwierig. Insbesondere die Übertragbarkeit der Ergebnisse von PDLSC auf VSMC ist diskutabel, denn es handelt sich zwar um ähnliche Regulationsmechanismen und Prozesse, dennoch unterscheiden sich die Zelltypen voneinander. Besonders unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Hoch- und Runterregulation von osteoinduktiven Genen in der ossären Mineralisierung sind Unterschiede in der physiologischen Beteiligung von EVs in PDLSC und pathologischen Beteiligung in VSMC zu vermuten (Lu et al., 2023).

### **5.2.3 Rab27b reduziert Kollagen I in Osteoblasten**

Kollagene weisen durch ihre Beteiligung am Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM) eine Relevanz bei der vaskulären und ossären Kalzifikation auf. Darauf basierend lässt sich ein Einfluss der Kollagene auf die Inhibition der Exozytose in OM vermuten und soll im Verlauf diskutiert werden, Kollagen Typ I stellt hierbei ein essenzielles Gerüst für Kalziumphosphat und an der Kalzifizierung beteiligten EVs dar (Zhao et al., 2022). Außerdem hat Kollagen Typ I einen Einfluss auf die Distribution, Aggregation und Nukleation von EVs und beeinflusst so die Differenzierung von SMC zu Osteoblasten (Zhao et al., 2022). Neben Kollagen Typ I sind noch weitere Kollagen an der EZM der Gefäße beteiligt (Xu & Shi, 2014). In der Literatur wurde der Einfluss von Rab27b auf Kollagen in Osteoblasten bereits analysiert. Bei Osteoblasten handelt es sich um spezialisierte Kollagen-produzierende Zellen des Knochens (Nabavi et al., 2012). Es erfolgte die Behandlung der Osteoblasten mit Ascorbinsäure, welche die Differenzierung der Osteoblasten durch Hochregulation osteogener Gene und Proteine, besonders Kollagen Typ I, induziert (Kitching et al., 2002). Nach sechsstündiger Stimulation mit Ascorbinsäure konnte festgestellt werden, dass die Expression mehrere Rab-GTPasen auf mRNA-Ebene hochreguliert wurden. Besonders Rab1, Rab3d und Rab27b wiesen eine erhöhte Expression auf (Nabavi et al., 2012). In den Rab-Proteinen konnte eine erhöhte Kolo-kalisation mit Prokollagen nach Stimulation mit Ascorbinsäure nachgewiesen werden (Nabavi et al., 2012). Außerdem konnte eine Reduktion des extrazellulären Kollagens, welches relevant für die EZM ist, nach Rab1-, Rab3d- und Rab27b-Transfektion im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Nabavi et al., 2012). Die reduzierte Menge an extrazellulärem Kollagen könnte ein Erklärungsansatz für die reduzierte Matrixmineralisierung durch Rab27-Inhibitor darstellen. Es konnte jedoch kein Einfluss von Ascorbinsäure in Osteoblasten auf Rab27a festgestellt werden (Nabavi et al., 2012), sodass dies vermutlich keinen Einfluss auf die Kalzifikation von VSMC haben wird. Nichtsdestotrotz hat Kollagen vermutlich eine relevante Rolle auf die kardiovaskuläre Kalzifizierung und bedarf weiterer Untersuchung.

### **5.3 Limitationen der Inhibition von Rab7 in der endosomalen Reifung**

Im Gegensatz zur Inhibition von Rab27 konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss der Inhibition von Rab7 auf die Matrixmineralisierung gezeigt werden

(Anhang Abbildung 4). Dementsprechend konnte auch keine Änderung der EV-Menge oder deren Mineralbeladung nachgewiesen werden.

### **5.3.1 Rab7 als Marker der endosomalen Reifung**

Rab7 spielt im späten Endosom (LE) eine zentrale Rolle bei der Cargo-Sortierung und der Weiterleitung von Cargo, einschließlich der intraluminal gespeicherten EVs, vom LE zum Lysosom. Durch eine Inhibition von Rab7 und der damit resultierende fehlenden Transport vom EE zum LE der EVs, die maßgeblich an der Kalzifizierung beteiligt sind, wäre eine reduzierte Matrixmineralisierung und eine reduzierte EV-Menge zu erwarten. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der Inhibition von Rab7 auf die EV-Menge, Mineralbeladung und Größe nachgewiesen werden. In der Literatur erfolgte bereits die Analyse eines Rab7 Knockouts in HeLa-Zellen. Hierbei konnte in der Transmissionselektronenmikroskopie nachgewiesen werden, dass die Bildung von intraluminalen Vesikeln im LE bei einem Knockout unbeeinflusst bleibt (Vanlandingham & Ceresa, 2009). Jedoch konnte durch den Knockout einer Verlangsamung des Transports der Cargo und einer Akkumulation der intraluminalen Vesikel im LE beobachtet werden (Vanlandingham & Ceresa, 2009). Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Ergebnisse wäre, dass Rab7 zwar nicht zwingend für die Bildung multivesikulärer Körperchen (MVB) und den Cargo-Transport erforderlich ist, jedoch für die Fusion des LE mit dem Lysosom eine zentrale Rolle spielt (Vanlandingham & Ceresa, 2009). Denkbar wäre zudem, dass die Funktion von Rab7 im Falle eines Ausfalls durch ein anderes Rab-Protein kompensiert wird. Dies könnte erklären, warum trotz der zentralen Bedeutung von Rab7 für die endosomale Reifung dessen Inhibition in der vorliegenden Arbeit keinen nachweisbaren Einfluss hatte. Als mögliche Alternativen für Rab7 kämen Rab4, Rab11 und Rab25 des Recycling Pathways in Betracht. In der Literatur erfolgte bisher noch keine Analyse dieser Pathways unter diesen Konditionen, sodass dieser Erklärungsansatz auf Basis der zellbiologischen Signalwege fundiert. Rab4 ist verantwortlich für die Regulation des schnellen Recyclings der EE. Dies geschieht durch ständige Assoziation und Dissoziation von Rab4 mit den EE (Mohrmann et al., 2002). Rab11 und Rab25 sind gemeinsam für das langsam Recycling verantwortlich. In der Literatur konnte in HeLa-Zellen bereits beschrieben werden, dass eine Überexpression

von Rab11 und Rab25 zu einem höheren intrazellulären Transport führe mit vermehrten Rab11- und Rab25-positiven Vesikeln (Kessler et al., 2012). Darauf basierend weisen sowohl Rab4, als auch Rab11 und Rab25 eine relevante Rolle in der Regulation der Endosomen und könnte eine Kompensation des inhibierten Rab7-Signalweges ermöglichen. Zur weiteren Klärung dieser Mechanismen sind jedoch weiterführende Untersuchungen zur Funktion der Rab-Proteine in vitro in VSMC erforderlich

### **5.3.2 CID-1067700 als Inhibitor der endosomalen Reifung**

Des Weiteren wäre eine unspezifische Wirkung des Inhibitors CID-1067700 als Erklärungsansatz denkbar dafür, dass trotz der zentralen Rolle von Rab7 in der endosomalen Reifung kein Einfluss auf die Mineralisierung vorhanden war. Wie bereits oben beschrieben wird bei einem Ausfall von Rab7 dessen Funktion wahrscheinlich von einem anderen Rab-Protein übernommen (Vanlandingham & Ceresa, 2009). Im Folgenden soll nun die Spezifität des inhibitorischen Moleküls CID-1067700 und dessen Wirkung auf Rab7 diskutiert werden. Da Rab-Proteine sowohl in einer GDP-inaktiven-, als auch in einer GTP-aktiven-Form vorliegen, wäre denkbar, dass CID-1067700 nur eine der beiden Formen und somit unvollständig inhibiert. Experimentelle Studien konnten jedoch nachweisen, dass CID-1067700 sowohl die GDP- als auch die GTP-gebundene Form von Rab7 mit einer Inhibitionsrate von  $\geq 97\%$  hemmt (Agola et al., 2012). Kristallstrukturanalysen zeigen, dass CID-1067700 die Nukleotid-Bindungsstellen beider Konformationen ausfüllt und somit die reguläre physiologische Bindung imitiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Wirksamkeit gegenüber der GDP-Konformation etwas geringer ist (Agola et al., 2012). Somit ist CID-1067700 trotz der etwas geringeren Affinität für die GDP-Konformation ein passender Inhibitor für beide Konformationen von Rab7. Ferner konnte festgestellt werden, dass CID-1067700 auch inhibitorische Aktivitäten bei anderen GTPasen aufweist, insbesondere bei Rab2 (Agola et al., 2012; Hong et al., 2015). Rab2 ist vermutlich für die Reifung von dense-core-Vesikeln und Phagosomen verantwortlich. Somit weist es keine unmittelbare Beteiligung in der endosomalen Reifung auf (Lund et al., 2018). Weitere Effekte von CID-1067700 auf andere Rab-Proteine, insbesondere Rab4, Rab11 und Rab25, wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben. Um mögliche Einflüsse auszuschließen, wären jedoch weiterführende Analysen erforderlich.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Obwohl kardiovaskuläre Erkrankungen mit eine der häufigsten globalen Todesursachen darstellen und viele Studien das Thema kardiovaskuläre Kalzifizierung, insbesondere in Bezug auf CVD und CKD analysieren, sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen der vesikel-vermittelten Kalzifikation bisher nicht abschließend geklärt. Besonders die zielgerichtete medikamentöse Therapie gegen kardiovaskuläre Kalzifizierung bleibt dementsprechend nicht realisierbar. Des Weiteren ist der genaue Pathomechanismus der EVs in der vaskulären Kalzifizierung nicht abschließend geklärt. Es lässt sich jedoch aus der Literatur und bisherigen Daten der AG Göttsch beobachten, dass diese einen relevanten Einfluss auf die vaskuläre Kalzifizierung aufweisen und als möglicher Ansatzpunkt für weitere Forschungsfragen in Betracht kommen. Die vorliegende Arbeit analysierte die vaskuläre Kalzifizierung anhand von Zellkulturmodellen für die intimale (OM) und mediale Kalzifizierung (CaP). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der Exozytose durch Inhibition der Rab27a-JFC1-Interaktion zu einer Reduktion der Matrixmineralisierung im osteogenen Medium führte. Allerdings ließ sich auf Grundlage der EVs nicht nachweisen, wodurch diese Reduktion verursacht wurde, sodass weitere Analysen erforderlich sind. Es konnte in dieser Arbeit bereits ein Trend der Reduktion der EV-Menge durch Inhibition der Exozytose beobachtet werden, jedoch ohne Signifikanz. Zur Überprüfung dieses Trends wären weitere Repetitionen der Zellkulturexperimente sinnvoll. Basierend auf der Literatur lässt sich ein Einfluss des Kollagens vermuten. Bisher wurde ausschließlich der Einfluss von Rab27b auf Kollagen I in Osteoblasten beschrieben. Ergänzend dazu wären Kollagen-Assays sinnvoll, um den Einfluss von Rab27a sowie insbesondere die Auswirkungen der Inhibition der Rab27a-JFC1-Interaktion auf Kollagen in VSMC weiter zu untersuchen. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität des Inhibitors auf Rab27a könnte ein RNA-Silencing dieses Gens durchgeführt werden. Somit würde sichergestellt werden, obwohl schon in der Literatur beschrieben, dass durch den Inhibitor Nexinhib20 keine weiteren unspezifischen Interaktionen inhibiert werden, welche einen Einfluss auf die Matrixmineralisierung haben könnten. Final werden komplexere Versuchsmodelle wie beispielsweise Tiermodelle benötigt, um die Komplexität der Erkrankung und den Einfluss der Inhibition von Rab27a besser repräsentativ und in vivo darzustellen.

