



Die Rolle der extrazellulären Matrix
in der degenerativen Aortenklappenerkrankung
unter dem Einfluss von Diabetes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jessica Isabel Selig

aus Wolfen

Düsseldorf, Dezember 2018

aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2019

„Wer kein Ziel vor Augen hat,
kann auch keinen Weg hinter sich bringen.“

Ernst Ferstl

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Das Herz und seine Klappen - der Motor des Lebens	1
1.1.1. Entwicklung, Lage und Funktion der Herzklappen	1
1.1.2. Der dreischichtige Aufbau der AK-Taschen.....	2
1.1.3. Epidemiologie von Herzklappenvitien.....	4
1.1.4. Pathophysiologie der DAVID	4
1.1.5. Therapie von AK-Vitien.....	6
1.2. EZM-Moleküle	9
1.2.1. Zusammensetzung und Funktion der EZM	9
1.2.2. Proteoglykane.....	10
1.2.3. HA	10
1.3. Diabetes	12
1.3.1. Definition, Klassifikation und Prävalenz	12
1.3.2. Zelluläre Insulinwirkung	14
1.4. AK-Degeneration, EZM und Diabetes - die Zusammenhänge.....	16
1.4.1. Bedeutung der EZM bei der Degeneration von AK.....	16
1.4.2. Einfluss von Diabetes auf die Degeneration von AK.....	18
1.4.3. Auswirkungen von Diabetes auf Proteoglykane und Glykosaminoglykane	18
1.5. Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Chemikalien.....	21
2.2. Humanes AK-Gewebe	21
2.2.1. Gewebegewinnung und -lagerung.....	21
2.2.2. Klassifizierung humaner AK.....	21
2.2.3. Patientenauswahl	22
2.2.4. Patientenkohorten.....	23
2.2.5. Aufreinigung von BGN aus humanen AK-Taschen.....	24
2.3. <i>In-vitro</i> -Versuche mit primären ovinen VIC	26

2.3.1.	Isolation, Kultivierung und Lagerung oviner VIC	26
2.3.2.	Aussaat und Behandlung primärer VIC	27
2.3.3.	Herstellung von Zelllysaten	29
2.3.4.	Lichtmikroskopische Kontrollen und Aufnahmen	30
2.3.5.	Bestimmung der Zellzahl	30
2.3.6.	Glukosekonzentrationsbestimmung in Zellkulturüberständen	31
2.3.7.	Bestimmung der Glukoseaufnahme von behandelten VIC	31
2.3.8.	Quantifizierung von BGN in Zellkulturüberständen	32
2.3.9.	Quantifizierung sezernierter HA in Zellkulturüberständen	32
2.3.10.	Alizarinrot-Färbung	33
2.4.	<i>In-vivo</i> -Analysen im Tiermodell	33
2.4.1.	Tierversuchsgenehmigung	33
2.4.2.	<i>Bgn</i> -defiziente Mäuse	33
2.4.3.	Zucht, Haltung und Genotypisierung der Versuchstiere	34
2.4.4.	Streptozocin-induzierte Hyperglykämie	34
2.4.5.	Implantation und Verlaufskontrolle	36
2.4.6.	Probenentnahme und -lagerung	38
2.4.7.	Multiplexanalyse von murinem Blutplasma	39
2.5.	Aufreinigung und Analyse von RNA	40
2.5.1.	RNA-Aufreinigung	40
2.5.1.1.	RNA-Aufreinigung aus Gewebe	40
2.5.1.2.	RNA-Aufreinigung aus primären VIC	40
2.5.2.	Konzentrationsbestimmung und reverse Transkription	41
2.5.3.	Primerdesign und -sequenzen	41
2.5.4.	Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer PCR	43
2.6.	Proteinbiochemische und biochemische Methoden	44
2.6.1.	Proteinkonzentrationsbestimmung	44
2.6.1.1.	Proteinbestimmung nach Lowry	44
2.6.1.2.	Coomassie-basierte Proteinbestimmung nach BGN-Aufreinigung	45
2.6.2.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
2.6.3.	Western-Blot-Analyse	47
2.6.4.	Kalziumquantifizierung	49
2.7.	Statistische Auswertung	49
3.	Ergebnisse	51

3.1.	EZM-Umbau in humanen AK	51
3.1.1.	Klinische Parameter der untersuchten Patientenkohorte.....	51
3.1.2.	Einfluss des Degenerationsgrads auf die mRNA-Expression von EZM-Molekülen.....	55
3.1.2.1.	Untersuchung kompletter AK-Taschen	55
3.1.2.2.	Untersuchung verschiedener Degenerationsgrade innerhalb derselben AK-Tasche	59
3.1.3.	Einfluss von T2D auf die Expression von EZM-Molekülen.....	62
3.1.3.1.	Untersuchung kompletter AK-Taschen	62
3.1.3.2.	Expression des BGN-Kernproteins in humanen AK-Taschen.....	66
3.1.3.3.	Untersuchungen innerhalb derselben AK-Tasche mit Unterscheidung nach T2D	68
3.1.3.4.	Einteilung der Diabetiker entsprechend ihres HbA _{1c}	74
3.2.	Einfluss diabetischer und degenerativer Bedingungen auf ovine VIC.....	76
3.2.1.	Nachweis des Insulinsignalwegs in ovinen VIC	76
3.2.1.1.	Insulin-sensitive Rezeptoren	76
3.2.1.2.	Phosphorylierung von AKT und GSK-3.....	77
3.2.1.3.	Glukosetransporter	85
3.2.2.	Auswirkungen diabetischer Bedingungen auf den Glukosemetabolismus oviner VIC	87
3.2.2.1.	Glukoseverbrauch im Zellkulturüberstand.....	87
3.2.2.2.	Glukoseaufnahme oviner VIC	89
3.2.3.	Mitogene Effekte diabetischer und degenerativer Bedingungen auf ovine VIC	92
3.2.3.1.	Proliferation und osteogene Differenzierung.....	92
3.2.3.2.	Umbau der EZM	98
3.3.	Degeneration von AK-Prothesenmaterial in einem ektopen Degenerationsmodell in Mäusen.....	105
3.3.1.	Etablierung eines Hyperglykämie-Modells für die Degeneration von AK-Prothesenmaterial in <i>Bgn</i> ⁻⁰ -Mäusen.....	105
3.3.2.	RNA- und Proteingehalt der Prothesenstanzen	106
3.3.3.	Inflammation	108
3.3.3.1.	mRNA-Expression von Inflammationsmarkern	108
3.3.3.2.	Bestimmung zirkulierender Zytokine	110
3.3.4.	Degeneration und Kalzifizierung der Prothesenstanzen	112

3.3.4.1.	mRNA-Expression von Degenerationsmarkern und EZM-Komponenten	112
3.3.4.2.	Kalziumakkumulation in dem AK-Prothesenmaterial	114
4.	Diskussion	115
4.1.	<i>Ex-vivo</i> -Analysen zum EZM-Umbau in humanen AK	115
4.1.1.	Morphologische Einteilung des AK-Gewebes und Validierung durch chondro- osteogene Differenzierungsmarker	115
4.1.1.1.	Einteilung des AK-Gewebes nach morphologischem Degenerationsgrad	115
4.1.1.2.	Validierung der Degenerationsgrade kompletter AK-Taschen	116
4.1.1.3.	Validierung der Degenerationsgrade innerhalb derselben AK-Tasche	116
4.1.2.	Beurteilung der Patientenkohorte	117
4.1.3.	Expression von EZM-Molekülen in Abhängigkeit des Degenerationsgrads der AK	118
4.1.3.1.	Expression von Proteoglykanen	118
4.1.3.2.	Expression der HA-Synthase-Isoformen	119
4.1.4.	Änderungen in der Expression von EZM-Molekülen aufgrund einer T2D- Erkrankung	121
4.1.4.1.	Einfluss von T2D auf die Expression von Degenerationsmarkern	121
4.1.4.2.	Expression von Proteoglykanen	121
4.1.4.3.	Expression der HA-Synthase-Isoformen	122
4.1.5.	Limitierungen und Ausblick der <i>Ex-vivo</i> -Analysen an humanen AK	123
4.2.	Charakterisierung von VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen	126
4.2.1.	Nachweis der Insulinantwort oviner VIC	126
4.2.1.1.	Die Insulinsignalkaskade	126
4.2.1.2.	Insulinsensitivität von VIC	127
4.2.2.	Glukoseverbrauch von VIC unter diabetischen Bedingungen	128
4.2.3.	Proliferation und osteogene Differenzierung unter diabetischen und degenerativen Bedingungen	130
4.2.4.	Einfluss diabetischer und degenerativer Bedingungen auf den EZM-Umbau <i>in vitro</i>	131
4.2.5.	Limitierungen und Ausblick der <i>In-vitro</i> -Analysen mit ovinen, primären VIC	132
4.3.	Degeneration von AK-Prothesenmaterial in einem ektopen Degenerationsmodell in Mäusen	134

4.3.1.	Etablierung eines Hyperglykämie-Modells für die Degeneration von AK-Prothesenmaterial in <i>Bgn</i> ⁻⁰ -Mäusen.....	134
4.3.2.	RNA- und Proteingehalt der Prothesenstanzen.....	135
4.3.3.	Inflammatorische Prozesse.....	135
4.3.4.	Folgen der Hyperglykämie und <i>Bgn</i> -Defizienz auf die Integrität des Prothesenmaterials	137
4.3.5.	Limitierungen und Ausblick der <i>In-vivo</i> -Analysen zur Degeneration von AK-Prothesenmaterial in Mäusen	138
5.	Zusammenfassung.....	140
6.	Summary	141
7.	Literaturverzeichnis.....	142
	Veröffentlichungen und Projektförderungen	XI
	Originalarbeiten.....	XI
	Kongressbeiträge.....	XI
	Projektförderungen.....	XIII
	Eidesstattliche Versicherung	XIV
	Danksagung.....	XV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anatomie des Herzens und Lage der Herzklappen	2
Abbildung 2: Dreischichtiger Aufbau der AK-Tasche	3
Abbildung 3: Pathophysiologie der DAVD	6
Abbildung 4: Degenerierte AK-Prothese	8
Abbildung 5: Proteoglykane und HA in der EZM	12
Abbildung 6: Regulation der Blutglukosekonzentration.....	14
Abbildung 7: Die Insulinsignalkaskade	16
Abbildung 8: Klassifizierung von humanem AK-Gewebe nach dem Degenerationsgrad.....	22
Abbildung 9: Humane AK-Tasche mit fibrotischem und kalzifiziertem Anteil.....	24
Abbildung 10: Versuchsaufbau der <i>In-vitro</i> -Experimente mit primären ovinen VIC	29
Abbildung 11: Mausmodell für die Degeneration von AK-Prothesenmaterial unter Hyperglykämie	36
Abbildung 12: Subkutane Implantation von Prothesenstanzen in Mäusen.....	38
Abbildung 13: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern in humanen AK-Taschen	56
Abbildung 14: mRNA-Expression von Proteoglykanen in humanen AK-Taschen.....	57
Abbildung 15: mRNA-Expression von HA-Synthasen in humanen AK-Taschen	59
Abbildung 16: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern in fibrotischen und kalzifizierten Bereichen derselben AK-Tasche	60
Abbildung 17: mRNA-Expression von Proteoglykanen in fibrotischen und kalzifizierten Bereichen derselben AK-Tasche	61
Abbildung 18: mRNA-Expression von HA-Synthasen in fibrotischen und kalzifizierten Bereichen derselben AK-Tasche	62
Abbildung 19: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern mit Einteilung nach T2D.....	63
Abbildung 20: mRNA-Expression von Proteoglykanen mit Einteilung nach T2D.....	65
Abbildung 21: mRNA-Expression von HA-Synthasen mit Einteilung nach T2D.....	66
Abbildung 22: Western-Blot-Analysen zur BGN-Expression in humanen AK-Taschen.....	68
Abbildung 23: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern in verschieden stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche mit Unterscheidung nach T2D.....	70
Abbildung 24: mRNA-Expression von Proteoglykanen in verschieden stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche mit Unterscheidung nach T2D.....	72
Abbildung 25: mRNA-Expression von HA-Synthasen in verschieden stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche mit Unterscheidung nach T2D.....	73

Abbildung 26: mRNA-Expression in humanen AK-Taschen nach HbA _{1c} -Werten.....	75
Abbildung 27: mRNA-Expression Insulin-sensitiver Rezeptoren in ovinen VIC	77
Abbildung 28: Western-Blot-Ergebnisse zur Phosphorylierung von AKT nach AI-Stimulation	79
Abbildung 29: AKT-Phosphorylierung nach AI-Stimulation.....	80
Abbildung 30: Vergleich der AKT-Phosphorylierung unter NG- und HG-Bedingungen	81
Abbildung 31: Western-Blot-Ergebnisse zur Phosphorylierung von GSK-3 α / β	83
Abbildung 32: GSK-3 α -Phosphorylierung nach AI-Stimulation.....	84
Abbildung 33: GSK-3 β -Phosphorylierung nach AI-Stimulation.....	85
Abbildung 34: Expression von Glukosetransportern in ovinen VIC	87
Abbildung 35: Glukosekonzentration im Zellkulturüberstand während der Behandlung	89
Abbildung 36: Glukoseaufnahme oviner VIC unter diabetischen Bedingungen.....	91
Abbildung 37: Mikroskopaufnahmen von VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen.....	93
Abbildung 38: Zellzahl oviner VIC über sechs Tage Kultivierung	94
Abbildung 39: mRNA-Expression von Degenerations- und Differenzierungsmarkern	96
Abbildung 40: Alizarinrot-Färbung und Kalziumquantifizierung	98
Abbildung 41: mRNA-Expression von Proteoglykanen in ovinen VIC <i>in vitro</i>	99
Abbildung 42: Expression von BGN unter diabetischen und degenerativen Bedingungen ..	100
Abbildung 43: mRNA-Expression von HA-Synthasen in ovinen VIC <i>in vitro</i>	102
Abbildung 44: HA-Synthese in VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen ...	103
Abbildung 45: mRNA-Expression von Kollagenen in ovinen VIC <i>in vitro</i>	104
Abbildung 46: Blutglukosekonzentration zwei und zehn Wochen nach STZ-Injektion	106
Abbildung 47: RNA- und Proteingehalt der explantierten Prothesenstanzen.....	107
Abbildung 48: mRNA-Expression von Zytokinen.....	109
Abbildung 49: mRNA-Expression von <i>Tlr2</i> und <i>Tlr4</i>	110
Abbildung 50: Einfluss des operativen Eingriffs auf zirkulierende Zytokine.....	111
Abbildung 51: Einfluss der <i>Bgn</i> -Defizienz und Hyperglykämie auf zirkulierende Zytokine	112
Abbildung 52: mRNA-Expression von <i>Spp1</i> , <i>Tgf-β</i> und <i>Dcn</i>	113
Abbildung 53: Kalziumgehalt der explantierten Prothesenstanzen	114

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Primersequenzen für die Genotypisierung von <i>Bgn</i> ^{-/-} -Mäusen.....	34
Tabelle 2: Primersequenzen für die qPCR humaner Gene.....	42
Tabelle 3: Primersequenzen für die qPCR oviner Gene	42
Tabelle 4: Primersequenzen für die qPCR muriner Gene	43
Tabelle 5: Temperatur- und Zeitprofil der qPCR.....	44
Tabelle 6: Gelzusammensetzung der SDS-PAGE für Western-Blot-Analysen.....	46
Tabelle 7: Primärantikörper für Western-Blot-Analysen.....	48
Tabelle 8: Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen.....	48
Tabelle 9: Patientenkohorte für die Analyse kompletter AK-Taschen	52
Tabelle 10: Patientenkohorte für die Analyse kompletter AK-Taschen mit Unterteilung nach T2D.....	54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

18S	ribosomale Ribonukleinsäure 18S
ACTA2	α -Glattmuskelaktin (<i>alpha smooth muscle actin</i>)
AI	akuter Insulinstimulus
AK	Aortenklappe
AKT	Proteinkinase B
ALPL	alkalische Phosphatase (<i>alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>)
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
BGLAP	Osteocalcin (<i>bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein</i>)
BGN	Biglycan
<i>Bgn</i> ⁻⁰	Biglycan-defiziente Mäuse
BMP-2	knochenmorphogenes Proteine 2 (<i>bone morphogenetic protein 2</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
COL1A1	α -1-Typ-1-Kollagen (<i>collagen type 1 alpha 1</i>)
DAVD	degenerative Aortenklappenerkrankung (<i>degenerative aortic valve disease</i>)
DCN	Decorin
DEAE	Diethylaminoethyl
DEG	degenerative Bedingung (in den <i>In-vitro</i> -Experimenten)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EZM	extrazelluläre Matrix
GLUT-1/2/4	Glukosetransporter-1/2/4
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GSK-3 α/β	Glykogensynthase-Kinase 3 α/β
HA	Hyaluronsäure, Hyaluronan (<i>hyaluronic acid</i>)
HAS1-3	Hyaluronsäuresynthasen 1-3
HG	Hyperglykämie, hyperglykämische Bedingung (in den <i>In-vitro</i> -Experimenten)
HI	Hyperinsulinämie (in den <i>In-vitro</i> -Experimenten)
IGF1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (<i>insulin-like growth factor 1</i>)
IGF1R	Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsfaktors 1 (<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
IL-1 β /2/5/10	Interleukin-1 β /2/5/10
INF- γ	Interferon- γ
INSR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
Kat.-Nr.	Katalognummer
LUM	Lumican
MAC-2	Galectin-3

MCPI	Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (<i>monocyte chemotactic protein 1</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NCBI	Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NG	Normoglykämie, normoglykämische Bedingung (in den <i>In-vitro</i> -Experimenten)
ns	nicht signifikant
OP	Operation
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PDK	Phosphoinositid-abhängige Kinase (<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	semi-quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (<i>semi-quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RHAMM	Rezeptor für HA-vermittelte Motilität (<i>receptor for HA-mediated motility</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPL13a	ribosomales Protein L13a (<i>ribosomal protein L13a</i>)
RPL29	ribosomales Protein L29 (<i>ribosomal protein L29</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
<i>Slc2a1/2/4</i>	Genname des Glukosetransporter 1/2/4 (<i>solute carrier family 2 member 1/2/4</i>)
<i>SPP1</i>	Osteopontin (<i>secreted phosphoprotein 1</i>)
STZ	Streptozocin
T2D	Typ-2-Diabetes
TAVI	Transkatheter-Aortenklappenimplantation (<i>transcatheter aortic valve implantation</i>)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (<i>tris-buffered saline with Tween 20</i>)
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β (<i>TGF-β, transforming growth factor β</i>)
TLR2/4	Toll-ähnlicher Rezeptor 2/4 (<i>toll-like receptor 2/4</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ü. N.	über Nacht
VCAN	Versican
VIC	valvuläre Interstitialzelle (<i>valvular interstitial cell</i>)
WT	Wildtypmäuse
β -GP	β -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat

In Anlehnung an die Gennomenklatur der *Human Genome Organisation* wurden humane Gene groß und kursiv (z. B. *BGN*) und die entsprechenden Proteine groß und nicht kursiv (z. B. BGN) gekennzeichnet (1). Ovine und murine Gene sind ebenfalls kursiv aber nur der erste Buchstabe groß (z. B. *Bgn*) und die zugehörigen Proteine in groß und nicht kursiv (z. B. BGN) dargelegt (2).

1. EINLEITUNG

1.1. DAS HERZ UND SEINE KLAPPEN - DER MOTOR DES LEBENS

1.1.1. ENTWICKLUNG, LAGE UND FUNKTION DER HERZKLAPPEN

In der embryonalen Entwicklung des Menschen wird das Herz bereits in der dritten Woche aus dem Mesoderm angelegt und übernimmt zwischen dem 23. und 24. Tag mit peristaltischen Kontraktionen die Pumpfunktion des Blutes (3). In der fünften bis siebenten Woche beginnt die Valvulogenese, die Bildung der Herzklappen, durch Einfaltung des Endokards, wobei sich der klassisch dreischichtige Aufbau der Herzklappen erst in späten Gestationsphasen bzw. kurz nach der Geburt ausbildet (4). Diverse Untersuchungen weisen darauf hin, dass Signalwege der Valvulogenese auch bei der Pathogenese adulter Klappen aktiviert werden und die Degeneration des Gewebes vorantreiben (5).

Die Herzklappen sichern den unidirektionalen Fluss des Blutes durch das Herz und den Körper. Dabei stellen sie eine Art biologisches Rückschlagventil dar, in dem sie sich nach der Kontraktion des Herzens aufgrund der veränderten Druckverhältnisse schließen. Anhand der Position im Herzen und dem strukturellen Aufbau wird zwischen Segelklappen (Atrioventrikularklappen) und Taschenklappen (Semilunarklappen) unterschieden (6).

Die Segelklappen liegen zwischen den Atrien (Vorhöfen) und den Ventrikeln (Kammern) und werden in der linken Herzhälfte als Mitralklappe und in der rechten Herzhälfte als Trikuspidalklappe bezeichnet (Abbildung 1). Sie sind durch Sehnenfäden (*Chordae tendineae*) mit den Papillarmuskeln verbunden, die ein Zurückschlagen der Klappen in die Atrien und damit den Rückfluss des Blutes während der Systole verhindern (6).

Die Taschenklappen befinden sich zwischen den Ventrikeln und den vom Herz wegführenden Gefäßen, wobei sich in der linken Herzhälfte die Aortenklappe (AK) am Ursprung der Aorta und in der rechten Herzhälfte die Pulmonalklappe am Ursprung der Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*) befindet (Abbildung 1). Beide Klappen setzen sich aus drei halbmondförmigen Taschen (*Valvulae semilunares*) zusammen, die sich öffnen, wenn der Druck im Ventrikel den in der Aorta bzw. der Pulmonalarterie übersteigt. Am Ende der ventrikulären Systole fällt der Druck im Ventrikel rapide, wodurch der Druck in den abgehenden Gefäßen die Klappen schließt (6).

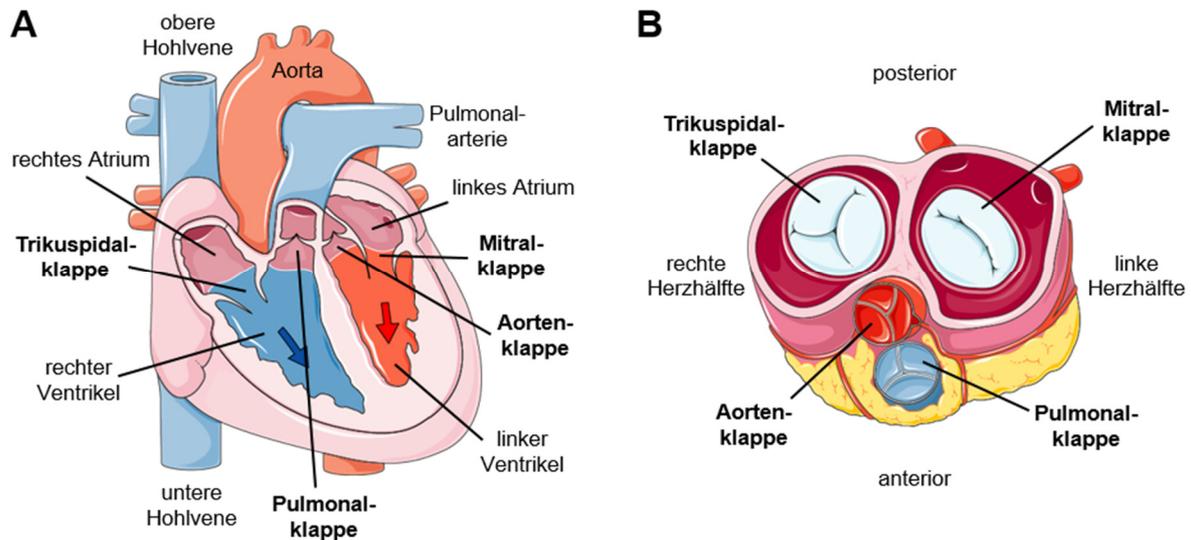


Abbildung 1: Anatomie des Herzens und Lage der Herzklappen

A: Längsschnitt des Herzens. Die Herzklappen sichern den unidirektionalen Fluss des Blutes während der Kontraktion des Herzens. In der linken Herzhälfte verhindern die Trikuspidal- und die Pulmonalklappe den Rückfluss des Blutes. In der rechten Herzhälfte wird der Blutstrom durch die Mitral- und die Aortenklappe vorgegeben (Abbildung erstellt mit (7), angelehnt an (6)). **B:** Querschnitt des Herzens in der Klappenebene. Die Herzklappen werden entsprechend ihrer Lage und Struktur in Segelklappen (Trikuspidal- und Mitralklappe) und Taschenklappen (Pulmonal- und Aortenklappen) eingeteilt (Abbildung erstellt mit (7), angelehnt an (6)).

1.1.2. DER DREISCHICHTIGE AUFBAU DER AK-TASCHEN

Im Laufe eines Lebens mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 80 Jahren öffnet und schließt sich die AK etwa 3 Milliarden Mal. Dabei muss sie aufgrund ihrer Position zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta hohen Drücken und enormen mechanischen Belastungen widerstehen. Mit jedem Herzschlag werden die Taschen der Klappe gedehnt und gebogen, während pulsatile und oszillierende Scherkräfte auf die Oberfläche der Klappe wirken (8). Diesen starken repetitiven Belastungen kann die Klappe aufgrund ihrer Struktur und funktionsspezifischen Zusammensetzung aus spezialisierten Zellen und extrazellulären Matrix (EZM)-Molekülen standhalten (Abbildung 2; (8)).

Die einzelnen Taschen einer gesunden AK sind hauchdünn und in der Regel nicht vaskularisiert, wobei die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung größtenteils durch Diffusion sichergestellt wird (9). Die Oberfläche der Klappe wird durch valvuläre Endothelzellen begrenzt, die mit den fibroblastoiden valvulären Interstitialzellen (VIC) im Inneren der Tasche interagieren und die Integrität des Klappengewebes aufrechterhalten (Abbildung 2; (8)). Beiden Zelltypen wird eine wesentliche Rolle bei der Degeneration der AK zugeschrieben, da sie an

der Steuerung inflammatorischer Prozesse und am Umbau des Gewebes beteiligt sind. Insbesondere bei den VIC kommt es aufgrund äußerer Stimuli zu phänotypischen Veränderungen, die für die normale Entwicklung und Homöostase der Klappe wichtig sind, aber auch zu pathologischen Veränderungen des Gewebes führen können (10).

Das Gewebe selbst besteht aus drei Schichten, die sich in der Zusammensetzung der EZM unterscheiden (Abbildung 2). Auf der aortalen Seite befindet sich die Fibrosa, die mit dicht gepackten Kollagenfasern die Struktur und Zugfestigkeit der Tasche sichert. Die mittlere Schicht wird als Spongiosa bezeichnet und besteht größtenteils aus Glykosaminoglykanen, welche entweder an Proteoglykane gebunden sind oder einzeln in Form von Hyaluronsäure (HA, *hyaluronic acid*) frei im extrazellulären Raum vorliegen. Diese Moleküle bilden eine lose Matrix, die große Mengen Wasser speichern kann und als eine Art Stoßdämpfer fungiert. Auf der ventrikulären Seite liegt die Ventricularis. Sie ist reich an Elastin und verleiht der Klappe während der Systole die notwendige Elastizität (11). Die Degeneration von AK ist mit dem Umbau der EZM und dem Zerfall der dreischichtigen Struktur verbunden, wodurch die Klappe letztendlich ihre Funktionalität verliert (12).

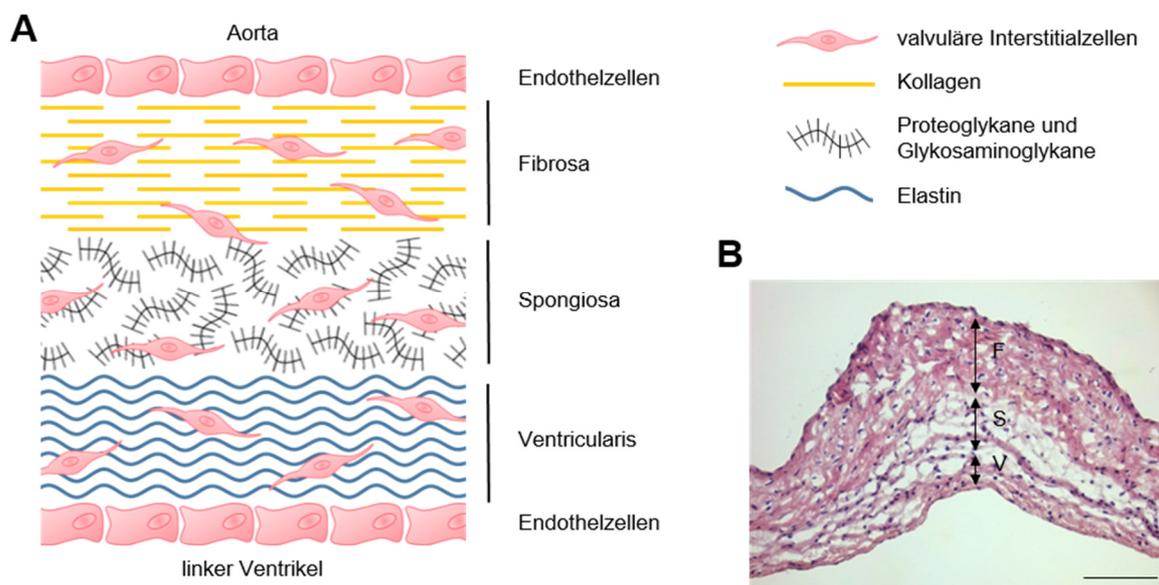


Abbildung 2: Dreischichtiger Aufbau der AK-Tasche

A: Schematische Darstellung des Aufbaus einer AK-Tasche. Die einzelnen Taschen einer AK sind dreischichtig aufgebaut, wobei sich die Schichten in der Zusammensetzung der EZM unterscheiden (angelehnt an (8)).

B: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer nativen ovinen AK-Tasche mit der Lamina Fibrosa (F), Spongiosa (S) und Ventricularis (V). Maßstab: 100 µm.

1.1.3. EPIDEMIOLOGIE VON HERZKLAPPENVITIIEN

Herzklappenvitien umfassen alle angeborenen oder erworbenen Fehlfunktionen der Herzklappen, wobei die zugrundeliegenden Pathologien vielseitigster Natur sind. Während bei angeborenen Herzklappenfehlern die Auslöser oft genetisch bedingt sind, reichen die Ursachen für erworbene Herzklappenvitien von akuten Infektionen über Folgeschäden durch kardiale Grunderkrankungen bis hin zu degenerativen Veränderungen der Klappen.

Anhand der an den Klappen vorherrschenden hämodynamischen Bedingungen werden zwei Arten von Funktionsstörungen unterschieden: die Klappeninsuffizienz und die Klappenstenose. Bei einer Klappeninsuffizienz schließt die Klappe nicht vollständig, wodurch der Rückfluss des Blutes nur unzureichend verhindert wird. Die Klappenstenose zeichnet sich wiederum durch eine Verengung der Klappenöffnung aus, die zu einer verminderten Ejektionsfraktion und einem Rückstau des Blutes vor der Klappe führt (6).

Obwohl alle vier Klappen des Herzens von Vitien betroffen sein können, neigen vor allem die Klappen der linken Herzhälfte aufgrund der vorherrschenden Strömungsverhältnisse und der hohen Druckbelastungen zu Fehlfunktionen. Dabei stellt die degenerative Aortenklappenerkrankung (DAVD, *degenerative aortic valve disease*) das häufigste Klappenvitium in westlichen Ländern dar (13). Unter den über 65-Jährigen leiden zwischen 2 % und 7 % an einer DAVD mit pathologisch eingeschränkter Klappenfunktion (13, 14). Frühe Stadien der Erkrankung haben in der Altersklasse sogar eine Prävalenz von bis zu 30 % (14-16).

1.1.4. PATHOPHYSIOLOGIE DER DAVD

Die DAVD ist eine progressive Erkrankung der AK. Makroskopisch wird sie zunächst durch fibrotische Verdickungen der Klappentaschen sichtbar, die sich im weiteren Verlauf durch Kalziumeinlagerungen in dem Gewebe verstärken und zur Immobilisierung der Klappe führen (17). Letztendlich haben diese morphologischen Veränderungen eine Insuffizienz der AK mit Regurgitation oder eine schwere Stenose zur Folge, welche nur durch einen chirurgischen Klappenersatz therapiert werden kann. Die Erkrankung beginnt jedoch deutlich früher mit zellbiologischen Veränderungen in den Taschen (10, 18). Lange wurde angenommen, dass die DAVD eine rein passive Erkrankung aufgrund von Abnutzungserscheinungen und Alterungsprozessen ist, jedoch legen experimentelle und klinische Studien einen aktiven Verlauf der Krankheit nahe (19, 20).

Neben nicht zu beeinflussenden Risikofaktoren wie Alter, männliches Geschlecht, Anatomie der Klappe oder genetische Disposition wirken sich vor allem klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren auf die Integrität der AK aus (21). Dazu gehören zu wenig physische Bewegung oder Rauchen, aber auch die Charakteristika des metabolischen Syndroms: arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Adipositas und gestörte Blutglukoseregulation (21, 22). Die DAVD stellt damit eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung dar (21, 22).

Außerdem weist die DAVD pathophysiologisch viele Gemeinsamkeiten zur Atherosklerose auf (23, 24). So kommt es bei beiden Erkrankungen zu Lipideinlagerungen, Inflammation und der Degradation der EZM (25) und damit zu zellulären Mechanismen, die auch auf eine gemeinsame Therapieoption hoffen lassen. Auf der anderen Seite unterscheiden sich die beiden Krankheiten hinsichtlich der beteiligten Zellen und der Stärke der Kalzifizierung. Biominalisierungen beispielsweise treten in AK deutlich früher und mit stärkerer Ausprägung auf als bei der Atherosklerose, was wiederum auf Unterschiede in den zugrundeliegenden Prozessen hinweist (25, 26).

Eine vereinfachte Darstellung der Pathophysiologie der DAVD ist in Abbildung 3 wiedergegeben. In frühen Phasen der Erkrankung kommt es zunächst durch mechanischen Stress zu Endothelschäden auf der aortalen Seite der AK, die das Eindringen von Lipiden in das Klappeninnere ermöglichen (27). Durch oxidative Modifizierungen der Lipidproteine und die Ausschüttung von Entzündungsmolekülen wird die Invasion von Makrophagen und T-Lymphozyten begünstigt (28). Zusammen mit autokrinen Signalen führt das Eindringen der Immunzellen zu einer Aktivierung der VIC (29). Dabei differenzieren die Zellen von einem ruhenden zu einem aktivierten oder osteoblastischen Phänotyp und sind mit der Expression bestimmter chondro-osteogener Degenerationsmarker, wie alkalische Phosphatase (*ALPL*, *alkaline phosphatase, liver/bone/kidney*), Osteopontin (*SPP1*, *secreted phosphoprotein 1*) oder Osteocalcin (*BGLAP*, *bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein*), direkt an der pathobiologischen Antwort beteiligt (10, 30).

In der Ausbreitungsphase verstärkt sich die Fibrose mit dem Umbau der EZM durch die VIC (31). Die Umstrukturierung der Klappenarchitektur fördert die Einlagerung von Kalziumkristallen, die wiederum zu mechanischem Stress, einer erhöhten Invasion von Immunzellen und zur Ausschüttung von Zytokinen führt. Diese wirken auf die VIC und regen sie abermals zum proliferieren und differenzieren an (27). Es startet ein sich selbst fortsetzender Zyklus aus Verkalkung, Entzündung und VIC-Aktivierung, der die Degeneration der Klappentaschen vorantreibt (31).

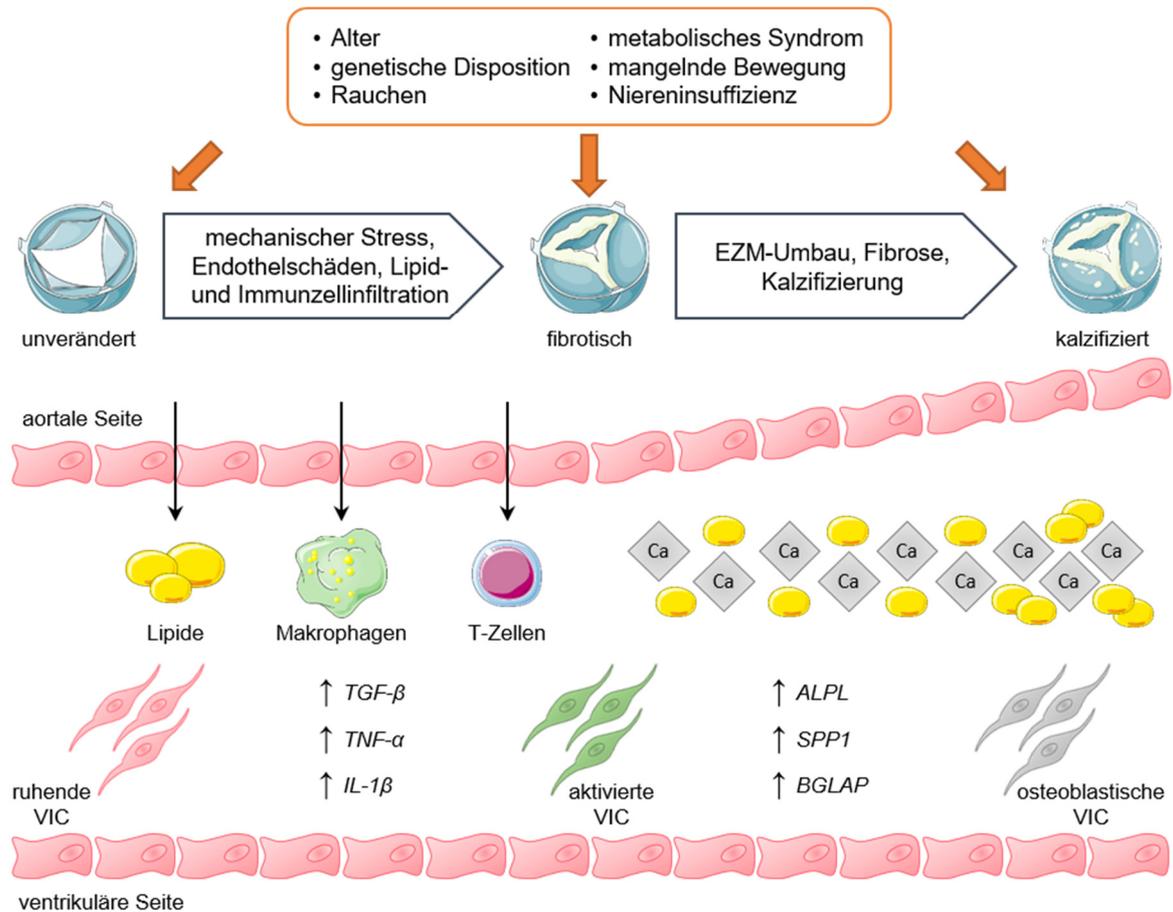


Abbildung 3: Pathophysiologie der DAVD

Die DAVD ist eine aktive Erkrankung der AK. Durch mechanischen Stress und Endothelschäden kommt es zur Akkumulation von Lipiden und zur Einwanderung von Inflammationszellen in das Interstitium der Tasche. Die Sekretion von Entzündungsmarkern führt zur Proliferation und Differenzierung der VIC, die durch den Umbau der EZM die Fibrose und Kalzifizierung der AK vorantreiben (erstellt mit (7), angelehnt an (17, 27, 29)).

1.1.5. THERAPIE VON AK-VITIEN

Der aus den degenerativen Veränderungen resultierende Funktionsverlust der AK während der DAVD hat unmittelbare Auswirkungen auf das Herz. Durch die Verengung der Öffnungsfläche muss das Herz einem immer höheren Druck entgegenwirken. Anfangs kann die benötigte Kraft zur Aufrechterhaltung des Blutflusses durch konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels aufgebracht werden, in späten Phasen verdünnt sich jedoch die Ventrikelwand aufgrund der hohen Belastung und die systolische Funktion des Herzens verschlechtert sich (32).

Bei Patienten mit einer leichten AK-Stenose, die keine oder nur milde klinische Symptome aufzeigen, erfolgt zunächst eine konservative, nicht-invasive Behandlung mit engmaschiger medizinischer Kontrolle. Mit Fortschreiten der Krankheit setzen jedoch erhebliche klinische Symptome ein. Die Patienten leiden an belastungsabhängigen Synkopen, Dyspnoe und Angina

pectoris aufgrund der Hypertrophie des Herzens und der reduzierten Sauerstoffversorgung des Gewebes (32). Ohne operative Therapie verschlechtert sich die Prognose für diese Patienten massiv mit einer 10-jährigen Überlebensrate von nur 10 % (33, 34).

Ein operativer Ersatz der AK sollte laut Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie und der Europäischen Gesellschaft für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie immer nach echokardiografischer Untersuchung abgewogen werden (35). Eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion < 50 %, ein mittlerer Druckgradient > 40 mmHg und eine Klappenöffnungsfläche < 1 cm² stellen dabei Indikatoren für eine hochgradige AK-Stenose dar, die eine operative Intervention notwendig machen (35, 36). Darüber hinaus wird die Stärke der Symptomausprägung zur Beurteilung der Behandlungsoptionen herangezogen (35).

Beim konventionellen, operativen Klappenersatz wird die degenerierte AK entfernt und durch eine Endoprothese ersetzt. Dabei stehen zwei Formen an Klappenprothesen mit individuellen Vor- und Nachteilen zur Verfügung: mechanische und biologische AK-Prothesen (35, 36).

Mechanische AK-Prothesen sind aus widerstandsfähigen Materialien wie Titan oder Carbon gefertigt und überzeugen durch ihre lange Haltbarkeit von mehreren Jahrzehnten (37, 38). Die Re-Operationsrate nach mechanischem Klappenersatz liegt nach 15 Jahren bei unter 10 % (39). Das Einbringen des metallischen Fremdkörpers führt jedoch zu einer Gerinnungsaktivierung mit vermehrtem Auftreten von Thrombosen und Embolien und bedingt eine lebenslange Antikoagulation. Die blutverdünnenden Medikamente sind mit weiteren Einschränkungen und Risiken für den Patienten verbunden, sodass der Einsatz einer mechanischen Prothese genau abgewogen werden muss (40). Außerdem beschreiben viele Patienten das markante „Klicken“ beim Schließen der mechanischen Klappe als störend (41).

Eine gute Alternative zu mechanischen AK-Prothesen stellen biologische Klappen dar. Sie bestehen aus humanem oder tierischem Gewebe und benötigen nach der Implantation keine antikoagulierende Medikation. Es werden verschiedene Subtypen unterschieden, wobei Xenografts aus nativen Schweineklappen oder Kunstklappen, bei denen die Klappenanatomie aus Rinderperikard nachgebildet wird, weit verbreitet sind (42). Das Proteingerüst des Gewebes wird dabei durch chemische Fixierung haltbar gemacht (43). Zudem wirkt die Fixierung einer Abstoßung des Materials vom Empfänger entgegen (44). Dennoch unterliegen biologische AK-Prothesen degenerativen Prozessen, die denen in der nativen AK ähneln (Abbildung 4). Darin begründet liegt auch die geringere Haltbarkeit dieses Prothesentyps. Die Re-Operationsrate liegt nach zehn Jahren zwar noch unter 10 %, steigt jedoch nach 15 Jahren

auf über 30 % (39). Neben den Xenograft-Prothesen finden auch Homo- und Autografts aus humanem Gewebe Anwendung in der Klinik. Sie sind jedoch nur limitiert verfügbar (42).

Zumeist wird entsprechend dem Alter des Patienten eine der beiden Prothesenformen bevorzugt. Jüngere Patienten erhalten aufgrund der längeren Haltbarkeit meist mechanische Prothesen, während ältere Patienten bevorzugt biologische Prothesen bekommen. Dennoch spielen individuelle Faktoren wie besondere körperliche Belastungen, Ko-Morbiditäten oder auch Kinderwunsch bei Frauen eine entscheidende Rolle bei der Prothesenwahl.

Zusätzlich zu dem konventionellen, offenen Klappenersatz etablierte sich in den letzten Jahren auch eine minimal-invasive Implantationsmethode, bei der die AK-Prothese mit Hilfe eines Katheters in das Herz eingebracht wird (45, 46). Die sogenannte Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI) stellt vor allem für Hochrisikopatienten, bei denen das konventionelle Verfahren kontraindiziert ist, eine Alternative dar (35, 47). Bisher fehlen jedoch noch Langzeitstudien, die einen direkten Vergleich zur konventionellen Methode ermöglichen (48).

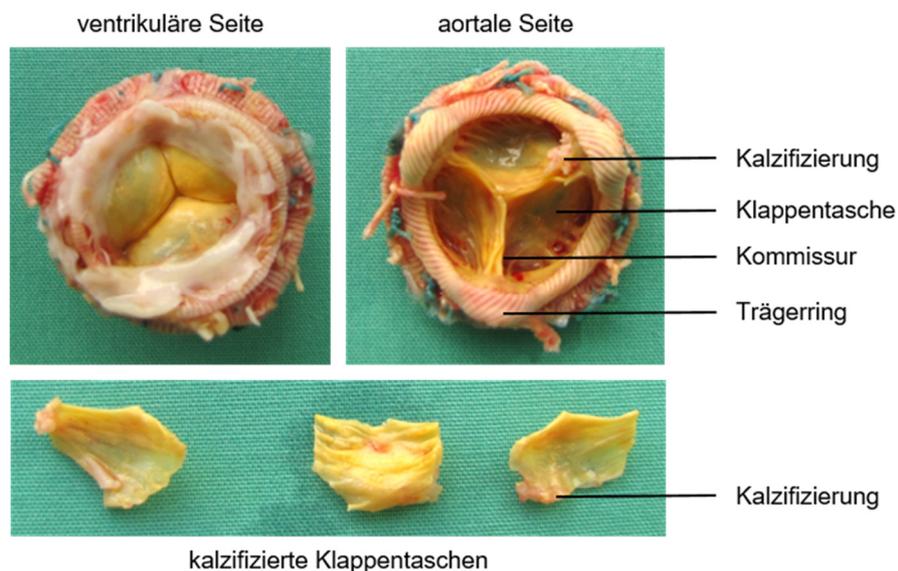


Abbildung 4: Degenerierte AK-Prothese

Degenerierte biologische AK-Prothese mit versteiften Klappentaschen und Kalzifizierungen an den Kommissuren und am Trägerring.

1.2. EZM-MOLEKÜLE

1.2.1. ZUSAMMENSETZUNG UND FUNKTION DER EZM

Die EZM bildet den Anteil eines Gewebes, der im Interzellularraum, also zwischen den Zellen, liegt. Sie wird zum größten Teil von den umgebenden Zellen gebildet, wobei Zusammensetzung und Funktion der EZM von dem Zelltyp und der Art des Gewebes abhängen (49). EZM-reiche Gewebe übernehmen vielseitige Aufgaben in den einzelnen Organen. So hat das Bindegewebe beispielsweise eine wichtige Stützfunktion, dient als Wasserspeicher oder ist an der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt. Spezialisierte Fibroblasten wie Osteoblasten und Chondrozyten sezernieren EZM-Moleküle, die die Grundlage für Knochen und Knorpel bilden (50). Die glatten Muskelzellen der großen Gefäße exprimieren wiederum eine Matrix, die den Gefäßen Zug- und Reißfestigkeit verleiht (51).

Insgesamt stellt die EZM eine komplexe Ansammlung verschiedenster Makromoleküle dar, die sich in faserige Bestandteile und amorphe Grundsubstanz unterteilen lassen. Zu den faserigen Bestandteilen zählen verschiedene Kollagentypen sowie die elastischen Fasern aus Elastin und Fibrillin (52). Als Grundsubstanz werden die Glykosaminoglykane und die mit ihnen assoziierten Proteine verstanden (52). Glykosaminoglykane sind langkettige Polysaccharide und bis auf HA an Proteine gebunden, mit denen sie die Proteoglykane bilden. Darüber hinaus enthält die EZM verschiedene Adhäsionsproteine wie die nicht-kollagenen Glykoproteine Integrine, Laminine und Fibronectin, die zwischen den Matrixbestandteilen und den Rezeptoren auf den Zelloberflächen interagieren und so die Kommunikation zwischen der EZM und den Zellen gewährleisten (52).

Die Zusammensetzung der EZM ist nicht nur für die Festigkeit und Elastizität der Gewebe von besonderer Bedeutung, sondern beeinflusst auch diverse zelluläre Prozesse wie Zellkontraktion, -migration und -proliferation bis hin zur Differenzierung der Zellen. Alle Komponenten der EZM unterliegen einem ständigen Auf-, Um- und Abbau, der vor allem durch die Zellen gesteuert wird. Während der Umsatz von faserigen Bestandteilen recht lange dauert, werden Proteoglykane innerhalb weniger Tage bis Wochen umgebaut. Diverse Krankheiten wie Atherosklerose, Myokardinfarkt oder auch DAVD sind mit dem Umbau der EZM assoziiert (53), wobei oft nicht eindeutig ist, ob dies die Ursache oder die Folge der Erkrankung darstellt. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Rolle von Proteoglykanen und HA in der degenerativen AK-Erkrankung untersucht mit besonderem Augenmerk auf Diabetes als Risikofaktor.

1.2.2. PROTEOGLYKANE

Proteoglykane setzen sich aus einem Kernprotein, an das kovalent ein oder mehrere Glykosaminoglykane gebunden sind, zusammen (54). Das Kernprotein oder auch Proteinzentralfilament wird zunächst durch Ribosomen synthetisiert und in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums transloziert. Anschließend erfolgt die Glykosylierung im Golgi-Apparat, bei der die repetitiven Disaccharideinheiten der Glykosaminoglykane über eine Tetrasaccharidsequenz an einen Serinrest des Kernproteins geknüpft werden (55). Letztlich werden die Proteoglykane über sekretorische Vesikel in den Interzellularraum transportiert, wo sie entweder allein oder als riesige Proteoglykan-Aggregate zusammen mit HA oder anderen EZM-Molekülen vorliegen (Abbildung 5; (56)).

Die individuellen Funktionen der einzelnen Proteoglykane in einem Gewebe sind ähnlich divers wie die Proteinfamilie selbst (57). Durch die hohe Anzahl an negativ geladenen Sulfatresten in den Glykosaminoglykanketten sind Proteoglykane beispielsweise an der Bindung von Wasser beteiligt und geben dem Gewebe so Stabilität und Form. Zudem werden aber auch Prozesse der Immunabwehr und Wundheilung, die Koagulation des Bluts oder die Bewegung von Molekülen durch den Interzellularraum von Proteoglykanen gesteuert.

Unterteilt werden Proteoglykane unter anderem nach der Größe ihres Proteinzentralfilaments in kleine und große Proteoglykane (58). Dabei zählen die leucinreichen Proteoglykane Biglycan (BGN), Decorin (DCN) und Lumican (LUM) zu den kleinen Proteoglykanen, während Versican (VCAN) und Aggrecan den großen Proteoglykanen zugeordnet sind (58). Außerdem werden Proteoglykane entsprechend des Aufbaus ihrer Glykosaminoglykanketten eingeteilt. Anhand der Zusammensetzung der Disaccharideinheiten wird zwischen Chondroitinsulfat-, Dermatansulfat-, Heparansulfat- und Keratansulfat-Glykosaminoglykanen unterschieden, wobei ein Proteoglykan auch verschiedene Typen an Glykosaminoglykanen binden kann (55, 59).

1.2.3. HA

Unter den Glykosaminoglykanen stellt die HA eine Besonderheit dar. Zum einen liegt sie frei als lineares, nicht-sulfatiertes Polysaccharid in der EZM vor, ohne an ein Proteinzentralfilament gebunden zu sein. Zum anderen wird die HA nicht wie die anderen Glykosaminoglykane im Inneren der Zelle synthetisiert sondern über membranständige HA-Synthasen, die das Molekül direkt in den interzellularen Raum extrudieren (60). Säugetiere besitzen drei

HA-Synthase-Isoformen, HAS1, HAS2 und HAS3, die die Monosaccharide D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin über β -1,3- und β -1,4-glycosidische Bindungen alternierend miteinander verknüpfen und die HA aus bis zu 20000 Disaccharid-Einheiten zusammensetzen (Abbildung 5, (60, 61)). So kann HA in Abhängigkeit von der Synthase-Isoform eine atomare Masse zwischen 1×10^5 und 2×10^6 Da erreichen (61, 62).

In den Geweben und Körperflüssigkeiten von Wirbeltieren liegt HA in großen Mengen vor und übernimmt aufgrund ihrer besonderen chemischen Eigenschaften vielseitige Aufgaben (63). Vor allem der hydrophile Charakter von HA, der ihr ermöglicht hohe Mengen Wasser zu speichern, ist Grundlage ihrer Strukturfunktion (64). Damit verleiht sie vielen Geweben nicht nur Druckbeständigkeit (z. B. der Bandscheibe) oder dient als Schmiermittel (z. B. in der Gelenkflüssigkeit), sondern schafft auch Raum für Zellmigration und -proliferation. Darüber hinaus hat HA Einfluss auf pathophysiologische Prozesse, indem sie mit anderen EZM-Molekülen interagiert und diese durch den Interzellularraum leitet. Durch die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren, wie beispielsweise CD44 (*cluster of differentiation 44*), Rezeptor für HA-vermittelte Motilität (RHAMM, *receptor for HA-mediated motility*) und Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR, *toll-like receptors*), kann sie zudem intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die im Zusammenhang mit Inflammation, Wundheilung oder auch Tumorentstehung und -progression stehen (65). Umkehrt wird aber auch die Expression der HA-Synthasen und damit die Synthese von HA durch verschiedene Signalmoleküle beeinflusst. So induzieren die Zytokine Interleukin- 1β (IL- 1β), Interferon- γ (INF- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β , *transforming growth factor β*) nach Verletzungen oder in Folge von Entzündungen die Ausschüttung von HA (66).

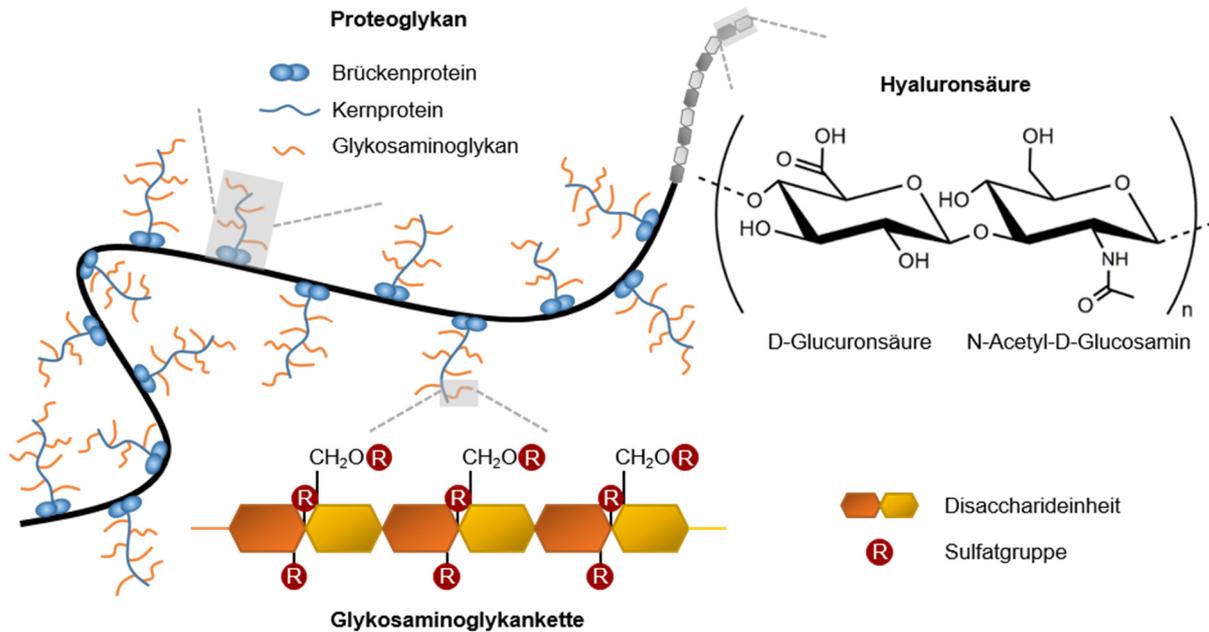


Abbildung 5: Proteoglykane und HA in der EZM

Proteoglykane setzen sich aus einem Kernprotein mit ein oder mehreren kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen zusammen. Gemeinsam mit HA, einem langkettigen, linearen Polysaccharid aus alternierenden Monomeren D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin, bilden sie riesige Proteoglykan-Aggregate mit vielseitigen Funktionen in der EZM (angelehnt an (56)).

1.3. DIABETES

1.3.1. DEFINITION, KLASSIFIKATION UND PRÄVALENZ

Diabetes mellitus, kurz Diabetes, bezeichnet eine heterogene Gruppe an chronischen Stoffwechselstörungen, denen allen eine erhöhte Blutglukosekonzentration gemeinsam ist (67, 68). Eine zentrale Rolle in der Pathologie des Diabetes spielt das Hormon Insulin, das in den Betazellen des Pankreas produziert wird und den Glukosestoffwechsel des Körpers reguliert (Abbildung 6). Durch Nahrungsaufnahme, insbesondere von kohlenhydratreicher Kost, steigt der Blutglukosespiegel an und das Pankreas schüttet vermehrt Insulin aus. Infolgedessen nehmen die Zellen des Zielgewebes die Glukose aus dem Blut auf und setzen sie in Energie um. Eine unzureichende Insulinsekretion des Pankreas oder Störungen in der Insulinantwort des Zielgewebes bzw. die Kombination von beidem führen zu einer Hyperglykämie (67, 68).

Beim Diabetes manifestiert sich die Hyperglykämie und gilt als entscheidendes Diagnosekriterium. Gelegenheits-Blutglukosewerte ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) oder Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l) gelten als deutliche Anzeichen für Diabetes (67-69). Darüber hinaus wird der HbA_{1c} für die Diabetesdiagnose

herangezogen. Er gibt den Anteil an glykiertem Hämoglobin zum Gesamthämoglobin wieder, wobei die Glykierungsstärke des Hämoglobins abhängig von der Höhe der mittleren Blutglukosekonzentration und dem durchschnittlichen Alter der Erythrozyten ist (70). Daher lässt der HbA_{1c} im Gegensatz zum Blutglukosewert Rückschlüsse über den Blutglukosespiegel der letzten vier bis zwölf Wochen zu und gilt als Langzeitblutglukosewert. Nach der Deutschen Diabetes Gesellschaft ist ein HbA_{1c} $\geq 6,5$ % hinreichend für die Diagnose Diabetes (67).

Eine über längere Zeit unzureichende Behandlung der Hyperglykämie verursacht starke gesundheitliche Beeinträchtigungen und Schäden an inneren Organen. Vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen stellen dabei eine gefährliche Begleiterscheinung von Diabetes dar. Entsprechend der Ursachen und des Pathomechanismus, der zur Entwicklung einer Hyperglykämie führt, wird Diabetes in verschiedene Formen unterteilt. Dabei wird neben Gestationsdiabetes und selteneren Subtypen, die auf genetische Defekte, Medikamente oder Endokrinopathien zurückzuführen sind, vor allem zwischen Typ-1- und Typ-2-Diabetes (T2D) unterschieden (68).

Beim Typ-1-Diabetes handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der das körpereigene Immunsystem eine Entzündungsreaktion im Pankreas hervorruft und die insulinproduzierenden Betazellen zerstört (71). Der Untergang der Betazellen führt zu einem Insulinmangel, der lebenslang durch die Gabe von Insulin ausgeglichen werden muss (72). Als Auslöser werden sowohl genetische als auch Umweltfaktoren diskutiert (71).

Im Gegensatz dazu ist beim T2D, der am weitesten verbreiteten Diabetesform, die Wirkung des Insulins an den Zielzellen gestört. Dieser als Insulinresistenz beschriebene Zustand der Zellen führt in frühen Stadien der Erkrankung zu einer kompensatorisch erhöhten Insulinsekretion der Betazellen, die sich in einer Hyperinsulinämie widerspiegelt. Die Blutglukosekonzentration ist beim sogenannten Prädiabetes zunächst nur leicht erhöht und die betroffenen Patienten meist beschwerdefrei. Dennoch weisen klinische Studien daraufhin, dass bereits in diesem Stadium des T2D das Risiko für vaskuläre Erkrankungen erhöht ist (73, 74). Im weiteren Verlauf der Krankheit können die Betazellen den Mehrbedarf an Insulin nicht decken und gehen durch Entzündungsprozesse unter. In diesem Stadium manifestiert sich der T2D mit erhöhten Blutglukosekonzentrationen und körperlichen Beschwerden, wodurch eine Therapie mit exogenem Insulin oft unabdingbar wird. Die Hauptursache für T2D ist Übergewicht, wobei genetische Veranlagungen oder umweltbedingte Faktoren die negativen Auswirkungen der Fettleibigkeit zusätzlich verschärfen. Durch körperliche Aktivität kann hingegen der Entwicklung und Progression von T2D entgegengewirkt werden.

Die Prävalenz von Diabetes, insbesondere von T2D, ist seit Jahrzehnten steigend, was vor allem auf Änderungen in den Ernährungsgewohnheiten und auf einen immer bewegungsärmeren Lebensstil zurückzuführen ist (75, 76). Im Jahr 2017 waren weltweit 425 Millionen Menschen zwischen 20 und 79 Jahren an Diabetes erkrankt (77). Dies entspricht jedem elften Erwachsenen. Eine erschreckend hohe Zahl, die noch weiter zunimmt. Bis 2045 wird mit einem weiteren Anstieg um 48 % auf 629 Millionen gerechnet (77), wobei die Herausforderungen für die weltweiten Gesundheitssysteme enorm sind. Allein in Deutschland entstehen durch Diabetes und seine Folgekrankheiten Kosten von rund 35 Milliarden Euro pro Jahr, wovon etwa 80 % nicht durch die Diabetestherapie selbst, sondern durch Begleiterkrankungen aufgrund einer unzureichenden Diabeteseinstellung hervorgerufen werden (78).

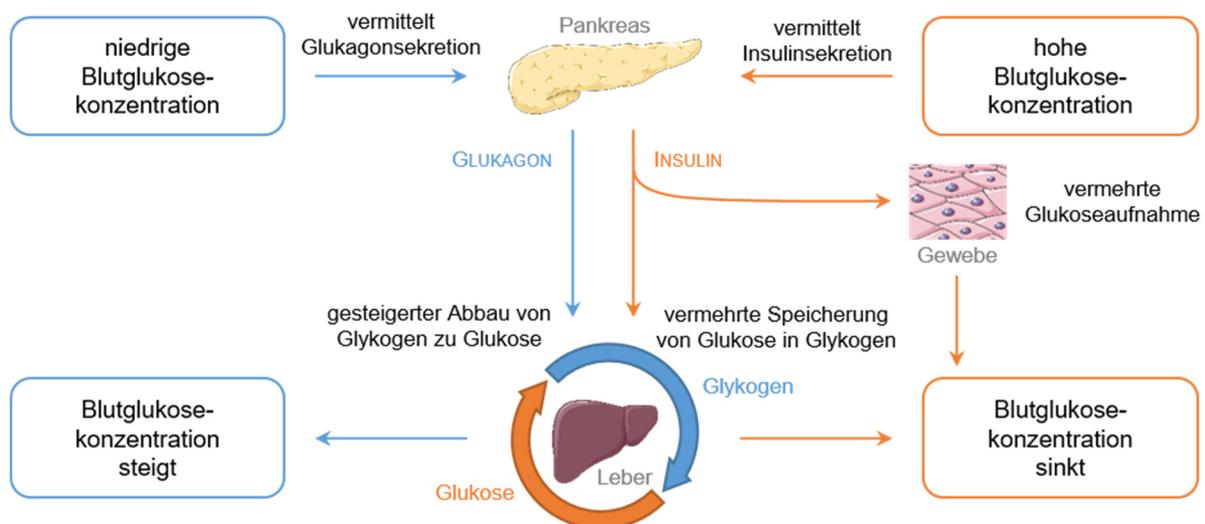


Abbildung 6: Regulation der Blutglukosekonzentration

Die Regulation der Blutglukosekonzentration ist ein fein abgestimmter Mechanismus, der im Wesentlichen von den beiden Peptidhormonen Insulin und Glukagon reguliert wird. Beim Diabetes ist die Insulinsekretion oder die Wirkung des Hormons im Zielgewebe bzw. beides gestört, wodurch die Blutglukosekonzentration dauerhaft erhöht bleibt (erstellt mit (7), angelehnt an (77)).

1.3.2. ZELLULÄRE INSULINWIRKUNG

In Insulin-sensitivem Gewebe führt die postprandiale Sekretion von Insulin zu verschiedenen intrazellulären Phosphorylierungskaskaden, die sich sowohl auf metabolische als auch auf mitogene Prozesse der Zielzellen auswirken (Abbildung 7). Damit beeinflusst Insulin nicht nur die Glukoseaufnahme der Zellen, sondern ist auch an Prozessen wie Zellteilung, -wachstum und -differenzierung beteiligt. Fehlregulationen dieser Mechanismen aufgrund einer

unzureichenden oder überstimulierten Insulinantwort können zu pathologischen Veränderungen im Zielgewebe führen und Ursache für Folgeerkrankungen des T2D sein.

Insulin selbst ist ein Proteohormon, das zunächst als Präproinsulin in den Betazellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas synthetisiert wird. Die Prozessierung zum funktionsfähigen Insulin erfolgt durch Faltung des Proteins und Abspaltung des Signal- und C-Peptids. Das reife Insulin wird intrazellulär in sekretorischen Vesikeln gespeichert und nach externer Stimulation durch Exozytose in die Blutbahn abgegeben.

Bei den Zielzellen angekommen bindet Insulin an den Insulinrezeptor (INSR), der aus zwei extrazellulären, Insulin-bindenden α -Untereinheiten und zwei über Disulfidbrücken verbundenen, membranüberspannenden β -Untereinheiten besteht. Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheiten bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die mit einer Aktivierung der Tyrosinkinase-Domänen der β -Untereinheiten einhergeht. Dies führt zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der β -Untereinheiten und damit zu einer weiteren Verstärkung der Kinaseaktivität.

Anschließend wird das Insulinsignal über den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -Signalweg weitergegeben. Dabei bindet zunächst das Insulinrezeptorsubstrat (IRS) an den INSR und wird durch dessen Tyrosinkinasen aktiviert. Im Weiteren erfolgt die Signaltransduktion durch Übertragung von Phosphatgruppen auf PI3K sowie auf die Phosphoinositid-abhängige Kinase (PDK, *Phosphoinositide-dependent kinase*) und die Proteinkinase B (AKT). Insbesondere die Serin/Threonin-Protein-Kinase AKT bildet dabei einen Angelpunkt zu verschiedenen weiteren Signalwegen (79). Durch die Phosphorylierung von AKT an den Aminosäuren Serin (Ser473) und Threonin (Thr308) werden weitere Substrate aktiviert oder inhibiert, die diverse zelluläre Mechanismen steuern. AKT-Phosphorylierung führt unter anderem zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme der Zellen durch Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT-4) an die Zellmembran. Darüber hinaus wird durch AKT die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) phosphoryliert und inhibiert, wodurch die Glykogensynthese in den Zielzellen stimuliert wird. Neben diesen metabolischen Effekten beeinflusst AKT aber auch mitogene Prozesse durch Aktivierung weiterer Signalwege, die sich auf den Zellzyklus, die Apoptose und die Proliferation der Zellen auswirken können (Abbildung 7, (79)).

Terminiert wird das Insulinsignal primär durch Endozytose des INSR. Das gebundene Insulin wird dabei abgebaut, während der INSR für eine erneute Nutzung zurück an die Zellmembran transportiert wird (80). Außerdem sorgen Protein-Tyrosin-Phosphatasen für eine schnelle Dephosphorylierung der Signalmoleküle (81).

Beim T2D ist die Signaltransduktion des Insulins gestört, wodurch die Zellen eine Insulinresistenz entwickeln (82). Die Ursachen für eine inadäquate Signalübertragung können dabei direkt bei den Substraten der Signalkaskade liegen oder über die Wirkung weiterer Moleküle hervorgerufen werden. Es existieren diverse positive und negative Feedbackmechanismen, die die Insulinwirkung beeinflussen und damit einen Teil der Pathologie darstellen (83).

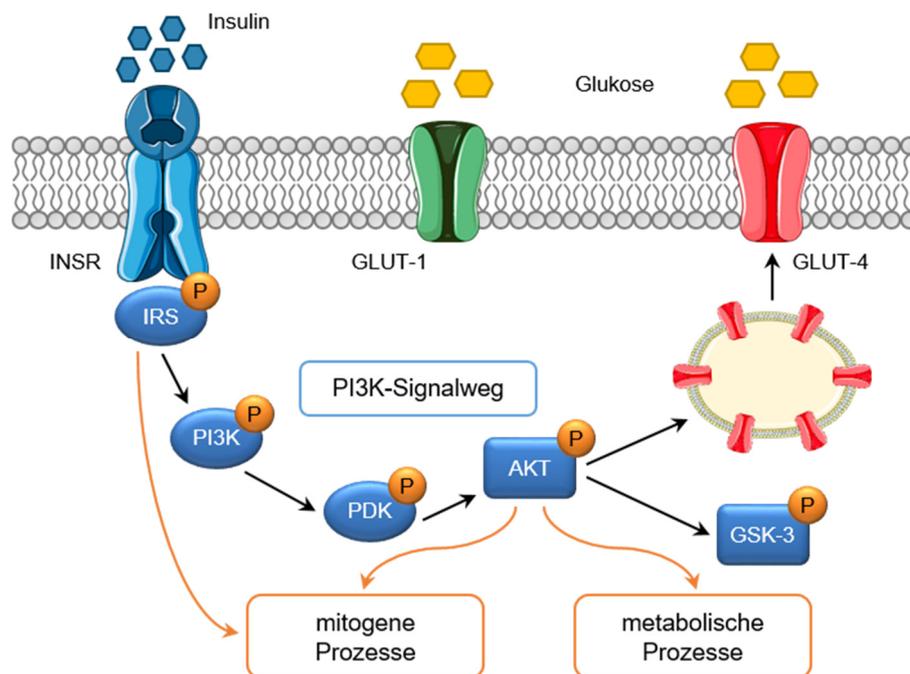


Abbildung 7: Die Insulinsignalkaskade

Durch die Bindung von Insulin an den INSR wird eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade über den PI3K-Signalweg ausgelöst. Dabei kommt es unter anderem zur Phosphorylierung von AKT, das über weitere Signalkaskaden diverse zelluläre Mechanismen beeinflusst. AKT-Phosphorylierung führt beispielsweise zur Translokation des GLUT-4 an die Zellmembran, zur Stimulation der Glykogensynthese oder zu veränderten Proteinexpressionsmustern in der Zelle (erstellt mit (7), angelehnt an (79)).

1.4. AK-DEGENERATION, EZM UND DIABETES - DIE ZUSAMMENHÄNGE

1.4.1. BEDEUTUNG DER EZM BEI DER DEGENERATION VON AK

Die Verdickung der Klappentaschen ist eines der eindeutigsten morphologischen Zeichen für eine fortschreitende DAVD. Diese einfache makroskopische Beobachtung basiert auf einem

komplexen Umbauprozess innerhalb der Tasche, der mit pathologischer Vermehrung, Umverteilung oder Fragmentierung der EZM einhergeht (84).

AK sind reich an EZM-Molekülen, vor allem an Kollagen, Proteoglykanen und HA, die der Klappe durch ihre besonderen Eigenschaften Stabilität, Elastizität und Widerstandsfähigkeit verleihen (Abbildung 2; (4)). In degenerierten AK verschiebt sich der Gehalt und die Verteilung dieser Moleküle und die Struktur der Klappe bricht auf, wodurch die Degeneration der AK vorangetrieben wird (84). Die Fibrose der Klappentaschen ist vor allem auf eine erhöhte Kollagensynthese durch die VIC zurückzuführen, wobei die periphere Anordnung der Fasern gestört ist (84). Darüber hinaus wird bei der DAVD die Synthese von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen in allen drei Schichten der Tasche hochreguliert (84). Insbesondere für BGN und DCN konnten *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Studien mit VIC oder degenerierten AK einen Zusammenhang zur DAVD herstellen (85-89). Trotzdem ist die Datenlage über die Expression spezifischer Proteoglykane und die Synthese von HA in den verschiedenen Stadien der DAVD teils widersprüchlich und vor allem bei *Ex-vivo*-Analysen die Größe der Patientenkohorten eher gering bis mäßig (87-89).

Neben diesen wichtigen Struktureigenschaften haben Proteoglykane und HA auch direkten Einfluss auf ihre Umgebung, indem sie mit Immunzellen interagieren, den extrazellulären Transport von Inflammationsmolekülen steuern und die Einlagerung von Lipiden im Gewebe modulieren (84). Allesamt Prozesse, die man aus der Atheroskleroseforschung kennt und die auch bei der Entstehung und Progression der DAVD mitwirken. Von BGN und DCN ist beispielsweise bekannt, dass sie mit den Wachstumsfaktoren TGF- β und TNF- α interagieren (90), die eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der DAVD spielen (17). Außerdem vermitteln sie die Bildung von Kollagenfibrillen und binden Lipide und Lipoproteine mittels ihrer Glykosaminoglykanketten (85, 91, 92). HA ist wiederum an der Rekrutierung von Makrophagen in arteriosklerotischen Läsionen beteiligt und aktiviert unter anderem das knochenmorphogene Protein 2 (BMP-2, *bone morphogenetic protein 2*), das die heterotope Mineralisierung vieler Gewebe einschließlich der Herzklappen stimuliert (85, 93, 94).

EZM-Moleküle stellen aufgrund all dieser vielseitigen Eigenschaften und Fähigkeiten, die sich auf die molekularen Mechanismen der DAVD auswirken können, interessante therapeutische Zielmoleküle für die Behandlung der Erkrankung dar. Daher ist es auch von besonderer Bedeutung, die Verteilung der verschiedenen Proteoglykane und die Synthese von HA in den unterschiedlichen Stadien der DAVD genau zu verstehen und ihre Rolle bei der Degeneration von AK und AK-Prothesen zu evaluieren.

1.4.2. EINFLUSS VON DIABETES AUF DIE DEGENERATION VON AK

Der negative Einfluss von Diabetes auf das kardiovaskuläre System trägt im hohen Maße zu der stetig wachsenden Prävalenz kardiovaskulär begründeter Todesfällen bei (95). Auch für die AK wurde gezeigt, dass Diabetes mit einem erhöhten Risiko an DAVD zu erkranken einhergeht und dass der Verlauf der Erkrankung durch Diabetes beschleunigt wird (96, 97). In großen retrospektiven Studien konnte ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung einer schweren AK-Stenose gezeigt werden (96, 98). Eine kleinere prospektive Studie zeigte zudem, dass T2D ein unabhängiger Prädiktor für die Entstehung einer AK-Stenose ist (99). Des Weiteren konnte eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl an Symptomen des metabolischen Syndroms und der Prävalenz für Kalziumeinlagerungen in der AK aufgezeigt werden (22).

Trotz der guten Studienlage über Diabetes als Risikofaktor für DAVD sind die genauen Mechanismen, die zur Degeneration und Kalzifizierung der AK-Taschen führen, unbekannt. Pathologische Gemeinsamkeiten zur Atherosklerose legen ein Zusammenspiel aus oxidativem Stress, gestörter Endothelfunktion und gesteigerter Inflammation nahe (100), bedürfen jedoch noch umfanglicher Forschung im Kontext der DAVD.

Darüber hinaus ist ein grundsätzliches Verständnis des Metabolismus der AK von Bedeutung, um pathologische Auswirkungen einer Diabeteserkrankung auf die Klappenphysiologie zu verstehen. Bisher fehlt es jedoch gänzlich an Daten zum Einfluss diabetischer Bedingungen auf zelluläre Prozesse der AK sowie deren potentielle Beteiligung an der Degeneration der Klappe.

1.4.3. AUSWIRKUNGEN VON DIABETES AUF PROTEOGLYKANE UND GLYKOSAMINOGLYKANE

Eine verminderte Insulinwirkung und die damit verbundenen erhöhten Blutglukosekonzentrationen wirken sich auf viele verschiedene Gewebe aus und führen zu weitverbreiteten Begleiterkrankungen. Eine Reihe dieser mit Diabetes assoziierten Erkrankungen wie Atherosklerose, Nephropathien und Retinopathien sind mit einem Umbau der EZM verbunden (101-103).

Hyperglykämische Bedingungen können die Verteilung von Proteoglykanen und ihrer Glykosaminoglykanketten verändern. Dabei ist entweder die Produktion der Glykosaminoglykane gestört oder es werden vermehrt Enzyme ausgeschüttet, die den Abbau der Proteoglykane unterstützen (103). Außerdem führt Diabetes durch Inflammation und

Hyperglykämie zu einer vermehrten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Modifikationen an den EZM-Molekülen verursachen (103-105).

Der Einfluss von Diabetes auf die Zusammensetzung der AK-Matrix ist jedoch weitestgehend unerforscht. Dabei ist ein besseres Verständnis, wie sich diabetische Bedingungen auf die EZM von AK auswirken, essentiell, um die zellulären Mechanismen von Diabetes auf die Degeneration von AK zu verstehen.