## 7 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar. Als besonderer Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt die vaskuläre Kalzifizierung. Die Kalzifizierung lässt sich differenzieren in die intimale und mediale Kalzifikation, welche sich morphologisch und in den assoziierten Krankheitsbildern unterscheiden. Die Kalzifikation der Tunica intima tritt häufig bei Patient:innen mit Atherosklerose auf, während die der Tunica media eher bei chronischer Nierenerkrankung (CKD) auftritt. Für die Induktion beider Kalzifikationsarten sind von glatten Gefäßmuskelzellen sezernierte extrazelluläre Vesikel (EVs) mit einer kalziumphosphatreichen Mineralbeladung von Relevanz. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der Inhibition der Exozytose und endosomalen Reifung auf die vesikel-vermittelte vaskuläre Kalzifizierung. Es wurden zwei in vitro Zellkulturmodelle genutzt, die die beider Kalzifikationsarten widerspiegeln. Dabei wurden SMC in osteogenem Medium (OM) für die intimale Kalzifizierung oder in kalziumphosphatreichem Medium (CaP) für die mediale Kalzifizierung kultiviert. Die Inhibition von Rab27 in der Exozytose erfolgte mittels Nexinhib20 und von Rab7 in der endosomalen Reifung durch CID-1067000. In OM-kalzifizierten SMCs hemmte die Inhibition von Rab27 die Matrixmineralisierung. Sowohl bei weiteren Analysen der EVs mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), Durchflusszytometrie als auch bei zellulären Experimenten wie dem Aggregationsassay, Polymerasen-Kettenreaktion und Messung der alkalischen Phosphatase konnte kein Unterschied zwischen der Inhibition von Rab27 und der Kontrolle gezeigt werden. Die Inhibition von Rab27 in CaP-kalzifizierten SMCs hatte keinen Einfluss auf die Matrix-Mineralisierung. Ferner hatte die Inhibition von Rab7, sowohl in OM-, als auch in CaP-kalzifizierten SMCs keinen Einfluss auf die Matrix-Mineralisierung.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit durch die Inhibition der Exozytose in OM eine Reduktion der Mineralisierung gezeigt werden. Jedoch gelang kein Nachweis, dass dies an der Änderung der Vesikelmenge oder deren Mineralisierung lag. Weitere Experimente zur Analyse der Mechanismen wie beispielsweise eine Analyse der Kollagenablagerung sollten erfolgen.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Agola, J. O., Hong, L., Surviladze, Z., Ursu, O., Waller, A., Strouse, J. J., Simpson, D. S., Schroeder, C. E., Oprea, T. I., Golden, J. E., Aube, J., Buranda, T., Sklar, L. A., & Wandinger-Ness, A. (2012). A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition. *ACS Chem Biol*, 7(6), 1095-1108. <https://doi.org/10.1021/cb3001099>
- Aguilar-Ballester, M., Hurtado-Genoves, G., Taberner-Cortes, A., Herrero-Cervera, A., Martinez-Hervas, S., & Gonzalez-Navarro, H. (2021). Therapies for the Treatment of Cardiovascular Disease Associated with Type 2 Diabetes and Dyslipidemia. *Int J Mol Sci*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020660>
- Al-Aly, Z., Shao, J. S., Lai, C. F., Huang, E., Cai, J., Behrmann, A., Cheng, S. L., & Towler, D. A. (2007). Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(12), 2589-2596. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.153668>
- Amboss. (2024a). *Stofftransport - Endozytose*. Retrieved 29.05.2024 from <https://next.amboss.com/de/article/xK0EiS?q=endozytose&m=kGamzN#Z88e0d7b1074d4440cf8c437d5d5d7927>
- Amboss. (2024b). *Stofftransport - Exozytose*. Retrieved 30.05.2024 from <https://next.amboss.com/de/article/xK0EiS?q=exozytose&m=CQYqyK#Zac675bdaede3dec995d5e2306781e4f7>
- Ansari, S., de Wildt, B. W. M., Vis, M. A. M., de Korte, C. E., Ito, K., Hofmann, S., & Yuana, Y. (2021). Matrix Vesicles: Role in Bone Mineralization and Potential Use as Therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/ph14040289>
- Bakhshian Nik, A., Hutcheson, J. D., & Aikawa, E. (2017). Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification. *Front Cardiovasc Med*, 4, 78. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00078>
- Banerjee, C., & Chimowitz, M. I. (2017). Stroke Caused by Atherosclerosis of the Major Intracranial Arteries. *Circ Res*, 120(3), 502-513. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308441>
- Blaser, M. C., & Aikawa, E. (2018). Roles and Regulation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Mineral Metabolism. *Front Cardiovasc Med*, 5, 187. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00187>
- Boonrungsiman, S., Gentleman, E., Carzaniga, R., Evans, N. D., McComb, D. W., Porter, A. E., & Stevens, M. M. (2012). The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(35), 14170-14175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208916109>
- Boudoulas, K. D., Triposkiadis, F., Gumina, R., Addison, D., Iliescu, C., & Boudoulas, H. (2022). Cardiovascular Disease, Cancer, and Multimorbidity Interactions: Clinical Implications. *Cardiology*, 147(2), 196-206. <https://doi.org/10.1159/000521680>
- Boyce, B. F., & Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 1(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/ar2165>

- Brown, J. C., Gerhardt, T. E., & Kwon, E. (2023). Risk Factors for Coronary Artery Disease. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119297>
- Bundesamt, S. (2025). *Todesursachen nach Krankheitsarten 2023*. Retrieved 31.01.2025 from [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html)
- Busatto, S., Morad, G., Guo, P., & Moses, M. A. (2021). The role of extracellular vesicles in the physiological and pathological regulation of the blood-brain barrier. *FASEB Bioadv*, 3(9), 665-675. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00045>
- Cai, X., Tintut, Y., & Demer, L. L. (2023). A Potential New Link Between Inflammation and Vascular Calcification. *J Am Heart Assoc*, 12(1), e028358. <https://doi.org/10.1161/JAHA.122.028358>
- Cantalupo, G., Alifano, P., Roberti, V., Bruni, C. B., & Bucci, C. (2001). Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J*, 20(4), 683-693. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.683>
- Chen, J., Budoff, M. J., Reilly, M. P., Yang, W., Rosas, S. E., Rahman, M., Zhang, X., Roy, J. A., Lustigova, E., Nessel, L., Ford, V., Raj, D., Porter, A. C., Soliman, E. Z., Wright, J. T., Jr., Wolf, M., He, J., & Investigators, C. (2017). Coronary Artery Calcification and Risk of Cardiovascular Disease and Death Among Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA Cardiol*, 2(6), 635-643. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.0363>
- Chen, S., Li, N., Gao, Y., Jiang, H., & Shen, Y. (2022). Prevalence and risk factors for vascular calcification based on the ankle-brachial index in the general population: a cross-sectional study. *BMC Cardiovasc Disord*, 22(1), 227. <https://doi.org/10.1186/s12872-022-02668-9>
- Chuasuwana, A., Pooripussarakul, S., Thakkinstian, A., Ingsathit, A., & Pattanapratchee, O. (2020). Comparisons of quality of life between patients underwent peritoneal dialysis and hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. *Health Qual Life Outcomes*, 18(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12955-020-01449-2>
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857-902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Durham, A. L., Speer, M. Y., Scatena, M., Giachelli, C. M., & Shanahan, C. M. (2018). Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res*, 114(4), 590-600. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy010>
- Frak, W., Wojtasinska, A., Lisinska, W., Mlynarska, E., Franczyk, B., & Rysz, J. (2022). Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease. *Biomedicines*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081938>
- Fukuda, M. (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci*, 65(18), 2801-2813. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8351-4>
- Fuster, B. B. K. (2010). In V. Fuster & B. B. Kelly (Eds.), *Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A Critical Challenge to Achieve Global Health*. <https://doi.org/10.17226/12815>
- Gauthier-Bastien, A., Ung, R. V., Lariviere, R., Mac-Way, F., Lebel, M., & Agharazii, M. (2014). Vascular remodeling and media calcification