1.5. ZIELSETZUNG

Die degenerative Aortenklappenerkrankung stellt mit einer Prävalenz von 2 % bis 7 % bei über 65-Jährigen das häufigste Klappenvitium in westlichen Ländern dar. Dabei geht die Degeneration der Klappe mit Umbauprozessen der extrazellulären Matrix und morphologischen Veränderungen des Gewebes einher, welche sich zunächst durch fibrotische Verdickung der Klappentaschen und im weiteren Verlauf durch Kalziumeinlagerungen in das Gewebe zeigen. Letztlich führt die degenerative Aortenklappenerkrankung zum Funktionsverlust der Klappe, dessen einzige Therapieoption bislang der chirurgische Klappenersatz darstellt. Der demografische Wandel, der immer bewegungsärmere Lebensstil und sich ändernde Ernährungsgewohnheiten führen langfristig zu kardiovaskulären Erkrankungen und tragen zu der stetig wachsenden Zahl an betroffenen Patienten bei. Insbesondere Typ-2-Diabetes steht dabei im Verdacht, die Entstehung und Progression der degenerativen Aortenklappenerkrankung zu begünstigen, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen weitestgehend unbekannt sind. Ein tiefgreifendes Verständnis der Pathophysiologie, die zur Klappendegeneration führt, bildet jedoch die Grundlage zur Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Ansätze.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zusammenhänge zwischen der Degeneration von Aortenklappen, dem Umbau der extrazellulären Matrix und den Auswirkungen von Diabetes besser zu verstehen. Dabei wurden verschiedene Aspekte der degenerativen Aortenklappenerkrankung durch ausgewählte Modelle und Untersuchungsmethoden eingehend beleuchtet:

- I. *Ex-vivo*-Analysen zur Charakterisierung des extrazellulären Matrixumbaus humaner Aortenklappen verschiedener Degenerationsgrade sowie zum Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die Expression von Degenerationsmarkern und extrazellulären Matrixmolekülen.
- II. *In-vitro*-Untersuchungen zur Auswirkung von Hyperinsulinämie und Hyperglykämie auf die Insulinantwort, den Glukosemetabolismus und mitogene Effekte oviner valvulärer Interstitialzellen.
- III. *In-vivo*-Studien zum Einfluss von Biglycan auf die ektope Degeneration von Aortenklappen-Prothesenmaterial in Biglycan-defizienten Mäusen unter Hyperglykämie.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Carl Roth (Karlsruhe) oder VWR International (Radnor, Pennsylvania, USA) bezogen. Für die *In-vitro*-Experimente wurden Medien und Zusätze von Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) und Kunststoffwaren von Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich) verwendet. Etwaige Abweichungen sind in den entsprechenden Kapiteln gekennzeichnet.

2.2. HUMANES AK-GEWEBE

2.2.1. GEWEBEGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität (Studiennummern der Ethikvoten: 3428, 4412R und 4567) sammelt die Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie seit 2010 AK-Gewebe von Patienten nach AK-Ersatz oder Herztransplantation. Gemäß der Deklaration von Helsinki zu „Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen“ (106) liegt für jede Probe eine vom Patienten unterschriebene Patientenaufklärung vor, in der er sich zur Spende seiner AK für Forschungszwecke bereiterklärt.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die einzelnen Taschen der AK makroskopisch klassifiziert (siehe 2.2.2) und bei inhomogener Struktur in entsprechend fibrotische und kalzifizierte Anteile präpariert. Anschließend wurden die Proben fotografiert und in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -160 °C in einem Flüssigstickstofftank.

2.2.2. KLASSIFIZIERUNG HUMANER AK

Der Grad der Degeneration der einzelnen AK-Taschen wurde anhand makroskopischer Gesichtspunkte bestimmt. Dabei ist es wichtig hervorzuheben, dass die makroskopische Beurteilung der AK-Taschen keine Rückschlüsse über die funktionellen Eigenschaften der AK zulässt.

Bei der Klassifizierung wurde zwischen unverändertem, fibrotischem und kalzifiziertem AK-Gewebe unterschieden. AK der Kontrollgruppe stammten größtenteils von Patienten, bei denen eine orthotope Herztransplantation durchgeführt wurde. Diese AK wiesen keine äußerlich sichtbaren, strukturellen Veränderungen auf. Die fibrotische Gruppe umfasste Gewebe, das aufgrund fibrotischer Prozesse strukturell verdickt war, aber keinerlei Kalzifizierungsherde enthielt. In der kalzifizierten Gruppe befanden sich wiederum ausschließlich AK-Taschen mit großflächigen Kalzifizierungen und starken morphologischen Veränderungen (Abbildung 8).

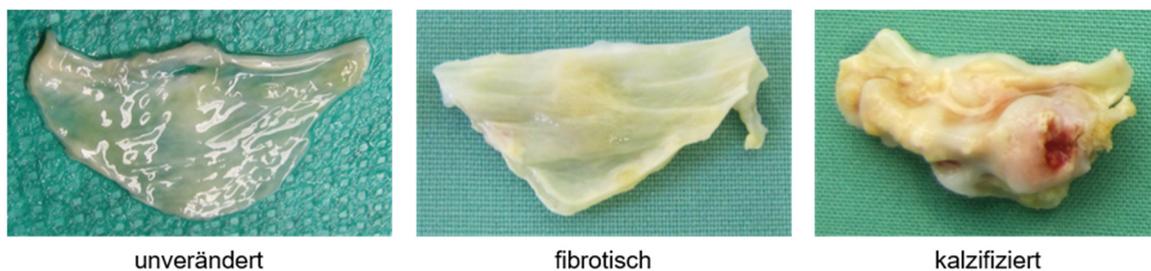


Abbildung 8: Klassifizierung von humanem AK-Gewebe nach dem Degenerationsgrad

Humane AK wurden entsprechend ihrer Struktur und ihres äußeren Erscheinungsbildes makroskopisch in verschiedene Degenerationsgrade unterteilt. Unveränderte AK-Taschen waren hauchdünn und wiesen keine morphologischen Veränderungen auf. Im Gegensatz dazu waren fibrotische AK strukturell verdickt, ließen jedoch keine Anzeichen an Kalzifizierungen erkennen. Kalzifizierte AK waren morphologisch stark verändert und zeigten großflächige Kalzifizierungen über die gesamte Fläche.

2.2.3. PATIENTENAUSWAHL

Zur fundierten Beurteilung der Forschungsergebnisse wurden personenbezogene Daten und Informationen über Vorerkrankungen jedes Spenders dokumentiert. Diese sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 zusammengefasst und geben einen Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen Untersuchungskohorten. Dabei erfolgte die Patientenauswahl retrospektiv und entsprechend der aufgeführten Kriterien nicht-randomisiert.

Patienten mit bikuspiden AK wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen, da die Anatomie dieser Klappen mit veränderten hämodynamischen Verhältnissen und damit assoziiert mit Regurgitation und beschleunigter Kalzifizierung einhergeht (107). Darüber hinaus wurden Patienten, deren Krankengeschichte aktive Endokarditis, rheumatische Herzkrankheiten oder virale Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus oder Hepatitis-C-Virus beinhalteten, von den Versuchen ausgeschlossen.

Für Untersuchungen zum Einfluss von T2D auf die Degeneration von AK wurden die Patienten in Nicht-Diabetiker und Typ-2-Diabetiker unterteilt. Für die Einstufung als Diabetiker wurde die Diagnose eines behandelnden Arztes oder der HbA_{1c}-Wert während des stationären Aufenthalts in der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) herangezogen. Entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft galt ein HbA_{1c} \geq 6,5 % als hinreichend für die Diabetesdiagnose (67). Zwischen insulinpflichtigen und nicht-insulinpflichtigen Diabetikern (z. B. diätische Einstellung oder Metformin-Behandlung) wurde nicht unterschieden. Patienten mit Typ-1-Diabetes wurden ausgeschlossen, da sich der zugrundeliegende Pathomechanismus stark von dem des T2D unterscheidet (71).

Außerdem wurden die Diabetiker für weitere Analysen nach der Höhe ihres HbA_{1c}-Werts gruppiert. Typ-2-Diabetiker mit einem HbA_{1c} $<$ 6,5 % wurden als gut eingestellte Diabetiker definiert, während bei Diabetikern mit einem Wert $>$ 6,5 % von einer schlechten Blutglukosekontrolle ausgegangen wurde.

2.2.4. PATIENTENKOHORTEN

Die mRNA-Expression verschiedener Degenerationsmarker und Proteoglykane wurde an AK-Taschen von 158 Patienten untersucht. Dabei ging von jedem Patienten eine komplette Tasche seiner AK in die Untersuchungen ein. AK-Taschen mit inhomogener Struktur, die nur partielle oder intermediäre Kalzifizierungen aufwiesen, wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Die Gruppierung der Patientenkohorte erfolgte anhand des Degenerationsgrads in unveränderte, fibrotische und kalzifizierte AK (siehe 2.2.2). Weiterführend wurden die degenerierten AK in Nicht-Diabetiker und Diabetiker untergliedert (siehe 2.2.3). Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Svenja Klose (Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Teile des Datensatzes sind ebenfalls Gegenstand ihres Promotionsvorhabens.

Zur Beurteilung des Einflusses von Hyperglykämie auf die mRNA-Expression von Proteoglykanen wurden in weiterführenden Versuchen Diabetiker entsprechend ihres HbA_{1c}-Werts unterteilt (siehe 2.2.3). Auch für diese Analysen wurden ganze AK-Taschen verwendet, wobei keine Unterscheidung zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK erfolgte. AK von Nicht-Diabetikern mit einem HbA_{1c} $<$ 5,5 % wurden bei diesen Versuchen als Kontrollen genutzt.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit ganzen AK-Taschen wurden in einer kleineren Patientenkohorte ($n = 44$) die verschiedenen Degenerationsgrade innerhalb der gleichen Tasche untersucht. Dafür wurden AK-Taschen mit nahezu gleich großen Anteilen fibrotischen und kalzifizierten Gewebes vor der Kryokonservierung präpariert und beide Anteile getrennt voneinander analysiert (Abbildung 9). Auch hier erfolgte eine Unterteilung in Nicht-Diabetiker und Diabetiker entsprechend der beschriebenen Kriterien (siehe 2.2.3). Die RNA-Aufreinigung wurde von Sebastian Bauer (Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt, der das Probenmaterial ebenfalls in seiner Promotion verwendet.



Abbildung 9: Humane AK-Tasche mit fibrotischem und kalzifiziertem Anteil

Humane AK mit inhomogener Struktur, die innerhalb derselben Tasche verschiedene Degenerationsgrade aufwiesen, wurden vor der Kryokonservierung in fibrotische und kalzifizierte Anteile präpariert. Die Analyse dieser Präparate erfolgte getrennt von den Versuchen mit ganzen AK-Taschen.

2.2.5. AUFREINIGUNG VON BGN AUS HUMANEN AK-TASCHEN

Proteoglykane aus humanen AK-Taschen wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Dabei binden die negativ geladenen Proteoglykane an positiv geladene Diethylaminoethyl (DEAE)-Zellulosekügelchen und werden nach mehrmaligen Waschen mit einer hochmolekularen NaCl-Lösung eluiert (108).

Die in Flüssigstickstoff gefrorenen AK-Taschen wurden mit einem Metallhomogenisator mechanisch zerkleinert und in 5 ml DEAE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde das Lysat für zehn Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm, *revolutions per minute*) zentrifugiert (Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific Inc.) und die Zellfragmente entfernt. Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurden 1,5 ml Sephacel-Kügelchen (Diethylaminoethyl-Sephacel, Kat.-Nr.: I6505, Sigma-Aldrich) pro Chromatographie-Säule (Poly-Prep Chromatography Columns, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) mit 10 ml Waschpuffer äquilibriert. Danach wurden die in Lösung gebrachten Proben

schrittweise auf die Säulen pipettiert, wobei 100 µl für die Bestimmung der Proteinkonzentration zurückbehalten wurden (siehe 2.6.1.2). Nach fünfmaligem Waschen der Chromatographie-Säulen mit je 5 ml Waschpuffer wurden die Proteoglykane mit 900 µl Elutionspuffer herausgelöst. Das Eluat wurde mit 15 µl Chondroitinsulfat A (10 mg/ml, Kat.-Nr.: C8529, Sigma-Aldrich) versetzt und in gleichen Teilen auf drei Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden die Proteoglykane mit 1,05 ml Kaliumacetat-Lösung über Nacht (ü. N.) bei -80 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben für fünf Minuten bei 10000 ×g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 300 µl Reinstwasser (Milli-Q Biocel, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) aufgenommen. Die Fällung wurde so oft wiederholt bis kein NaCl oder Harnstoff mehr in dem Pellet ersichtlich war.

Um die anschließende Bestimmung der BGN-Konzentration mittels Western-Blot-Analysen zu ermöglichen, wurde das Pellet in 19,5 µl Reinstwasser aufgenommen und mit Chondroitin-ABC-Lyase (Chondroitinase ABC from *Proteus vulgaris*, Kat.-Nr.: C2905, Sigma-Aldrich) verdaut. Das Enzym degradiert die an BGN gebundenen Polysaccharidketten und legt das Kernprotein frei. Für den Verdau wurden die Probe mit 3 µl Chondroitin-ABC-Lyase (20 U/ml), 5 µl ABC-Puffer und 2,5 µl Protease-Inhibitoren-Lösung versetzt und für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die vollständige Degradation der Polysaccharidketten sicherzustellen, wurde jede Probe zweimal verdaut. In den Western-Blot-Analysen wurden 10 µl jeder Probe sowie 50 ng und 100 ng rekombinantes BGN (Kat.-Nr.: 2667-CM, R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) eingesetzt. Die BGN-Menge pro AK wurde durch Berechnen des Intensitätsverhältnisses zwischen Probe und rekombinanten Protein bestimmt. Da nach der Anionenaustausch-Chromatographie eine klassische Normalisierung auf Ladekontrollen nicht möglich war, wurde die BGN-Menge pro AK auf die Proteinkonzentration des eingesetzten AK-Lysats bezogen.

DEAE-Puffer (pH 7,5)

Harnstoff	8 M
EDTA	2 mM
Tris base	50 mM
(2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol)	
Triton X-100 (Polyethylenglycol-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl)-ether)	0,5 %
Protease-Inhibitor Cocktail (cOmplete, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)	1x
dH ₂ O	ad 1 l

Waschpuffer

NaCl	25 mM
DEAE-Puffer (pH 7,5)	ad 1 l

Elutionspuffer

NaCl	3 M
DEAE-Puffer (pH 7,5)	50 ml

Kaliumacetat-Lösung

Kaliumacetat	132 mM
95%iger Ethanol	ad 50 ml

ABC-Puffer (6x, pH 8.0)

Tris base	100 mM
bovines Serumalbumin (BSA)	15 %
Natriumacetat	18 mM

Protease-Inhibitoren-Lösung

ϵ -Aminocaprinsäure	100 mM
Benzamidin Hydrochlorid	5 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid	1 mM
dH ₂ O	ad 5 ml

2.3. *IN-VITRO*-VERSUCHE MIT PRIMÄREN OVINEN VIC

2.3.1. ISOLATION, KULTIVIERUNG UND LAGERUNG OVINER VIC

Primäre VIC wurden aus ovinen AK von sechs bis acht Monate alten Schafen isoliert. Dafür wurden Herzen frisch von einem lokalen Schlachthof (Laame GmbH & Co. KG, Wuppertal) bezogen und die AK aus dem Gewebe präpariert. Nach ausgiebigem Spülen der AK-Taschen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), wurden die AK in 5 ml Kulturmedium mit 450 mg/dl Glukose überführt und mit einer Schere in etwa 1 mm² große Fragmente zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde dann in eine mit 1%iger Gelatine beschichtete 25-cm²-Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ unter humider Atmosphäre inkubiert.

Nach einer Woche wurden die Gewebefragmente aus der Zellkulturflasche entfernt und die herausgewachsenen Zellen passagiert. Dafür wurden die VIC zweimal mit PBS gewaschen und mit einer 0,25%igen Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in gleichen Teilen auf zwei Reaktionsgefäße

verteilt und bei 1500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert (Heraeus Labofuge 300, Thermo Fisher Scientific Inc.). Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte getrennt, entweder in Kulturmedium mit 100 mg/dl Glukose oder in Medium mit 450 mg/dl Glukose, sodass von jedem Schaf VIC unter beiden Glukosekonzentrationsbedingungen vorlagen. Die VIC wurden standardmäßig in gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ unter humider Atmosphäre gehalten. Dabei wurde das Medium alle zwei Tage erneuert. Bei einer Konfluenz von etwa 90 % wurden die VIC im Verhältnis 1:4 in neuen Kulturflaschen vereinzelt.

Die Langzeitlagerung primärer VIC erfolgte durch Kryokonservierung in Flüssigstickstoff. Dafür wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS mittels 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung in Suspension gebracht und bei 1500 rpm fünf Minuten pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in einem adäquaten Volumen (ca. 1 ml pro 10⁶ Zellen) des vorgekühlten Einfriermediums aufgenommen und die Zellsuspension à 1 ml auf Kryoröhrchen verteilt. Der Einfrierprozess erfolgte stufenweise ü. N. bei -80 °C in einem mit Propan-2-ol gefüllten Gefrierbehälter (Nalge Nunc International Corporation, Rochester, New York, USA), bevor die Zellen zur Langzeitlagerung in einen Flüssigstickstofftank überführt wurden.

Kulturmedium

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) mit 100 mg/dl oder 450 mg/dl Glukose	500 ml
fötale Kälberserum	10 %
Penicillin / Streptomycin	1 %
nichtessentielle Aminosäuren	1 %

1%ige Gelatine

Gelatine	5 g
PBS	500 ml
autoklavieren und steril filtrieren	

Einfriermedium

Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 %
fötale Kälberserum	10 ml

2.3.2. AUSSAAT UND BEHANDLUNG PRIMÄRER VIC

Für die *In-vitro*-Experimente wurden primäre VIC der Passagen drei bis fünf verwendet. Dabei steht jedes Replikat für ein einzelnes Schaf, von dem jeweils VIC unter zwei

Glukosekonzentrationsbedingungen gezogen wurden. Eine Glukosekonzentration von 100 mg/dl (5,5 mM) im Kulturmedium wurde im Folgenden als normoglykämische Bedingung bzw. Normoglykämie (NG) bezeichnet, da dies dem physiologischen Plasmaglukosewert bei gesunden Menschen entspricht (67). Im Gegensatz dazu wurde eine Glukosekonzentration von 450 mg/dl (25 mM) als hyperglykämische Bedingung bzw. Hyperglykämie (HG) definiert. Ein Blutglukosewert dieser Höhe wird im Menschen als dringend behandlungsbedürftig eingeschätzt, um Folgeschäden zu vermeiden (67).

Für die Aussaat wurden die VIC zweimal mit PBS gewaschen, mit einer 0,25%igen Trypsin-EDTA-Lösung suspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön) gezählt. Die Experimente wurden in gelatinebeschichteten Mikrotiterplatten mit sechs Kavitäten durchgeführt, wobei in jede Kavität 75000 Zellen (ca. 7800 Zellen/cm²) mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums ausgesät wurden.

Nach einem Tag in Kulturmedium wurde mit der Behandlung der Zellen begonnen. Dabei wurde zum einen eine Hyperinsulinämie (HI) durch eine erhöhte Insulinkonzentration (100 nM, Kat.-Nr.: I5523, Sigma-Aldrich) im Behandlungsmedium simuliert. Zum anderen wurden die VIC mit β -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat (β -GP, 10 mM, Kat.-Nr.: 50020, Sigma-Aldrich) und CaCl₂ (1,5 mM) zur Degeneration (DEG) angeregt. Dabei wirkte β -GP als organische Quelle für Phosphatgruppen bei der Bildung von Kalziumphosphatkristallen (109). Darüber hinaus wurde mit einer Kombination beider Behandlungsmedien (HI + DEG) gearbeitet. Die Behandlung der VIC erfolgte über fünf Tage mit Medienwechseln alle 48 Stunden. Eine Übersicht des Versuchsablaufs mit den durchgeführten Behandlungen ist in Abbildung 10 dargestellt.

Am sechsten Tag in Kultur wurden die Zellen entsprechend der weiteren Analysen geerntet. Für Untersuchungen, die eine unmittelbare Aktivierung des Insulinsignalwegs voraussetzen (z. B. AKT und GSK-3 α/β Phosphorylierung), wurden die VIC vor der Ernte vier Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend folgte ein akuter Insulinstimulus (AI) mit 100 nM Insulin für zehn Minuten, um die Insulinantwort hervorzurufen.

Medium für Hyperinsulinämie (HI)

Kulturmedium mit 100 mg/dl (NG) oder 450 mg/dl Glukose (HG)	10 ml
Insulin	100 nM

Degeneratives Medium (DEG)

Kulturmedium mit 100 mg/dl oder 450 mg/dl Glukose	10 ml
β -GP	10 mM
CaCl ₂	1,5 mM

Degeneratives Medium mit Hyperinsulinämie (HI + DEG)

Kulturmedium mit 100 mg/dl oder 450 mg/dl Glukose	10 ml
β -GP	10 mM
CaCl ₂	1,5 mM
Insulin	100 nM

Serumfreies Medium

DMEM mit 100 mg/dl oder 450 mg/dl Glukose	500 ml
Penicillin / Streptomycin	1 %
nichtessentielle Aminosäuren	1 %

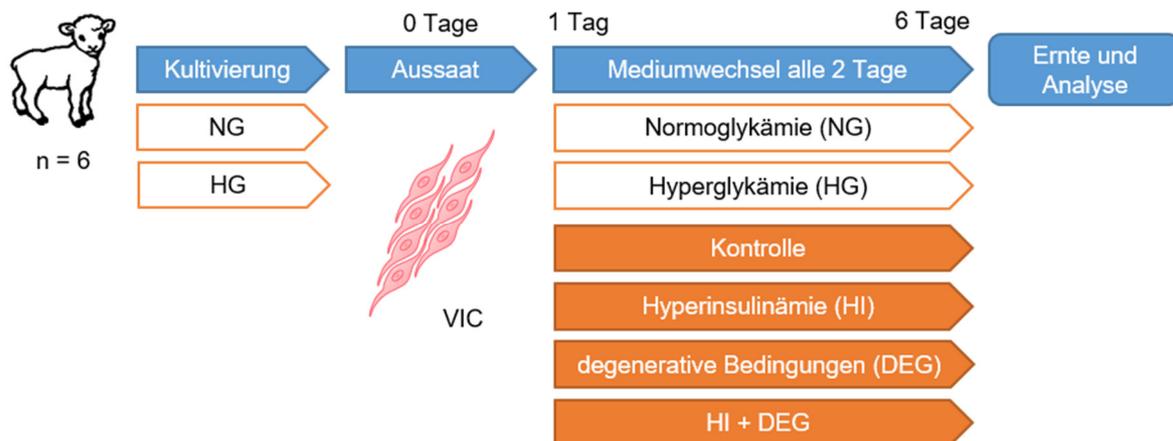


Abbildung 10: Versuchsaufbau der *In-vitro*-Experimente mit primären ovinen VIC

Ovine VIC wurden aus AK von sechs bis acht Monate alten Lämmern isoliert und in normoglykämischem (NG; 100 mg/dl Glukose) oder hyperglykämischem (HG; 450 mg/dl Glukose) Kulturmedium herangezogen. Für die *In-vitro*-Versuche wurden VIC der Passagen drei bis fünf ausgesät und nach einem Tag unter Hyperinsulinämie (HI; 100 nM Insulin) oder degenerativen Bedingungen (DEG; 10 mM β -GP, 1,5 mM CaCl₂) kultiviert. Zudem wurde eine Kombination beider Behandlungen verwendet. Am sechsten Tag wurden die Zellen geerntet und analysiert.

2.3.3. HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN

Für Western-Blot-Analysen oder zur Normalisierung anderer Nachweisverfahren wurden Zellysate behandelter VIC mit HEPES-Puffer hergestellt. Dafür wurden die Zellen zweimal

mit PBS gewaschen, mit 120 µl HEPES-Puffer überschichtet und die Zellkulturplatten bei -20 °C ü. N. eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zelllysate in Reaktionsgefäße überführt und für zwei Stunden bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Um Zellfragmente zu entfernen, wurden die Proben bei 4 °C und 18000 ×g für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zelllysate bei -80 °C gelagert.

HEPES-Puffer (pH 7,4)

HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure)	50 mM
Triton X-100	1 %
Protease-Inhibitor Cocktail (cOmplete, Hoffmann-La Roche AG)	1x
Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP, Hoffmann-La Roche AG)	1x
dH ₂ O	ad 50 ml

2.3.4. LICHTMIKROSKOPISCHE KONTROLLEN UND AUFNAHMEN

Die Zelldichte und die Morphologie der kultivierten VIC wurde regelmäßig unter einem Inversmikroskop (DM IL LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) kontrolliert. Zur Dokumentation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Bilder der behandelten VIC mit einer Mikroskopkamera (DFC425 C, Leica Microsystems GmbH) und der dazugehörigen Software *Leica Application Suite* Version 3.8 (Leica Microsystems GmbH) aufgenommen.

2.3.5. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Der Einfluss der Behandlungsbedingungen auf die Zellzahl wurde alle zwei Tage durch Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG) nachvollzogen. Dafür wurden die VIC zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion mit 500 µl Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension 1:1 mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung gefärbt. Für jede Bedingung wurde die durchschnittliche Zellzahl von vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer ermittelt und mit dem Faktor 2×10^4 multipliziert, um die Gesamtzellzahl zu berechnen.

2.3.6. GLUKOSEKONZENTRATIONSBESTIMMUNG IN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN

Um den Glukoseverbrauch der VIC unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen zu evaluieren, wurde die Glukosekonzentration der Zellkulturüberstände täglich gemessen. Dafür wurden zweimal 50 µl des entsprechenden Kulturmediums auf einen Parafilmstreifen überführt und die Glukosekonzentration mit einem Blutglukosemessgerät (GlucoSmart Swing, MSP bodmann GmbH, Bobingen) ermittelt. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung in zwei unabhängigen Proben derselben Kultur.

2.3.7. BESTIMMUNG DER GLUKOSEAUFNAHME VON BEHANDELTEN VIC

Die Glukoseaufnahme der Zellen wurde mittels eines Luciferase-basierten *Glucose Uptake-Glo Assays* (Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA) quantifiziert. Dabei wird 2-Deoxyglukose von den Zellen aufgenommen und zu 2-Deoxyglukose-6-Phosphat phosphoryliert, welches anschließend zu einem der Konzentration proportionalen Lumineszenzsignal umgewandelt wird.

Nach fünf Tagen Behandlung wurden die VIC zweimal mit serumfreiem Medium (siehe 2.3.2) gewaschen und für 18 Stunden in diesem kultiviert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die VIC für eine Stunde in PBS ohne oder mit 100 nM akutem Insulin (AI) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µM 2-Deoxyglukose in PBS behandelt. Die Glukoseaufnahme wurde nach zwölf Minuten mit 500 µl Stoppuffer durch Lyse der Zellen gestoppt. Zellen, die nicht mit 2-Deoxyglukose behandelt wurden, dienten als Leerkontrolle.

Die Messung wurde in Doppelbestimmung mit jeweils 75 µl Zelllysate, 25 µl Neutralisierungspuffer und 100 µl 2-Deoxyglukose-6-Phosphat-Detektionsreagenz in einer weißen Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten durchgeführt. Dafür wurde die Platte zunächst für vier Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann die Lumineszenz mit einer Belichtungszeit von 750 ms in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M1000 PRO, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen.

2-Deoxyglukose-6-Phosphat Detektionsreagenz

Luciferase-Reagenz	100 µl
NADP ⁺	1 µl
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	2,5 µl
Reduktase	0,5 µl
Reduktasesubstrat	0,0625 µl
vor Verwendung eine Stunde bei RT äquilibrieren lassen	

2.3.8. QUANTIFIZIERUNG VON BGN IN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN

Das von primären VIC sezernierte BGN wurde mit einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for BGN* (Cloud-Clone Corp., Houston, Texas, USA) nach Herstellerangaben quantifiziert. Der Nachweis beruht auf der klassischen „Sandwich-Technik“. Dabei bindet das in den Proben enthaltene BGN an Protein-spezifische Antikörper, die an der verwendeten Mikrotiterplatte angeheftet sind. Zudem wird BGN von Biotin-konjugierten Antikörpern gebunden, die durch Zugabe von Meerrettichperoxidase-konjugiertem Avidin und einem Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) eine enzymatische Farbreaktion auslösen.

Für die Quantifizierung wurden Zellkulturüberstände verwendet, die vom vierten auf den fünften Behandlungstag auf den VIC verblieben. Die Proben wurden vor der Analyse für 20 Minuten bei 1000 ×g zentrifugiert, von Zellfragmenten befreit und in Duplikaten bei der Analyse eingesetzt. Nach der Enzymreaktion wurde die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M1000 PRO, Tecan Group AG) gemessen und die BGN-Konzentration anhand des mitgelieferten Standards berechnet. Die Werte wurden auf die Proteinkonzentration der jeweiligen VIC bezogen.

2.3.9. QUANTIFIZIERUNG SEZERNIERTER HA IN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN

Die HA-Konzentration in Zellkulturüberständen wurde von Irmhild Rüter (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mit einem *Hyaluronic Acid Test Kit* (Corgenix Medical Corporation, Broomfield, Colorado, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Das Testprinzip beruht auf HA-Bindungsproteinen, die in einer Mikrotiterplatte immobilisiert sind und die HA in der Probe abfangen. Anschließend wird die gebundene HA mit Meerrettichperoxidase-konjugierten HA-Bindungsproteinen durch die Umsetzung eines Chromophors (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) quantifiziert.

Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung mit Zellkulturüberständen, die vom vierten auf den fünften Behandlungstag auf den Zellen inkubierten. Nach der enzymatischen Reaktion wurde die optische Dichte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer, Thermo Fischer Scientific Inc.) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und auf Standardproben mit bekannter HA-Konzentration bezogen. Die HA-Konzentration im Überstand wurde auf die Proteinkonzentration der entsprechenden Zellen normalisiert.

2.3.10. ALIZARINROT-FÄRBUNG

Mit der Alizarinrot-Färbung wurden Kalziumablagerungen in der VIC Kultur nachgewiesen. Dabei bildet Alizarinrot S Chelatkomplexe mit Kalziumphosphat (110), das durch osteogene Differenzierung oder degenerative Prozesse in der EZM akkumuliert.

Für die Färbung wurden die Zellen nach fünf Tagen Behandlung zweimal mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 4%iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung fixiert. Die Fixierungslösung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS (pH 4,2) entfernt und die Zellen für 15 Minuten mit 2%iger Alizarinrot-Lösung inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene Alizarinrot S durch mehrmaliges Waschen mit PBS (pH 4,2) entfernt und die Färbung makroskopisch dokumentiert.

2%ige Alizarinrot-Lösung (pH 4,2)

Alizarinrot S	1 g
dH ₂ O	ad 50 ml
filtrieren, lichtgeschützt lagern	

2.4. *IN-VIVO*-ANALYSEN IM TIERMODELL

2.4.1. TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG

Die im Folgenden beschriebenen Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2011.A404 genehmigt. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte nach den Grundsätzen der „drei R“, *replacement* (Vermeidung), *reduction* (Verringerung), *refinement* (Verbesserung) unter Einhaltung der tierschutzgesetzlichen Vorgaben.

2.4.2. *BGN*-DEFIZIENTE MÄUSE

Die verwendeten *Bgn*-defizienten (*Bgn*⁻⁰) Mäuse wurden von Prof. Dr. Jens W. Fischer (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Der Mausstamm wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt und auf einem C57BL/6-Hintergrund gezüchtet. Dabei wurde durch das Einfügen einer Phosphoglycerat-Kinase-1-Kassette in Exon 2 der *Bgn*-Genlocus unterbrochen, wodurch die mutierten Tiere keine funktionsfähige mRNA exprimieren können (111). Da *Bgn* X-chromosomal codiert ist, haben männliche mutierte Mäuse einen *Bgn*⁻⁰ Genotyp.

2.4.3. ZUCHT, HALTUNG UND GENOTYPISIERUNG DER VERSUCHSTIERE

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Versuchstiere erhielten entkeimtes Wasser und Standardnagerfutter *ad libitum* und wurden in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Während die Zucht in einer spezifiziert pathogenfreien Umgebung durchgeführt wurde, wurden die Tiere in der experimentellen Phase unter konventionellen, offenen Bedingungen gehalten.

Entsprechend einer heterozygoten Zuchtstrategie wurden männliche *Bgn*⁻⁰-Mäuse mit weiblichen *Bgn*^{-/+}-Mäusen des gleichen Wurfs verpaart. Dies ermöglichte den direkten Vergleich von männlichen Wurfgeschwistern mit *Bgn*⁻⁰ und Wildtyp (WT, *Bgn*⁺⁰) Genotyp in den Versuchen.

Die Genotypisierung wurde vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) unter Verwendung des *KAPA Mouse Genotyping Kits* (Kat.-Nr.: KK7352; VWR International) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dies umfasst die Extraktion von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA, *deoxyribonucleic acid*) aus Schwanzspitzenbiopsien, die Amplifikation mutationsspezifischer DNA-Fragmente sowie die Auftrennung der Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Für die Amplifikation wurden die in der Tabelle 1 aufgeführten Primer verwendet.

Tabelle 1: Primersequenzen für die Genotypisierung von *Bgn*⁻⁰-Mäusen

Primername	Primersequenz (5' → 3')
Bgn forward	GAACATTGACCATGTGTCCCCT
Bgn reverse	GAAAGGACACATGGCACTGAAG
PGK1 reverse	TGGATGTGGAATGTGTCCGAGG

2.4.4. STREPTOZOCIN-INDUZIERTE HYPERGLYKÄMIE

Um die Auswirkungen einer Hyperglykämie auf die Degeneration von AK-Prothesenmaterial zu untersuchen, wurden die Versuchstiere vor der Implantation mit Streptozocin (STZ, Kat.-Nr.: S0130, Sigma-Aldrich) behandelt. STZ wirkt toxisch auf die insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas und ruft eine Insulinitis mit einhergehender Hyperglykämie hervor (112). Vor allem die alkylierende Eigenschaft von STZ, aber auch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, führen zu DNA-Schädigungen, die wiederum durch Überaktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase die Nekrose der Zellen hervorrufen (113). Die selektive Wirkung von STZ ist auf den GLUT-2-vermittelten Transport in das Zellinnere

zurückzuführen, da dieser Glukosetransporter in hohem Maße von murinen Betazellen exprimiert wird (114).

In der tierexperimentellen Forschung werden zwei STZ-Modelle zur Induktion von Hyperglykämie verwendet, die sich in der Dosis und der Applikationshäufigkeit unterscheiden. Während bei dem Niedrig-Dosis-Modell mit mehreren Applikationen eine partielle Entzündung der Betazellen mit sekundärer Autoimmun-Insulitis hervorgerufen wird, kommt es bei dem Hoch-Dosis-Modell mit nur einer Injektion zu einer massiven Betazell-Nekrose aufgrund der hohen Zytotoxizität von STZ (112, 115). Nach Evaluation einer Pilotgruppe mit 30 Tieren, wurde das Niedrig-Dosis-Modell für die anschließenden Experimente gewählt.

Für die *In-vivo*-Untersuchungen zur Degeneration von AK-Prothesenmaterial wurden *Bgn⁻⁰*- und WT-Mäuse im Alter von sechs Wochen an fünf konsekutiven Tagen mit 55 mg/kg STZ/Körpergewicht behandelt. Vor der Applikation wurden die Tiere für vier Stunden auf Nahrungsentzug gesetzt und anschließend eine dem Gewicht entsprechende Menge STZ (130 µl - 200 µl 7 mg/ml STZ in Citratpuffer) intraperitoneal injiziert. Kontrolltiere erhielten eine äquivalente Menge des Vehikels.

Zwei Wochen nach der ersten STZ-Injektion wurde der Behandlungserfolg durch Bestimmung der Blutglukosekonzentration nach vier Stunden Nahrungsentzug überprüft. Für die Messung wurde venöses Blut aus der Schwanzspitze entnommen und die Glukosekonzentration in Dreifachbestimmung mit einem Blutglukosemessgerät (GlucoSmart Swing, MSP bodmann GmbH) bestimmt. Tiere, die eine Nüchternblutglukosekonzentration ≥ 250 mg/dl zeigten, wurden als hinreichend hyperglykämisch gewertet und am Folgetag operiert. Eine weitere Überprüfung der Blutglukosekonzentration erfolgte einen Tag vor der Explantation. In Abbildung 11 ist der Versuchsaufbau zur *In-vivo*-Analyse der Degeneration von AK-Prothesenmaterial unter Hyperglykämie schematisch dargestellt.

Citratpuffer (pH 4,5)

Trinatriumcitrat	10 mM
0,9%ige NaCl-Lösung (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe)	ad 50 ml
pH 4,5 mit 1 M Zitronensäure einstellen, steril filtrieren, aliquotieren, Lagerung -20 °C	

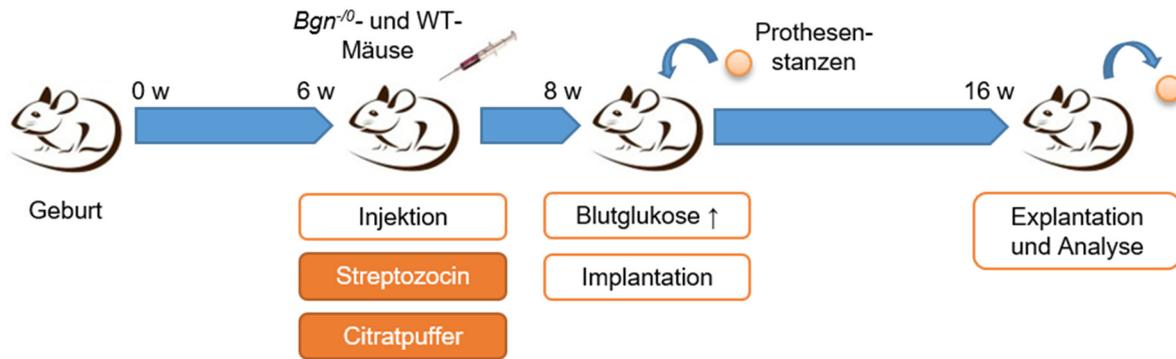


Abbildung 11: Mausmodell für die Degeneration von AK-Prothesenmaterial unter Hyperglykämie

Bgn^{-/-}- und WT-Mäusen wurde im Alter von sechs Wochen an fünf konsekutiven Tagen 55 mg/kg STZ/Körpergewicht intraperitoneal injiziert, um eine Hyperglykämie auszulösen. Kontrolltiere erhielten hingegen ein äquivalentes Volumen Citratpuffer. Der Behandlungserfolg wurde nach zwei Wochen durch Messung der Nüchternblutglukose überprüft und Tiere mit einer Blutglukosekonzentration ≥ 250 mg/dl operiert. Dabei wurden vier Biopsiestanzen eines gängigen AK-Prothesenmaterials subkutan implantiert. Acht Wochen nach der Implantation wurden die Präparate explantiert und auf verschiedene Degenerationsmerkmale untersucht. Abkürzungen: w - Wochen

2.4.5. IMPLANTATION UND VERLAUFSKONTROLLE

Die Degeneration von AK-Prothesenmaterial wurde in einem etablierten, ektopen Degenerationsmodell in Mäusen untersucht (116-118). Dabei wurde den Tieren Prothesenmaterial subkutan auf beiden Seiten des Rückens implantiert. Zur Beurteilung der Rolle von BGN an der Degeneration von AK-Bioprothesen wurde mit *Bgn*^{-/-}- und WT-Mäusen gearbeitet. Außerdem wurde der Einfluss von Hyperglykämie an STZ-behandelten Mäusen eruiert. Als Kontrolltiere wurden WT-Mäuse mit Vehikel-Applikation verwendet. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

Biologische AK-Prothesen sind oft aus chemisch behandeltem, bovinem Perikard gefertigt (42). In dieser Arbeit wurde bovines, Glutaraldehyd-fixiertes Perikardtransplantat (Modell 4700, Edwards Lifesciences, Irvine, Kalifornien, USA) verwendet, aus dem Bioplate mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestanzt wurden (Biopsie-Stanzen von pfm medical AG, Köln). Die Prothesenstanzen wurden für mindestens zwölf Stunden in sterilem PBS gespült, um die Fixierungslösung auszuwaschen.