- increases arterial stiffness in chronic kidney disease. *Clin Exp Hypertens*, 36(3), 173-180. <https://doi.org/10.3109/10641963.2013.804541>
- Genge, B. R., Wu, L. N., & Wuthier, R. E. (2007). Kinetic analysis of mineral formation during in vitro modeling of matrix vesicle mineralization: effect of annexin A5, phosphatidylserine, and type II collagen. *Anal Biochem*, 367(2), 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.029>
- Ghanta, M., & Jim, B. (2016). Renal Transplantation in Advanced Chronic Kidney Disease Patients. *Med Clin North Am*, 100(3), 465-476. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.12.003>
- Ginini, L., Billan, S., Fridman, E., & Gil, Z. (2022). Insight into Extracellular Vesicle-Cell Communication: From Cell Recognition to Intracellular Fate. *Cells*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/cells11091375>
- Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Aikawa, M., Iwata, H., Pham, T., Nykjaer, A., Kjolby, M., Rogers, M., Michel, T., Shibasaki, M., Hagita, S., Kramann, R., Rader, D. J., Libby, P., Singh, S. A., & Aikawa, E. (2016). Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J Clin Invest*, 126(4), 1323-1336. <https://doi.org/10.1172/JCI80851>
- Goettsch, C., Strzelecka-Kiliszek, A., Bessueille, L., Quillard, T., Mechtouff, L., Pikula, S., Canet-Soulas, E., Millan, J. L., Fonta, C., & Magne, D. (2022). TNAP as a therapeutic target for cardiovascular calcification: a discussion of its pleiotropic functions in the body. *Cardiovasc Res*, 118(1), 84-96. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa299>
- Gomi, H., Mori, K., Itohara, S., & Izumi, T. (2007). Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 18(11), 4377-4386. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0409>
- Guerra, F., & Bucci, C. (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/cells5030034>
- Hai, A. A., Rahman, M. M., Anwar, M. R., Miah, O. F., Latif, A., Jalil, M. E., Razzak, M. A., Morshed, A. M., Mahmud, H., & Dowel, F. A. (2021). Status of Serum Calcium, Phosphate and Intact Parathyroid Hormone in Predialysis Chronic Kidney Disease Patients of Stage-3 to Stage-5 Compared To KDOQI Guideline. *Mymensingh Med J*, 30(4), 1031-1042. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34605474>
- Han, Q. F., Li, W. J., Hu, K. S., Gao, J., Zhai, W. L., Yang, J. H., & Zhang, S. J. (2022). Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*, 21(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>
- Haraszti, R. A., Miller, R., Dubuke, M. L., Rockwell, H. E., Coles, A. H., Sapp, E., Didiot, M. C., Echeverria, D., Stoppato, M., Sere, Y. Y., Leszyk, J., Alterman, J. F., Godinho, B., Hassler, M. R., McDaniel, J., Narain, N. R., Wollacott, R., Wang, Y., Shaffer, S. A., . . . Khvorova, A. (2019). Serum Deprivation of Mesenchymal Stem Cells Improves Exosome Activity and Alters Lipid and Protein Composition. *iScience*, 16, 230-241. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.029>
- Hashmi, M. F., Benjamin, O., & Lappin, S. L. (2023). End-Stage Renal Disease. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763036>
- Heuschkel, M. A., Babler, A., Heyn, J., van der Vorst, E. P. C., Steenman, M., Gesper, M., Kappel, B. A., Magne, D., Goueffic, Y., Kramann, R., Jahnen-Dechent, W., Marx, N., Quillard, T., & Goettsch, C. (2022). Distinct role of mitochondrial function and protein kinase C in intimal and medial

- calcification in vitro. *Front Cardiovasc Med*, 9, 959457. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.959457>
- Holmar, J., Noels, H., Bohm, M., Bhargava, S., Jankowski, J., & Orth-Alampour, S. (2020). Development, establishment and validation of in vitro and ex vivo assays of vascular calcification. *Biochem Biophys Res Commun*, 530(2), 462-470. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.085>
- Hong, L., Guo, Y., BasuRay, S., Agola, J. O., Romero, E., Simpson, D. S., Schroeder, C. E., Simons, P., Waller, A., Garcia, M., Carter, M., Ursu, O., Gouveia, K., Golden, J. E., Aube, J., Wandinger-Ness, A., & Sklar, L. A. (2015). A Pan-GTPase Inhibitor as a Molecular Probe. *PLoS One*, 10(8), e0134317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134317>
- Hoylaerts, M. F., Van Kerckhoven, S., Kiffer-Moreira, T., Sheen, C., Narisawa, S., & Millan, J. L. (2015). Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *PLoS One*, 10(3), e0119874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119874>
- Huang, W., Lin, M., & Rikihisa, Y. (2023). Rab27a via its effector JFC1 localizes to Anaplasma inclusions and promotes Anaplasma proliferation in leukocytes. *Microbes Infect*, 105278. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105278>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J*, 30(17), 3481-3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hutcheson, J. D., Blaser, M. C., & Aikawa, E. (2017). Giving Calcification Its Due: Recognition of a Diverse Disease: A First Attempt to Standardize the Field. *Circ Res*, 120(2), 270-273. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310060>
- Hutcheson, J. D., & Goettsch, C. (2023). Cardiovascular Calcification Heterogeneity in Chronic Kidney Disease. *Circ Res*, 132(8), 993-1012. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321760>
- Hutcheson, J. D., Goettsch, C., Rogers, M. A., & Aikawa, E. (2015). Revisiting cardiovascular calcification: A multifaceted disease requiring a multidisciplinary approach. *Semin Cell Dev Biol*, 46, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.004>
- Izumi, T. (2021). In vivo Roles of Rab27 and Its Effectors in Exocytosis. *Cell Struct Funct*, 46(2), 79-94. <https://doi.org/10.1247/csf.21043>
- Jankowski, J., Floege, J., Fliser, D., Bohm, M., & Marx, N. (2021). Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation*, 143(11), 1157-1172. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686>
- Johnson, J. L., Ramadass, M., He, J., Brown, S. J., Zhang, J., Abgaryan, L., Biris, N., Gavathiotis, E., Rosen, H., & Catz, S. D. (2016). Identification of Neutrophil Exocytosis Inhibitors (Nexinhibs), Small Molecule Inhibitors of Neutrophil Exocytosis and Inflammation: DRUGGABILITY OF THE SMALL GTPase Rab27a. *J Biol Chem*, 291(50), 25965-25982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741884>
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., & Neefjes, J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol*, 11(21), 1680-1685. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00531-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00531-0)
- Kalantar-Zadeh, K., Jafar, T. H., Nitsch, D., Neuen, B. L., & Perkovic, V. (2021). Chronic kidney disease. *Lancet*, 398(10302), 786-802. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00519-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00519-5)

- Kariya, Y., Honma, M., Hanamura, A., Aoki, S., Ninomiya, T., Nakamichi, Y., Udagawa, N., & Suzuki, H. (2011). Rab27a and Rab27b are involved in stimulation-dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*, 26(4), 689-703. <https://doi.org/10.1002/jbmr.268>
- Karwowski, W., Naumnik, B., Szczepanski, M., & Mysliwiec, M. (2012). The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Med Sci Monit*, 18(1), RA1-11. <https://doi.org/10.12659/msm.882181>
- Kavelak, H. L. (2022). Electrolyte, acid-base, and medication management with renal replacement therapy. *Nutr Clin Pract*, 37(5), 1015-1022. <https://doi.org/10.1002/ncp.10880>
- Kay, R. R. (2021). Macropinocytosis: Biology and mechanisms. *Cells Dev*, 168, 203713. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203713>
- Kessler, D., Gruen, G. C., Heider, D., Morgner, J., Reis, H., Schmid, K. W., & Jendrossek, V. (2012). The action of small GTPases Rab11 and Rab25 in vesicle trafficking during cell migration. *Cell Physiol Biochem*, 29(5-6), 647-656. <https://doi.org/10.1159/000295249>
- Kim, D., Lee, B., Thomopoulos, S., & Jun, Y. S. (2018). The role of confined collagen geometry in decreasing nucleation energy barriers to intrafibrillar mineralization. *Nat Commun*, 9(1), 962. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03041-1>
- Kim, G. H., Choi, B. S., Cha, D. R., Chee, D. H., Hwang, E., Kim, H. W., Chang, J. H., Kim, J. K., Noh, J. W., Joo, K. W., Lee, S. C., Han, S. W., Kim, S., Kim, S. W., Shin, S. K., Park, W., Kim, W., Huh, W., Kwon, Y. J., & Kang, Y. S. (2014). Serum calcium and phosphorus levels in patients undergoing maintenance hemodialysis: A multicentre study in Korea. *Kidney Res Clin Pract*, 33(1), 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2013.12.003>
- Kim, H. J. (2021). Metabolic Acidosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis, Clinical Consequences, and Treatment. *Electrolyte Blood Press*, 19(2), 29-37. <https://doi.org/10.5049/EBP.2021.19.2.29>
- Kinchen, J. M., & Ravichandran, K. S. (2010). Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature*, 464(7289), 778-782. <https://doi.org/10.1038/nature08853>
- Kitching, R., Qi, S., Li, V., Raouf, A., Vary, C. P., & Seth, A. (2002). Coordinate gene expression patterns during osteoblast maturation and retinoic acid treatment of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Metab*, 20(5), 269-280. <https://doi.org/10.1007/s007740200039>
- Kobayashi-Sun, J., Yamamori, S., Kondo, M., Kuroda, J., Ikegame, M., Suzuki, N., Kitamura, K. I., Hattori, A., Yamaguchi, M., & Kobayashi, I. (2020). Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale. *Commun Biol*, 3(1), 190. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0925-1>
- Krieg, S., Kostev, K., Luedde, M., Krieg, A., Luedde, T., Roderburg, C., & Loosen, S. H. (2022). The association between the body height and cardiovascular diseases: a retrospective analysis of 657,310 outpatients in Germany. *Eur J Med Res*, 27(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00881-y>
- Krohn, J. B., Hutcheson, J. D., Martinez-Martinez, E., & Aikawa, E. (2016). Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms. *J Physiol*, 594(11), 2895-2903. <https://doi.org/10.1113/JP271338>

- Lee, S. J., Lee, I. K., & Jeon, J. H. (2020). Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *Int J Mol Sci*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082685>
- Li, G., & Marlin, M. C. (2015). Rab family of GTPases. *Methods Mol Biol*, 1298, 1-15. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2569-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2569-8_1)
- Li, T., Yu, H., Zhang, D., Feng, T., Miao, M., Li, J., & Liu, X. (2022). Matrix Vesicles as a Therapeutic Target for Vascular Calcification. *Front Cell Dev Biol*, 10, 825622. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.825622>
- Li, Y., Cao, G. Y., Jing, W. Z., Liu, J., & Liu, M. (2023). Global trends and regional differences in incidence and mortality of cardiovascular disease, 1990-2019: findings from 2019 global burden of disease study. *Eur J Prev Cardiol*, 30(3), 276-286. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwac285>
- Lu, Y., Zhao, L., Mao, J., Liu, W., Ma, W., & Zhao, B. (2023). Rab27a-mediated extracellular vesicle secretion contributes to osteogenesis in periodontal ligament-bone niche communication. *Sci Rep*, 13(1), 8479. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35172-x>
- Lund, V. K., Madsen, K. L., & Kjaerulff, O. (2018). Drosophila Rab2 controls endosome-lysosome fusion and LAMP delivery to late endosomes. *Autophagy*, 14(9), 1520-1542. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1458170>
- Major, R. W., Cheng, M. R. I., Grant, R. A., Shantikumar, S., Xu, G., Oozeerally, I., Brunskill, N. J., & Gray, L. J. (2018). Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 13(3), e0192895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192895>
- Martinez-Arroyo, O., Selma-Soriano, E., Ortega, A., Cortes, R., & Redon, J. (2021). Small Rab GTPases in Intracellular Vesicle Trafficking: The Case of Rab3A/Raphillin-3A Complex in the Kidney. *Int J Mol Sci*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147679>
- Mohan, A. G., Calenic, B., Ghiurau, N. A., Duncea-Borca, R. M., Constantinescu, A. E., & Constantinescu, I. (2023). The Golgi Apparatus: A Voyage through Time, Structure, Function and Implication in Neurodegenerative Disorders. *Cells*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/cells12151972>
- Mohrmann, K., Gerez, L., Oorschot, V., Klumperman, J., & van der Sluijs, P. (2002). Rab4 function in membrane recycling from early endosomes depends on a membrane to cytoplasm cycle. *J Biol Chem*, 277(35), 32029-32035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203064200>
- Nabavi, N., Pustynnik, S., & Harrison, R. E. (2012). Rab GTPase mediated procollagen trafficking in ascorbic acid stimulated osteoblasts. *PLoS One*, 7(9), e46265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046265>
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*, 36, 489-517. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>
- Nakano-Kurimoto, R., Ikeda, K., Uraoka, M., Nakagawa, Y., Yutaka, K., Koide, M., Takahashi, T., Matoba, S., Yamada, H., Okigaki, M., & Matsubara, H. (2009). Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(5), H1673-1684. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00455.2009>
- Nephrology, I. S. o. (2024, April 2024). *KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and*

- Management of Chronic Kidney Disease*. Retrieved 14.12.2024 from <https://kdigo.org/wp-content/uploads/2024/03/KDIGO-2024-CKD-Guideline.pdf>
- New, S. E., & Aikawa, E. (2013). Role of extracellular vesicles in de novo mineralization: an additional novel mechanism of cardiovascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(8), 1753-1758. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300128>
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A., de With, G., & Sommerdijk, N. A. (2010). The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat Mater*, 9(12), 1004-1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>
- Ohishi, Y., Ammann, S., Ziaee, V., Strege, K., Gross, M., Amos, C. V., Shahrooei, M., Ashournia, P., Razaghian, A., Griffiths, G. M., Ehl, S., Fukuda, M., & Parvaneh, N. (2020). Griscelli Syndrome Type 2 Sine Albinism: Unraveling Differential RAB27A Effector Engagement. *Front Immunol*, 11, 612977. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.612977>
- Orimo, H., & Shimada, T. (2008). The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem*, 315(1-2), 51-60. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9788-3>
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*, 12(1), 19-30; sup pp 11-13. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- Palit, S., & Kendrick, J. (2014). Vascular calcification in chronic kidney disease: role of disordered mineral metabolism. *Curr Pharm Des*, 20(37), 5829-5833. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140212194926>
- Pankiv, S., Alemu, E. A., Brech, A., Bruun, J. A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjorkoy, G., & Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol*, 188(2), 253-269. <https://doi.org/10.1083/jcb.200907015>
- Patel, J. J., Bourne, L. E., Davies, B. K., Arnett, T. R., MacRae, V. E., Wheeler-Jones, C. P., & Orriss, I. R. (2019). Differing calcification processes in cultured vascular smooth muscle cells and osteoblasts. *Exp Cell Res*, 380(1), 100-113. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.020>
- Pfeffer, S. R. (2010). Two Rabs for exosome release. *Nat Cell Biol*, 12(1), 3-4. <https://doi.org/10.1038/ncb0110-3>
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*, 141(3), 497-508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.011>
- Progida, C., Cogli, L., Piro, F., De Luca, A., Bakke, O., & Bucci, C. (2010). Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. *J Cell Sci*, 123(Pt 9), 1480-1491. <https://doi.org/10.1242/jcs.051474>
- Proudfoot, D., Skepper, J. N., Hegyi, L., Bennett, M. R., Shanahan, C. M., & Weissberg, P. L. (2000). Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*, 87(11), 1055-1062. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.11.1055>

- Pustlauk, W., Westhoff, T. H., Claeys, L., Roch, T., Geissler, S., & Babel, N. (2020). Induced osteogenic differentiation of human smooth muscle cells as a model of vascular calcification. *Sci Rep*, *10*(1), 5951. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62568-w>
- Rennenberg, R. J., Kessels, A. G., Schurgers, L. J., van Engelshoven, J. M., de Leeuw, P. W., & Kroon, A. A. (2009). Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag*, *5*(1), 185-197. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s4822>
- Reynolds, J. L., Joannides, A. J., Skepper, J. N., McNair, R., Schurgers, L. J., Proudfoot, D., Jahnen-Dechent, W., Weissberg, P. L., & Shanahan, C. M. (2004). Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, *15*(11), 2857-2867. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28>
- Saito, A., Sato, H., Iino, N., & Takeda, T. (2010). Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol*, *2010*, 403272. <https://doi.org/10.1155/2010/403272>
- Saveri, P., De Luca, M., Nisi, V., Pisciotto, C., Romano, R., Piscoquito, G., Reilly, M. M., Polke, J. M., Cavallaro, T., Fabrizi, G. M., Fossa, P., Cichero, E., Lombardi, R., Lauria, G., Magri, S., Taroni, F., Pareyson, D., & Bucci, C. (2020). Charcot-Marie-Tooth Type 2B: A New Phenotype Associated with a Novel RAB7A Mutation and Inhibited EGFR Degradation. *Cells*, *9*(4). <https://doi.org/10.3390/cells9041028>
- Savina, A., Vidal, M., & Colombo, M. I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci*, *115*(Pt 12), 2505-2515. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.12.2505>
- Skjeldal, F. M., Haugen, L. H., Mateus, D., Frei, D. M., Rodseth, A. V., Hu, X., & Bakke, O. (2021). De novo formation of early endosomes during Rab5-to-Rab7a transition. *J Cell Sci*, *134*(8). <https://doi.org/10.1242/jcs.254185>
- Smit, M., Coetzee, A. R., & Lochner, A. (2020). The Pathophysiology of Myocardial Ischemia and Perioperative Myocardial Infarction. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, *34*(9), 2501-2512. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2019.10.005>
- Sugita, S. (2008). Mechanisms of exocytosis. *Acta Physiol (Oxf)*, *192*(2), 185-193. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01803.x>
- ThermoFisher. (2010). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>
- ThermoFisher. (2024). *AlamarBlue Assays for Cell Viability*. Retrieved 03.07.2024 from <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/alarmarblue-assay-cell-viability.html>
- Vanlandingham, P. A., & Ceresa, B. P. (2009). Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem*, *284*(18), 12110-12124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809277200>
- Wei, Y., Tang, C., Zhang, J., Li, Z., Zhang, X., Miron, R. J., & Zhang, Y. (2019). Extracellular vesicles derived from the mid-to-late stage of osteoblast differentiation markedly enhance osteogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, *514*(1), 252-258. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.029>