Die Allgemeinanästhesie der Mäuse erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Anästhetikum). Außerdem wurde intraoperativ 5 mg/kg Körpergewicht Carprofen (Analgetikum) subkutan injiziert, um Wundschmerzen vorzubeugen. Die Augen des Tieres wurden mit Augensalbe (50 mg/g

Dexpanthenol, Bepanthen, Bayer AG, Leverkusen) vor dem Austrocknen geschützt und die Körpertemperatur durch Verwendung einer Wärmeplatte stabil gehalten.

Für die Implantation wurde die obere Rückenpartie der Maus enthaart und mit einem Antiseptikum (Octenisept, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert. Anschließend erfolgte ein ca. 1,5 cm langer Hautschnitt in der Medianebene. Die lateralen Bereiche des Hautschnitts wurden durch Bildung zweier subkutaner Taschen unterminiert und auf beiden Seiten je zwei Prothesenstanzen implantiert. Dabei wurde jede Prothesenstanze mit drei Knopfnähten (6-0 Prolenefaden, Ethicon Inc., Somerville, New Jersey, USA) an der darunterliegenden Faszie fixiert (Abbildung 12). Während der Implantation wurde die Wunde regelmäßig mit 0,9%iger NaCl-Lösung vor dem Austrocknen geschützt. Letztlich wurde die Haut durch fünf bis sieben Knopfnähte mit einem chirurgischen 5-0 Vicrylfaden (Ethicon Inc.) verschlossen und mit Povidon-Iod-Lösung (Betasisodona, Mundipharma GmbH, Limburg) desinfiziert. Bis zur vollständigen Wiederherstellung der Vigilanz wurden die Mäuse unter einer Infrarotlampe positioniert.

Einen Tag nach Implantation der Prothesenstanzen wurde von Standardnagerfutter auf eine pro-kalzifizierende Diät gewechselt, um die Degeneration des Prothesenmaterials zu fördern. Das Futter enthielt erhöhte Mengen an Dicalciumphosphat (1,5 %), Cholesterol (2 %) und Vitamin D₃ (300.000 IU/kg), Substanzen, die eine Kalziumakkumulation begünstigen (Kat.-Nr.: E15312-44, Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest).

Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde ab der ersten STZ-Injektion bis zum Tag der Explantation engmaschig überprüft. Dabei wurde besonders auf körperliche Merkmale (z. B. Entzündung der Wunde, Gewichtsverlust), das äußere Erscheinungsbild (z. B. vernachlässigte Fellpflege) oder Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere (z. B. Apathie, anormale Körperhaltung, reduzierter Allgemeinzustand) geachtet. Bei Anzeichen andauernder Schmerzen oder Belastungen wurden die betroffenen Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen und getötet.

Anästhetikum

Esketaminhydrochlorid (Ketanest S 25 mg/ml, Pfizer Inc., New York, New York, USA)	4 ml
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %, Bayer AG)	0,25 ml
0,9%ige NaCl-Lösung	0,25 ml
steril filtrieren, aliquotieren, Lagerung -20 °C	

Analgetikum

Carprofen (Rimadyl 50 mg/ml, Pfizer Inc.)	0,1 ml
0,9%ige NaCl-Lösung frisch ansetzen	4,9 ml

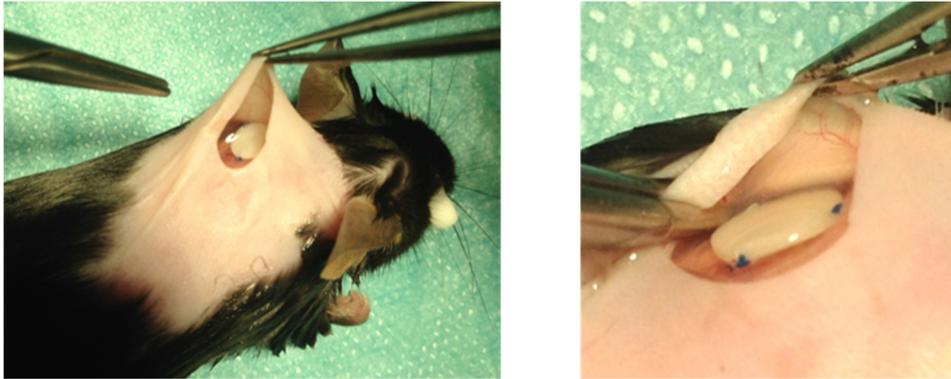


Abbildung 12: Subkutane Implantation von Prothesenstanzen in Mäusen

Die Implantation der Prothesenstanzen aus bovinem, Glutaraldehyd-fixiertem Perikardtransplantat erfolgte entsprechend eines etablierten Mausmodells (116-118). Dabei wurden je zwei Prothesenstanzen subkutan an beiden Flanken der oberen Rückenpartie implantiert. Der Eingriff wurde unter Allgemeinanästhesie durchgeführt und dauerte vom Einleiten der Narkose bis zum Schließen der Wunde etwa 45 Minuten.

2.4.6. PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG

Acht Wochen nach der Implantation der Prothesenstanzen wurden die Tiere durch Inhalation von CO₂ getötet und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Vor der Explantation des Prothesenmaterials wurde der Thorax geöffnet, das Herz frei gelegt und Vollblut durch Punktion des rechten Ventrikels entnommen. Die Koagulation des Blutes wurde durch Zugabe einer 100 mM EDTA-Lösung verhindert und die Proben bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Zur Plasmagewinnung wurde das Blut zunächst für 15 Minuten bei 800 ×g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten bei 15700 ×g und 4 °C. Das im Überstand befindliche Plasma wurde bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Nach der Blutentnahme wurde das Herz aus dem Thorax präpariert, der Apex entfernt und das Gewebe mit PBS gespült. Für histologische Untersuchungen wurde das Herz in Einbettmedium (CryoCompound, Klinipath B. V., Duiven, Niederlande) eingebettet und in 2-Methylbutan, welches zuvor in Flüssigstickstoff gekühlt wurde, eingefroren.

Für die Explantation des Prothesenmaterials wurde die Rückenpartie der Maus freigelegt und die Prothesenstanzen entsprechend ihres anschließenden Verwendungszwecks unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Oberkochen) herauspräpariert. Bei den Prothesenstanzen für die mRNA-Expressionsanalyse und die Kalziumquantifizierung wurde das umliegende Gewebe vollständig entfernt und das Präparat in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Prothesenstanzen für histologische Färbungen wurden großflächig mit umgebendem Gewebe entnommen und halbiert. Eine Hälfte wurde für Gefrierschnitte in Einbettmedium eingebettet und in Flüssigstickstoff-gekühltem 2-Methylbutan ausgehärtet. Die andere Hälfte wurde für mindesten einen Tag in 4%iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Bis zur weiteren Analyse wurden die Paraffinblöcke bei RT aufbewahrt und die restlichen Proben bei -80 °C gelagert.

EDTA-Lösung

EDTA	100 mM
0,9%ige NaCl-Lösung	10 ml

2.4.7. MULTIPLEXANALYSE VON MURINEM BLUTPLASMA

Das murine Blutplasma wurde auf die Sekretion von Zytokinen mit einem *Multiplex Immunoassay* (Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 8-plex Assay, Kat.-Nr.: M60000007A, Bio-Rad Laboratories Inc.) untersucht. Die Multiplexanalyse des murinen Plasmas wurde von Dr. Sonja Hartwig und Dr. Stefan Lehr (Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, INF- γ , TNF- α und der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) bestimmt.

In der Multiplexanalyse wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Kügelchen verschiedener Farben verwendet, wobei jede Farbvariante mit einem spezifischen Reagenz für eines der zu erfassenden Zytokine konjugiert war. Nach Bindung der Zytokine aus der Probe an die Kügelchen folgte die Markierung mit Analyt-spezifischen Detektionsantikörpern, die einen Fluoreszenzreporterfarbstoff tragen (119). Die Detektion wurde in einem auf Durchflusszytometrie basierenden System durchgeführt (Bio-Plex 200 System, Bio-Rad Laboratories Inc.). Dabei wurden die Kügelchen zum einen nach ihrer Farbe kategorisiert, zum anderen wurde die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes gemessen. Die Zytokinkonzentration wurde mit Hilfe der Software *Bio-Plex Manager* Version 6.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.) berechnet.

2.5. AUFREINIGUNG UND ANALYSE VON RNA

2.5.1. RNA-AUFREINIGUNG

2.5.1.1. RNA-AUFREINIGUNG AUS GEWEBE

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus humanen AK oder explantiertem Prothesenmaterial erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Methode (120). Dafür wurde das tiefgefrorene Gewebe mechanisch zerkleinert und in 1 ml TRI Reagenz (Sigma-Aldrich) aufgenommen. Humane AK wurden zunächst mit einem Metallhomogenisator zerkleinert und anschließend mit einem elektrischen Gewebehomogenisator (Typ D-8, Micra GmbH, Müllheim) weiter aufgeschlossen. Bei den explantierten Prothesenstanzen wurde ein vollautomatisierter Gewebehomogenisator (gentleMACS Dissociator und M Tubes, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) für den Aufschluss der Proben verwendet und dem TRI Reagenz 70 µg/ml Glykogen zugesetzt, um auch geringe Mengen RNA aus der Probe abzufangen.

Nach fünf Minuten Inkubation wurde die Probe mit 200 µl Chloroform versetzt und für weitere zehn Minuten inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 ×g unter RT. Danach wurde die wässrige Phase in 500 µl Propan-2-ol überführt und die RNA präzipitiert. RNA aus humanen AK wurde durch zehn minütige Inkubation bei RT gefällt, während RNA aus Prothesenmaterial bei 4 °C ü. N. präzipitiert wurde.

Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 12000 ×g und 4 °C sedimentiert, zweimal mit 75%igen Ethanol gewaschen und getrocknet. RNA aus humanen AK wurde in 100 µl Ribonuklease-freiem H₂O aufgenommen und nochmal mit einem kommerziellen Kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen N. V., Venlo, Niederlande) aufgearbeitet. Dabei wurde die RNA entsprechend der Herstellerangaben mit DNase verdaut, aufgereinigt und in 50 µl Ribonuklease-freiem H₂O eluiert. Die RNA aus den explantierten Prothesenstanzen wurde in 20 µl Ribonuklease-freiem H₂O aufgenommen und für fünf Minuten bei 65 °C gelöst. Bis zur weiteren Analyse wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.5.1.2. RNA-AUFREINIGUNG AUS PRIMÄREN VIC

Die RNA aus kultivierten VIC wurde mit einem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen N. V.) aufgereinigt. Bei dieser auf Säulen-basierenden Methode wird RNA an eine Membran aus Siliciumdioxid gebunden und über mehrere Waschstschritte und den Verdau mit Desoxyribonuklease aufgereinigt.

Dafür wurden primäre VIC zweimal mit PBS gewaschen und mit 350 µl RLT-Puffer mit 100 mM Dithiothreitol lysiert. Das Zelllysat wurde mit einem QIAshredder (Qiagen N. V.) homogenisiert und die RNA entsprechend der Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die RNA mit 30 µl Ribonuklease-freiem H₂O eluiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.2. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG UND REVERSE TRANSKRIPTION

Die Quantität und Qualität der aufgereinigten RNA wurden mit einem *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt.

Für die mRNA-Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer *real-time* Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde 1 µg RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die reverse Transkription wurde unter Verwendung des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen N. V.) nach Herstellerangaben durchgeführt und die cDNA mit 100 µl Reinstwasser (Milli-Q Biocel, Merck Millipore) auf eine Endkonzentration von 8,33 ng/µl verdünnt.

2.5.3. PRIMERDESIGN UND -SEQUENZEN

Die in der qPCR verwendeten Primer wurden Exongrenzen-übergreifend erstellt, um eine Amplifikation genomischer DNA zu verhindern. Als Vorlagen dienten dabei die mRNA-Sequenzen der entsprechenden Gene, die in der online Datenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologieinformation (NCBI, Bethesda, Maryland, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) zur Verfügung gestellt werden. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Primer3Plus Software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>; (121)) erstellt und anschließend auf ihre Spezifität mit der Software Primer-BLAST vom NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; (122)) überprüft. Dabei wurde, um die Amplifikation von Fehlprodukten auszuschließen, die Primersequenz mit der Gesamt-mRNA der entsprechenden Spezies abgeglichen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2 bis Tabelle 4 aufgelistet. Bezogen wurden die Primer von Eurofins Scientific SE (Luxemburg, Luxemburg).

Tabelle 2: Primersequenzen für die qPCR humaner Gene

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
<i>18S</i> (endogene Kontrolle)	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>ALPL</i>	CTACCTGTGTGGGGTGAAGG	GGTCACAATGCCACAGATT
<i>BGLAP</i>	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	CTCCCAGCCATTGATACAGG
<i>BGN</i>	GGACTCTGTACACCCACCT	CTCTTTGGGCACAGACTTCA
<i>DCN</i>	TCTTCCCCCTGACACAACCTC	TGCTCCAGGACTAACTTTGCT
<i>HAS1</i>	TACAACCAGAAGTTCCTGGG	CTGGAGGTGTACTTGGTAGC
<i>HAS2</i>	GTGGATTATGTACAGTTTGTGA	TCCAACCATGGGATCTTCTT
<i>HAS3</i>	GAGATGTCCAGATCCTCAACAA	CCCACTAATACTGCACAC
<i>LUM</i>	CTTCAATCAGATAGCCAGACTGC	AGCCAGTTCGTTGTGAGATAAAC
<i>SPP1</i>	TTGCAGTGATTTGCTTTTGC	GCCACAGCATCTGGGTATTT
<i>TGF-β</i>	CTGAACCCGTGTTGCTCTC	GAGGTATCGCCAGGAATTGT
<i>VCAN</i>	AGACTGTCAGATATCCCATCC	AATCCATAAGTCTGACTCCT

Tabelle 3: Primersequenzen für die qPCR oviner Gene

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
<i>Acta2</i>	TAGAACACGGCATCATCACC	TGAGAAGGGTTGGATGCTCT
<i>Bglap</i>	AAAGCCTGGTGTATGCAGAGT	CTCCAGCGGATCTGGGTAG
<i>Bgn</i>	TCTGCTCCGCTACTCCAAGT	TTGTTGTCCAAGTGCAGCTC
<i>Colla1</i>	AAGACATCCCACCAGTCACC	TAAGTTCGTCGCAGATCACG
<i>Dcn</i>	ATGCAGCTAGCCTGAAAGGA	GAGGAGTGTTGGCCAAAGAG
<i>Has1</i>	GTCATGTACACGGCCTTCAA	GGTCCAGCCTCGTATCTGAGT
<i>Has2</i>	TCACCCAGTTGGTCTTGTC	GGTCAAGCATGGTGTCTGAA
<i>Has3</i>	TGGAGGAGGACCCTCAAGTA	CCAAAGTAGGACTGGCAAGC
<i>Igfl</i>	CGGAGACAGGGGCTTTTATT	GCCTCCTCAGATCACAGCTC
<i>Igflr</i>	GACGGAGCCTGTGTTCTTCT	CAGAGCAATCATCAGGTGGA
<i>Insr</i>	GGCGGAAGATAGTGAGCTGTA	CACTCTGGTTGTGCTTCTGG
<i>Lum</i>	TGTTGGAGCTGGATCTCTCC	TAGGATAGGGTCCCAGGAT
<i>Rpl29</i> (endogene Kontrolle)	CCAAGTCCAAGAACCACACC	TATCGTTGTGATCGGGGTTT
<i>Slc2a1</i>	GCACCAGCTAGGCATCGT	GGGATGAAGATGACGCTCAG
<i>Slc2a2</i>	TGGACGGGCAATTTTATTAT	GTAAAGGCCAAGACCACACC
<i>Slc2a4</i>	CCCCGCTACCTCTACATCAT	CTCAGCCAACACCTCAGACA
<i>Spp1</i>	AATACCCAGATGCTGTAGCCA	TAGATCGTCTGTTTGTCTCAGG
<i>Tgf-β</i>	CTGAACCCGTGTTGCTCTC (entspricht dem humanen Primer)	GAGGTATCGCCAGGAATTGT (entspricht dem humanen Primer)
<i>Vcan</i>	CTTGGGGTGAGAACCCTGTA	TCGATGGTTGTAGCCTCTGA

Tabelle 4: Primersequenzen für die qPCR muriner Gene

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
<i>Dcn</i>	TAAAAGGTCGTGAAAATACAT	GAAGTCAAATAAGCCTCTCTG
<i>Il-1β</i>	GGATGAGGACATGAGCACCT	TAATGGGAACGTCACACACC
<i>Inf-γ</i>	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA	GCTGATGGCCTGATTGTCTT
<i>Mcp1</i>	CAGGTGTCCCAAAGAAGCTG	TGTCTGGACCCATTCTCTCT
<i>Rpl13a</i> (endogene Kontrolle)	TCCGGAAGCGGATGAATAC	CCTGGCCTCTCTTGGTCTT
<i>Spp1</i>	GCTTGGCTTATGGACTGAGG	CCTTAGACTCACCGCTCTTCA
<i>Tgf-β</i>	GGACCCTGCCCTATATTTG	CGGGTTGTGTTGGTTGTAGA
<i>Tlr2</i>	TAGGGGCTTCACTTCTCTGC	CCAAAGAGCTCGTAGCATCC
<i>Tlr4</i>	TCAGAACTTCAGTGGCTGGAT	CCTGGGGAAAACTCTGGAT
<i>Tnf-α</i>	TCGAGTGACAAGCCTGTAGC	AAGGTACAACCCATCGGCTG

2.5.4. EXPRESSIONSANALYSE MITTELS SEMI-QUANTITATIVER PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert. Für die Reaktion wurde das *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit* (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit zugesetztem Referenzfarbstoff nach Herstellerangaben verwendet, wobei jede Probe in Duplikaten gemessen wurde. Das Temperatur- und Zeitprofil der qPCR ist in Tabelle 5 angegeben. Dabei wurde für humane AK das *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) genutzt. Ansätze mit cDNA aus *in vitro* kultivierten VIC oder dem Prothesenmaterial der *In-vivo*-Experimente wurden mit dem *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) gemessen. Die endogene Kontrolle wurde spezies- und gewebespezifisch gewählt und die C_T -Werte auf Stabilität überprüft. Bei humanen Proben wurde 18S ribosomale RNA (*18S*) als Kontrolle herangezogen, während bei ovinen VIC das 60S ribosomale Protein L29 (*Rpl29*) und bei murinen Proben das ribosomale Protein L13a (*Rpl13a*) als endogene Kontrolle verwendet wurde.

Für die Auswertung der qPCR wurde die entsprechende Software des jeweiligen Geräts verwendet (*7300 Real-Time PCR System RQ Study Software Version 1.4* bzw. *StepOne Software Version 2.3*, Applied Biosystems). Ansätze, die mehrere Scheitelpunkte in der Schmelzkurve aufwiesen oder in der Doppelbestimmung mehr als einen C_T -Wert voneinander abwichen, wurden wiederholt oder von der Auswertung ausgeschlossen. Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (123). Dabei wurde die mRNA-Expression des Zielgens um die Expression der endogenen Kontrolle korrigiert. Bei den humanen AK und dem Prothesenmaterial aus den *In-vivo*-Experimenten wurde die

mRNA-Expression der einzelnen Proben auf die Expression einer Kontrollprobe bezogen. Für die Auswertung der *In-vitro*-Versuche wurde die interne Kontrolle eines jeden biologischen Replikats verwendet.

Reaktionsansatz der qPCR

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (2x konzentriert)	1x
Vorwärtsprimer	625 nM
Rückwärtsprimer	625 nM
cDNA	2,083 ng/ μ l

Tabelle 5: Temperatur- und Zeitprofil der qPCR

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Inkubation	50 °C	120 s	1
Enzymaktivierung	95 °C	120 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Primerhybridisierung und -elongation	60 °C	30 s	
Schmelzkurve	Standardprotokoll des jeweiligen Gerätes		

2.6. PROTEINBIOCHEMISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN

2.6.1. PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

2.6.1.1. PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY

Die Proteinkonzentrationen der Zellysate oder der Homogenisate der Prothesenstanzen aus den Mausexperimenten wurden mit einem kommerziellen DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc.) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der von Lowry *et al.* beschriebenen Methode, bei der Cu^{2+} unter alkalischen Bedingungen mit Peptidbindungen einen blau-violetten Komplex bildet. Zudem wird Cu^{2+} durch Oxidation aromatischer Aminosäuren in Cu^+ reduziert, welches das Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau umwandelt (124).

Bei den Analysen wurde eine Standardreihe aus 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA verwendet, welche in dem entsprechenden Puffer der Proben aufgenommen wurde. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung. Anschließend wurde die Reaktion in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M1000 PRO, Tecan Group AG) bei einer Wellenlänge von 750 nm quantifiziert und die Proteinkonzentration mit Hilfe des Standards berechnet.

2.6.1.2. COOMASSIE-BASIERTE PROTEINBESTIMMUNG NACH BGN-AUFREINIGUNG

Humanes AK-Homogenisat für die BGN-Aufreinigung wurde in einem hochmolekularen Harnstoffpuffer aufgenommen, der mit gängigen, kommerziellen Proteinbestimmungsanalysen nicht kompatibel ist. Daher wurde bei diesen Proben auf eine an Ghosh *et al.* angelehnte Methode zurückgegriffen, bei der die Proteine auf Chromatographiepapier gebunden werden (125). Anschließend werden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau, einem Triphenylmethanfarbstoff, der besonders effizient basische Aminosäuren bindet, gefärbt (126). Für die in Triplikaten durchgeführte Messung wurden etwa 1 cm² große Chromatographiepapiere (Whatman 3MM CHR, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) mit 10 µl Probe bzw. Standard (0 µg bis 20 µg BSA in DEAE-Puffer) benetzt und für zehn Minuten getrocknet. Anschließend wurden die Filterpapiere mit 500 µl Coomassie-Färbelösung in einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten für zehn Minuten gefärbt. Ungebundenes Coomassie wurde durch dreimaliges Waschen mit 500 µl Entfärbelösung für jeweils fünf Minuten entfernt und die Chromatographiepapiere in neue Mikrotiterplatten überführt. Der an die Proteine gebundene Farbstoff wurde mit 1 ml 3%iger SDS-Lösung ü. N. aus dem Chromatographiepapier extrahiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption der Proben mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Synergy Mx, BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA) bei 590 nm gemessen und auf die Werte der Standardreihe bezogen.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliantblau G-250	250 mg
Methanol	40 %
Essigsäure	10 %
dH ₂ O	ad 100 ml

Entfärbelösung

Methanol	20 %
Essigsäure	7 %
dH ₂ O	ad 250 ml

3%ige SDS-Lösung

SDS	6 g
Natriumdodecylsulfat	
dH ₂ O	ad 200 ml

2.6.2. NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Für die quantitative Analyse von Proteinen wurden Zelllysate und AK-Homogenisate nach BGN-Aufreinigung in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (127) und anschließend über Western-Blot-Analysen auf die Expression spezifischer Proteine untersucht. Bei der Auftrennung wurden 10 µg bis 20 µg Zelllysate oder 10 µl des aufgereinigten und verdauten AK-Homogenisats mit 4x Protein-Geladepuffer (Roti-Load 1 reduzierend, Kat.-Nr.: K929.1, Carl Roth) versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt. Der Nachweis von GLUT-1 in ovinen VIC erfolgte in nicht-denaturierten Proben. Zusammen mit einem Proteingrößenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Kat.-Nr.: 26616, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aus Trenn- und Sammelgel aufgetragen, das in einer Elektrophoresekammer (Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories Inc.) mit Laufpuffer eingespannt war. Die Zusammensetzung der in der SDS-PAGE verwendeten Gele ist in Tabelle 6 aufgeführt. Für die Konzentrierung der Proteinkomplexe an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel wurde eine konstante Spannung von 80 V verwendet, während für die Auftrennung entsprechend der Masse der Proteine 130 V angelegt wurden.

Laufpuffer der SDS-PAGE

Glycin	200 mM
Tris base	25 mM
SDS	0,1 %
dH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 6: Gelzusammensetzung der SDS-PAGE für Western-Blot-Analysen

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
40 % Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	1,875 ml	562,5 µl
1 M Tris base in dH ₂ O (pH 6,8)	-	562,5 µl
1,5 M Tris base in dH ₂ O (pH 8,8)	1,875 ml	-
10 % SDS (w/v in dH ₂ O)	75 µl	45 µl
dH ₂ O	3,6 ml	3,263 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v in dH ₂ O)	75 µl	45 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 µl	5 µl

2.6.3. WESTERN-BLOT-ANALYSE

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot-Analysen detektiert und quantifiziert (128). Dabei wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel durch elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Protran 0,2 μm NC, GE Healthcare Life Sciences) übertragen. Der Transfer wurde in einem Elektroblogger (Peqlab Biotechnologie GmbH) unter Verwendung von Transferpuffer und Chromatographiepapier (Whatman 3MM CHR, GE Healthcare Life Sciences) nach dem *semi-dry* Verfahren durchgeführt. Der Übertrag der Proteine wurde auf eine Stunde und 15 Minuten bei maximal 14 V, 1000 mA und 32 W begrenzt. Nach dem Transfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer 5%igen BSA-Blockierungslösung für eine Stunde bei RT blockiert.

Die Inkubation mit Zielprotein-spezifischen Primärantikörpern wurde bei 4 °C ü. N. durchgeführt. Überschüssige Primärantikörper wurden am nächsten Morgen durch dreimaliges Waschen mit Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBST) für je fünf Minuten entfernt. Anschließend wurden die Primärantikörper mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern gebunden und die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungs- und Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgelistet.

Das Fluoreszenzsignal wurde mit einem *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA) detektiert und mit der Software *Image Studio Lite* Version 5.2 (LI-COR Biosciences Inc.) ausgewertet. Die um den Hintergrund korrigierte, integrierte Intensität wurde als Maß für die Menge an exprimiertem Protein herangezogen. Bei Zelllysaten wurden die ermittelten Intensitäten unter Verwendung von Ladekontrollen, β -Aktin oder β -Tubulin, auf die Menge des eingesetzten Probenmaterials korrigiert. Die BGN-Expression des AK-Homogenisats wurde hingegen auf die Proteinkonzentration des Ausgangslysats bezogen, da klassische Ladekontrollen nach der Anionenaustausch-Chromatographie aus den Proben entfernt wurden (siehe 2.6.1.2).

Transferpuffer

Glycin	200 mM
Tris base	25 mM
Methanol	20 %
dH ₂ O	ad 1 l

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST, pH 7,6)

Tris base	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	0,1 %
dH ₂ O	ad 1 l

5%ige BSA-Blockierungslösung

BSA	2,5 g
TBST	ad 50 ml

Tabelle 7: Primärantikörper für Western-Blot-Analysen

Antigen	Spezies	Verdünnung	Inkubationszeit, -temperatur	Hersteller Artikelnummer
BGN	Maus	1:500 in 3 % BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) Kat.-Nr.: sc-100857
AKT	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK) Kat.-Nr.: 4691
pAKT (Ser473)	Kaninchen	1:2500 in 5 % BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling Technology Kat.-Nr.: 4060
GSK-3 α/β	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Cell Signaling Technology Kat.-Nr.: 5676
pGSK-3 α/β (Ser21/9)	Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Lifespan Biosciences Inc. (Seattle, Washington, USA) Kat.-Nr.: LS-C7154
GLUT-1	Kaninchen	1:2500 in 5 % BSA/TBST	ü. N., 4 °C	Abcam PLC (Cambridge, UK) Kat.-Nr.: ab14683
β -Aktin	Maus	1:10000 in TBST	30 Minuten, RT	Sigma-Aldrich Kat.-Nr.: A5316
β -Tubulin	Maus	1:10000 in TBST	30 Minuten, RT	Sigma-Aldrich Kat.-Nr.: T7816

Tabelle 8: Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

Antigen	Spezies	Verdünnung	Inkubationszeit, -temperatur	Hersteller Bestellnummer
<i>anti-rabbit</i> <i>IRDye 800 CW</i>	Ziege	1:10000 in TBST	1 Stunde, RT	LI-COR Biosciences Inc. Kat.-Nr.: 926-322 11
<i>anti-mouse</i> <i>IRDye 800 CW</i>	Ziege	1:10000 in TBST	30 Minuten - 1 Stunde, RT	LI-COR Biosciences Inc. Kat.-Nr.: 926-322 10
<i>anti-mouse</i> <i>IRDye 680 LT</i>	Ziege	1:10000 in TBST	30 Minuten, RT	LI-COR Biosciences Inc. Kat.-Nr.: 926-680 20

2.6.4. KALZIUMQUANTIFIZIERUNG

Kalziumakkumulationen in der Zellkultur oder in explantierten Prothesenstanzen wurden mit einem *Calcium Assay Kit* (Kat.-Nr.: KA1644, Abnova Corporation, Taipeh, Taiwan) quantifiziert. Dabei bildet der Farbstoff Phenolsulfonphthalein mit freiem Ca^{2+} einen stabilen, blauen Komplex, der spektralphotometrisch gemessen werden kann.

Für die Kalziumquantifizierung wurden ovine VIC zweimal mit PBS gewaschen, in 50 μl Tris-HCl-Puffer aufgenommen und für 15 Minuten in einem eisgekühlten Ultraschallbad aufgeschlossen. Die Prothesenstanzen aus den Mausexperimenten wurden mit einem in Flüssigstickstoff gekühltem Metallhomogenisator zerkleinert und in 70 μl Tris-HCl-Puffer suspendiert. Anschließend wurden die Lysate für 20 Minuten bei 18000 $\times g$ und 4 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand mit dem gelösten Kalzium abgenommen. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M1000 PRO, Tecan Group AG) bei einer Wellenlänge von 612 nm. Die Kalziumkonzentration der Proben wurde anhand des mitgelieferten Standards (0 mg/dl bis 20 mg/dl in Tris-HCl-Puffer) berechnet und auf die Proteinkonzentration des entsprechenden Lysats bezogen.

Tris-HCl-Puffer (pH 7,0)

Tris-HCl	100 mM
Triton X-100	1 %
dH ₂ O	ad 50 ml

2.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* Version 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) dargestellt. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden die Daten der Vergleichsgruppen als signifikant unterschiedlich erachtet.

Kategoriale Variablen, wie beispielsweise Geschlecht oder Primärindikation bei den Patientendaten, wurden bei zwei Vergleichsgruppen mit einem *Fisher's exact test* und bei mehr als zwei Gruppen mit einem *chi-square test* (χ^2 -Test) verglichen.

Kardinale Variablen, wie beispielsweise Alter oder experimentell erhobene Messgrößen, wurden zunächst mit einem *D'Agostino-Pearson test* auf parametrische Verteilung untersucht. Dabei zeigten alle erhobenen Datensätze eine nicht-parametrische Verteilung. Daher wurden

Vergleiche zwischen zwei Gruppen mit einem ungepaarten, zweiseitigen *Mann-Whitney U test* durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurden die Daten mit einem *Kruskal-Wallis test* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* analysiert.

Daten, die auf eine eigene Kontrolle bezogen wurden (z. B. fibrotische und kalzifizierte Anteile derselben Tasche oder die mRNA-Expression behandelter VIC gegen unbehandelte VIC der Kontrollgruppe), wurden bei zwei Vergleichsgruppen mit einem gepaarten *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* untersucht oder bei mehr als zwei Gruppen mit einem *Friedman test* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* ausgewertet.

Bei der Analyse von zwei beeinflussenden Variablen, wie beispielsweise bei der AKT-Phosphorylierung die fünftägige Behandlung der VIC und die AI-Stimulation am letzten Tag oder bei der Zellzahl die Behandlung der Zellen und die Dauer der Kultivierung, wurde eine *two-way analysis of variance (ANOVA)* mit anschließendem *Tukey's* oder *Sidak's multiple comparisons test* verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. EZM-UMBAU IN HUMANEN AK

Die DAVD zeichnet sich unter anderem durch starke morphologische Veränderungen der AK-Taschen aus, die zu einer Beeinträchtigung der AK-Funktion und letztlich zu Herzinsuffizienz führen können. Um die strukturellen Veränderungen der AK im Verlauf der Krankheit besser zu verstehen, wurde im Rahmen des Promotionsprojekts der EZM-Umbau in humanen AK mit unterschiedlichen Degenerationsgraden untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von T2D als Risikofaktor für eine frühzeitige Erkrankung auf die Expression von EZM-Molekülen näher analysiert.

3.1.1. KLINISCHE PARAMETER DER UNTERSUCHTEN PATIENTENKOHORTE

Die mRNA-Expression verschiedener EZM-Komponenten in Abhängigkeit des Degenerationsgrads und der Erkrankung an T2D wurde in einer umfassenden Patientenkohorte mit 158 Patienten untersucht. Dabei erfolgte die Patientenauswahl retrospektiv und nicht-randomisiert anhand der Morphologie der AK-Taschen und der Diagnose T2D. In die Analyse wurden ausschließlich Taschen mit einheitlicher Struktur aufgenommen und entsprechend des Degenerationsgrads in unveränderte, fibrotische und kalzifizierte AK unterteilt (Abbildung 8). Unveränderte AK wurden von Empfängern orthotoper Herztransplantationen (88 %) oder nach AK-Ersatz wegen Regurgitation (12 %) gewonnen. Patienten der fibrotischen Gruppe wiesen diverse Primärindikationen wie Stenose (61 %), Regurgitation (26 %) oder Operationen an der Aorta (3 %) auf, die einen AK-Ersatz zur Folge hatten. Zudem stammten 10 % der fibrotischen AK von Patienten nach orthotoper Herztransplantation. AK der kalzifizierten Gruppe wurden nach AK-Ersatz aufgrund einer AK-Stenose gewonnen (Tabelle 9).

Die Zusammensetzung der einzelnen Untersuchungskohorten samt den klinischen Parametern der Patienten sind in Tabelle 9 dargestellt. Patienten mit degenerierten AK wiesen ein höheres Alter und einen höheren Körpermasseindex auf im Vergleich zu Patienten mit unveränderten AK-Taschen. Zudem traten die kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie und Dyslipoproteinämie bei Patienten mit degenerierten AK gehäuft auf. Gemessen an der glomerulären Filtrationsrate unterschieden sich die Untersuchungskohorten außerdem in der Nierenfunktion. Während Patienten mit degenerierten AK oft eine milde chronische

Nierenerkrankung aufwiesen, hatten Patienten mit unveränderten AK signifikant öfter eine moderate bis schwere chronische Nierenerkrankung. Dies zeigte sich auch bei einem direkten Vergleich des Serumkreatinins. Patienten mit unveränderten AK wiesen im Vergleich zu Patienten mit degenerierten AK-Taschen erhöhte Serumkreatininwerte auf. Außerdem wurden Patienten mit unveränderten AK häufiger mit oralen Langzeit-Antikoagulanzen behandelt. Alle weiteren erhobenen klinischen Parameter waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den untersuchten Gruppen.

Tabelle 9: Patientenkohorte für die Analyse kompletter AK-Taschen

Angegeben sind die klinischen Parameter der Patienten, die in die Analyse vollständiger AK-Taschen eingeflossen sind. Die Kohorte wurde entsprechend des Degenerationsgrads der Taschen in unverändert, fibrotisch und kalzifiziert eingeteilt. Kategoriale Variablen sind als Anzahl der betroffenen Patienten mit prozentualer Angabe zur Gesamtzahl der Gruppe in Klammern aufgeführt. Die statistische Auswertung kategorialer Daten erfolgt mit einem *chi-square test* zwischen allen drei Gruppen und einem *Fisher's exact test* zwischen zwei Vergleichsgruppen. Kardinale Variablen sind als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst und wurden mit einem *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test* statistisch ausgewertet. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den Vergleich aller drei Gruppen. * signifikant unterschiedlich zu unveränderten AK ($p \leq 0,05$), # signifikant unterschiedlich zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK ($p \leq 0,05$) Abkürzungen: GFR - glomeruläre Filtrationsrate entsprechend der MDRD-Formel (Änderung der Ernährung bei Nierenerkrankungen, *modification of diet in renal disease*), CKD - chronische Nierenerkrankung, *chronic kidney disease*, ACE - Angiotensin-konvertierendes Enzym, *angiotensin-converting enzyme*, n. a. - nicht auswertbar

	alle Patienten (n = 158)	unverändert (n = 17)	fibrotisch (n = 69)	kalzifiziert (n = 72)	p-Wert
Geschlecht [männlich], n (%)	93 (59)	13 (76)	39 (57)	41 (57)	0,2949
Alter [Jahre]	71 \pm 0,8	55 \pm 3,1	72 \pm 1,1*	75 \pm 0,7*	< 0,0001
Körpermasseindex [kg/m ²]	27 \pm 0,4	24 \pm 0,9	27 \pm 0,6*	28 \pm 0,6*	0,0030
Primärindikation, n (%)					
Stenose	114 (72)	0 (0)	42 (61)*#	72 (100)*#	< 0,0001
Regurgitation	20 (13)	2 (12)	18 (26)#	0 (0)*#	< 0,0001
Herztransplantationsempfänger	22 (14)	15 (88)	7 (10)*#	0 (0)*#	< 0,0001
Operationen an der Aorta	2 (1)	0 (0)	2 (3)	0 (0)	n. a.
kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)					
Raucher oder ehemalige Raucher	72 (46)	5 (31)	35 (51)	32 (44)	0,2773
arterielle Hypertonie	129 (82)	8 (50)	61 (88)*	61 (85)*	0,0003
T2D	67 (42)	6 (35)	28 (41)	33 (46)	0,6728
davon insulinabhängiger T2D	15 (22)	1 (17)	7 (25)	7 (21)	0,8622
Dyslipoproteinämie	111 (70)	6 (35)	55 (80)*	59 (82)*	0,0002

	alle Patienten (n = 158)	unverändert (n = 17)	fibrotisch (n = 69)	kalzifiziert (n = 72)	p-Wert
Komorbiditäten, n (%)					
Nierenfunktion (GFR)					
normal (> 90 ml/min)	37 (23)	5 (29)	15 (22)	17 (24)	0,7983
milde CKD (60-89 ml/min)	88 (56)	4 (24)	39 (57)*	45 (63)*	0,0143
moderate/schwere CKD (< 60 ml/min)	33 (21)	8 (47)	15 (22)*	10 (14)*	0,0100
koronare Herzkrankheit	101 (64)	9 (53)	47 (68)	45 (63)	0,4775
extrakardiale Gefäßerkrankungen	36 (23)	2 (13)	20 (29)	14 (19)	0,2332
Medikamente, n (%)					
Statine	89 (56)	9 (53)	41 (59)	39 (54)	0,7248
Diuretika	77 (49)	7 (41)	39 (57)	31 (43)	0,1889
ACE-Inhibitoren	79 (50)	9 (53)	37 (54)	33 (46)	0,5822
β-Adrenozeptor-Antagonisten	88 (56)	12 (71)	40 (58)	36 (50)	0,2540
Antikoagulanzen					
orale Langzeitbehandlung	35 (22)	11 (65)	13 (19)*	11 (15)*	< 0,0001
Acetylsalicylsäure	101 (64)	9 (53)	47 (68)	45 (63)	0,4178
Laborwerte					
Blutglukose [mg/dl]	126 ± 3,2	129 ± 9,3	123 ± 4,2	129 ± 5,2	0,8951
Serumkreatinin [mg/dl]	0,93 ± 0,032	1,26 ± 0,095	0,95 ± 0,062*	0,84 ± 0,02*	0,0002
Thrombozyten [×1000/μl]	229 ± 6,1	213 ± 22,7	246 ± 9,5	216 ± 8,1	0,0841
Leukozyten [×1000/μl]	8,5 ± 0,74	7,7 ± 0,5	7,8 ± 0,26	9,3 ± 1,62	0,8474
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,8 ± 0,09	1,1 ± 0,27	0,9 ± 0,18	0,6 ± 0,08	0,0584

Zusätzlich zum Degenerationsgrad wurde der Einfluss von T2D auf den EZM-Umbau in humanen AK analysiert. Dafür wurde die Patientenkohorte in Patienten ohne und mit T2D unterteilt und innerhalb ihres Degenerationsgrads verglichen. Auf eine Unterteilung unveränderter AK wurde aufgrund der geringen Probenanzahl verzichtet und sich auf die Auswirkungen von T2D in degenerierten AK-Taschen konzentriert.

Die klinischen Parameter der Untersuchungskohorten zeigen klassische Charakteristika eines T2D auf und sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Sowohl bei den fibrotischen als auch bei den kalzifizierten AK hatten Diabetiker signifikant erhöhte Blutglukosespiegel. Außerdem waren Patienten mit T2D in der fibrotischen Gruppe öfter von einer Dyslipoproteinämie betroffen und wiesen in der kalzifizierten Gruppe einen erhöhten Körpermasseindex auf. Diabetiker mit kalzifizierten AK hatten zudem eine schlechtere Nierenfunktion gemessen an der glomerulären Filtrationsrate. Während Nicht-Diabetiker mit kalzifizierten AK oft von einer milden chronischen Nierenerkrankung betroffen waren, zeigten Diabetiker eine signifikant erhöhte Inzidenz für eine moderate bis schwere Nierenerkrankung. Darüber hinaus zeigten sich Unterschiede in der Medikamenteneinnahme. Diabetiker mit kalzifizierten AK nahmen signifikant öfter Statine ein und Patienten mit fibrotischen AK und T2D wurden häufiger mit Diuretika behandelt.

Tabelle 10: Patientenkohorte für die Analyse kompletter AK-Taschen mit Unterteilung nach T2D

Neben dem Degenerationsgrad der AK-Taschen wurde die Patientenkohorte in Nicht-Diabetiker und Diabetiker unterteilt und die klinischen Parameter der Untersuchungskohorten gegenübergestellt. Kategoriale Variablen sind als Anzahl der betroffenen Patienten mit prozentualer Angabe zur Gesamtzahl der Gruppe in Klammern aufgeführt und wurden mit einem *chi-square test* zwischen allen vier Gruppen und einem *Fisher's exact test* zwischen Patienten ohne und mit T2D innerhalb des gleichen Degenerationsgrads ausgewertet. Kardinale Variablen sind als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst und wurden mit einem *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test* analysiert. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den Vergleich aller vier Gruppen. * signifikant unterschiedlich zu ohne T2D des gleichen Degenerationsgrads ($p \leq 0,05$) Abkürzungen: GFR - glomeruläre Filtrationsrate entsprechend der MDRD-Formel (Änderung der Ernährung bei Nierenerkrankungen, *modification of diet in renal disease*), CKD - chronische Nierenerkrankung, *chronic kidney disease*, ACE - Angiotensin-konvertierendes Enzym, *angiotensin-converting enzyme*, n. a. - nicht auswertbar

	fibrotische AK-Taschen		kalzifizierte AK-Taschen		p-Wert
	ohne T2D (n = 41)	mit T2D (n = 28)	ohne T2D (n = 39)	mit T2D (n = 33)	
Geschlecht [männlich], n (%)	22 (54)	17 (61)	24 (62)	17 (52)	0,7839
Alter [Jahre]	71 \pm 1,6	72 \pm 1,5	77 \pm 0,8	73 \pm 1,1	0,0557
Körpermasseindex [kg/m ²]	26 \pm 0,7	29 \pm 1,0	26 \pm 0,7	31 \pm 0,9*	0,0006
Primärindikation, n (%)					
Stenose	18 (44)	24 (86)*	39 (100)	33 (100)	< 0,0001
Regurgitation	17 (41)	1 (4)*	0 (0)	0 (0)	< 0,0001
Herztransplantationsempfänger	4 (10)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0,0522
Operationen an der Aorta	2 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,1756
kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)					
Raucher oder ehemalige Raucher	22 (54)	14 (50)	20 (51)	11 (33)	0,3114
arterielle Hypertonie	36 (88)	25 (89)	31 (80)	30 (91)	0,4860
Dyslipoproteinämie	28 (68)	27 (96)*	30 (77)	29 (88)	0,0185
Komorbiditäten, n (%)					
Nierenfunktion (GFR)					
normal (> 90 ml/min)	9 (22)	6 (21)	7 (18)	10 (30)	0,6531
milde CKD (60-89 ml/min)	22 (54)	17 (61)	30 (77)	15 (45)*	0,0417
moderate/schwere CKD (< 60 ml/min)	10 (24)	5 (18)	2 (5)	8 (24)*	0,0916
koronare Herzkrankheit	28 (68)	19 (68)	22 (56)	23 (70)	0,5970
extrakardiale Gefäßerkrankungen	7 (17)	13 (46)	10 (26)	4 (12)	0,0250
Medikamente, n (%)					
Statine	21 (51)	20 (71)	16 (41)	23 (70)*	0,0274
Diuretika	19 (46)	20 (71)*	14 (36)	17 (52)	0,0369
ACE-Inhibitoren	21 (51)	16 (57)	14 (36)	19 (58)	0,2169
β -Adrenozeptor-Antagonisten	23 (56)	17 (61)	20 (51)	16 (48)	0,7771
Antikoagulanzen					
orale Langzeitbehandlung	5 (12)	8 (29)	6 (15)	5 (15)	0,3238
Acetylsalicylsäure	28 (68)	19 (68)	23 (59)	22 (67)	0,8114
Laborwerte					
Blutglukose [mg/dl]	107 \pm 3,3	146 \pm 7,2*	107 \pm 5,5	153 \pm 7,3*	< 0,0001
Serumkreatinin [mg/dl]	0,91 \pm 0,039	1,01 \pm 0,143	0,83 \pm 0,023	0,86 \pm 0,035	0,5919
Thrombozyten [$\times 1000/\mu$ l]	238 \pm 10,0	256 \pm 18,3	221 \pm 10,4	210 \pm 12,7	0,1927
Leukozyten [$\times 1000/\mu$ l]	7,8 \pm 0,35	7,9 \pm 0,41	7,4 \pm 0,35	11,5 \pm 3,46	0,6310
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,9 \pm 0,27	0,8 \pm 0,21	0,6 \pm 0,14	0,6 \pm 0,07	0,1552

3.1.2. EINFLUSS DES DEGENERATIONSGRADS AUF DIE mRNA-EXPRESSION VON EZM-MOLEKÜLEN

3.1.2.1. UNTERSUCHUNG KOMPLETTER AK-TASCHEN

Die Expression von EZM-Molekülen in Abhängigkeit vom Degenerationsgrad wurde in der unter 3.1.1 beschriebenen Patientenkohorte untersucht. Dabei ging von jedem Patienten eine vollständige Tasche seiner AK in die Untersuchungen ein, wobei ausschließlich AK-Taschen mit einer homogenen Morphologie verwendet wurden. Entsprechend der Ausprägung der Degeneration wurde zwischen unveränderten, fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen unterschieden. Die mRNA-Expression wurde semi-quantitativ mittels PCR gemessen und die Expression der einzelnen Proben auf die Expression eines Patienten mit unveränderter AK bezogen.

Um die osteogene Differenzierung und die damit verbundene Degeneration der AK-Taschen zu charakterisieren, wurde zunächst die mRNA-Expression verschiedener Degenerationsmarker untersucht (Abbildung 13). Dabei zeigte der frühe Degenerationsmarker *ALPL* sowohl in fibrotischen ($2,33 \pm 0,22$) als auch in kalzifizierten AK ($1,66 \pm 0,12$) eine signifikante Hochregulation im Vergleich zu strukturell unveränderten AK ($0,69 \pm 0,19$). Auch *SPPI*, dessen Rolle bei der Biomineralisierung und Inflammation umfassend beschrieben ist (29), war in degenerierten AK stufenweise hochreguliert, mit der höchsten Expression in kalzifizierten AK-Taschen (unverändert: $2,30 \pm 0,93$; fibrotisch: $13,80 \pm 1,91$; kalzifiziert: $45,28 \pm 3,40$). Die mRNA-Expression von *BGLAP*, ein Marker für Osteoblasten-Differenzierung und aktive Mineralisierung (29), war in degenerierten AK graduell erhöht, jedoch nicht signifikant (unverändert: $3,61 \pm 0,66$; fibrotisch: $4,53 \pm 0,32$; kalzifiziert: $6,18 \pm 0,70$). Das Zytokin *TGF- β* , der die Kalzifizierung von valvulären Zellen anregt (129), wies ebenfalls in degenerierten AK eine erhöhte mRNA-Expression auf (unverändert: $2,04 \pm 0,49$; fibrotisch: $3,58 \pm 0,23$; kalzifiziert: $3,32 \pm 0,20$).

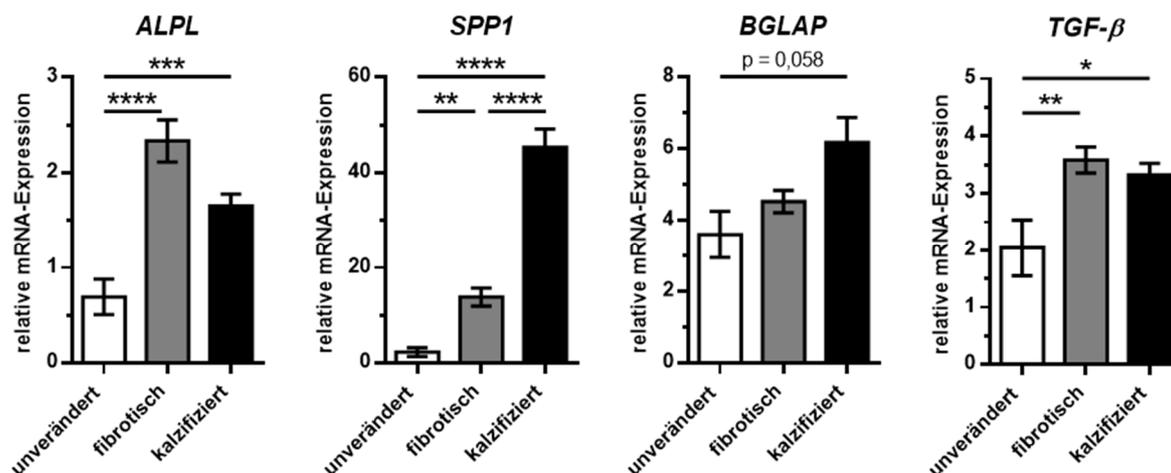


Abbildung 13: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern in humanen AK-Taschen

Die relative mRNA-Expression der Degenerationsmarker *ALPL*, *SPP1*, *BGLAP* und *TGF-β* wurde in verschieden stark degenerierten humanen AK-Taschen bestimmt. Dabei wurden die Proben entsprechend ihres Degenerationsgrads in strukturell unveränderte ($n = 17$), fibrotische ($n = 69$) und kalzifizierte AK ($n = 72$) unterteilt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zu einer unveränderten Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Einen wesentlichen Bestandteil der EZM von AK bilden Proteoglykane (84). Diese verleihen der Klappe nicht nur Stabilität und Elastizität, sondern sind auch an pathogenen Prozessen wie Lipidakkumulation und der Aktivität von Immunzellen beteiligt (84). Die mRNA-Expressionsanalyse ausgewählter Proteoglykane in humanen AK zeigte, dass vor allem *BGN* zwischen verschiedenen Stadien der Degeneration reguliert ist (Abbildung 14). Im Vergleich zu unveränderten AK ($1,90 \pm 0,44$) war die mRNA-Expression in degenerierten AK-Taschen signifikant erhöht. Dabei zeigten kalzifizierte AK ($2,98 \pm 0,16$) jedoch eine geringere *BGN*-Expression als fibrotische AK ($3,63 \pm 0,20$). Auch *DCN*, ein Gen, das ein dem *BGN* nah verwandtes Proteoglykan codiert, war in kalzifizierten Taschen ($1,81 \pm 0,09$) niedriger exprimiert als in fibrotischen AK ($2,33 \pm 0,10$). Verglichen mit unveränderten AK ($2,23 \pm 0,28$) wurden wiederum keine mRNA-Expressionsunterschiede detektiert. *LUM*, welches einen weiteren Vertreter der kleinen leucinreichen Proteoglykane codiert, war in AK-Taschen verschiedener Degenerationsgrade nicht reguliert (unverändert: $2,72 \pm 0,49$; fibrotisch: $2,12 \pm 0,11$; kalzifiziert: $2,03 \pm 0,06$). Neben den kleinen Proteoglykanen wurde mit *VCAN* ebenfalls das Gen eines Vertreters der großen Proteoglykane untersucht. Die mRNA-Expression von *VCAN* war in fibrotischen AK ($2,44 \pm 0,13$) signifikant erhöht im

Vergleich zu unveränderten AK ($1,63 \pm 0,31$). Im Trend ($p = 0,055$) wurde dies auch für kalzifizierte AK-Taschen ($1,99 \pm 0,10$) detektiert.

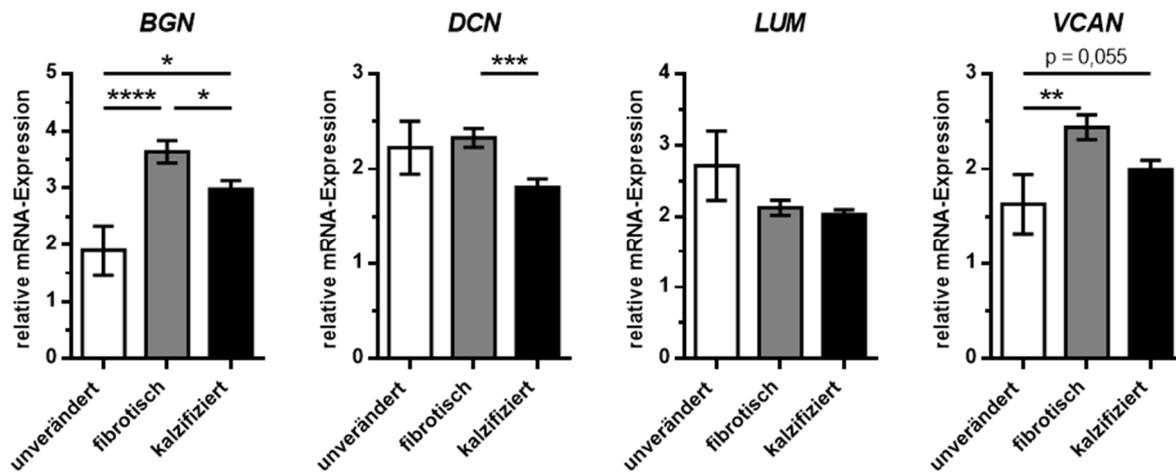


Abbildung 14: mRNA-Expression von Proteoglykanen in humanen AK-Taschen

Humane AK-Taschen unterschiedlicher Degenerationsgrade wurden auf die mRNA-Expression der Proteoglykane *BGN*, *DCN*, *LUM* und *VCAN* untersucht. Dabei erfolgte eine Unterteilung in unveränderte ($n = 17$), fibrotische ($n = 69$) und kalzifizierte Proben ($n = 72$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zu einer unveränderten Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Neben den Proteoglykanen übernimmt HA, als weiterer Bestandteil der EZM, wichtige Strukturfunktionen und interagiert mit diversen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. So beeinflusst HA unter anderem die Proliferation und Apoptose von VIC, Prozesse die sich ebenfalls auf die Degeneration der AK auswirken (130). Inwiefern die HA-Synthese durch den Krankheitsverlauf beeinflusst ist, wurde durch mRNA-Expressionsanalysen der drei HA-Synthese-Isoformen *HAS1-3* eruiert (Abbildung 15).

Es ist bekannt, dass sich die Expressionsstärke der drei Isoformen zwischen verschiedenen Zelltypen unterscheidet (131). Ein direkter Vergleich der ΔC_T -Werte ($C_T \text{ HAS} - C_T \text{ 18S}$) in unveränderten AK-Taschen zeigte, dass *HAS2* deutlich stärker von valvulären Zellen exprimiert wird als die beiden anderen Isoformen ($\Delta C_T \text{ HAS1}$: $13,98 \pm 0,48$; $\Delta C_T \text{ HAS2}$: $9,27 \pm 0,47$; $\Delta C_T \text{ HAS3}$ $14,93 \pm 0,39$; Abbildung 15A). Berechnet nach $2^{-\Delta C_T}$ entspricht dies einem Anteil von 94,54 % von *HAS2* an der Gesamtexpression der HA-Synthesen. *HAS1* und *HAS3* waren mit jeweils 3,60 % und 1,86 % hingegen deutlich geringer exprimiert (Abbildung 15B).

Die mRNA-Expression von *HAS2* ist zudem abhängig vom Degenerationsgrad und verringert sich stufenweise im Vergleich zwischen unveränderten ($6,54 \pm 2,56$) und fibrotischen ($5,86 \pm 0,44$) sowie zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen ($3,28 \pm 0,27$). Die *HAS1*-Expression zeigt hingegen keine Abhängigkeit vom Degenerationsgrad (unverändert: $0,73 \pm 0,23$; fibrotisch: $0,92 \pm 0,12$; kalzifiziert: $0,71 \pm 0,08$). Bei *HAS3* wurde eine verringerte mRNA-Expression zwischen fibrotischen ($1,45 \pm 0,11$) und kalzifizierten AK ($0,95 \pm 0,06$) festgestellt, jedoch keine Unterschiede zu unveränderten AK-Taschen ($2,74 \pm 1,14$; Abbildung 15C).

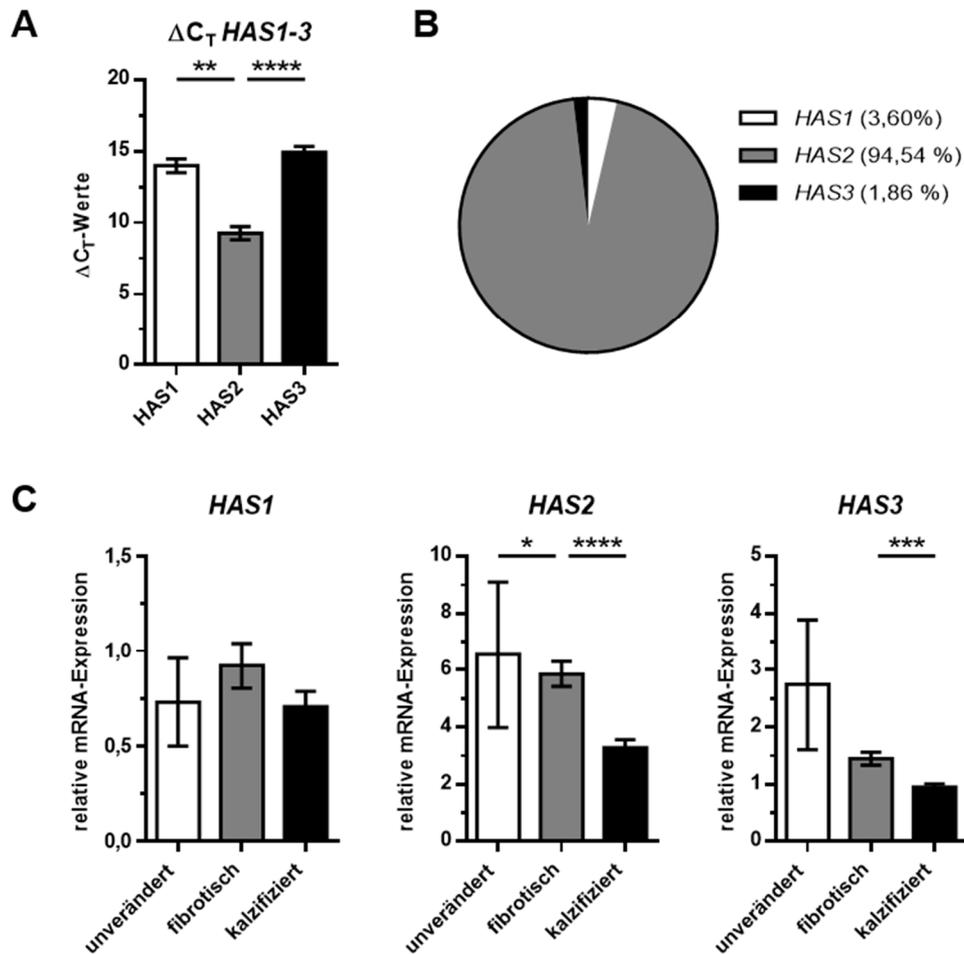


Abbildung 15: mRNA-Expression von HA-Synthasen in humanen AK-Taschen

A: Vergleich des mRNA-Expressionsverhältnisses der drei HA-Synthase-Isoformen *HAS1-3* in strukturell unveränderten, humanen AK-Taschen. Dargestellt sind die ΔC_T -Werte (C_T HAS - C_T 18S) der einzelnen Isoformen als Mittelwerte \pm SEM ($n = 17$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Friedman test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$. **B:** Die ΔC_T -Werte der einzelnen *HAS* entsprechen dem im Kreisdiagramm angegebenen Anteil an der Gesamtexpression (berechnet nach $2^{-\Delta C_T}$). **C:** Relative mRNA-Expression der HA-Synthasen *HAS1-3* in humanen AK-Taschen mit unveränderter ($n = 17$), fibrotischer ($n = 69$) und kalzifizierter Morphologie ($n = 72$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zu einer unveränderten Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

3.1.2.2. UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER DEGENERATIONSGRAD E INNERHALB DERSELBEN AK-TASCHE

DAVD ist oft von Komorbiditäten wie arterieller Hypertonie, kardialer oder extrakardialer Gefäßerkrankungen oder eingeschränkter Nierenfunktion begleitet, wodurch die oft älteren Patienten eine Vielzahl an Medikamenten einnehmen. Um den Einfluss der verschiedenen patientenabhängigen Parameter auf die mRNA-Expression zwischen den Vergleichsgruppen

kongruent zu halten, wurden in einer kleineren Patientenkohorte AK mit inhomogener Morphologie untersucht. Dafür wurden die AK-Taschen in fibrotische und kalzifizierte Anteile präpariert und die mRNA-Expression von Degenerationsmarkern und EZM-Molekülen in Abhängigkeit vom Degenerationsgrad analysiert.

Alle untersuchten Degenerationsmarker, *ALPL* (fibrotisch: $2,02 \pm 0,30$; kalzifiziert: $7,75 \pm 1,10$), *SPP1* (fibrotisch: $6,41 \pm 1,96$; kalzifiziert: $261,31 \pm 63,28$), *BGLAP* (fibrotisch: $1,28 \pm 0,14$; kalzifiziert: $3,55 \pm 0,48$) und *TGF- β* (fibrotisch: $1,10 \pm 0,12$; kalzifiziert: $2,57 \pm 0,29$), zeigten im kalzifizierten Anteil eine deutliche Hochregulation der mRNA-Expression im Vergleich zum fibrotischen Anteil (Abbildung 16).

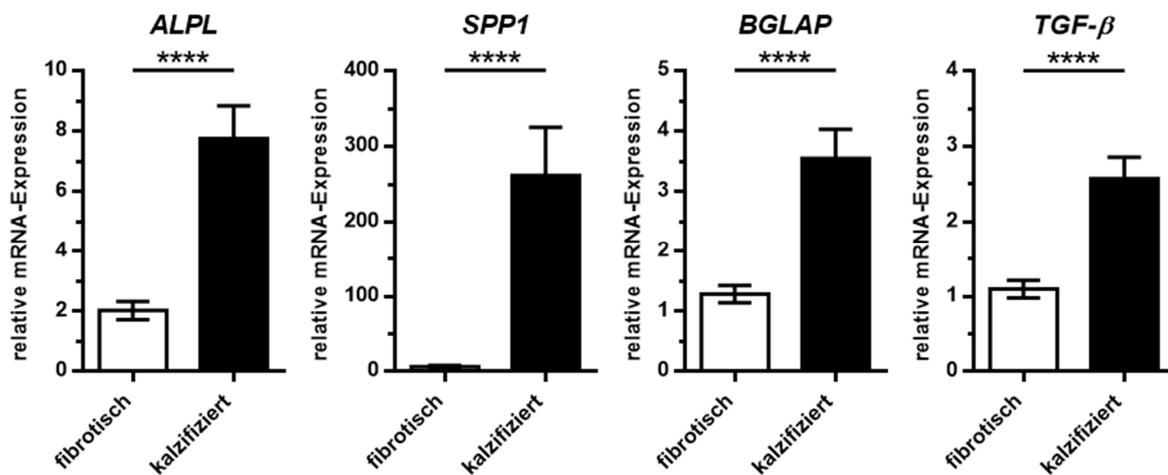


Abbildung 16: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern in fibrotischen und kalzifizierten Bereichen derselben AK-Tasche

Die relative mRNA-Expression der Degenerationsmarker *ALPL*, *SPP1*, *BGLAP* und *TGF- β* wurde in fibrotischen und kalzifizierten Anteilen humaner AK-Taschen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 44) relativ zu einer fibrotischen Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: **** $p \leq 0,0001$.

Die mRNA-Expression der kleinen leucinreichen Proteoglykane *BGN* (fibrotisch: $2,69 \pm 0,23$; kalzifiziert: $3,68 \pm 0,34$) und *LUM* (fibrotisch: $7,15 \pm 1,17$; kalzifiziert: $12,86 \pm 1,43$) sowie des großen Proteoglykans *VCAN* (fibrotisch: $1,85 \pm 0,17$; kalzifiziert: $2,80 \pm 0,25$) war in kalzifizierten Anteilen signifikant erhöht verglichen mit den fibrotischen Anteilen. *DCN* zeigte hingegen keine Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den unterschiedlich stark degenerierten Anteilen der AK-Taschen (fibrotisch: $5,62 \pm 0,85$; kalzifiziert: $4,13 \pm 0,45$; Abbildung 17).

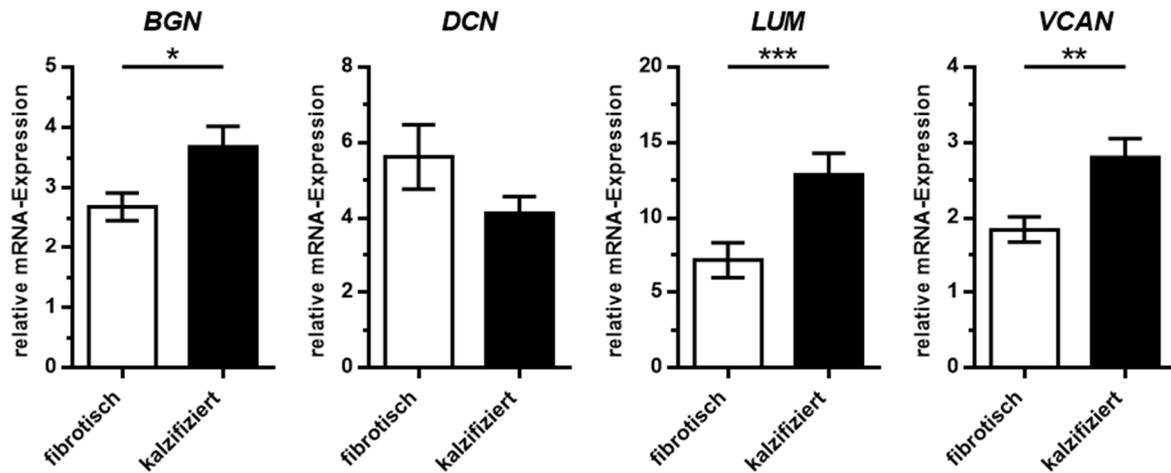


Abbildung 17: mRNA-Expression von Proteoglykanen in fibrotischen und kalzifizierten Bereichen derselben AK-Tasche

Gezeigt ist die relative mRNA-Expression der Proteoglykane *BGN*, *DCN*, *LUM* und *VCAN* in fibrotischen und kalzifizierten Anteilen von degenerierten AK-Taschen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 44$) relativ zu einer fibrotischen Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die HA-Synthasen *HAS1* (fibrotisch: $0,49 \pm 0,08$; kalzifiziert: $0,95 \pm 0,13$), *HAS2* (fibrotisch: $1,83 \pm 0,20$; kalzifiziert: $2,87 \pm 0,30$) und *HAS3* (fibrotisch: $4,04 \pm 0,34$; kalzifiziert: $6,66 \pm 1,03$) waren im kalzifizierten Anteil signifikant höher exprimiert im Vergleich zum fibrotischen Anteil derselben humanen AK-Tasche (Abbildung 18).

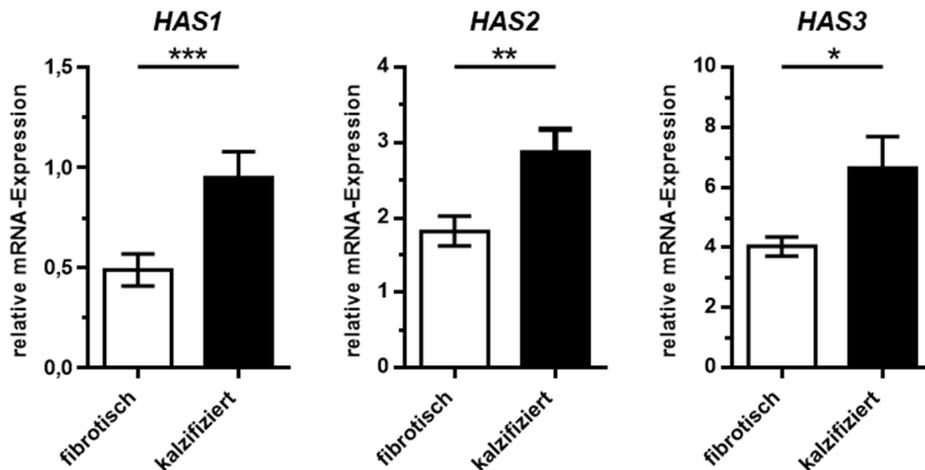


Abbildung 18: mRNA-Expression von HA-Synthasen in fibrotischen und kalzifizierten Bereichen derselben AK-Tasche

Die relative mRNA-Expression der HA-Synthasen *HAS1* (n = 32), *HAS2* (n = 44) und *HAS3* (n = 24) wurde in unterschiedlich stark degenerierten Anteilen humaner AK-Taschen semi-quantitativ gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zu einer fibrotischen Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001.

3.1.3. EINFLUSS VON T2D AUF DIE EXPRESSION VON EZM-MOLEKÜLEN

3.1.3.1. UNTERSUCHUNG KOMPLETTER AK-TASCHEN

Um die Auswirkungen einer T2D-Erkrankung auf den Umbau der EZM im Verlauf der DAVD zu untersuchen, wurde die unter 3.1.1 beschriebene Patientenkohorte in Nicht-Diabetiker und Diabetiker unterteilt. Ausschlaggebend für die Einstufung als Diabetiker war dabei die Diagnose eines behandelnden Arztes oder gemäß den Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft ein $HbA_{1c} \geq 6,5\%$ (67). In den Expressionsanalysen wurde von jedem Patienten eine vollständige Tasche seiner AK eingesetzt.

Bei keinem der untersuchten Degenerationsmarkern, *ALPL* (fibrotisch: $27,29 \pm 3,09$; fibrotisch + T2D: $35,26 \pm 5,52$; kalzifiziert: $19,56 \pm 2,04$; kalzifiziert + T2D: $23,91 \pm 2,56$), *SPP1* (fibrotisch: $30,92 \pm 6,31$; fibrotisch + T2D: $25,50 \pm 3,07$; kalzifiziert: $102,97 \pm 11,21$; kalzifiziert + T2D: $84,23 \pm 11,70$), *BGLAP* (fibrotisch: $20,26 \pm 1,78$; fibrotisch + T2D: $17,74 \pm 2,05$; kalzifiziert: $30,46 \pm 5,13$; kalzifiziert + T2D: $21,22 \pm 2,05$) und *TGF- β* (fibrotisch: $19,59 \pm 1,60$; fibrotisch + T2D: $17,29 \pm 1,76$; kalzifiziert: $16,88 \pm 1,55$; kalzifiziert + T2D: $17,84 \pm 1,37$), wurden Expressionsunterschiede zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern detektiert (Abbildung 19).

Unterschiede aufgrund des Degenerationsgrads, nicht aber aufgrund des T2D, ließen sich bei *SPP1* nachweisen. Die mRNA-Expression von *SPP1* war sowohl in kalzifizierten AK-Taschen von Nicht-Diabetikern als auch von Diabetikern signifikant erhöht (Abbildung 19).

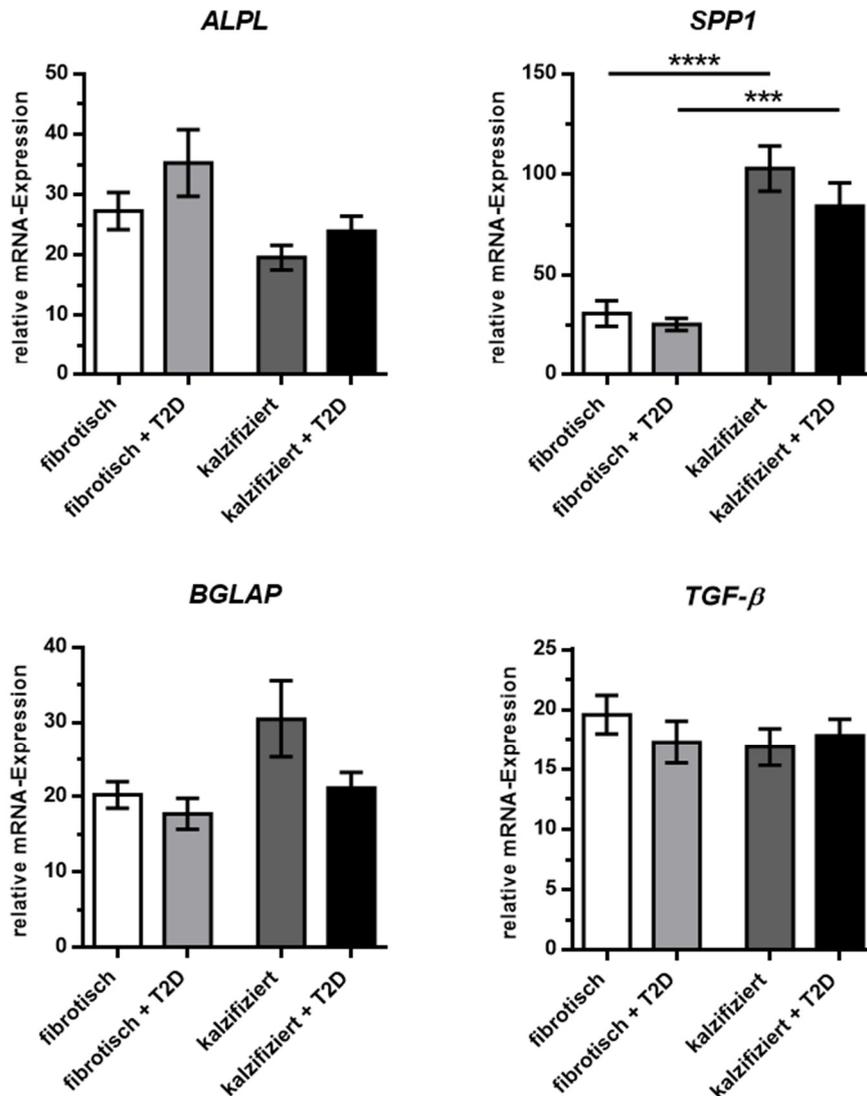


Abbildung 19: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern mit Einteilung nach T2D

Relative mRNA-Expression der Degenerationsmarker *ALPL*, *SPP1*, *BGLAP* und *TGF-β* in humanen AK-Taschen. Die Proben wurden entsprechend ihres Degenerationsgrads bzw. der Diagnose T2D in fibrotisch (n = 41), fibrotisch + T2D (n = 28), kalzifiziert (n = 39) und kalzifiziert + T2D (n = 33) unterteilt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM relativ zu einer fibrotischen Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Einzelne Proteoglykane wiesen in der mRNA-Expressionsanalyse Unterschiede zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern auf (Abbildung 20). Die mRNA-Expression von *LUM*

(fibrotisch: $1,11 \pm 0,06$; fibrotisch + T2D: $0,94 \pm 0,10$; kalzifiziert: $1,02 \pm 0,04$; kalzifiziert + T2D: $0,96 \pm 0,04$) war in fibrotischen AK-Taschen von Diabetikern signifikant herunterreguliert im Vergleich zu Nicht-Diabetikern. In kalzifizierten AK war die Expression von *BGN* (fibrotisch: $17,11 \pm 1,20$; fibrotisch + T2D: $15,61 \pm 1,33$; kalzifiziert: $12,48 \pm 1,07$; kalzifiziert + T2D: $14,76 \pm 0,86$) und *VCAN* (fibrotisch: $14,36 \pm 1,01$; fibrotisch + T2D: $13,48 \pm 1,12$; kalzifiziert: $10,54 \pm 0,83$; kalzifiziert + T2D: $12,54 \pm 0,69$) bei einem paarweisen Vergleich zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern signifikant erhöht.

Außerdem zeigten *BGN*, *DCN* (fibrotisch: $5,03 \pm 0,30$; fibrotisch + T2D: $4,24 \pm 0,20$; kalzifiziert: $3,51 \pm 0,27$; kalzifiziert + T2D: $3,82 \pm 0,23$) und *VCAN* eine Herunterregulation der mRNA-Expression zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen von Nicht-Diabetikern, die sich in Diabetikern nicht nachweisen ließ.