- Westenfeld, R., Schafer, C., Kruger, T., Haarmann, C., Schurgers, L. J., Reutelingsperger, C., Ivanovski, O., Druke, T., Massy, Z. A., Ketteler, M., Floege, J., & Jahn-Dechent, W. (2009). Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*, *20*(6), 1264-1274. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008060572>
- Xu, J., & Shi, G. P. (2014). Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta*, *1842*(11), 2106-2119. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.008>
- Yates, A. G., Pink, R. C., Erdbrugger, U., Siljander, P. R., Dellar, E. R., Pantazi, P., Akbar, N., Cooke, W. R., Vatish, M., Dias-Neto, E., Anthony, D. C., & Couch, Y. (2022). In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology: Part I: Health and Normal Physiology. *J Extracell Vesicles*, *11*(1), e12151. <https://doi.org/10.1002/jev2.12151>
- Yu, J., Sane, S., Kim, J. E., Yun, S., Kim, H. J., Jo, K. B., Wright, J. P., Khoshdoozmasouleh, N., Lee, K., Oh, H. T., Thiel, K., Parvin, A., Williams, X., Hannon, C., Lee, H., & Kim, D. K. (2023). Biogenesis and delivery of extracellular vesicles: harnessing the power of EVs for diagnostics and therapeutics. *Front Mol Biosci*, *10*, 1330400. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1330400>
- Zazzeroni, L., Faggioli, G., & Pasquinelli, G. (2018). Mechanisms of Arterial Calcification: The Role of Matrix Vesicles. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *55*(3), 425-432. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2017.12.009>
- Zhang, M., Chen, L., Wang, S., & Wang, T. (2009). Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Biosci Rep*, *29*(3), 193-209. <https://doi.org/10.1042/BSR20090032>
- Zhao, Y., Sun, Z., Li, L., Yuan, W., & Wang, Z. (2022). Role of Collagen in Vascular Calcification. *J Cardiovasc Pharmacol*, *80*(6), 769-778. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000001359>
- Zwakenberg, S. R., de Jong, P. A., Hendriks, E. J., Westerink, J., Spiering, W., de Borst, G. J., Cramer, M. J., Bartstra, J. W., Doesburg, T., Rutters, F., van der Heijden, A. A., Schalkwijk, C., Schurgers, L. J., van der Schouw, Y. T., Beulens, J. W. J., & Group, S. S. (2020). Intimal and medial calcification in relation to cardiovascular risk factors. *PLoS One*, *15*(7), e0235228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235228>

## 9 Anhang

A

```
1 input = getDirectory("Choose a Directory");
2 processFolder(input);
3
4 function processFolder(input) {
5     list = getFileList(input);
6     for (i = 0; i < list.length; i++) {
7         processFile(input, list[i]);
8     }
9 }
10
11 function processFile(input, filename) {
12     path = input + filename;
13     open(path);
14
15     run("Split Channels");
16     close();
17     selectWindow(filename + " (red)");
18     close();
19     selectWindow(filename + " (green)");
20     run("8-bit");
21     setAutoThreshold("Default dark no-reset");
22     setThreshold(43, 255);
23     setOption("BlackBackground", true);
24     run("Convert to Mask");
25     run("Create Selection");
26     run("Watershed");
27     run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity summarize");
28
29     close();
30 }
```

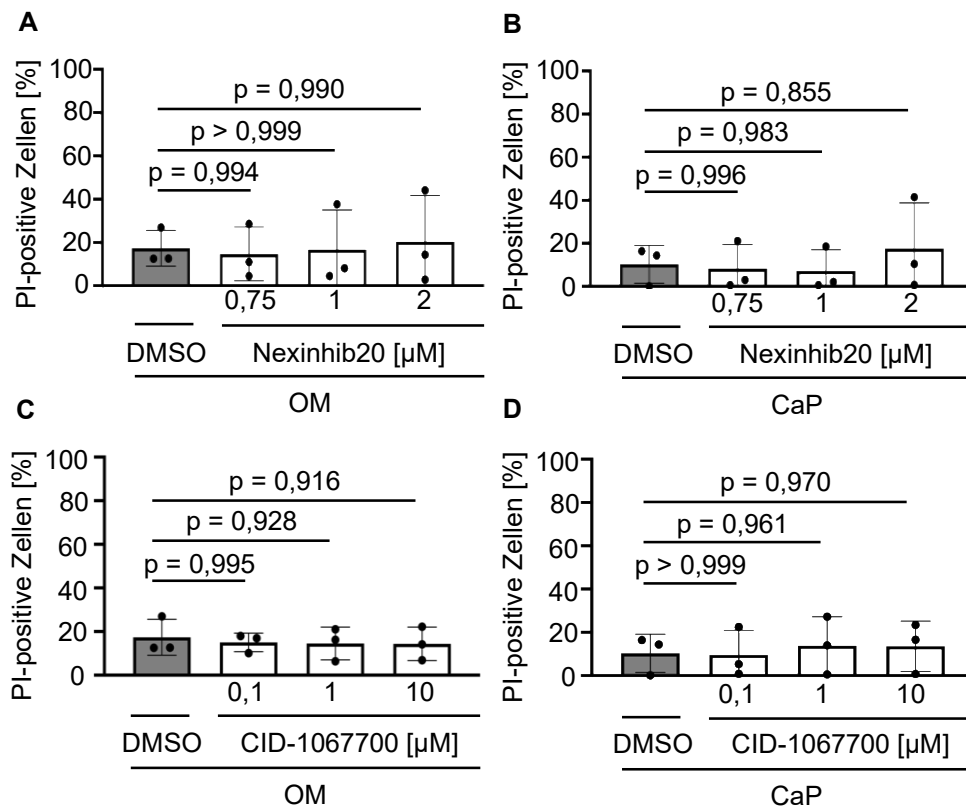
B

```
1 input = getDirectory("Choose a Directory");
2 processFolder(input);
3
4 function processFolder(input) {
5     list = getFileList(input);
6     for (i = 0; i < list.length; i++) {
7         processFile(input, list[i]);
8     }
9 }
10
11 function processFile(input, filename) {
12     path = input + filename;
13     open(path);
14
15     run("Split Channels");
16     close(filename + " (green)");
17     close(filename + " (blue)");
18     selectWindow(filename + " (red)");
19     run("8-bit");
20     setAutoThreshold("Default dark no-reset");
21     setThreshold(31, 255);
22     setOption("BlackBackground", true);
23     run("Convert to Mask");
24     run("Create Selection");
25     run("Watershed");
26     run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity summarize");
27
28     close();
29 }
```

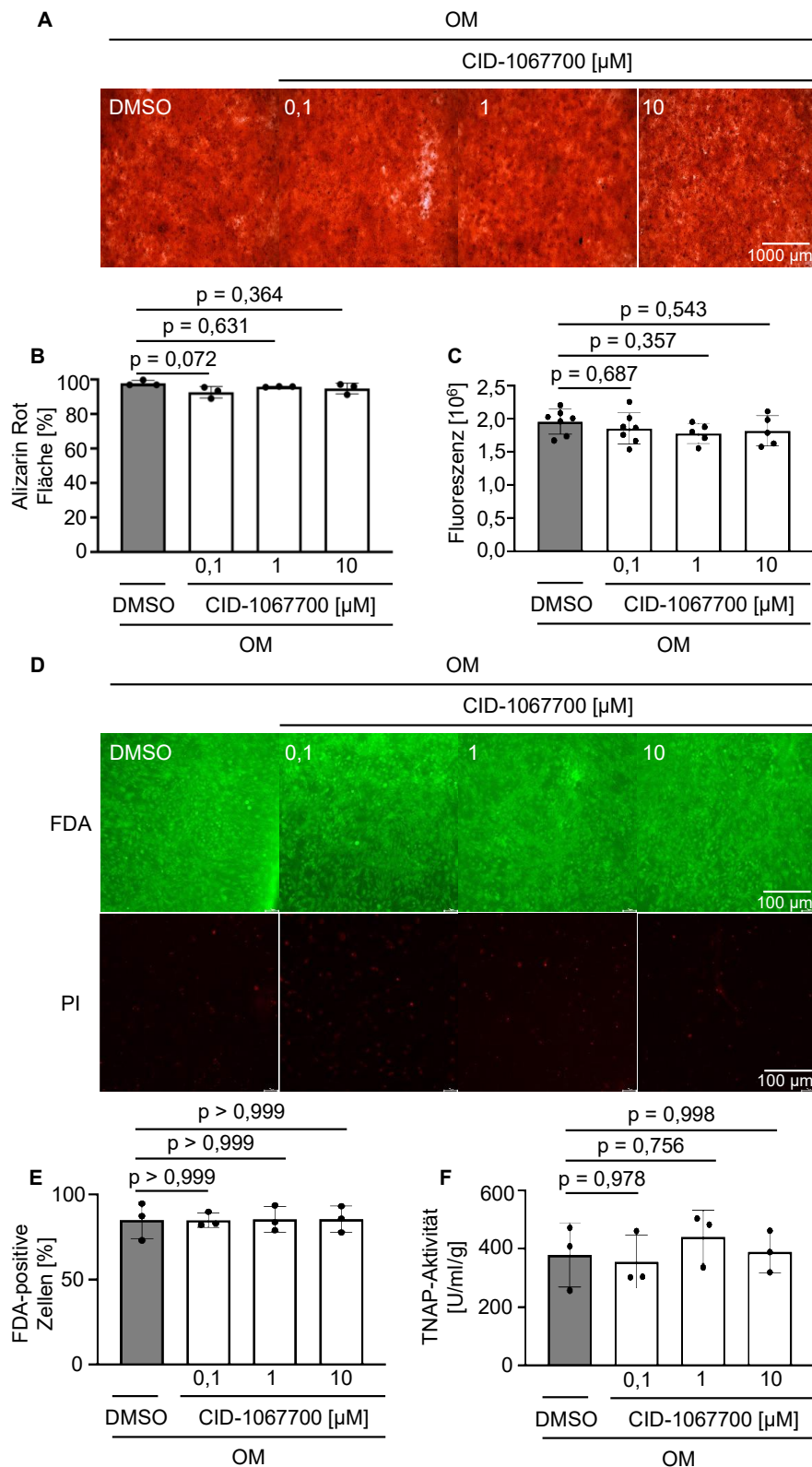
**Anhang Abbildung 1. Bildanalyse der Fluoreszeindiacetat-Propiumiodid-Färbung (FDA-PI).** Für die Quantifizierung der Mikroskopie der FDA-PI-Bilder erfolgte zunächst die Ordnerauswahl mit den dazugehörigen Bildern. Anschließend erfolgte die Trennung der Farbkanäle in grün, rot und blau. Für die Analyse der FDA-Bilder wurde der grüne Kanal (A) und für PI der rote Kanal (B) weiter analysiert. Die Bilder wurden für die weitere Analyse in 8-bit konvertiert. Final wurden die Zellen für die Analyse voneinander getrennt und analysiert.

```
1 input = getDirectory("Choose a Directory");
2
3 processFolder(input);
4
5 function processFolder(input) {
6     list = getFileList(input);
7     for (i = 0; i < list.length; i++) {
8         processFile(input, list[i]);
9     }
10 }
11
12 function processFile(input, file) {
13
14     open(input + file); //open image
15
16     run("8-bit");
17     setAutoThreshold("Default");
18     //run("Threshold...");
19     setThreshold(0, 100);
20     run("Measure");
21     close("*");
22 }
```

**Anhang Abbildung 2. Bildanalyse der Alizarin Rot Mikroskopie.** Mittels Bildanalyse wurden die Alizarin Rot Bilder ausgewertet. Dafür erfolgt zunächst die Auswahl des Ordners mit den Mikroskopie-Bildern. Anschließend erfolgt die Konversion in 8-bit und die Anpassung des Thresholds. Final erfolgt die Messung der Alizarin Rot Fläche in Prozent.

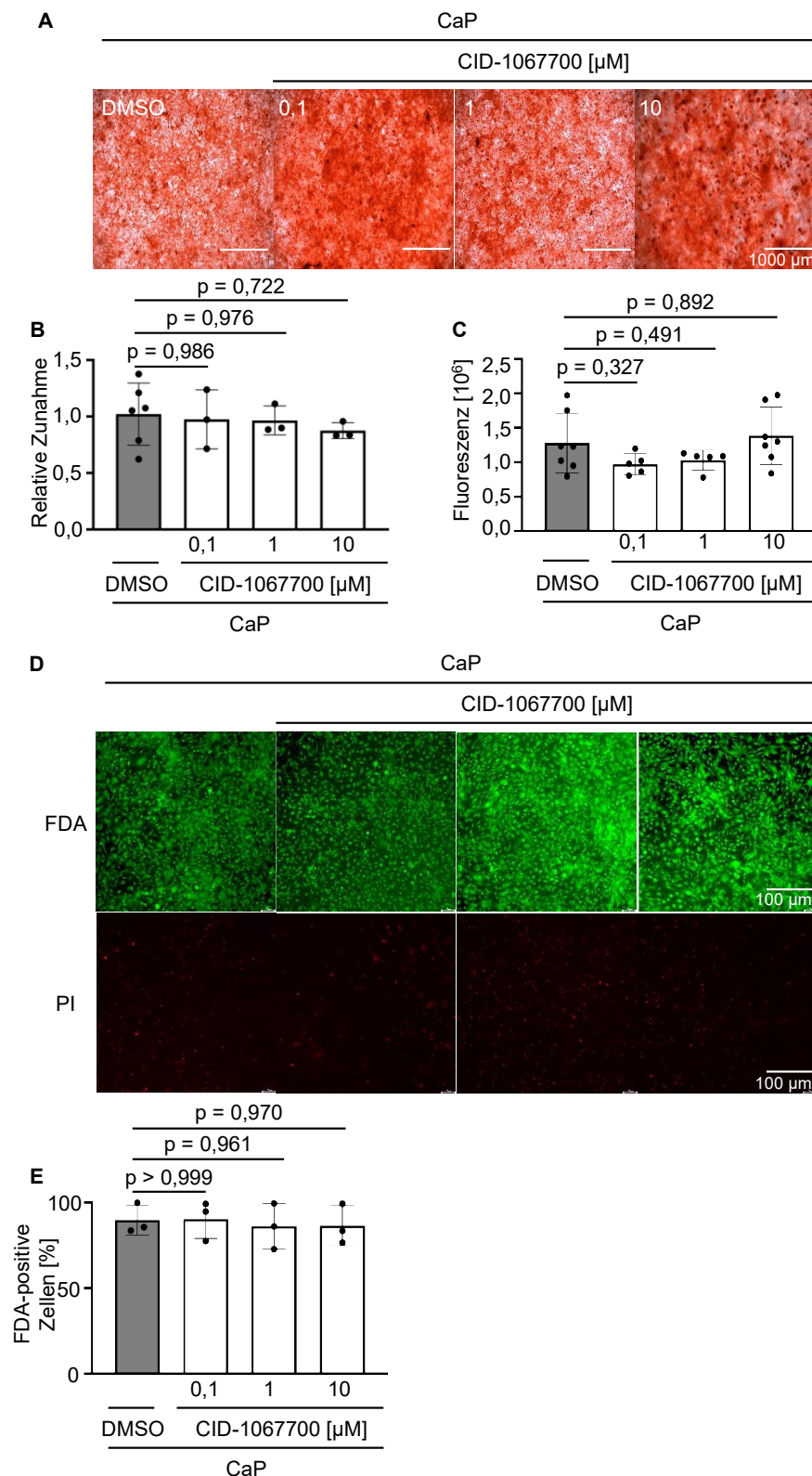


**Anhang Abbildung 3. Inhibition der Exozytose und endosomalen Reifung beeinflussen nicht die Zellvitalität.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 14 Tage in osteogenem Medium (OM) kultiviert und mit 0,75, 1 und 2  $\mu\text{M}$  Nexinhib20 und 0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$  CID-1067700 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Zur Überprüfung der Zellvitalität erfolgte eine Fluoresceindiacetat-Propidiumiodid-Färbung (FDA-PI), welche im Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurden. Lebende Zellen erscheinen hierbei grün fluoreszierend und tote Zellen rot. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . (A – D) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji, wobei die lebenden Zellen durch FDA dargestellt werden und die toten durch PI. n = 3, MW  $\pm$  SD, One-way-ANOVA.



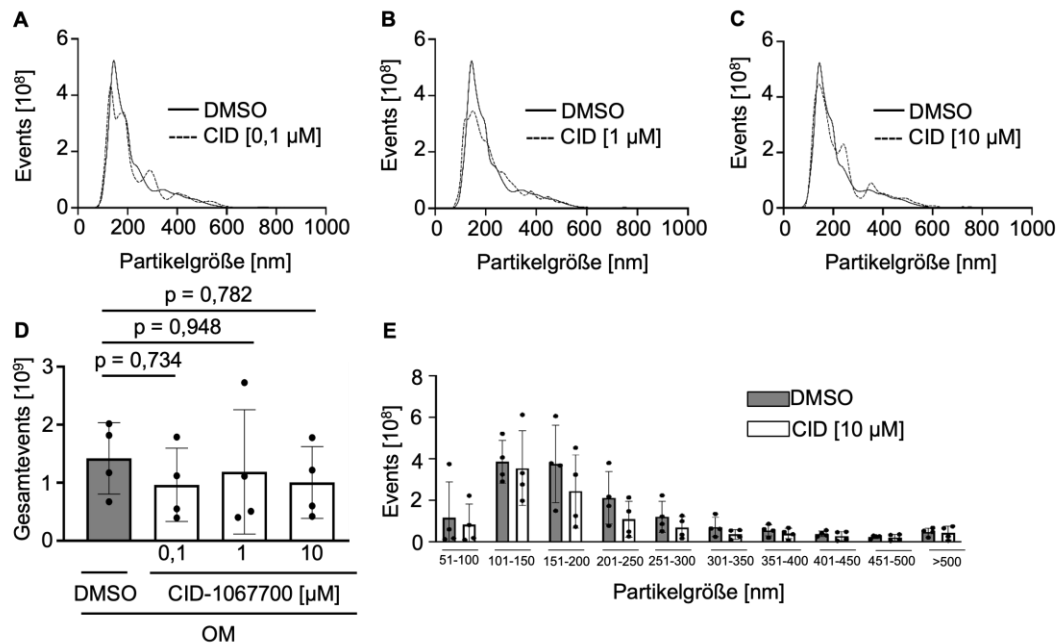
**Anhang Abbildung 4. Inhibition von Rab7 in der endosomal Reifung durch CID-1067700 unter osteogenen Konditionen (OM) beeinflusst nicht die Matrixmineralisierung und Zellvitalität.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 14 Tage in OM kultiviert und mit 0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$  CID-1067700 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. (A) Die Matrixmineralisierung wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durch Alizarin Rot Färbung dargestellt. Maßstab 1000  $\mu\text{m}$ . (B) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji. (C) Die Überprüfung der Zellvitalität erfolgte mittels Messung der Fluoreszenz der metabolischen Aktivität durch Resazurin-Reduktion nach 14 Tagen. (D) Zur weiteren Überprüfung der Zellvitalität erfolgte eine Fluoreszeindiacetat-Propidiumiodid-Färbung (FDA-PI), welche im

Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurden. Lebende Zellen erscheinen hierbei grün fluoreszierend und tote Zellen rot. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . (E) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji, wobei die lebenden Zellen durch FDA dargestellt werden und die toten durch PI (Anhang Abbildung 3C). (F) Die TNAP-Aktivität wurde nach sieben Tagen bestimmt und auf die Proteinmenge normalisiert.  $n = 3 - 7$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , One-way-ANOVA.

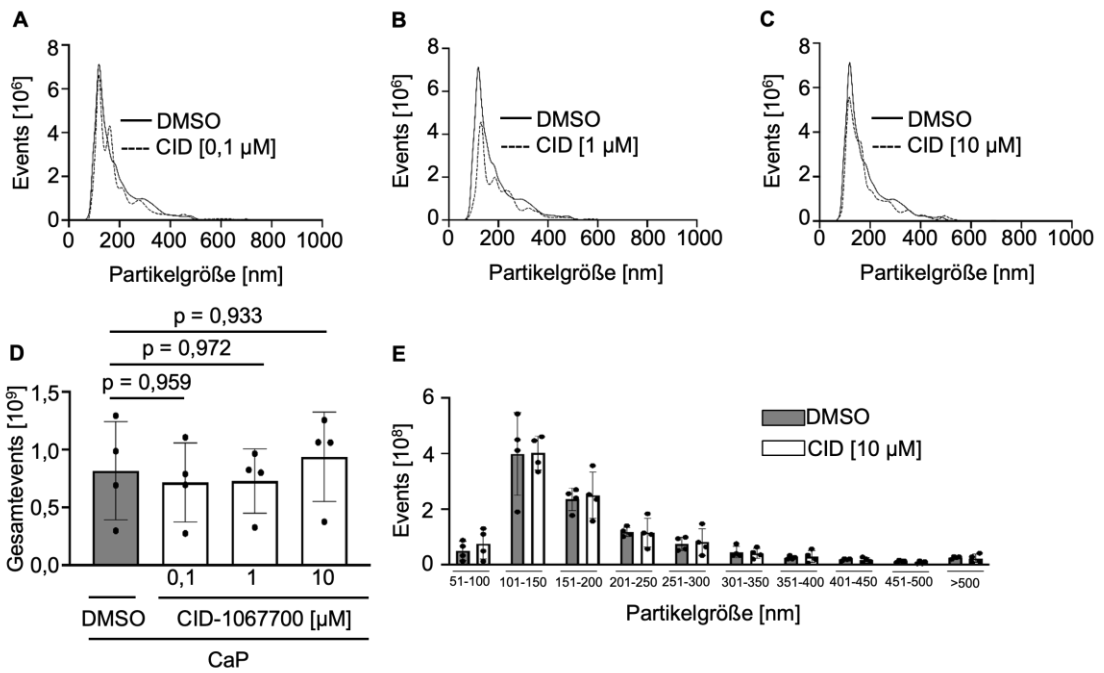


**Anhang Abbildung 5. Inhibition von Rab7 in der endosomal Reifung unter kalziumphosphatreichen Konditionen (CaP) durch CID-1067700 beeinflusst nicht die Matrixmineralisierung und Zellvitalität.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 7 Tage in Kalziumphosphat Medium (CaP) kultiviert und mit 0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$  CID-1067700 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für

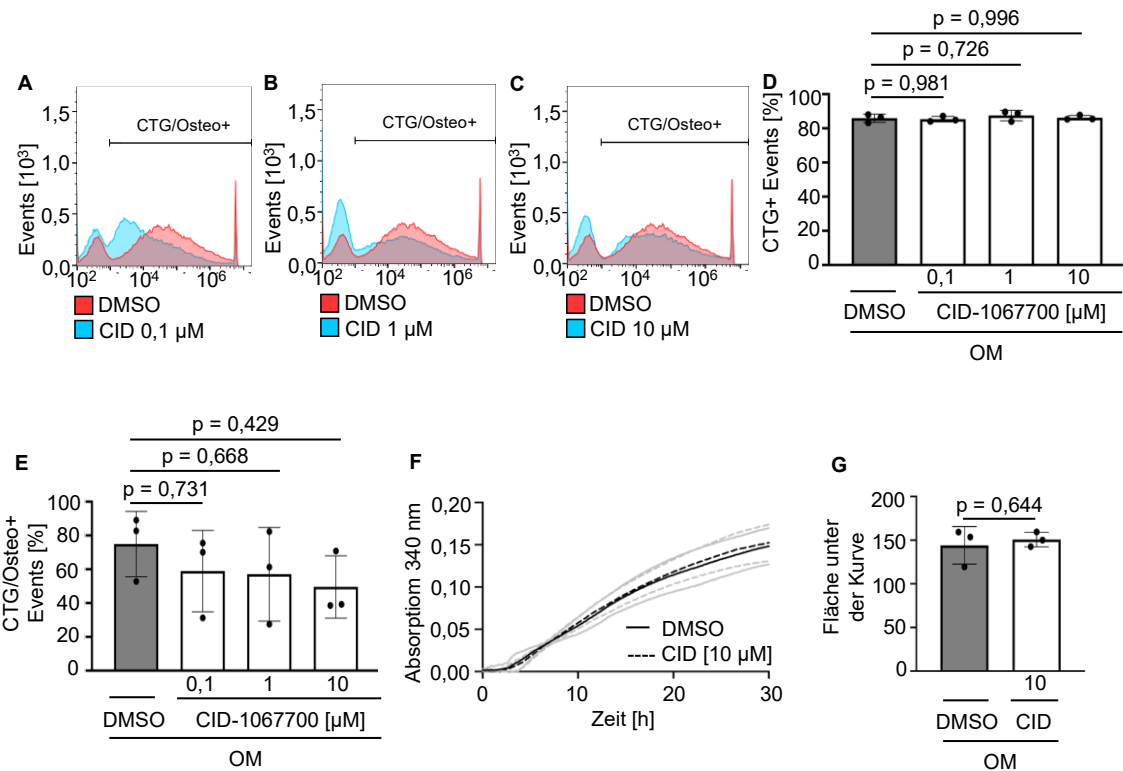
24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. (A) Die Matrixmineralisierung wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durch Alizarin Rot Färbung dargestellt. Maßstab 1000  $\mu\text{m}$ . (B) Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji. (C) Die Überprüfung der Zellvitalität erfolgte mittels Messung der Fluoreszenz der metabolischen Aktivität durch Resazurin-Reduktion nach 7 Tagen. (D) Zur weiteren Überprüfung der Zellvitalität erfolgte eine Fluoreszeindiacetat-Propidiumiodid-Färbung (FDA-PI), welche im Fluoreszenzmikroskop visualisiert wurden. (E) Lebende Zellen erscheinen hierbei grün fluoreszierend und tote Zellen rot. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . Die Quantifizierung erfolgte durch Bildanalyse mittels Fiji, wobei die lebenden Zellen durch FDA dargestellt werden und tote durch PI (Anhang Abbildung 3D).  $n = 3 - 7$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , One-way-ANOVA.



**Anhang Abbildung 6. Partikelzahl ist nicht beeinflusst durch die Inhibition der endosomalen Reifung.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 14 Tage in osteogenem Medium (OM) kultiviert und mit 0,1, 1 und 10  $\mu\text{M}$  CID-1067700 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der extrazellulären Vesikel (EVs) wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Die Analyse erfolgte mittels Nanopartikeltracking-Analyse im Vergleich zu DMSO. Es wurden fünf Videos je 60 s pro Probe aufgenommen und analysiert. Darstellung (A – C) repräsentativer Kurven pro Konzentration und (D) Quantifizierung mit Aufteilung nach Gesamtevents und (E) Partikelgröße.  $n = 4$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ , One-way-ANOVA.