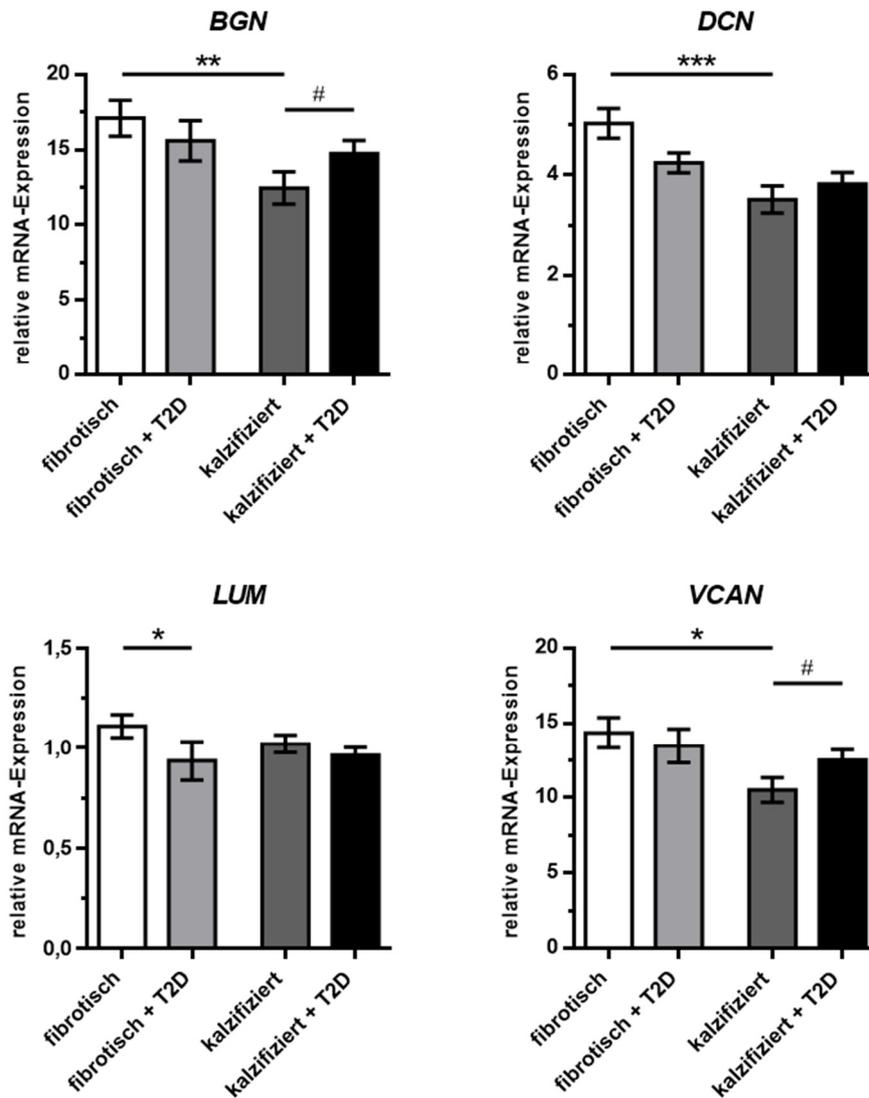


Abbildung 20: mRNA-Expression von Proteoglykanen mit Einteilung nach T2D

Humane AK-Taschen mit homogener Struktur wurden auf die relative mRNA-Expression der Proteoglykane *BGN*, *DCN*, *LUM* und *VCAN* untersucht. Die Einteilung der Proben erfolgte in fibrotisch (n = 41), fibrotisch + T2D (n = 28), kalzifiziert (n = 39) und kalzifiziert + T2D (n = 33). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zu einer fibrotischen Probe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: # $p \leq 0,05$.

Bei den HA-Synthasen zeigte *HAS2* in kalzifizierten AK-Taschen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in Diabetikern bei einem paarweisen Vergleich zu Nicht-Diabetikern (kalzifiziert: $0,18 \pm 0,02$; kalzifiziert + T2D: $0,25 \pm 0,03$). Für fibrotische AK wurden keine Expressionsunterschiede für *HAS2* aufgrund einer T2D-Diagnose detektiert (fibrotisch: $0,37 \pm 0,04$; fibrotisch + T2D: $0,39 \pm 0,04$). Die mRNA-Expression von *HAS1* (fibrotisch: $0,70 \pm 0,13$; fibrotisch + T2D: $0,60 \pm 0,10$; kalzifiziert: $0,55 \pm 0,09$; kalzifiziert + T2D: $0,45 \pm 0,07$) und

HAS3 (fibrotisch: $0,39 \pm 0,04$; fibrotisch + T2D: $0,43 \pm 0,06$; kalzifiziert: $0,26 \pm 0,02$; kalzifiziert + T2D: $0,28 \pm 0,02$) war innerhalb des gleichen Degenerationsgrads nicht von T2D abhängig (Abbildung 21).

Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen wurden für *HAS2* und *HAS3* nachgewiesen. Beide Isoformen wurden in kalzifizierten AK von Nicht-Diabetikern vermindert exprimiert. Eine Regulation, die sich bei Diabetikern nicht zeigte (Abbildung 21).

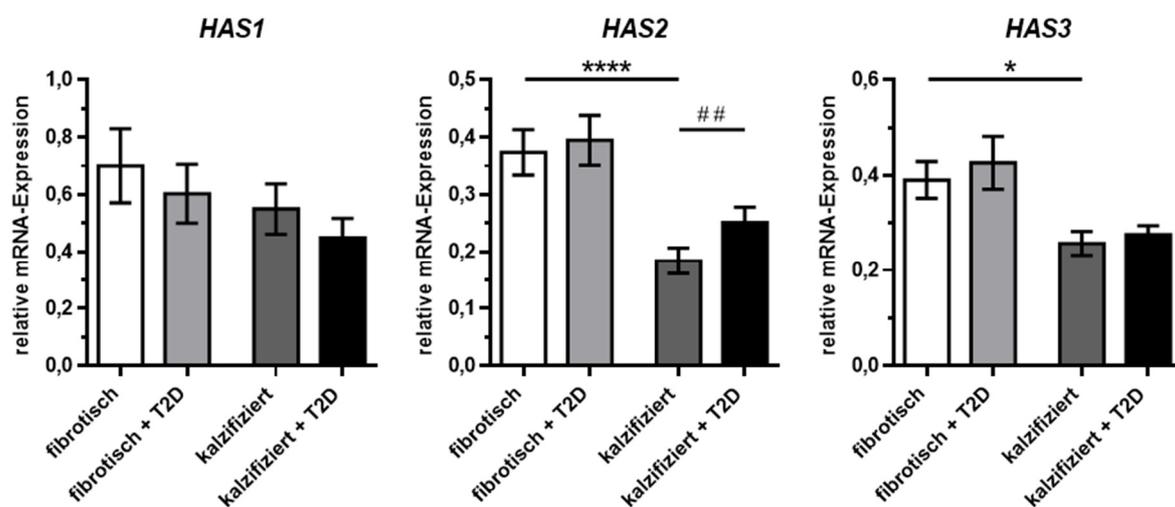


Abbildung 21: mRNA-Expression von HA-Synthasen mit Einteilung nach T2D

Die relative mRNA-Expression der HA-Synthasen *HAS1-3* wurde in morphologisch homogenen, humanen AK-Taschen unterschiedlicher Degenerationsgrade und in Abhängigkeit einer Erkrankung an T2D bestimmt (fibrotisch: $n = 36$; fibrotisch + T2D: $n = 28$; kalzifiziert: $n = 39$; kalzifiziert + T2D: $n = 33$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: ## $p \leq 0,01$.

3.1.3.2. EXPRESSION DES BGN-KERNPROTEINS IN HUMANEN AK-TASCHEN

Neben der mRNA-Expression wurde für BGN ebenfalls die Expression des Kernproteins in humanen AK-Taschen verschiedener Degenerationsgrade und in Abhängigkeit einer T2D-Erkrankung bestimmt. Dafür wurde BGN zunächst über Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt und die gebundenen Polysaccharidketten mit Chondroitin-ABC-Lyase verdaut. Anschließend erfolgte der Nachweis des BGN-Kernproteins mittels Western-Blot-Analysen (Abbildung 22A).

Die BGN-Konzentration in humanen AK wurde durch das Intensitätsverhältnis der einzelnen AK-Taschen zum rekombinanten Protein bekannter Konzentration (50 ng und 100 ng) berechnet. Fibrotische AK von Nicht-Diabetikern zeigten dabei eine signifikant erhöhte BGN-Konzentration im Vergleich zu allen anderen Untersuchungskohorten (fibrotisch: $14,82 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 1,29 \text{ ng}/\mu\text{l}$; fibrotisch + T2D: $2,47 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 0,88 \text{ ng}/\mu\text{l}$; kalzifiziert: $1,32 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 0,42 \text{ ng}/\mu\text{l}$; kalzifiziert + T2D: $1,91 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 0,74 \text{ ng}/\mu\text{l}$; Abbildung 22B).

Da eine klassische Normalisierung der Western-Blot-Ergebnisse auf interne Ladekontrollen nach der Anionenaustausch-Chromatographie nicht möglich war, die Menge an Probenmaterial die Ergebnisse jedoch verfälschen könnte, wurde die BGN-Konzentrationen zusätzlich auf die Proteinkonzentration des Ausgangslysats normalisiert. Dabei zeigte sich bei Nicht-Diabetikern in fibrotischen AK-Taschen eine geringere Proteinkonzentration im paarweisen Vergleich zu kalzifizierten AK (fibrotisch: $7,92 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 1,13 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$; kalzifiziert: $13,78 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 1,48 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Auch Diabetiker wiesen in fibrotischen AK geringere Proteinmengen auf (fibrotisch + T2D: $7,10 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 0,84 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$; kalzifiziert + T2D: $15,81 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 2,50 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Unterschiede aufgrund des T2D wurden innerhalb eines Degenerationsgrads nicht detektiert (Abbildung 22C).

Durch die Normalisierung der absoluten BGN-Konzentrationen auf die Proteinkonzentrationen des Ausgangslysats blieben die Verhältnisse zwischen den einzelnen Untersuchungskohorten erhalten. Das Verhältnis von BGN zur Gesamtproteinmenge war in fibrotischen AK-Taschen von Nichtdiabetikern deutlich erhöht verglichen mit kalzifizierten AK oder mit fibrotischen AK-Taschen von Diabetikern (fibrotisch: $2144 \text{ ng}/\text{mg} \pm 275 \text{ ng}/\text{mg}$; fibrotisch + T2D: $293 \text{ ng}/\text{mg} \pm 93 \text{ ng}/\text{mg}$; kalzifiziert: $97 \text{ ng}/\text{mg} \pm 28 \text{ ng}/\text{mg}$; kalzifiziert + T2D: $178 \text{ ng}/\text{mg} \pm 65 \text{ ng}/\text{mg}$; Abbildung 22D).

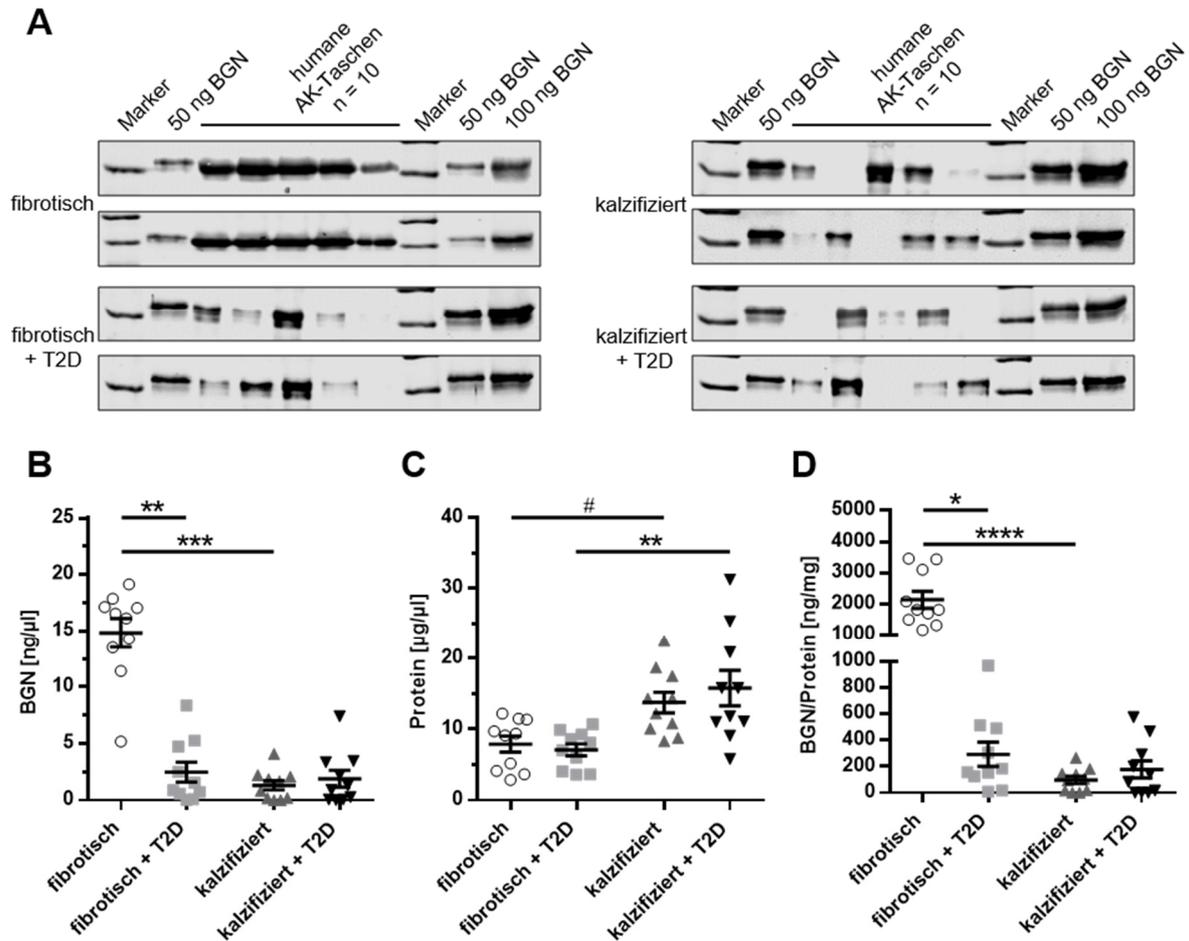


Abbildung 22: Western-Blot-Analysen zur BGN-Expression in humanen AK-Taschen

A: Nachweis des BGN-Kernproteins aus humanen AK-Taschen mittels Western-Blot-Analysen. Marker: obere Bande 55 kDa; mittlere/untere Bande 40 kDa. **B:** Quantifizierung der Western-Blot-Ergebnisse. Die BGN-Konzentrationen der humanen AK wurden durch das Intensitätsverhältnis der einzelnen Proben zum rekombinanten BGN berechnet. **C:** Quantifizierung der Proteinkonzentration des Ausgangslysats. **D:** Normalisierung der BGN-Konzentration auf die Proteinkonzentration des Ausgangslysats. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 10). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001; **** p \leq 0,0001. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: # p \leq 0,05.

3.1.3.3. UNTERSUCHUNGEN INNERHALB DERSELBEN AK-TASCHE MIT UNTERSCHIEDUNG NACH T2D

Der Einfluss von T2D auf die mRNA-Expression von Degenerationsmarkern und EZM-Komponenten wurde ebenfalls in AK-Taschen mit inhomogener Struktur analysiert. Dabei wurde der fibrotische und kalzifizierte Anteil ein und derselben AK-Taschen miteinander verglichen und die Ergebnisse von Patienten mit und ohne T2D gegenübergestellt.

Die relative mRNA-Expression der untersuchten Degenerationsmarker war unabhängig von T2D zwischen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen derselben AK-Tasche reguliert (Abbildung 23). Sowohl Nicht-Diabetiker als auch Diabetiker wiesen im kalzifizierten Anteil für *ALPL* (fibrotisch: $1,80 \pm 0,31$; kalzifiziert: $6,95 \pm 1,44$; fibrotisch + T2D: $1,25 \pm 0,31$; kalzifiziert + T2D: $4,74 \pm 0,92$), *SPPI* (fibrotisch: $4,76 \pm 1,57$; kalzifiziert: $209,05 \pm 30,16$; fibrotisch + T2D: $1,42 \pm 0,67$; kalzifiziert + T2D: $54,58 \pm 23,44$), *BGLAP* (fibrotisch: $1,01 \pm 0,12$; kalzifiziert: $3,99 \pm 0,69$; fibrotisch + T2D: $1,12 \pm 0,19$; kalzifiziert + T2D: $2,03 \pm 0,44$) und *TGF- β* (fibrotisch: $1,03 \pm 0,19$; kalzifiziert: $2,72 \pm 0,44$; fibrotisch + T2D: $0,73 \pm 0,07$; kalzifiziert + T2D: $1,47 \pm 0,21$) eine signifikant erhöhte mRNA-Expression auf.

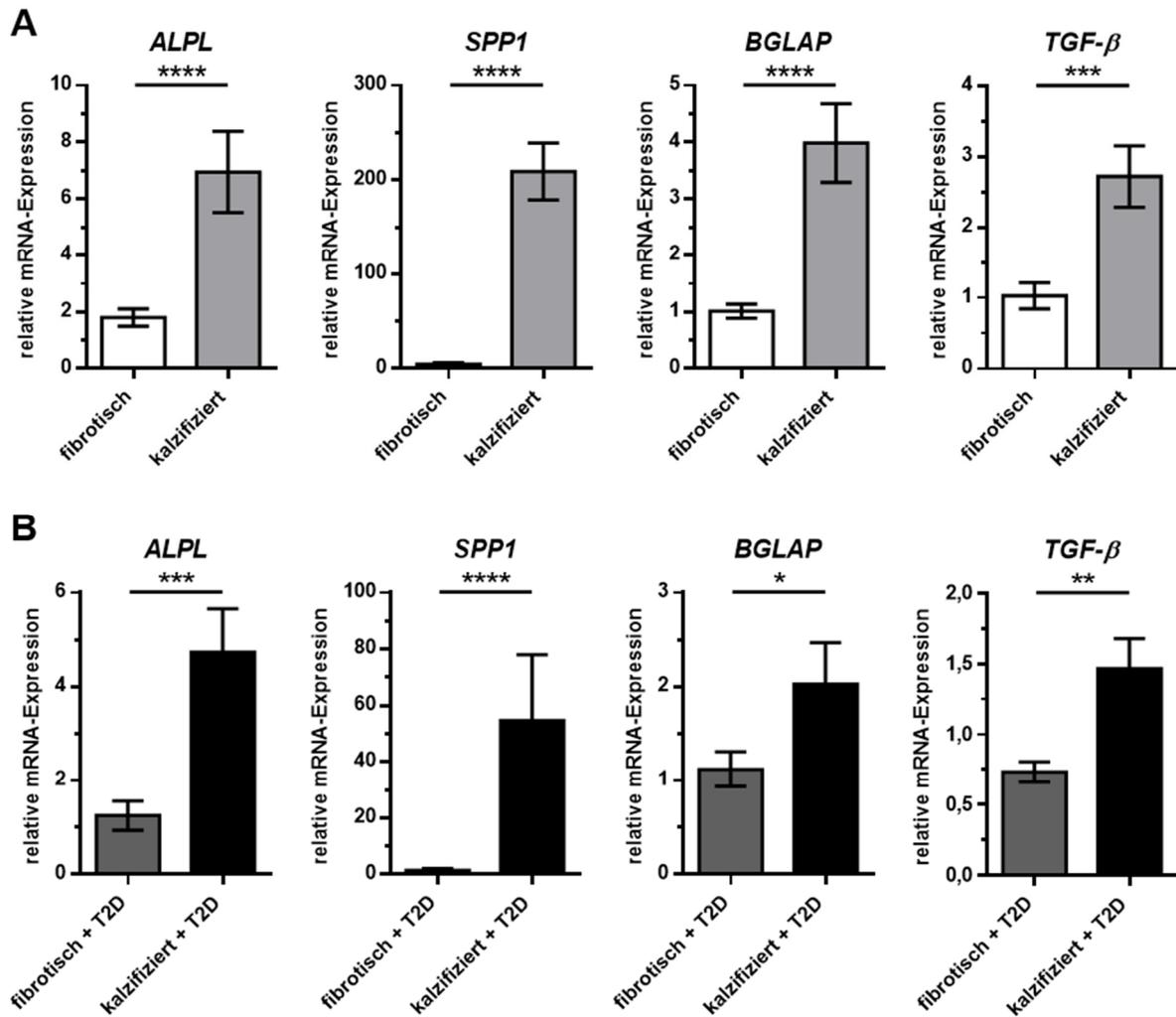


Abbildung 23: mRNA-Expression von Degenerationsmarkern in verschiedenen stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche mit Unterscheidung nach T2D

Fibrotische und kalzifizierte Anteile der selben humanen AK-Tasche wurden auf die relative mRNA-Expression der Degenerationsmarker *ALPL*, *SPP1*, *BGLAP* und *TGF-β* untersucht. Dabei wurde zwischen Proben von Nicht-Diabetikern (A; n = 25) und Diabetikern (B; n = 19) unterschieden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM relativ zu einer fibrotischen Probe (A) oder einer fibrotischen Probe mit T2D (B). Signifikanzen wurden berechnet mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Die analysierten Proteoglykane wiesen in ihrer mRNA-Expression diverse Regulationen auf. Dabei zeigten sich sowohl Unterschiede zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern als auch Unterschiede bei den verschiedenen Degenerationsgraden der untersuchten Anteile derselben AK-Tasche (Abbildung 24). *BGN* (fibrotisch: 2,43 ± 0,33; kalzifiziert: 3,91 ± 0,54; fibrotisch + T2D: 0,88 ± 0,08; kalzifiziert + T2D: 0,97 ± 0,10) und *VCAN* (fibrotisch: 1,58 ± 0,22; kalzifiziert: 3,00 ± 0,38; fibrotisch + T2D: 1,21 ± 0,14; kalzifiziert + T2D: 1,40 ± 0,16) waren bei Nicht-Diabetikern im kalzifizierten Anteil hochreguliert (Abbildung 24A), wiesen jedoch

keine Unterschiede bei Diabetikern auf (Abbildung 24B). Die mRNA-Expression von *DCN* (fibrotisch: $5,13 \pm 1,02$; kalzifiziert: $4,70 \pm 0,66$; fibrotisch + T2D: $0,74 \pm 0,17$; kalzifiziert + T2D: $0,40 \pm 0,06$) war im Gegensatz bei Nicht-Diabetikern unverändert (Abbildung 24A), bei Diabetikern jedoch im kalzifizierten Anteil vermindert (Abbildung 24B). *LUM* (fibrotisch: $6,93 \pm 1,61$; kalzifiziert: $15,04 \pm 2,00$; fibrotisch + T2D: $0,65 \pm 0,15$; kalzifiziert + T2D: $0,87 \pm 0,16$) zeigte sowohl bei Nicht-Diabetikern als auch bei Diabetikern erhöhte mRNA-Expressionen im kalzifizierten Anteil im Vergleich zum fibrotischen Anteil auf (Abbildung 24).

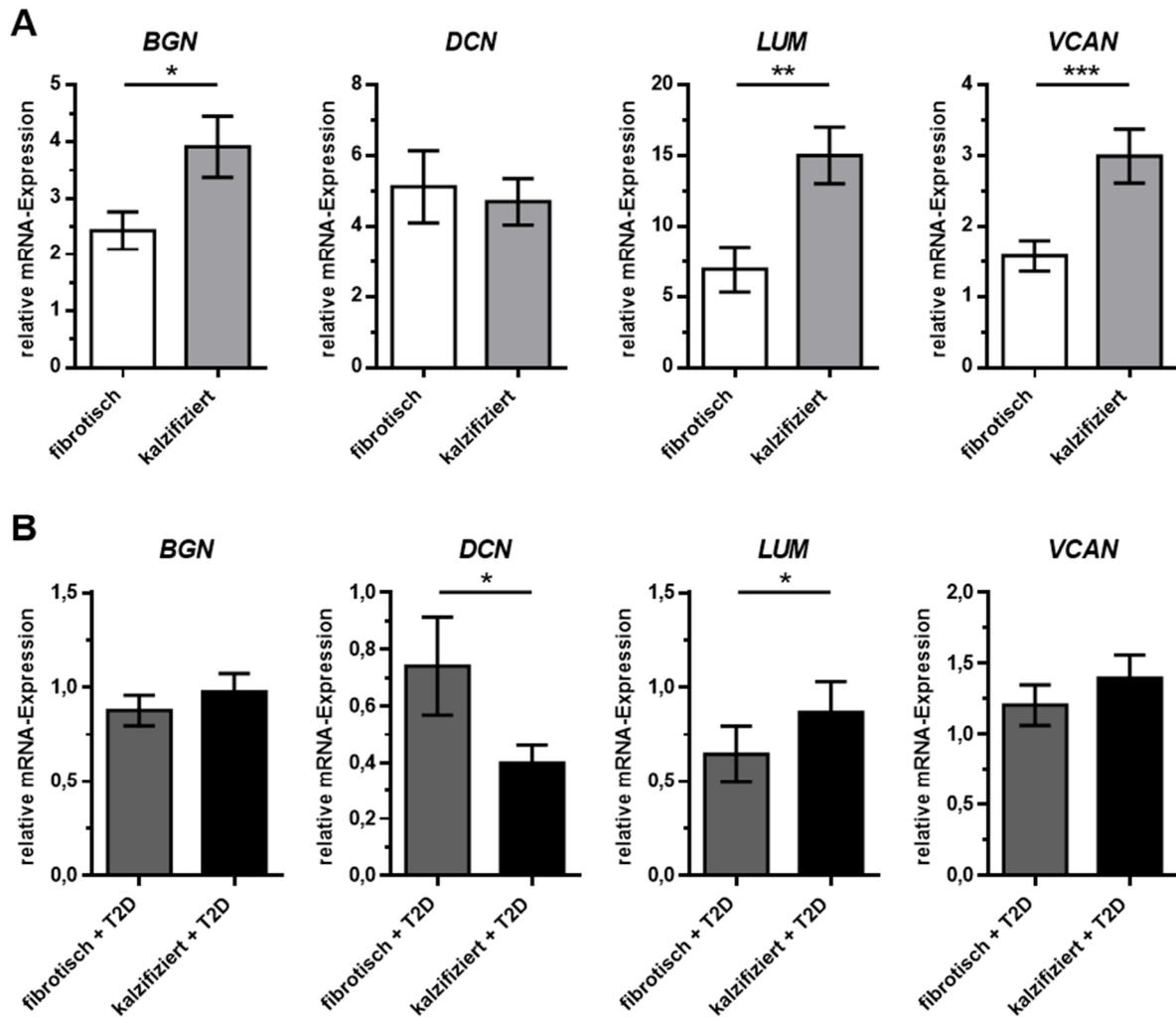


Abbildung 24: mRNA-Expression von Proteoglykanen in verschiedenen stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche mit Unterscheidung nach T2D

Humane AK-Taschen von Nicht-Diabetikern (A; n = 25) und Diabetikern (B; n = 19) wurden in fibrotische und kalzifizierte Anteile präpariert und die relative mRNA-Expression der Proteoglykane *BGN*, *DCN*, *LUM* und *VCAN* quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zu einer fibrotischen Probe (A) oder einer fibrotischen Probe mit T2D (B). Signifikanzen wurden berechnet mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001.

Bei Nicht-Diabetikern zeigte die mRNA-Expression aller drei HA-Synthesen eine signifikante Regulation abhängig vom Degenerationsgrad des untersuchten Anteils der AK-Tasche (Abbildung 25). Sowohl *HAS1* (fibrotisch: $0,46 \pm 0,10$; kalzifiziert: $1,09 \pm 0,20$), *HAS2* (fibrotisch: $1,58 \pm 0,27$; kalzifiziert: $2,90 \pm 0,45$) als auch *HAS3* (fibrotisch: $3,14 \pm 0,41$; kalzifiziert: $6,65 \pm 1,55$) war bei Nicht-Diabetikern im kalzifizierten Anteil stärker exprimiert als im fibrotischen Anteil derselben AK-Tasche (Abbildung 25A). Diese Regulation ging bei Patienten mit T2D verloren (Abbildung 25B). Die relative mRNA-Expression von

HAS1 (fibrotisch + T2D: $1,03 \pm 0,26$; kalzifiziert + T2D: $1,51 \pm 0,28$), *HAS2* (fibrotisch + T2D: $1,09 \pm 0,15$; kalzifiziert + T2D: $1,44 \pm 0,20$) und *HAS3* (fibrotisch + T2D: $1,50 \pm 0,13$; kalzifiziert + T2D: $2,09 \pm 0,45$) war bei Diabetikern im fibrotischen und kalzifizierten Anteil der AK statistisch gleich.

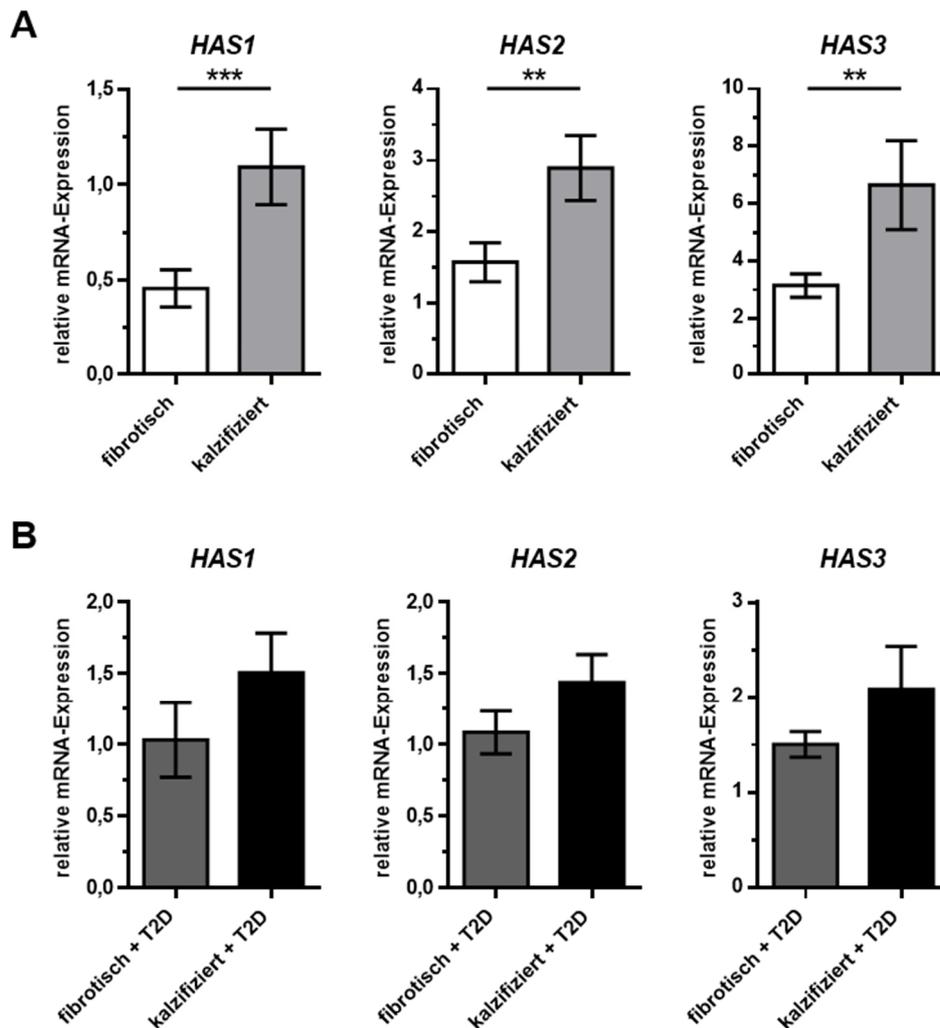


Abbildung 25: mRNA-Expression von HA-Synthasen in verschiedenen stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche mit Unterscheidung nach T2D

Die relative mRNA-Expression der HA-Synthasen *HAS1* (n = 18; 14), *HAS2* (n = 25; 19) und *HAS3* (n = 11; 13) wurde zwischen fibrotischen und kalzifizierten Anteilen derselben AK-Taschen verglichen. Zudem erfolgte eine Unterteilung in Patienten ohne T2D (A) und mit T2D Diagnose (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM relativ zu einer fibrotischen Probe (A) oder einer fibrotischen Probe mit T2D (B). Signifikanzen wurden berechnet mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.1.3.4. EINTEILUNG DER DIABETIKER ENTSPRECHEND IHRES HbA_{1c}

Ein schwerer T2D bzw. eine unzureichende Blutglukosekontrolle des Patienten manifestiert sich häufig in einer starken Hyperglykämie. Hohe Blutglukosekonzentrationen stehen dabei im Verdacht, proatherogene Zustände wie Zunahme von oxidativem Stress oder eingeschränkte Endothelfunktion auszulösen, und damit die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen voran zu treiben (100). Um den Faktor Hyperglykämie näher zu analysieren, wurden die Patienten mit T2D der in 3.1.1 beschriebenen Patientenkohorte entsprechend ihrer HbA_{1c}-Werte in gut eingestellte Diabetiker (HbA_{1c} < 6,5 %) und Diabetiker mit hohem HbA_{1c}-Wert (HbA_{1c} > 6,5 %) unterteilt und die mRNA-Expression untersucht (Abbildung 26). Als Kontrollen wurden humane AK-Taschen von Nicht-Diabetikern mit einem HbA_{1c} < 5,5 % verwendet.

Der Degenerationsmarker *SPPI* zeigte bei paarweisen Vergleichen eine erhöhte mRNA-Expression in humanen AK von Diabetikern mit guter Blutglukoseeinstellung ($5,23 \pm 1,18$) im Gegensatz zu AK-Taschen von Kontrollpatienten ($2,04 \pm 0,40$) und Diabetikern mit hohem HbA_{1c} ($2,60 \pm 0,60$). Auch die mRNA-Expression von *BGN* war in AK-Taschen von gut eingestellten Diabetikern hochreguliert ($1,21 \pm 0,17$). Dabei wurde sowohl ein signifikanter Unterschied zu AK von Kontrollpatienten ($0,87 \pm 0,19$) als auch ein Unterschied im paarweisen Vergleich zu Diabetikern mit hohem HbA_{1c} ($0,87 \pm 0,10$) nachgewiesen. Die HA-Synthase-Isoform *HAS2* wies ebenfalls eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in AK-Taschen von Diabetikern mit niedrigem HbA_{1c} ($3,84 \pm 1,15$) im Vergleich zu AK von Kontrollpatienten ($1,46 \pm 0,36$) und Diabetikern mit pathologischem HbA_{1c} ($1,70 \pm 0,25$) auf.

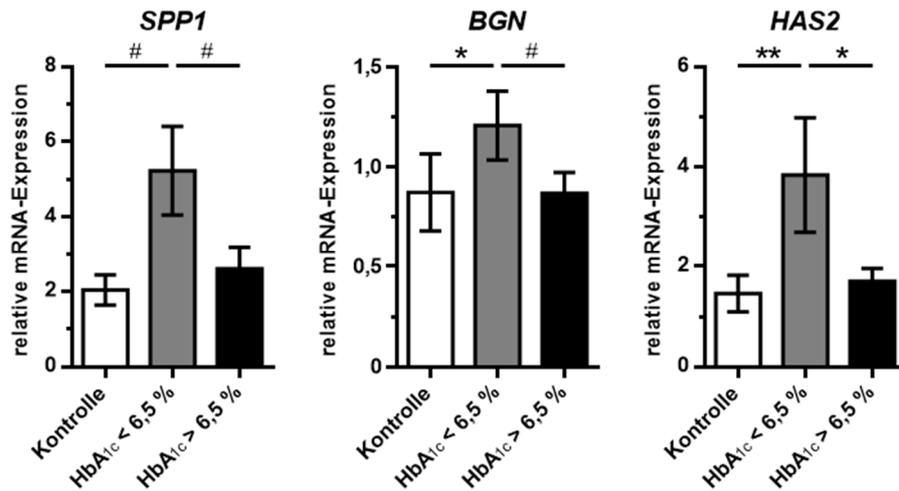


Abbildung 26: mRNA-Expression in humanen AK-Taschen nach HbA_{1c}-Werten

Der Einfluss der Blutglukosekonzentration auf die relative mRNA-Expression von *SPP1*, *BGN* und *HAS2* wurde in humanen AK-Taschen von Nicht-Diabetikern (Kontrolle; HbA_{1c} < 5,5 %; n = 22), gut eingestellten Diabetikern (HbA_{1c} < 6,5; n = 17) und Diabetikern mit hohem HbA_{1c} (HbA_{1c} > 6,5; n = 32) untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM relativ zu einer Kontrollprobe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: # p ≤ 0,05.

3.2. EINFLUSS DIABETISCHER UND DEGENERATIVER BEDINGUNGEN AUF OVINE VIC

Obwohl viele klinische Studien T2D als Risikofaktor für die Entwicklung und Progression der DAVD beschreiben, ist wenig über den Stoffwechsel valvulärer Zellen bekannt. Um den Einfluss von Insulin und HG auf die Physiologie von VIC nachzuvollziehen, wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, welches diabetische mit degenerativen Bedingungen verbindet. Dafür wurden ovine VIC über fünf Tage mit erhöhten Insulinkonzentrationen und HG kultiviert und zusätzlich mit einer DEG-Behandlung aus β -GP und CaCl_2 zur Degeneration angeregt. Neben dem Nachweis der Insulinsignalkaskade wurden Untersuchungen zur direkten Insulinwirkung auf den Glukosemetabolismus und auf mitogene Effekte, die auf eine Degeneration der Zellen hinweisen und denen während der DAVD ähneln, durchgeführt.

3.2.1. NACHWEIS DES INSULINSIGNALWEGS IN OVINEN VIC

3.2.1.1. INSULIN-SENSITIVE REZEPTOREN

T2D definiert sich über eine mangelnde Insulinwirkung aufgrund verminderter Insulinsensitivität der Zielzellen, wobei nicht jedes Gewebe gleich auf die zunächst erhöhten Insulinspiegel im Anfangsstadium des T2D reagiert (132). Um die Insulinsensitivität von VIC zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression des INSR und des Rezeptors für den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF1R, *insulin-like growth factor 1 receptor*) nachgewiesen sowie die mRNA-Expression des insulinähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF1, *insulin-like growth factor 1*) analysiert (Abbildung 27). IGF1 stellt dabei den Hauptliganden des IGF1R dar und beeinflusst viele mitogene Effekte wie die Proliferation und Differenzierung von Zellen (133).

Beide Rezeptoren waren in ovinen VIC exprimiert, wobei die mRNA-Expression nicht durch die Kultivierungsbedingungen beeinflusst wurde. Weder diabetische Bedingungen wie HI und HG noch die DEG-Behandlung hatten einen Einfluss auf die mRNA-Expression der Rezeptoren. Auch *Igfl* wurde auf mRNA-Ebene nachgewiesen, zeigte aber ebenfalls keine signifikanten Unterschiede aufgrund diabetischer oder DEG-Kultivierungsbedingungen.

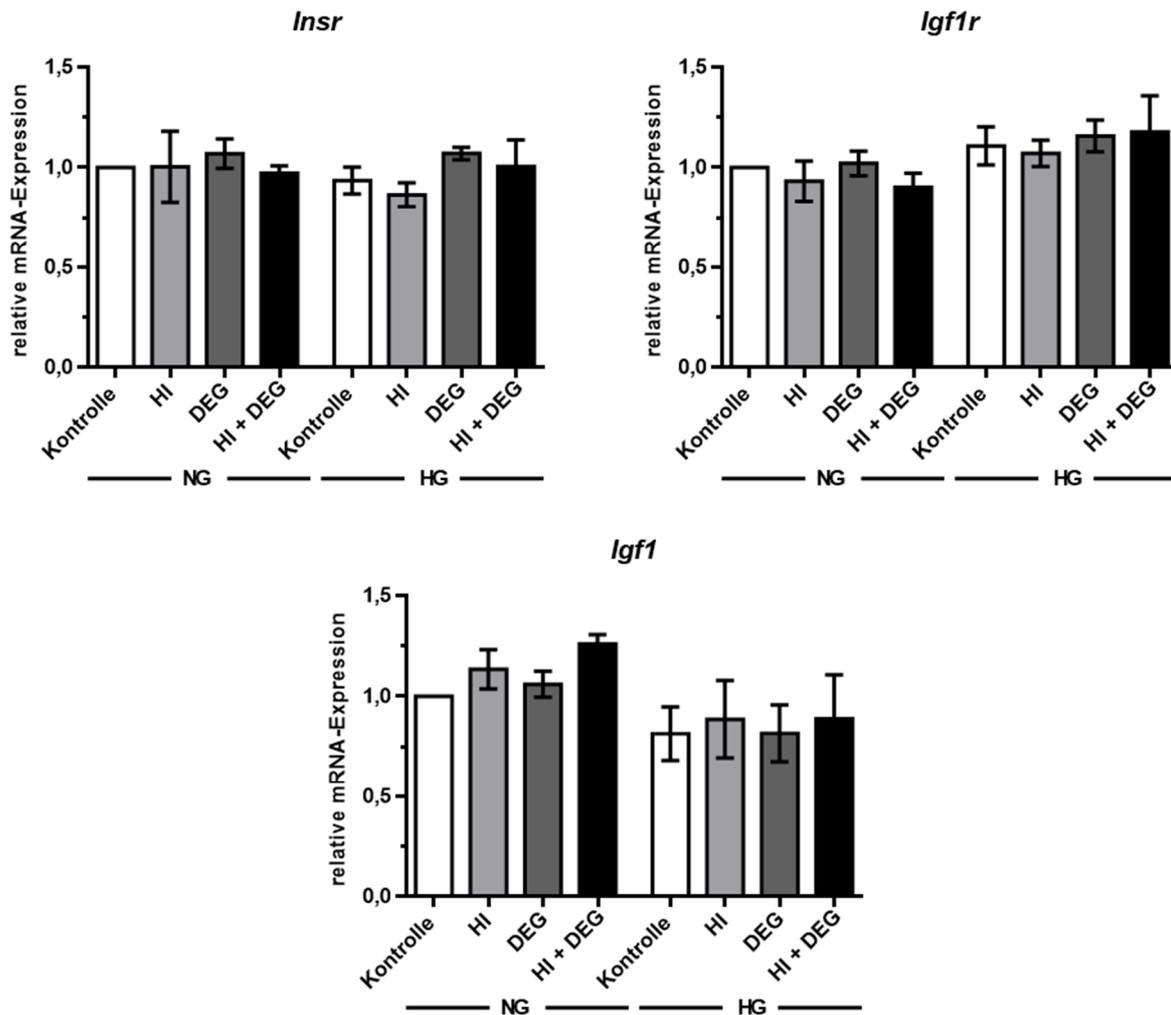


Abbildung 27: mRNA-Expression Insulin-sensitiver Rezeptoren in ovinen VIC

Relative mRNA-Expression der Insulin-sensitiven Rezeptoren *Insr* und *Igf1r* sowie des insulinähnlichen Proteins *Igf1* in ovinen VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6) relativ zur NG Kontrolle. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

3.2.1.2. PHOSPHORYLIERUNG VON AKT UND GSK-3

Durch die Bindung von Insulin an den INSR auf der Zelloberfläche startet eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade, welche zur Insulinantwort der Zellen führt (134). Dabei werden unter anderem die Serin/Threonin-Protein-Kinasen AKT und GSK-3 α/β phosphoryliert, wobei die Stärke der Phosphorylierung von der Insulinsensitivität der Zellen abhängt. Um die Insulinantwort oviner VIC nachzuweisen und den Einfluss diabetischer Bedingungen zu bestimmen, wurden die Zellen für zehn Minuten mit AI stimuliert und die

AKT-Phosphorylierung mittels Western-Blot-Analysen quantifiziert (Abbildung 28 und Abbildung 29).

Sowohl unter NG- als auch unter HG-Bedingungen wiesen unbehandelte ovine VIC (Kontrolle) eine signifikant höhere AKT-Phosphorylierung nach AI-Stimulation auf im Vergleich zu Kontrollzellen ohne AI-Behandlung (NG: Kontrolle - AI $0,03 \pm 0,00$ versus Kontrolle + AI $1,00 \pm 0,00$; HG: Kontrolle - AI $0,03 \pm 0,01$ versus $1,00 \pm 0,00$). Diese Aktivierung des Insulinsignalwegs durch die AI-Stimulation zeigte sich ebenfalls in den unter HI- und DEG-Bedingungen kultivierten VIC (NG: HI - AI $0,02 \pm 0,00$ versus HI + AI $0,50 \pm 0,07$; DEG - AI $0,03 \pm 0,01$ versus DEG + AI $1,18 \pm 0,10$; HI + DEG - AI $0,02 \pm 0,00$ versus HI + DEG + AI $0,45 \pm 0,06$; HG: HI - AI $0,01 \pm 0,00$ versus $0,41 \pm 0,06$; DEG - AI $0,03 \pm 0,01$ versus DEG + AI $1,09 \pm 0,07$; HI + DEG - AI $0,02 \pm 0,01$ versus HI + DEG + AI $0,42 \pm 0,07$).

Die Stärke der AKT-Phosphorylierung unterschied sich jedoch zwischen den einzelnen Kultivierungsbedingungen. Zellen, die für fünf Tage unter HI kultiviert wurden, wiesen eine signifikant geringere Phosphorylierung von AKT nach AI-Stimulation auf im Vergleich zu Kontrollzellen mit AI. Ovine VIC mit fünftägiger DEG-Behandlung zeigten hingegen keine Unterschiede in der AKT-Phosphorylierung nach AI-Stimulation verglichen mit Zellen der Kontrollgruppe. Eine Kombination aus HI- und DEG-Behandlung hatte einen ähnlichen Effekt auf die Insulinsensitivität der Zellen wie die Kultivierung unter HI allein. Die Phosphorylierung von AKT nach AI-Stimulation war im gleichen Maß verringert wie unter HI-Behandlung und war signifikant geringer zu Kontrollzellen und VIC mit DEG-Behandlung. Die basale Phosphorylierung von AKT ohne AI-Stimulation war hingegen unabhängig von den verschiedenen Behandlungsbedingungen. Außerdem war die Expression von Gesamt-AKT weder durch die verschiedenen Behandlungen noch durch die AI-Stimulation beeinflusst. Die beschriebenen Auswirkungen einer erhöhten Insulinkonzentration im Medium auf die AKT-Phosphorylierung der Zellen wurden sowohl bei der Kultivierung unter NG als auch unter HG mit etwa gleicher Verminderung der Insulinantwort beobachtet.

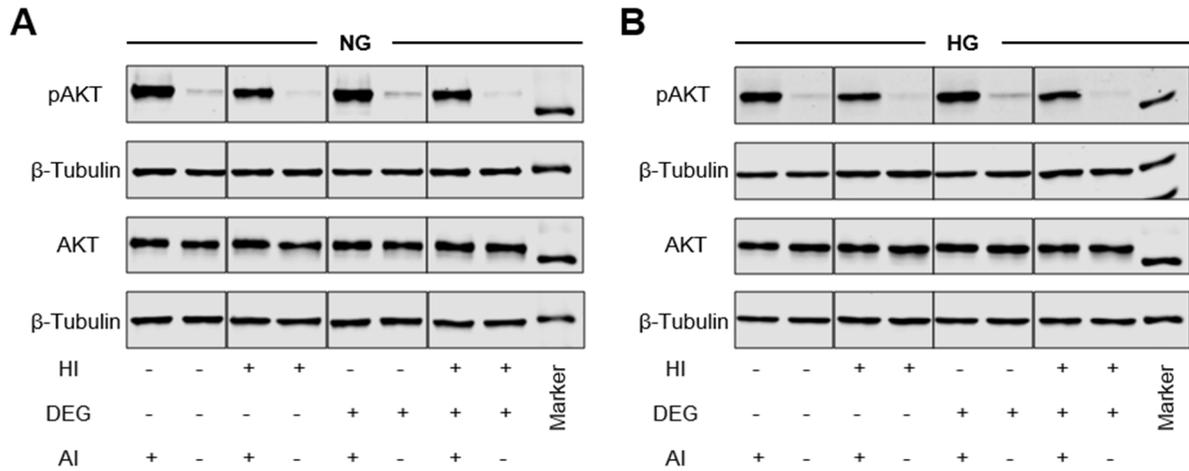


Abbildung 28: Western-Blot-Ergebnisse zur Phosphorylierung von AKT nach AI-Stimulation

Ovine VIC mit chronischer HI- und DEG-Behandlung wurden mittels Western-Blot-Analyse auf den Phosphorylierungsgrad von AKT (Ser473) untersucht. Dabei wurden die Zellen entweder unter NG- (A) oder HG-Bedingungen (B) kultiviert. Die Insulinantwort der Zellen zeigte sich durch erhöhte AKT-Phosphorylierung (Ser473) nach AI-Stimulation bei gleichbleibender AKT-Gesamtkonzentration. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analyse (n = 6). Marker: 55 kDa. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen, AI - Akutinsulin

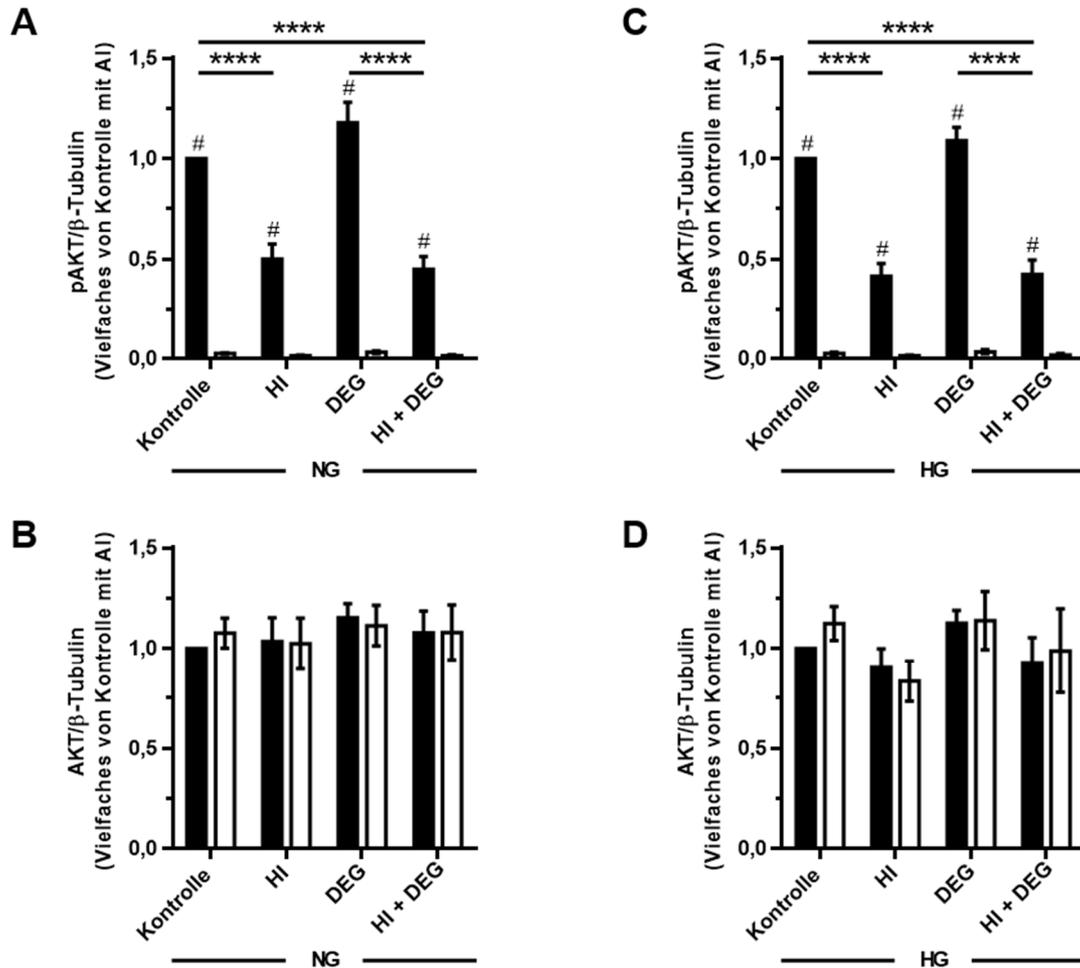


Abbildung 29: AKT-Phosphorylierung nach AI-Stimulation

Quantifizierung der Western-Blot-Ergebnisse zur AKT-Phosphorylierung (Ser473) in ovinen VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen. Untersucht wurden primäre VIC mit HI- und DEG-Behandlung unter NG- (A, B) und HG-Bedingungen (C, D). Die erhöhte AKT-Phosphorylierung (Ser473) nach AI-Stimulation (schwarze Balken) im Vergleich zu Zellen ohne AI-Stimulation (weiße Balken) stellte die Insulinantwort der VIC dar (A, C). Die Verringerung der Insulinantwort nach chronischer HI-Behandlung wies auf eine verminderte Insulinsensitivität der Zellen aufgrund der erhöhten Insulinkonzentration hin. Die Expression an Gesamt-AKT war von den verschiedenen Behandlungen nicht beeinflusst (B, D). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6). Signifikanzen wurden berechnet mit *two-way ANOVA* und *Tukey's multiple comparisons test*: **** $p \leq 0,0001$; # $p \leq 0,0001$ signifikant unterschiedlich zur gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen, AI - Akutinsulin

Um einen direkten Vergleich der Insulinantwort unter NG- und HG-Bedingungen zu ermöglichen, wurde in zusätzlichen Western-Blot-Analysen die AKT-Phosphorylierung von unbehandelten Kontrollzellen mit AI-Stimulation beider Glukosebedingungen gegenübergestellt (Abbildung 30A und B). Dabei zeigten ovine VIC unter HG eine signifikant verringerte Phosphorylierung von AKT im Vergleich zu Zellen, welche in NG-Medium

kultiviert wurden (NG: $1,00 \pm 0,00$; HG: $0,74 \pm 0,08$). Die Expression von Gesamt-AKT war hingegen nicht von den verschiedenen Glukosekonzentrationen im Kulturmedium beeinflusst (NG: $1,00 \pm 0,00$; HG $1,13 \pm 0,07$).

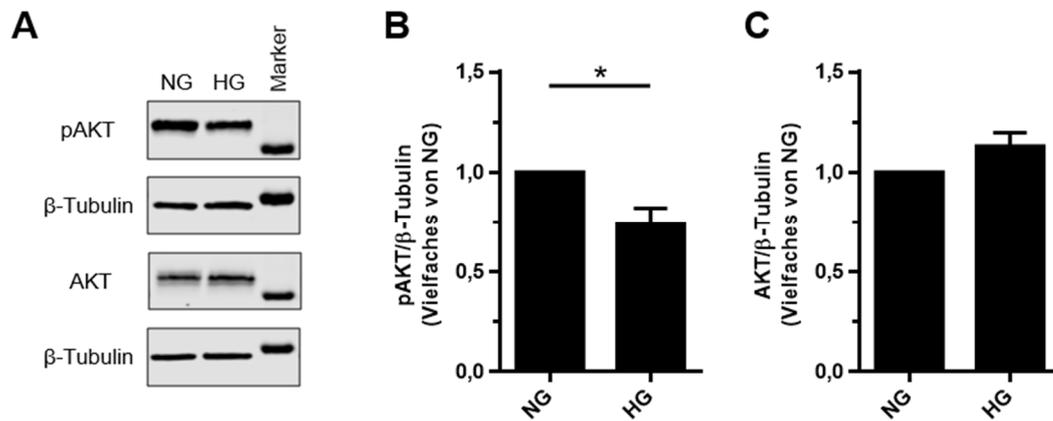


Abbildung 30: Vergleich der AKT-Phosphorylierung unter NG- und HG-Bedingungen

Die Insulinantwort oviner VIC unter NG- und HG-Bedingungen wurde mittels Western-Blot-Analysen verglichen (A). Dafür wurden VIC der entsprechenden Kontrollgruppen nach AI-Stimulation auf die Expression von phosphoryliertem AKT (Ser473, B) und Gesamt-AKT (C) untersucht. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analyse bzw. Mittelwerte \pm SEM der Quantifizierung ($n = 6$). Marker: 55 kDa. Signifikanzen wurden berechnet mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: * $p \leq 0,05$. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie

Zusätzlich zur AKT-Phosphorylierung wurde die Phosphorylierung von GSK-3 α und GSK-3 β , zwei weiteren Proteinen der Insulinsignalkaskade, mittels Western-Blot-Analysen untersucht (Abbildung 31 bis Abbildung 33). Auch hier hatte die zehnmünütige AI-Stimulation der kultivierten VIC eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung der Proteine zur Folge (NG GSK-3 α : Kontrolle - AI $0,28 \pm 0,02$ versus Kontrolle + AI $1,00 \pm 0,00$; HI - AI $0,25 \pm 0,03$ versus HI + AI $0,81 \pm 0,05$; DEG - AI $0,29 \pm 0,05$ versus DEG + AI $0,95 \pm 0,06$; HI + DEG - AI $0,28 \pm 0,06$ versus HI + DEG + AI $0,69 \pm 0,08$; HG GSK-3 α : Kontrolle - AI $0,24 \pm 0,02$ versus Kontrolle + AI $1,00 \pm 0,00$; HI - AI $0,21 \pm 0,02$ versus HI + AI $0,73 \pm 0,02$; DEG - AI $0,26 \pm 0,03$ versus DEG + AI $0,94 \pm 0,06$; HI + DEG - AI $0,21 \pm 0,04$ versus HI + DEG + AI $0,70 \pm 0,07$; NG GSK-3 β : Kontrolle - AI $0,48 \pm 0,03$ versus Kontrolle + AI $1,00 \pm 0,00$; HI - AI $0,44 \pm 0,05$ versus HI + AI $0,92 \pm 0,06$; DEG - AI $0,55 \pm 0,05$ versus DEG + AI $1,02 \pm 0,06$; HI + DEG - AI $0,44 \pm 0,04$ versus HI + DEG + AI $0,88 \pm 0,07$; HG GSK-3 β : Kontrolle - AI $0,56 \pm 0,06$ versus Kontrolle + AI $1,00 \pm 0,00$; HI - AI $0,47 \pm 0,04$ versus HI + AI $0,92 \pm 0,04$;

DEG - AI $0,61 \pm 0,06$ versus DEG + AI $1,17 \pm 0,06$; HI + DEG - AI $0,47 \pm 0,03$ versus HI + DEG + AI $0,96 \pm 0,07$). Diese direkte Insulinantwort wurde in allen Kultivierungsbedingungen sowohl für GSK-3 α als auch für GSK-3 β beobachtet. Die Gesamtexpression von GSK-3 α und GSK-3 β war hingegen unabhängig von der AI-Stimulation. Außerdem unterschieden sich die Zellen der verschiedenen Behandlungsbedingungen nicht in ihrer basalen Phosphorylierung von GSK-3 α und GSK-3 β ohne AI-Stimulation.

Für GSK-3 α wurden zudem Unterschiede in der Phosphorylierungsstärke aufgrund der verschiedenen Kultivierungsbedingungen der Zellen detektiert. Unter NG-Bedingungen zeigten VIC mit kombinierter HI- und DEG-Behandlung eine signifikant verringerte GSK-3 α -Phosphorylierung nach AI-Stimulation im Vergleich zu Kontrollzellen und Zellen, die nur unter DEG-Bedingungen kultiviert wurden, jedoch nicht zu HI-behandelten VIC. Eine HI- oder DEG-Behandlung allein hatte unter NG jedoch keine Auswirkungen auf die Phosphorylierungsstärke von GSK-3 α nach AI-Stimulation. Unter HG-Bedingungen wurden sowohl für VIC mit HI-Behandlung als auch für Zellen mit kombinierter HI- und DEG-Behandlung signifikant geringere Phosphorylierungen von GSK-3 α detektiert. Die alleinige DEG-Behandlung wirkte sich hingegen nicht auf die Phosphorylierungsstärke von GSK-3 α aus. Die Expression von Gesamt-GSK-3 α war von der HI- und DEG-Behandlung nicht beeinflusst.

Bei GSK-3 β wurden weder unter NG- noch unter HG-Bedingungen Unterschiede in der Phosphorylierungsstärke aufgrund der chronischen HI- oder DEG-Behandlung detektiert. Ebenso war die Gesamtexpression von GSK-3 β zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen bei beiden Glukosekonzentrationen gleich.

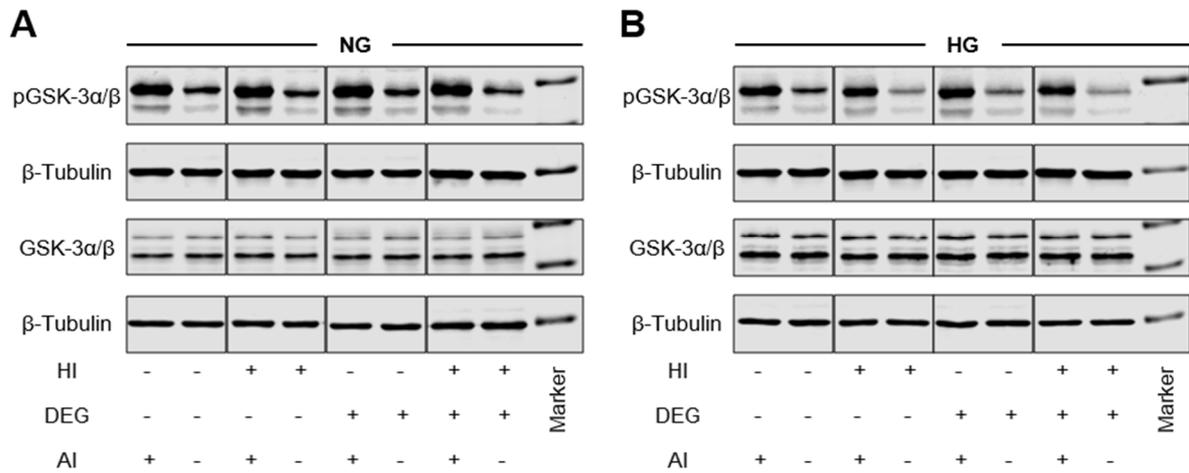


Abbildung 31: Western-Blot-Ergebnisse zur Phosphorylierung von GSK-3α/β

Die Phosphorylierung von GSK-3α/β (Ser21/9) wurde in kultivierten VIC mit HI- und DEG-Behandlung durch Western-Blot-Analysen bestimmt. Dabei wurde zwischen Zellen unter NG- (A) und HG-Bedingungen (B) unterschieden. Die erhöhte GSK-3α/β-Phosphorylierung (Ser21/9) nach AI-Stimulation bei konstanter GSK-3α/β-Gesamtkonzentration zeigte die Insulinantwort der VIC. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analyse (n = 6). Marker pGSK-3α/β und GSK-3α/β: obere Bande 55 kDa; untere Bande 40 kDa. Marker β-Tubulin: 55 kDa. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen, AI - Akutinsulin

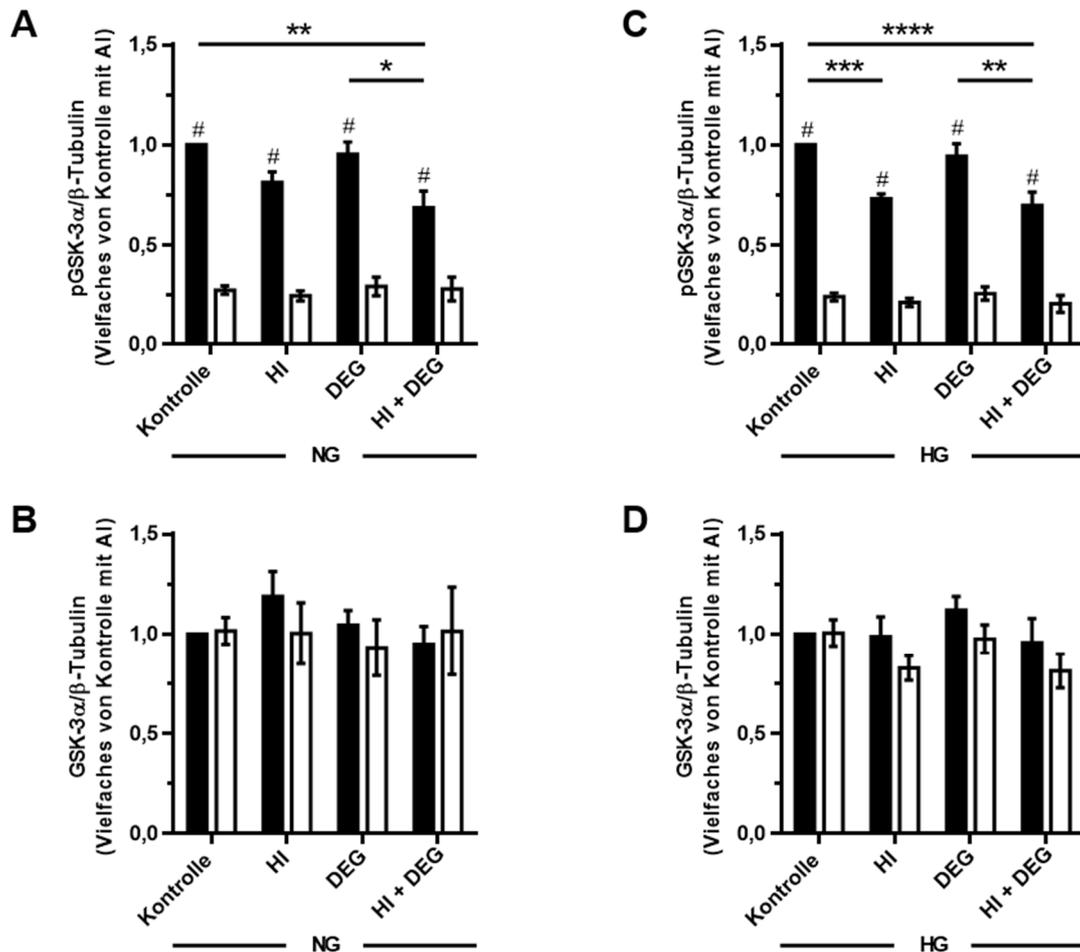


Abbildung 32: GSK-3α-Phosphorylierung nach AI-Stimulation

Quantifizierung der Western-Blot-Ergebnisse zur GSK-3α-Phosphorylierung (Ser21) in ovinen VIC unter NG- (A, B) und HG-Bedingungen (C, D) sowie mit HI- und DEG-Behandlung. Die erhöhten GSK-3α-Phosphorylierungen (Ser21) nach AI-Stimulation (schwarze Balken) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (weiße Balken) repräsentierten die Insulinantwort der VIC (A, C). Unterschiede in der Insulinsensitivität aufgrund der chronischen HI- und DEG-Behandlung zeigten sich im Vergleich der AI-stimulierten Zellen. Die Expression an Gesamt-GSK-3α war von den verschiedenen Behandlungen nicht beeinflusst (B, D). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n = 6). Signifikanzen wurden berechnet mit *two-way ANOVA* und *Tukey's multiple comparisons test*: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001; # p ≤ 0,0001 signifikant unterschiedlich zur gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen, AI - Akutinsulin

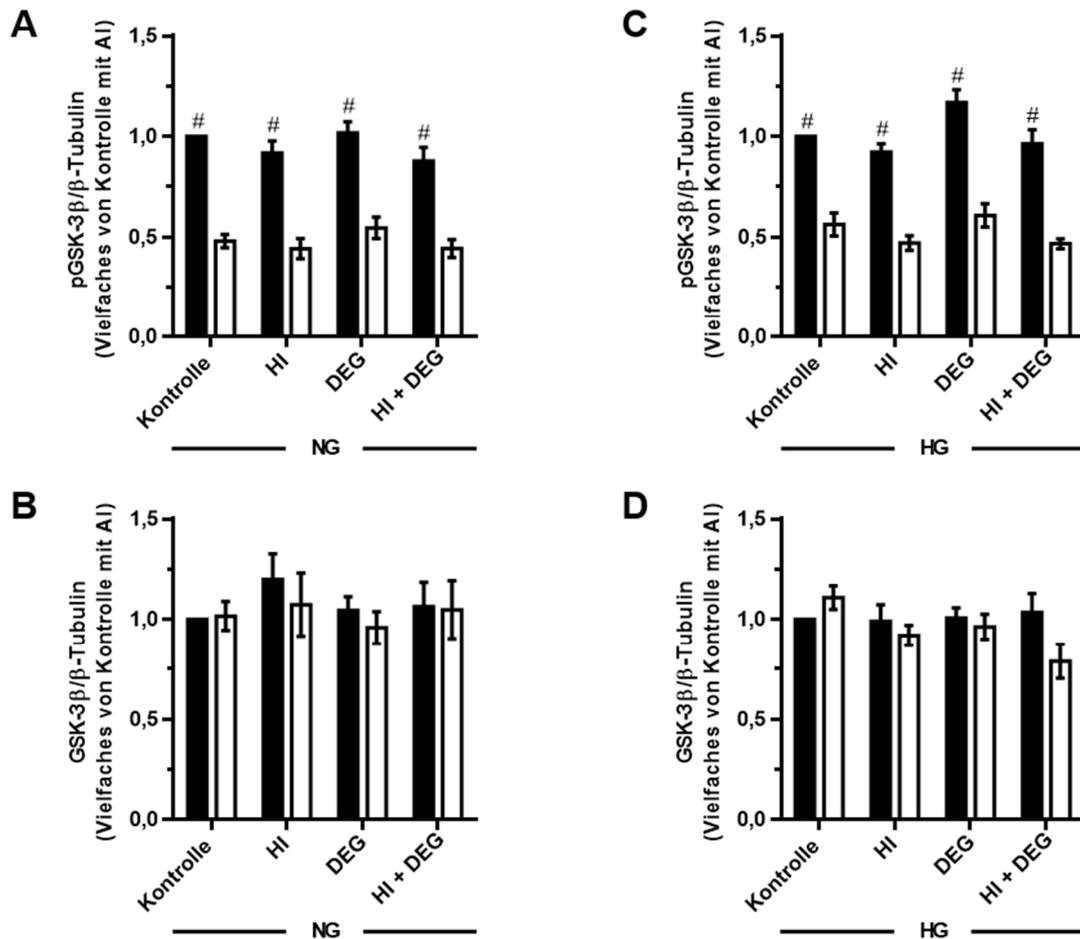


Abbildung 33: GSK-3β-Phosphorylierung nach AI-Stimulation

Quantifizierung der Western-Blot-Ergebnisse zur GSK-3β-Phosphorylierung (Ser9) in kultivierten VIC mit HI- und DEG-Behandlung. Die Zellen wurden sowohl unter NG- (A, B) als auch unter HG-Bedingungen (C, D) untersucht. Die Insulinantwort der VIC zeigte sich durch erhöhte GSK-3β-Phosphorylierung nach AI-Stimulation (schwarze Balken) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (weiße Balken; A, C). Unterschiede in der GSK-3β-Phosphorylierung (Ser9) aufgrund der verschiedenen Behandlungen wurden nicht detektiert. Die Expression an Gesamt-GSK-3β war zwischen den verschiedenen Behandlungen gleich (B, D). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n = 6). Signifikanzen wurden berechnet mit *two-way ANOVA* und *Tukey's multiple comparisons test*: # $p \leq 0,0001$ signifikant unterschiedlich zur gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen, AI - Akutinsulin

3.2.1.3. GLUKOSETRANSPORTER

Die Glukoseaufnahme in die Zelle erfolgt über verschiedene Glukosetransporter, wobei sich die Glukosetransporter-Typen gewebespezifisch in ihrer Abhängigkeit von Insulin und ihrer Affinität zu Glukose unterscheiden (133). Um zu bestimmen, welche Glukosetransporter in AK exprimiert werden, wurden die gängigsten Glukosetransporter-Typen, GLUT-1 (*Slc2a1*),

GLUT-2 (*Slc2a2*) und GLUT-4 (*Slc2a4*), in kultivierten VIC und nativen AK von Schafen über qPCR analysiert (Abbildung 34A). Dabei wurde sowohl in kultivierten VIC als auch in nativen AK eine deutliche mRNA-Expression für *Slc2a1* nachgewiesen. *Slc2a2* und *Slc2a4* wurden in ovinen VIC und AK nicht detektiert, zeigten aber deutliche Signale in ovinem Myokard (*Slc2a4*) oder Leber (*Slc2a2*). Außerdem war in beiden Positivkontrollen *Slc2a1* exprimiert.

Eine mögliche Abhängigkeit der *Slc2a1*-Expression von diabetischen oder degenerativen Bedingungen wurde *in vitro* in ovinen VIC nachvollzogen (Abbildung 34B). Weder die HI- oder DEG-Behandlung noch die Kultivierung in HG-Medium hatten einen Einfluss auf die mRNA-Expression von *Slc2a1*.

Auch die Western-Blot-Analysen zeigten keine Unterschiede in der GLUT-1-Expression aufgrund diabetischer oder degenerativer Kultivierungsbedingungen (Abbildung 34C und D). Die Expression von GLUT-1 war sowohl unabhängig von der Glukosekonzentration im Medium als auch von der HI- und DEG-Behandlung.

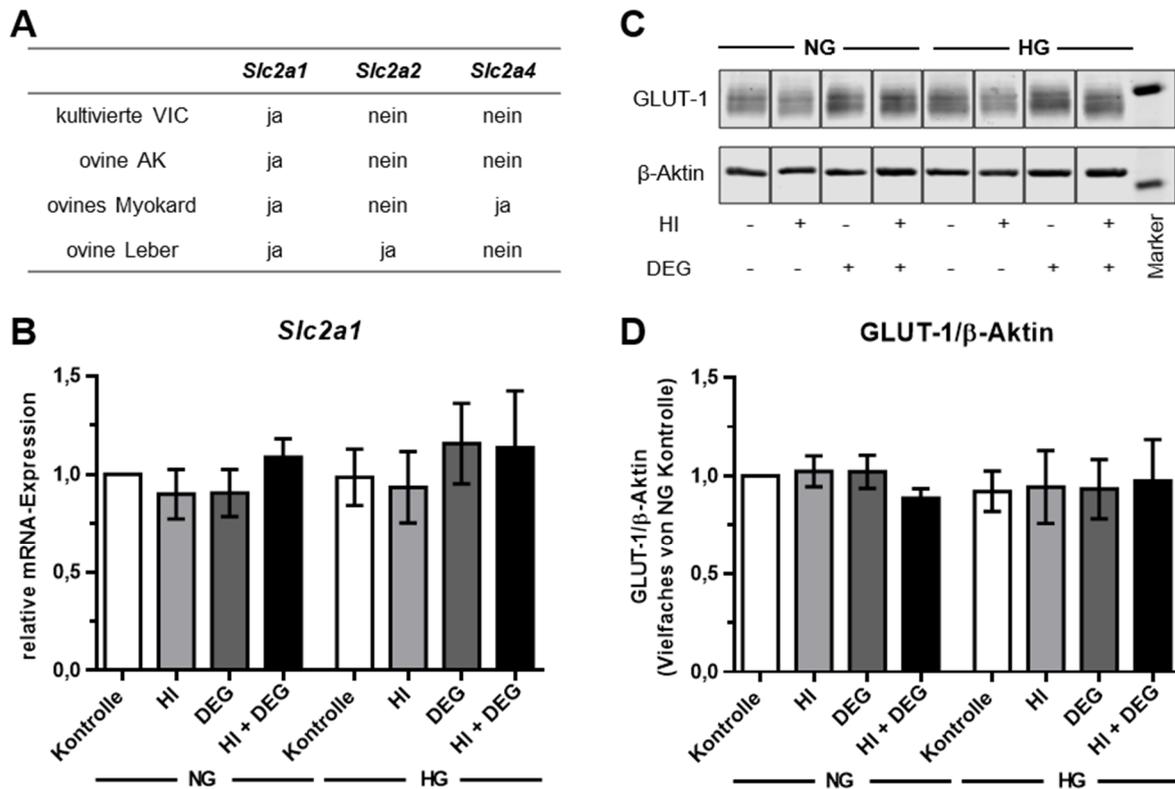


Abbildung 34: Expression von Glukosetransportern in ovinen VIC

A: Kultivierte VIC und native AK von Schafen wurden auf die mRNA-Expression der Glukosetransporter-Typen *Slc2a1*, *Slc2a2* und *Slc2a4* analysiert, wobei ausschließlich *Slc2a1* nachgewiesen wurde. Als Positivkontrollen dienten ovines Myokard und Leber. **B:** Relative mRNA-Expression von *Slc2a1* in VIC unter diabetischen und degenerativen Kultivierungsbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$) relativ zur NG Kontrolle. **C:** Nachweis von GLUT-1 mittels Western-Blot-Analyse in VIC nach HI- und DEG-Behandlung unter NG- und HG-Bedingungen. Marker GLUT-1: 55 kDa. Marker β -Aktin: 40 kDa. **D:** Quantifizierung der GLUT-1-Expression in kultivierten VIC unter diabetischen und degenerativen Kultivierungsbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

3.2.2. AUSWIRKUNGEN DIABETISCHER BEDINGUNGEN AUF DEN GLUKOSEMETABOLISMUS OVINER VIC

3.2.2.1. GLUKOSEVERBRAUCH IM ZELLKULTURÜBERSTAND

Die Auswirkungen der verminderten Insulinantwort oviner VIC unter diabetischen Bedingungen auf den Glukosemetabolismus wurde durch Bestimmung des Glukoseverbrauchs im Zellkulturüberstand bzw. der Glukoseaufnahme der Zellen eruiert. Da VIC mit DEG-Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der Insulinsensitivität im Vergleich zur

Kontrolle zeigten, wurde sich in den folgenden Analysen auf VIC mit HI-Behandlung unter NG- und HG-Bedingungen konzentriert und die DEG-Bedingungen vernachlässigt.

Die Glukosekonzentration im Zellkulturüberstand wurde täglich mit einem Blutglukosemessgerät quantifiziert (Abbildung 35). Dabei zeigten sich unter NG-Bedingungen deutliche Schwankungen in der Glukosekonzentration des Mediums über den Verlauf der Kultivierung. Sowohl Kontrollzellen als auch HI-behandelte VIC wiesen am dritten Tag (Kontrolle: $76,5 \pm 6,5$ mg/dl; HI: $73,3 \pm 5,9$ mg/dl), fünften Tag (Kontrolle: $51,3 \pm 7,6$ mg/dl; HI: $48,2 \pm 6,7$ mg/dl) und sechsten Tag (Kontrolle: $54,7 \pm 9,8$ mg/dl; HI: $39,5 \pm 10,8$ mg/dl) signifikant verringerte Glukosekonzentrationen im Überstand auf verglichen mit der Glukosekonzentration bei der Aussaat bzw. beim letzten Mediumwechsel (etwa 100 mg/dl). Unter HG-Bedingungen wurden keine Unterschiede über die Dauer der Kultivierung detektiert, wobei die gemessenen Werte hohe Standardabweichungen aufwiesen. Abweichend von den Herstellerangaben waren die gemessenen Glukosekonzentrationen im reinen Kulturmedium bzw. im Überstand der Kultur deutlich höher als der angegebene Wert von 450 mg/dl. Unterschiede aufgrund der HI-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden weder unter NG- noch unter HG-Bedingungen detektiert.