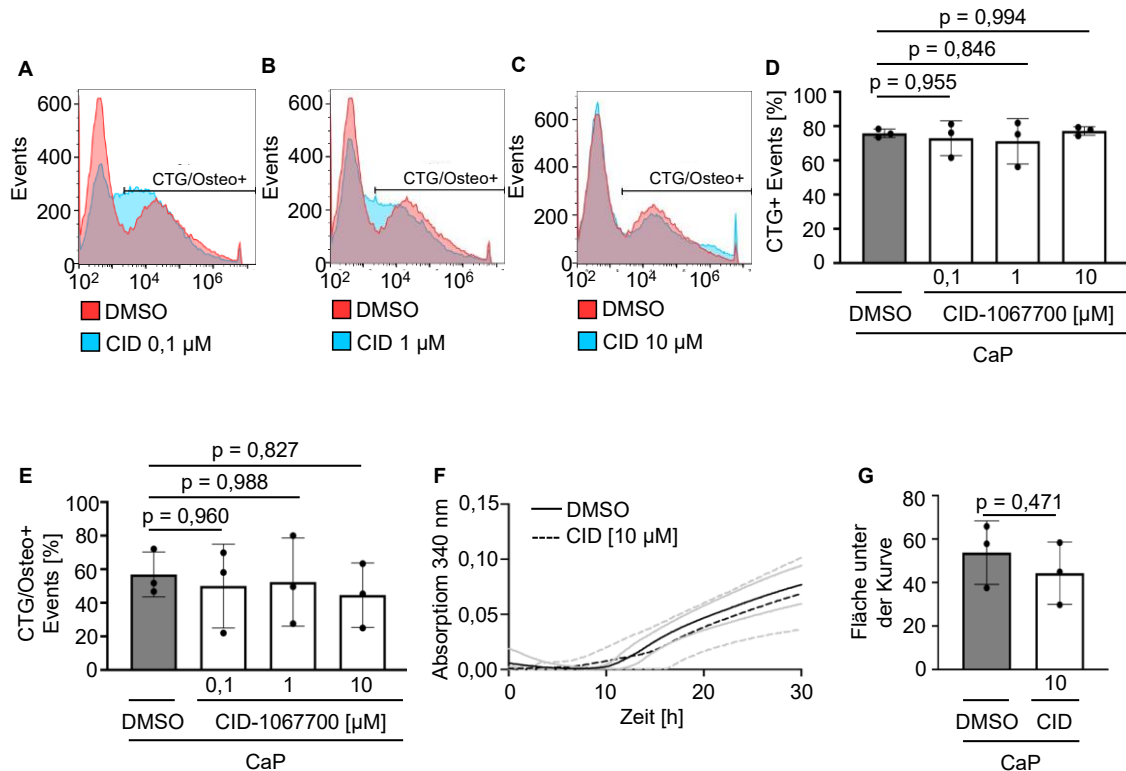


**Anhang Abbildung 7. Die Anzahl an extrazellulären Vesikeln ist nicht beeinflusst durch die Inhibition von Rab7 der endosomalen Reifung.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 7 Tage in Kalziumphosphat Medium (CaP) kultiviert und mit 0,1, 1 und 10 μM CID-1067700 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der extrazellulären Vesikel (EVs) wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Die Analyse erfolgte mittels Nanopartikeltracking-Analyse im Vergleich zu DMSO. Es wurden fünf Videos je 60 s pro Probe aufgenommen und analysiert. Darstellung (A – C) repräsentativer Kurven pro Konzentration und (D) Quantifizierung mit Aufteilung nach Gesamtevents und (E) Partikelgröße. n = 4, MW ± SD, One-way-ANOVA.



**Anhang Abbildung 8. Die Anzahl mineralpositiver Events und das Aggregationsverhalten wird nicht durch die Inhibition der endosomalen Reifung beeinflusst.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 14 Tage in osteogenem Medium (OM) kultiviert und mit 0,1, 1 und 10 μM CID-1067700 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der extrazellulären Vesikel (EVs) wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt.

Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Es erfolgte die Messung der vorhandenen Events durch Tracking der EVs mittels grünem CellTracker™ (CTG). Die Messung der Mineralbelastung erfolgte durch Osteosense (Osteo). Darstellung von repräsentativen Kurven aller Konzentrationen mit (A – C) Doppelfärbung CTG/Osteo und (D – E) Quantifizierung. Das Aggregationsverhalten wurde mittels des Aggregationsassays analysiert. Es fand die Messung einer Absorption bei 340 nm alle 5 min für 30 h bei 37°C statt. (F) Darstellung von repräsentativen Graphen des Aggregationsverhalten von CID-1067700 10 µM im Vergleich zu DMSO. (G) Es erfolgte die Quantifizierung der Graphen durch die Analyse der Fläche unter der Kurve. n = 3, MW (schwarze Linie) ± SD (gestrichelte Linie), Area under the curve (AUC), t-Test ggf. mit Welch-Korrektur bei signifikantem F-test, One-way-ANOVA.



**Anhang Abbildung 9. Inhibition von Rab7 in der endosomalen Reifung hat keinen Einfluss auf die Anzahl mineralpositiver Events und das Aggregationsverhalten.** Glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden für 7 Tage in Kalziumphosphat Medium (CaP) kultiviert und mit 0,1, 1 und 10 µM CID-1067700 stimuliert. DMSO (1:1000) diente als Kontrolle. Das konditionierte Medium zur Analyse der EVs wurde für 24 h mit 0,1 % FBS gesammelt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Messung der Mineralbelastung erfolgte durch Osteosense (Osteo). Darstellung von repräsentativen Kurven aller Konzentrationen mit (A – C) Doppelfärbung CTG/Osteo und (D – E) Quantifizierung. Das Aggregationsverhalten wurde mittels des Aggregationsassays analysiert. Es fand die Messung einer Absorption bei 340 nm alle 5 min für 30 h bei 37°C statt. (F) Darstellung von repräsentativen Graphen des Aggregationsverhalten von CID-1067700 10 µM im Vergleich zu DMSO. (G) Es erfolgte die Quantifizierung der Graphen durch die Analyse der Fläche unter der Kurve. n = 3, MW (schwarze Linie) ± SD (gestrichelte Linie), Area under the curve (AUC), t-Test ggf. mit Welch-Korrektur bei signifikantem F-test, One-way-ANOVA.

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Doktorarbeit unterstützten und diese ermöglicht haben. Ohne sie wäre all das nicht machbar gewesen. Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Claudia Göttisch, für die Möglichkeit an diesem Forschungsthema zu arbeiten und ihre Unterstützung. Sie arbeitete mich mit viel Verständnis und Geduld im Labor ein, half mir stets bei Fragen und stand mir immer mit ihrem Rat unterstützend zur Seite. Ein weiterer, ganz besonderer Dank, gilt meiner direkten Betreuerin Dr. rer. nat. Andrea Gorgels. Mit ihrer geduldigen und verständnisvollen Art war sie sowohl ein großer fachlicher, als auch menschlicher Gewinn und durch sie konnte ich viel lernen. Aufgrund ihrer guten Laune und Spaß an der Arbeit erhielten selbst die misslungenen Labortage ihre notwendige Menge Spaß. Durch diese Beiden lernte ich das experimentelle und wissenschaftliche Arbeiten mit all seinen Facetten kennen. Für diese gemachten Erfahrungen bin ich sehr dankbar. Ebenfalls möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe Göttisch für die großartige Zeit im Labor bedanken. Besonderer Dank geht an Nicolas, Jonas, Felix und Tabea. Es hat unglaublich viel Spaß gemacht mit euch zusammenzuarbeiten und ihr habt mich immer mit eurem Humor und Ratschlägen tatkräftig unterstützt. Ein weiterer besonderer Dank gebührt den weiteren Doktorand:innen des Labors der Klinik für Kardiologie. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Maren und Max. Ihr habt mich sehr herzlich im Labor aufgenommen und meinen dortigen Alltag stets bereichert. Des Weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Jahnen-Dechent bedanken. Besonders bei Camilla, Christian und Steffen, welche mich in ihrem Labor ebenfalls für Experimente aufgenommen haben und mir stets mit viel Geduld, Rat und Tat zur Seite standen. Zusammenfassend möchte ich dem gesamten SFB/TRR219 danken für die wertvollen Erfahrungen und die tolle Zeit. Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Freund:innen und meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Michelle und meiner Mutter Nicole, welche mich im Laufe dieser Promotion und während des gesamten Studiums unterstützt haben. Ohne sie wäre all dies nicht möglich gewesen. Ich bin zutiefst dankbar für die Möglichkeiten, die mir eingeräumt wurden, für den Rückhalt, ohne den ich in diesem Studium und dieser Promotion nie so weit gekommen wäre und für die ganzen tollen Momente, die das Leben lebenswert machen.

## **11 Erklärung zur Datenaufbewahrung**

Hiermit erkläre ich, **Joel Simon**, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der **Klinik für Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin (Medizinische Klinik I)** des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

## 12 Erklärung über den Eigenanteil

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung.

Hiermit erkläre ich, **Joel Simon**, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Der Einfluss der Exozytose und der endosomalen Reifung auf die vesikel-vermittelte vaskuläre Kalzifizierung**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	<b>Doktorand</b> Joel Simon	Nicolas Hense, M. Sc.	<b>Betreuerin</b> Dr. rer. nat. Andrea Gorgels	<b>Doktormutter</b> Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Claudia Göttsch	Sum- me (%)
Konzeption	10		40	50	100
Methodische Einarbeitung		5	45	50	100
Zellkultur und Probengewin- nung	95		5		100
Alizarin Rot Färbungen	100				100
qPCR	100				100
Aggregations- assay	100				100
NTA	100				100
Zellvitalitäts- assay	100				100
TNAP-Messung	100				100
Durchflusszyto- metrie	100				100
Statistische Auswertung	80		10	10	100
Bereitstellung von Materialien				100	100
Interpretation	80		10	10	100
Korrektur der Dissertation			50	50	100

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Doktoranden (Joel Simon)

Als Betreuerin der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Joel Simon

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktormutter (Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Claudia Göttsch)