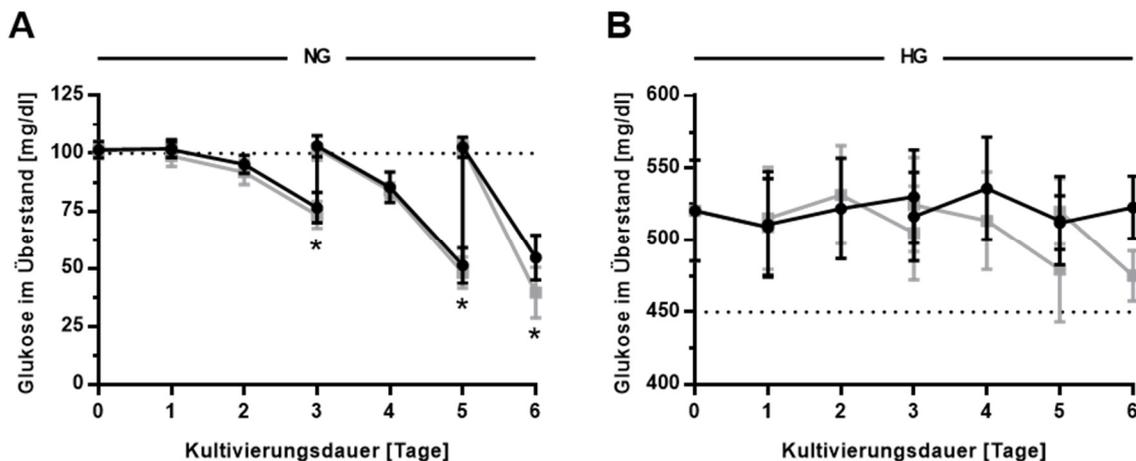


Abbildung 35: Glukosekonzentration im Zellkulturüberstand während der Behandlung

Die Glukosekonzentration der Zellkulturüberstände wurde über sechs Tage mit Hilfe eines Blutglukosemessgeräts sowohl unter NG- (A) als auch unter HG-Bedingungen (B) quantifiziert. Dabei wurden ovine VIC einen Tag nach der Aussaat mit HI (graue Linie) behandelt und mit unbehandelten VIC der Kontrollgruppe (schwarze Linie) verglichen. Der Mediumwechsel erfolgte am ersten, dritten und fünften Tag. Die gepunktete Linie gibt die vom Hersteller angegebene Glukosekonzentration des Kulturmediums wieder. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Signifikanzen wurden berechnet mit *two-way ANOVA* und *Sidak's multiple comparisons test* zwischen den Behandlungen bzw. *Tukey's multiple comparisons test* zwischen den Zeitpunkten: * $p \leq 0,01$ signifikant unterschiedlich zum Tag der Aussaat und zum letzten Mediumwechsel innerhalb einer Behandlung. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie

3.2.2.2. GLUKOSEAUFNAHME OVINER VIC

Für die Quantifizierung der Glukoseaufnahme oviner VIC wurde ein Luciferase-basierter *Glucose Uptake Assay* verwendet, der die aufgenommene Glukose in ein zu der Menge proportionales Lumineszenzsignal umwandelt. Zusätzlich zu den verschiedenen diabetischen Kultivierungsbedingungen wurden die VIC für eine Stunde mit AI stimuliert, um Unterschiede in der direkten Insulinantwort der Zellen zu quantifizieren (Abbildung 36A und B).

Unter NG-Kultivierungsbedingungen zeigten sich weder zwischen Kontrollzellen und HI-behandelten Zellen noch bei der Stimulation der VIC mit AI Unterschiede in der Glukoseaufnahme (Kontrolle - AI: $1,00 \pm 0,00$; Kontrolle + AI: $1,13 \pm 0,10$; HI - AI: $1,28 \pm 0,08$; HI + AI: $1,50 \pm 0,17$). Im Gegensatz dazu wurde unter HG-Bedingungen bei HI-behandelten VIC durch die AI-Stimulation eine signifikant erhöhte Glukoseaufnahme gemessen. Dieser Unterschied war sowohl im Vergleich zu Kontrollzellen mit AI als auch zu HI-behandelten Zellen ohne AI-Stimulation zu detektieren (Kontrolle - AI: $1,00 \pm 0,00$; Kontrolle + AI: $1,16 \pm 0,10$; HI - AI: $1,31 \pm 0,09$; HI + AI: $1,92 \pm 0,23$).

Außerdem wurde die basale Glukoseaufnahme der VIC ohne AI-Stimulation zwischen den verschiedenen diabetischen Kultivierungsbedingungen gegenübergestellt (Abbildung 36C). Dabei zeigten HI-behandelte VIC unter HG eine verminderte basale Glukoseaufnahme im Vergleich zu HI-behandelten Zellen unter NG. Bei den unbehandelten Kontrollgruppen wurden keine Unterschiede in der basalen Glukoseaufnahme aufgrund der Glukosekonzentration im Kulturmedium festgestellt und auch innerhalb einer Glukosebedingung war die Glukoseaufnahme zwischen unbehandelten und HI-behandelten VIC gleich (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI: $1,28 \pm 0,08$; HG Kontrolle: $0,66 \pm 0,09$; HG HI: $0,83 \pm 0,07$).

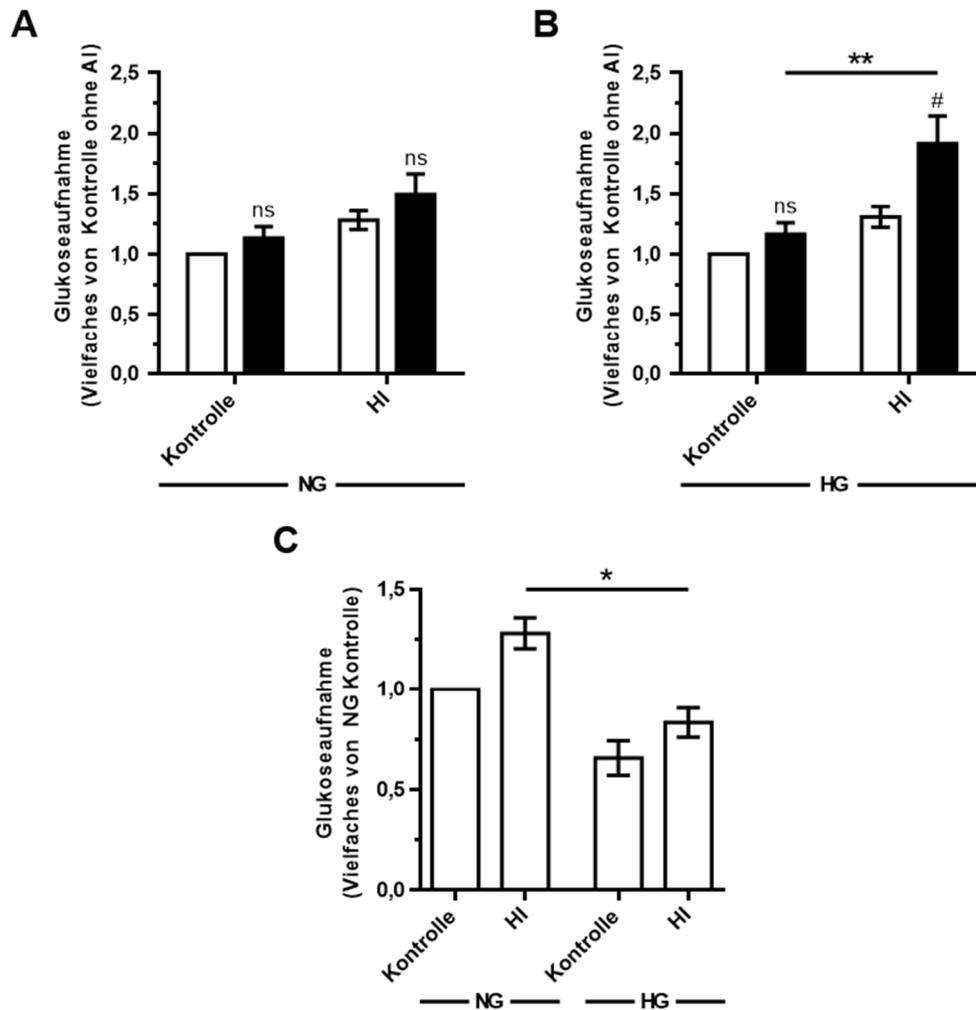


Abbildung 36: Glukoseaufnahme oviner VIC unter diabetischen Bedingungen

A/B: Die Glukoseaufnahme oviner VIC wurde mit einem Luciferase-basierten *Glucose Uptake Assay* nach chronischer HI-Behandlung quantifiziert und mit der von unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe verglichen. Zudem wurde die Glukoseaufnahme ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) AI-Stimulation gemessen, um die direkte Insulinwirkung auf den Glukosemetabolismus zu bestimmen. Dabei wurde zwischen Zellen unter NG- (**A**) und HG-Bedingungen (**B**) unterschieden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Signifikanzen wurden berechnet mit *two-way ANOVA* und *Tukey's multiple comparisons test*: ** $p \leq 0,01$; # $p \leq 0,05$ signifikant unterschiedlich zur gleichen Behandlung ohne AI. **C:** Direkter Vergleich der basalen Glukoseaufnahme von VIC ohne AI-Stimulation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, AI - Akutinsulin

3.2.3. MITOGENE EFFEKTE DIABETISCHER UND DEGENERATIVER BEDINGUNGEN AUF OVINE VIC

3.2.3.1. PROLIFERATION UND OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG

Zusätzlich zu seiner regulierenden Wirkung auf den Glukosemetabolismus beeinflusst Insulin viele mitogene Prozesse der Zelle wie Proliferation, Differenzierung und die Synthese von Proteinen (133). Diese zellulären Prozesse sind auch mit der Entwicklung von DAVD assoziiert und stellen potentielle Verknüpfungen zwischen T2D und kardiovaskulären Erkrankungen dar (135).

In durchlichtmikroskopischen Aufnahmen der unter diabetischen und degenerativen Bedingungen kultivierten VIC waren bis zum sechsten Tag in Kultur keine morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen ersichtlich (Abbildung 37). Weder die verschiedenen Glukosekonzentrationen im Kulturmedium noch die Behandlung mit HI oder DEG verursachten offensichtliche Veränderungen in der Zellmorphologie. Bei verlängerter Kultivierung, etwa ab dem siebenten Tag, zogen sich DEG-behandelte VIC zusammen und bildeten knötchenartige Strukturen (Abbildung 37). In diesem Stadium der Kultivierung war es nicht mehr möglich, RNA oder Proteine aus den Zellen aufzureinigen, wodurch die maximale Kultivierungsdauer auf sechs Tage begrenzt war und für alle beschriebenen Versuche verwendet wurde. Unbehandelte VIC und VIC mit HI-Behandlung stellten sich hingegen auch bei verlängerter Kultivierung als planer Zellrasen ohne auffallende morphologische Veränderungen dar.

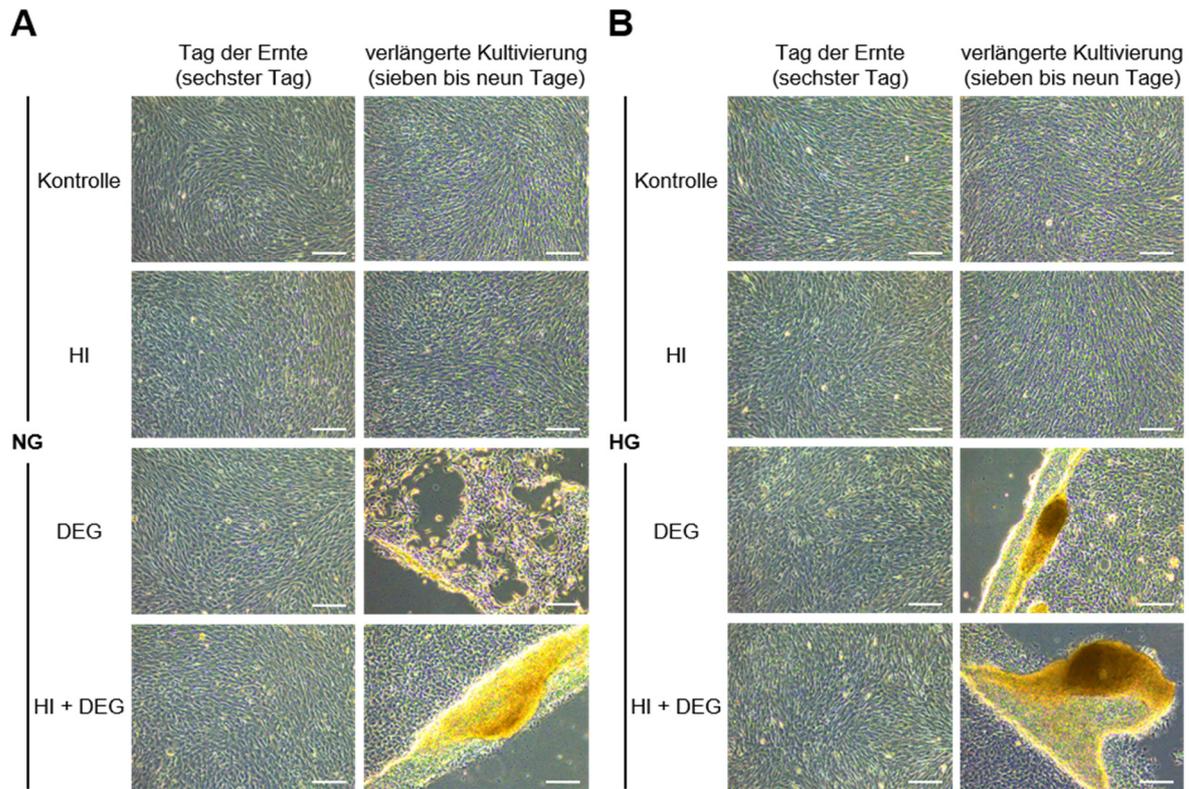


Abbildung 37: Mikroskopische Aufnahmen von VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen

Durchlichtmikroskopie oviner VIC unter diabetischen und degenerativen Kultivierungsbedingungen am Tag der Ernte (sechster Tag) und mit verlängerter Kultivierung (sieben bis neun Tage). Während Zellen der Kontrollgruppe und HI-behandelte VIC auch bei verlängerter Kultivierung keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede aufwiesen, zogen sich VIC unter DEG-Behandlung ab dem siebenten Tag zusammen. Zwischen VIC unter NG- (A) und HG-Bedingungen (B) wurden keine Unterschiede beobachtet. Maßstab: 200 μm . Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

Außerdem wurde alle zwei Tage die Zellzahl der kultivierten VIC bestimmt (Abbildung 38). Dabei zeigte sich nur zwischen dem zweiten und dem vierten Tag ein signifikanter Anstieg der Zellzahl in allen untersuchten Behandlungen (durchschnittlich zweiter Tag: $0,31 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6$; vierter Tag: $1,03 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$). Vom Tag der Aussaat auf den zweiten Tag war dies nur für HI+DEG-behandelte VIC unter HG zu beobachten (Tag der Aussaat: $0,08 \times 10^6 \pm 0,00 \times 10^6$; zweiter Tag: $0,35 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$). Auch zwischen dem vierten und dem sechsten Tag blieb die Zellzahl innerhalb der einzelnen Behandlungen mit Ausnahme von HI-behandelten VIC unter NG statistisch gleich (vierter Tag: $1,18 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$; sechster Tag: $1,56 \times 10^6 \pm 0,16 \times 10^6$).

Am Tag der Ernte war die Zellzahl der HI-behandelten VIC unter NG-Bedingungen signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrollzellen der gleichen Glukosebedingung (NG Kontrolle:

$1,15 \times 10^6 \pm 0,09 \times 10^6$; NG HI: $1,56 \times 10^6 \pm 0,16 \times 10^6$). Alle weiteren Behandlungen wirkten sich nicht auf die Zellzahl der kultivierten VIC aus.

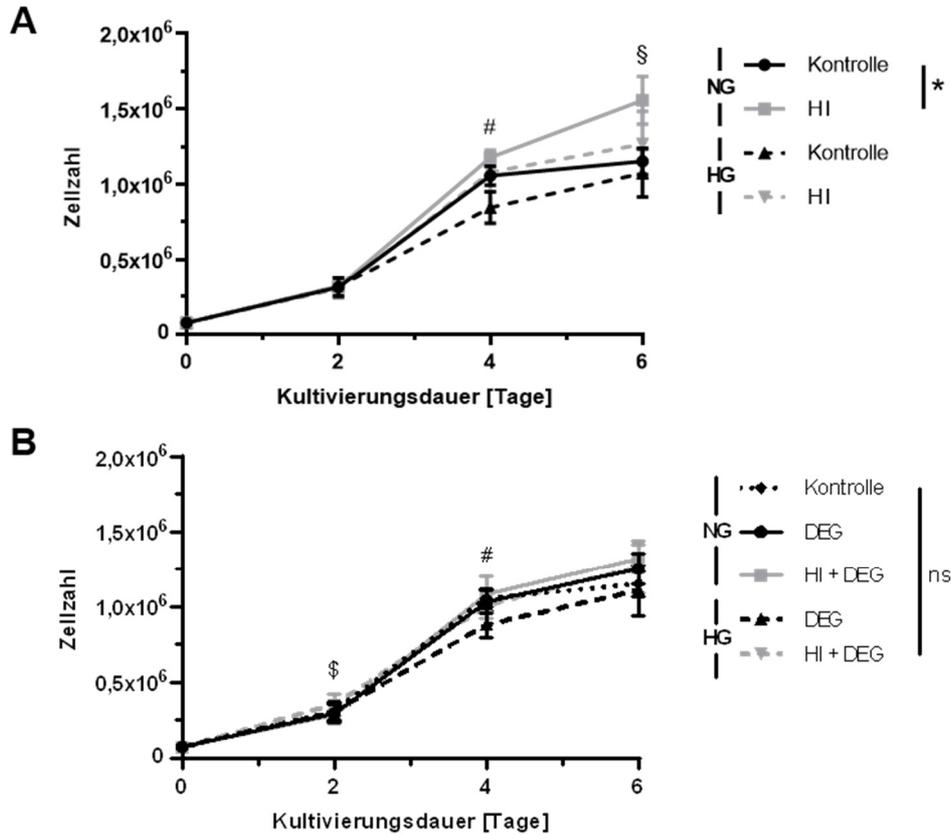


Abbildung 38: Zellzahl oviner VIC über sechs Tage Kultivierung

Anstieg der Zellzahl oviner VIC während der Kultivierung unter diabetischen oder degenerativen Bedingungen. Die Zellen wurden einen Tag nach der Aussaat mit HI und DEG behandelt und entweder unter NG- oder HG-Bedingungen kultiviert. Verglichen wurden VIC ohne (A) und mit DEG-Behandlung (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6). Signifikanzen wurden berechnet mit *two-way ANOVA* und *Tukey's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$ zwischen den Behandlungen; # $p \leq 0,001$ zweiter Tag auf vierter Tag in allen Behandlungen; § $p \leq 0,05$ vierter Tag auf sechster Tag bei NG HI; § $p \leq 0,05$ Tag der Aussaat auf zweiter Tag bei HG HI+DEG. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

Die mRNA-Expression der Degenerationsmarker *Spp1*, *Bglap* und *Tgf- β* war weder von der HI- und DEG-Behandlung noch von der Glukosekonzentration im Kulturmedium beeinflusst (Abbildung 39). Ausschließlich im paarweisen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter NG-Bedingungen wurden Trends ($p = 0,063$) in der mRNA-Expression festgestellt. Unter NG-Bedingungen zeigten HI-behandelte VIC sowohl ohne als auch mit zusätzlicher

DEG-Behandlung eine im Trend ($p = 0,063$) geringere mRNA-Expression von *Spp1* (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI: $0,66 \pm 0,11$; NG HI+DEG: $0,56 \pm 0,06$). Dies war ebenfalls unter NG für HI+DEG-behandelte Zellen in der mRNA-Expression von *Tgf- β* zu beobachten (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI+DEG: $0,50 \pm 0,11$).

Der Differenzierungsmarker α -Glattmuskelaktin (*Acta2*, *alpha smooth muscle actin*), der mit der Aktivierung von VIC assoziiert ist (10), zeigte im paarweisen Vergleich zu unbehandelten NG Kontrollzellen eine signifikant verminderte mRNA-Expression in HI-behandelten VIC unter NG (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI: $0,53 \pm 0,10$). Dies war im Trend ($p = 0,063$) auch bei der Kultivierung in HG-Medium und bei HI+DEG-behandelten VIC unter NG zu beobachten (HG HI: $0,70 \pm 0,13$; NG HI+DEG: $0,52 \pm 0,14$; Abbildung 39).

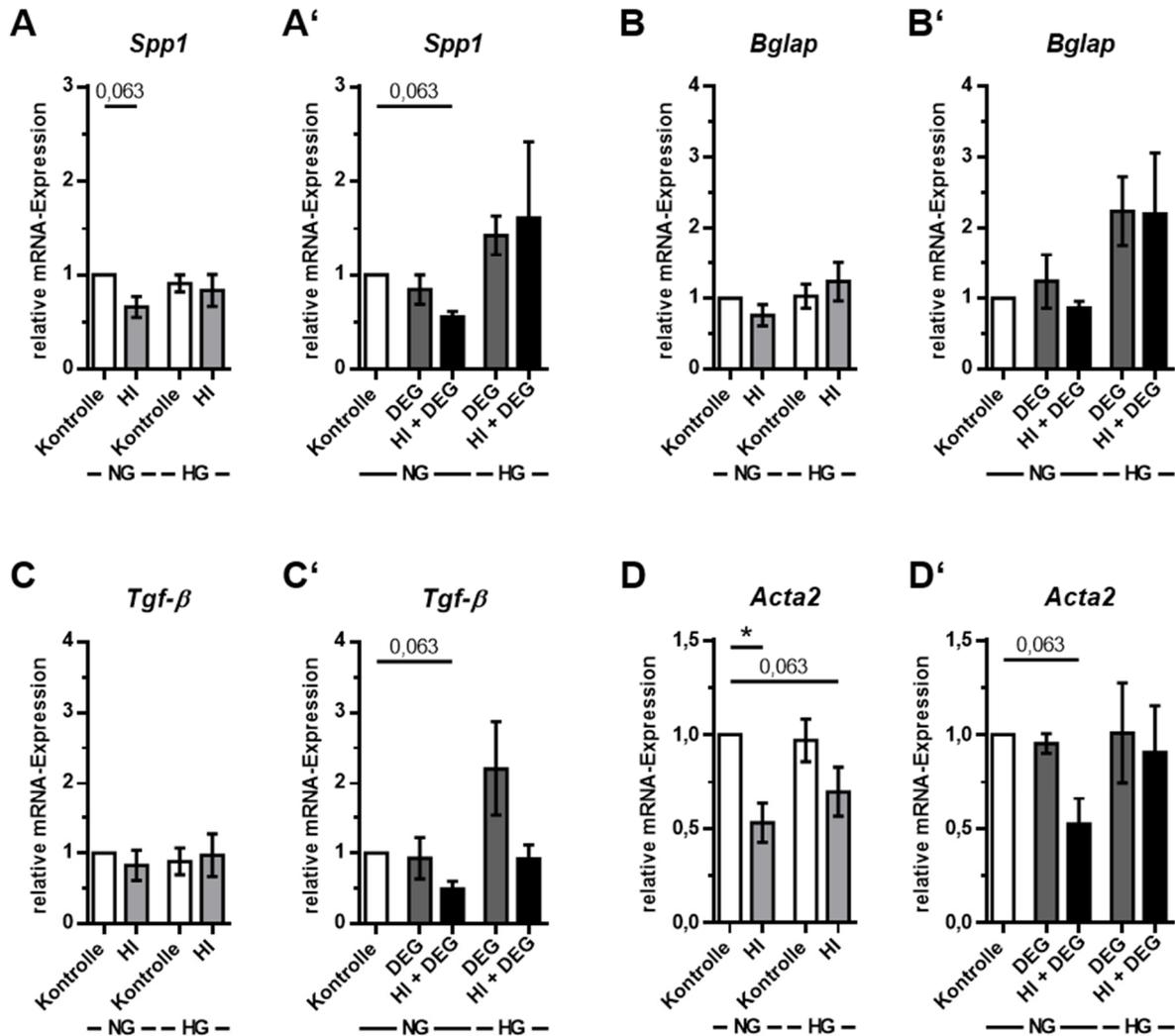


Abbildung 39: mRNA-Expression von Degenerations- und Differenzierungsmarkern

Relative mRNA-Expression der Degenerationsmarker *Spp1*, *Bglap* und *Tgf-β* sowie des Differenzierungsmarkers *Acta2* in ovinen VIC. Die Zellen wurden entweder unter NG- oder HG-Bedingungen kultiviert und mit HI behandelt. Die Auswertung erfolgte getrennt entweder ohne (A-D) oder mit zusätzlicher DEG-Behandlung (A'-D'). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n = 5) relativ zur NG Kontrolle. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Paarweise Vergleiche zur NG Kontrolle wurden durchgeführt mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: * p ≤ 0,05 bzw. p-Werte sind angegeben. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

Kalziumablagerungen in der VIC-Kultur wurden nach fünf Tagen Behandlung mit Alizarinrot angefärbt und makroskopisch dokumentiert (Abbildung 40A). Dabei zeigte sich eine deutliche Rotfärbung in allen DEG-behandelten VIC im Vergleich zu Zellen ohne DEG-Behandlung. Unterschiede aufgrund der beiden verwendeten Glukosekonzentrationen im Kulturmedium oder der Behandlung mit HI waren nicht ersichtlich.

Die Akkumulation von Kalzium wurde zudem mit einem kommerziellen *Calcium Assay Kit* quantifiziert (Abbildung 40B und C). VIC ohne DEG-Behandlung wiesen dabei nur geringe Mengen Kalzium auf und zeigten keine Unterschiede zwischen NG- und HG-Bedingungen oder aufgrund der Behandlung mit HI. Mit zusätzlicher DEG-Behandlung stieg die Kalziummenge in der VIC-Kultur in allen Untersuchungsgruppen signifikant zur gleichen Behandlung ohne DEG an. Außerdem wurde für DEG-behandelte VIC beider Glukosebedingungen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle unter NG nachgewiesen (NG Kontrolle: $0,75 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{mg}$; NG DEG: $6,09 \pm 0,67 \mu\text{g}/\text{mg}$; HG DEG: $7,07 \pm 1,30 \mu\text{g}/\text{mg}$), der sich bei zusätzlicher HI-Behandlung aufhob (NG HI+DEG: $4,55 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{mg}$; HG HI+DEG: $4,82 \pm 0,71 \mu\text{g}/\text{mg}$).

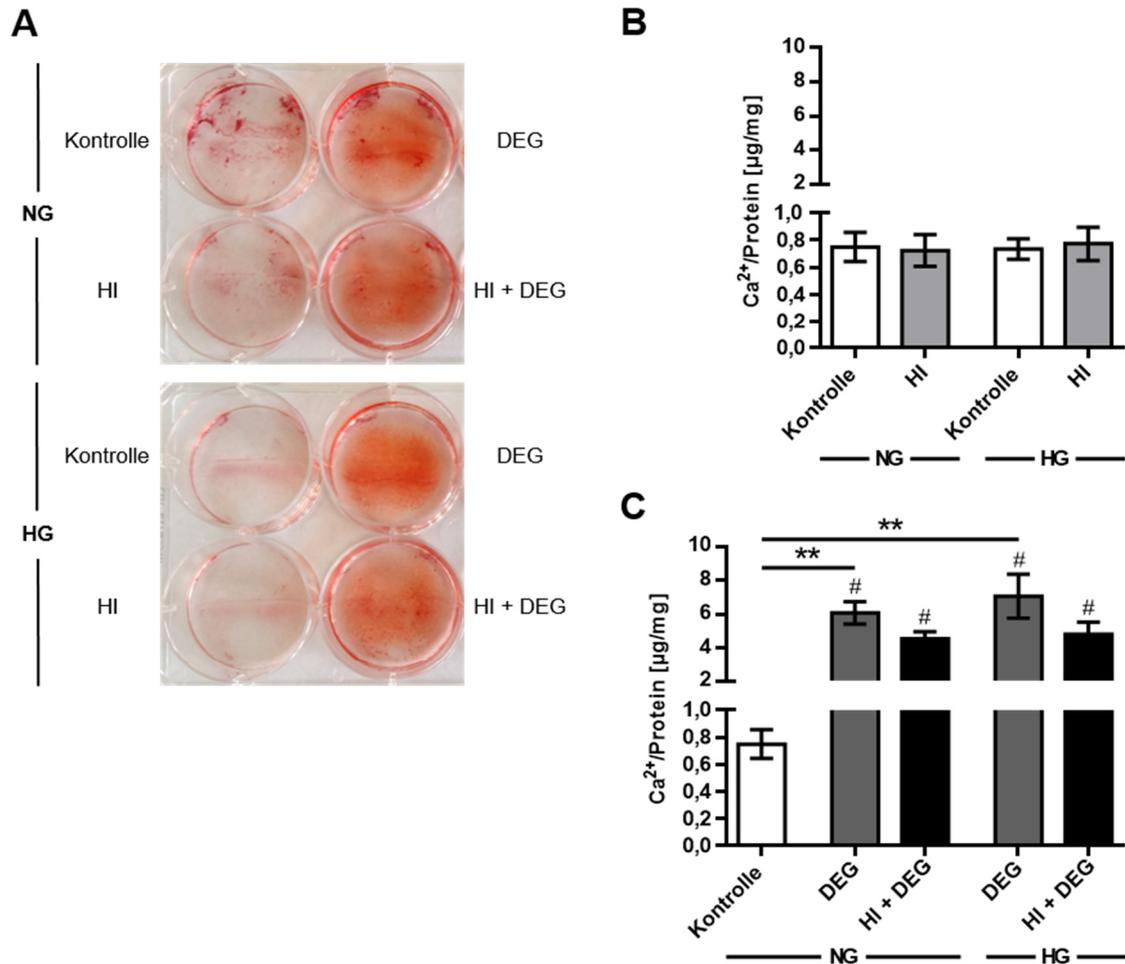


Abbildung 40: Alizarinrot-Färbung und Kalziumquantifizierung

A: Alizarinrot-Färbung von Kalziumablagerungen in der VIC-Kultur nach fünf Tagen unter diabetischen und degenerativen Bedingungen. **B/C:** Quantifizierung des Kalziumgehalts der VIC-Kulturen mittels *Calcium Assay Kit*. Bei der Auswertung wurde zwischen Zellen ohne (**B**) und mit DEG-Behandlung (**C**) unterschieden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ** p \leq 0,01. Paarweise Vergleiche zur gleichen Behandlung ohne DEG wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: # p \leq 0,01. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

3.2.3.2. UMBAU DER EZM

Die relative mRNA-Expression der bereits in humanen AK quantifizierten Proteoglykane *Bgn*, *Dcn*, *Lum* und *Vcan* wurde ebenfalls in VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen untersucht (Abbildung 41). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede aufgrund der Glukosekonzentration im Kulturmedium oder der alleinigen Behandlung mit HI festgestellt. Ausschließlich HI-behandelte VIC mit zusätzlicher DEG-Behandlung unter NG-Bedingungen zeigten im paarweisen Vergleich einen Trend (p = 0,063) zu einer verminderten

mRNA-Expression von *Bgn* (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI + DEG: $0,56 \pm 0,09$) und *Dcn* (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI + DEG: $0,58 \pm 0,05$) verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen unter NG. Für *Vcan* wurde im Trend ($p = 0,063$) eine verminderte mRNA-Expression in DEG-behandelten VIC im paarweisen Vergleich zu Kontrollzellen unter NG nachgewiesen (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG DEG: $0,69 \pm 0,05$).

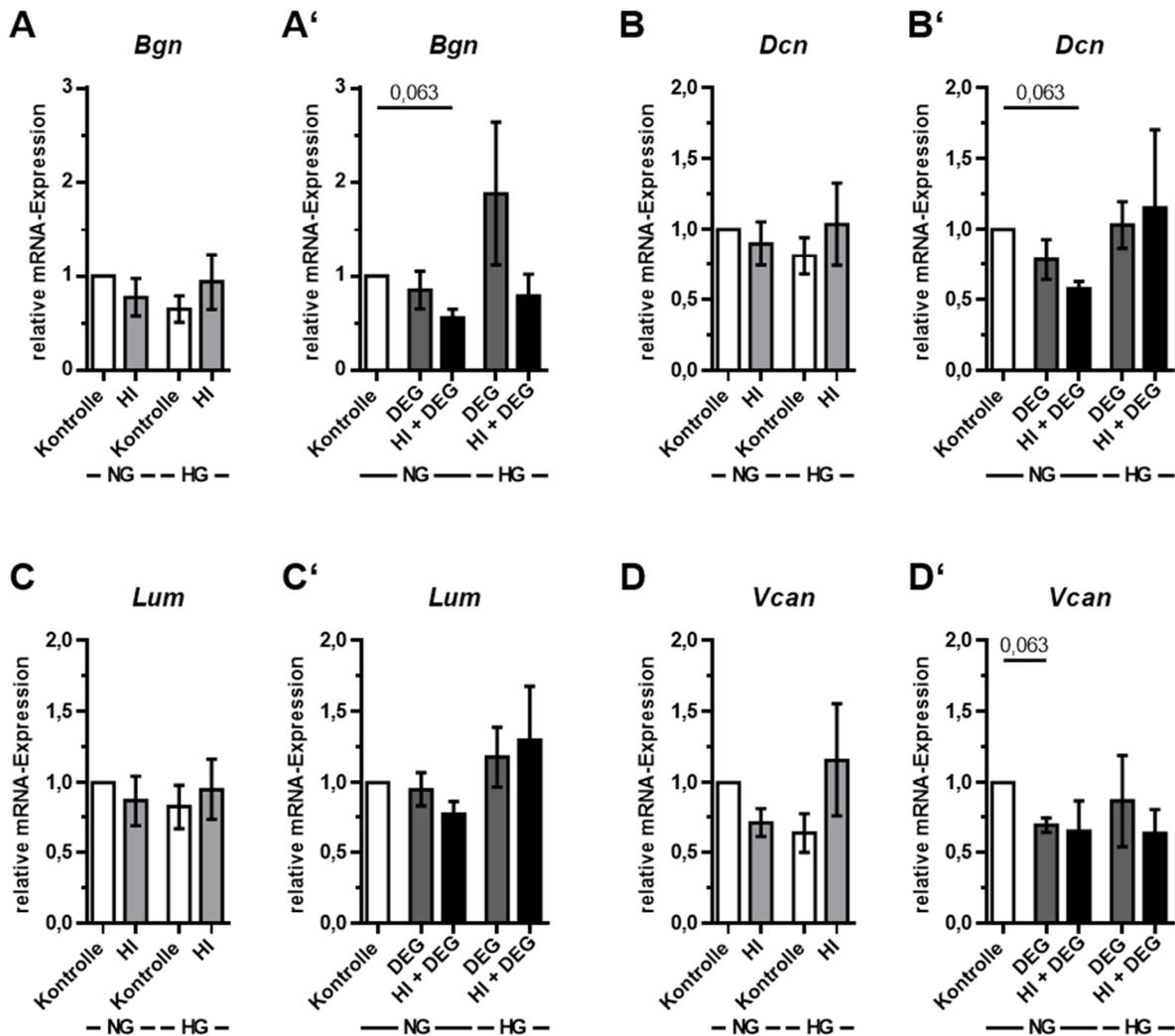


Abbildung 41: mRNA-Expression von Proteoglykanen in ovinen VIC *in vitro*

Ovine VIC mit HI- und DEG-Behandlung wurden unter NG- oder HG-Bedingungen kultiviert und die relative mRNA-Expression der Proteoglykane *Bgn*, *Dcn*, *Lum* und *Vcan* quantifiziert. Die Auswertung erfolgte getrennt zwischen VIC ohne (A-D) und mit DEG-Behandlung (A'-D'). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$) relativ zur NG Kontrolle. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Paarweise Vergleiche zur NG Kontrolle wurden durchgeführt mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: p-Werte sind angegeben. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

Die Expression des BGN-Kernproteins wurde mit einem spezifischen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit* aus dem Überstand der VIC-Kulturen quantifiziert (Abbildung 42). DEG-behandelte VIC unter HG-Bedingungen wiesen dabei eine nahsignifikant erhöhte BGN-Expression im paarweisen Vergleich zur NG Kontrolle auf (NG Kontrolle: $9,68 \pm 4,40$ ng/ μ g; HG DEG: $38,01 \pm 10,96$ ng/ μ g; $p = 0,057$). Alle weiteren Behandlungsmodalitäten hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von BGN.

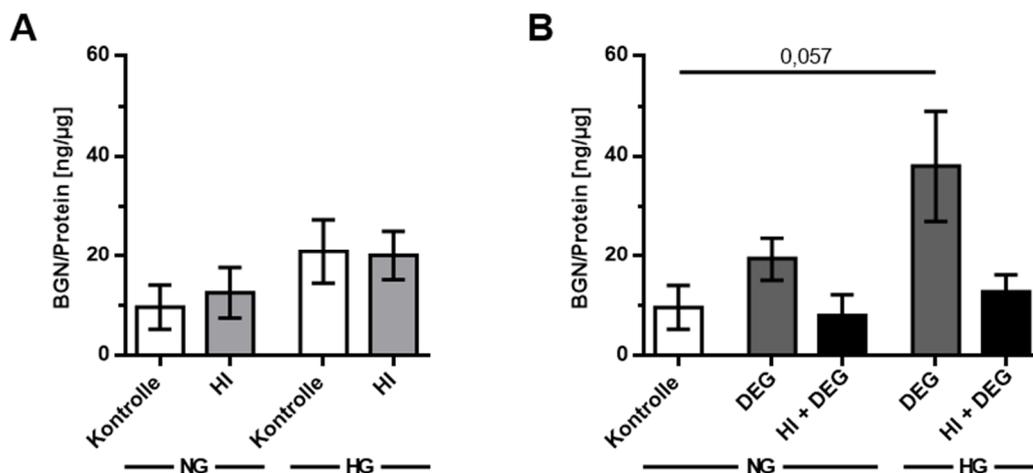


Abbildung 42: Expression von BGN unter diabetischen und degenerativen Bedingungen

Die Expression des BGN-Kernproteins wurde im Überstand der VIC-Kulturen quantifiziert und Zellen entweder ohne (A) oder mit DEG-Behandlung (B) verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 4$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: p-Wert ist angegeben. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

Zusätzlich zur Proteoglykanexpression wurde die mRNA-Expression der HA-Synthase-Isoformen *Has1-3* analysiert (Abbildung 43). Ein direkter Vergleich der ΔC_T -Werte der einzelnen Isoformen ($C_T \text{ Has} - C_T \text{ Rpl29}$) in unbehandelten VIC unter NG (Kontrolle) zeigte signifikante Unterschiede zwischen *Has2* und *Has3* auf ($\Delta C_T \text{ HAS1}$: $8,78 \pm 0,29$; $\Delta C_T \text{ HAS2}$: $6,57 \pm 0,38$; $\Delta C_T \text{ HAS3}$ $13,39 \pm 0,36$). Mit den ermittelten ΔC_T -Werten wurde nach $2^{-\Delta C_T}$ der Anteil der einzelnen HA-Synthase-Isoformen an der Gesamtexpression berechnet. Dabei wies *Has2* mit 81,54 % die anteilig höchste mRNA-Expression auf, während *Has1* und *Has3* mit jeweils 17,73 % und 0,73 % entsprechend geringer exprimiert wurden (Abbildung 43A).

Diabetische und degenerative Bedingungen in der VIC-Kultur hatten auf die relative mRNA-Expression der HA-Synthase-Isoformen *Has1* und *Has3* keinen signifikanten Einfluss.

Für *Has2* wurde im paarweisen Vergleich zur NG Kontrolle eine im Trend ($p = 0,063$) geringere mRNA-Expression in HI-behandelten VIC unter NG ohne und mit zusätzlicher DEG-Behandlung ermittelt (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI: $0,70 \pm 0,11$; NG HI + DEG: $0,50 \pm 0,08$). Auch die Kultivierung unter HG-Bedingungen in ansonsten unbehandelten Kontrollzellen hatte eine verminderte mRNA-Expression von *Has2* zur Folge (HG Kontrolle: $0,63 \pm 0,12$; Abbildung 43B-D).

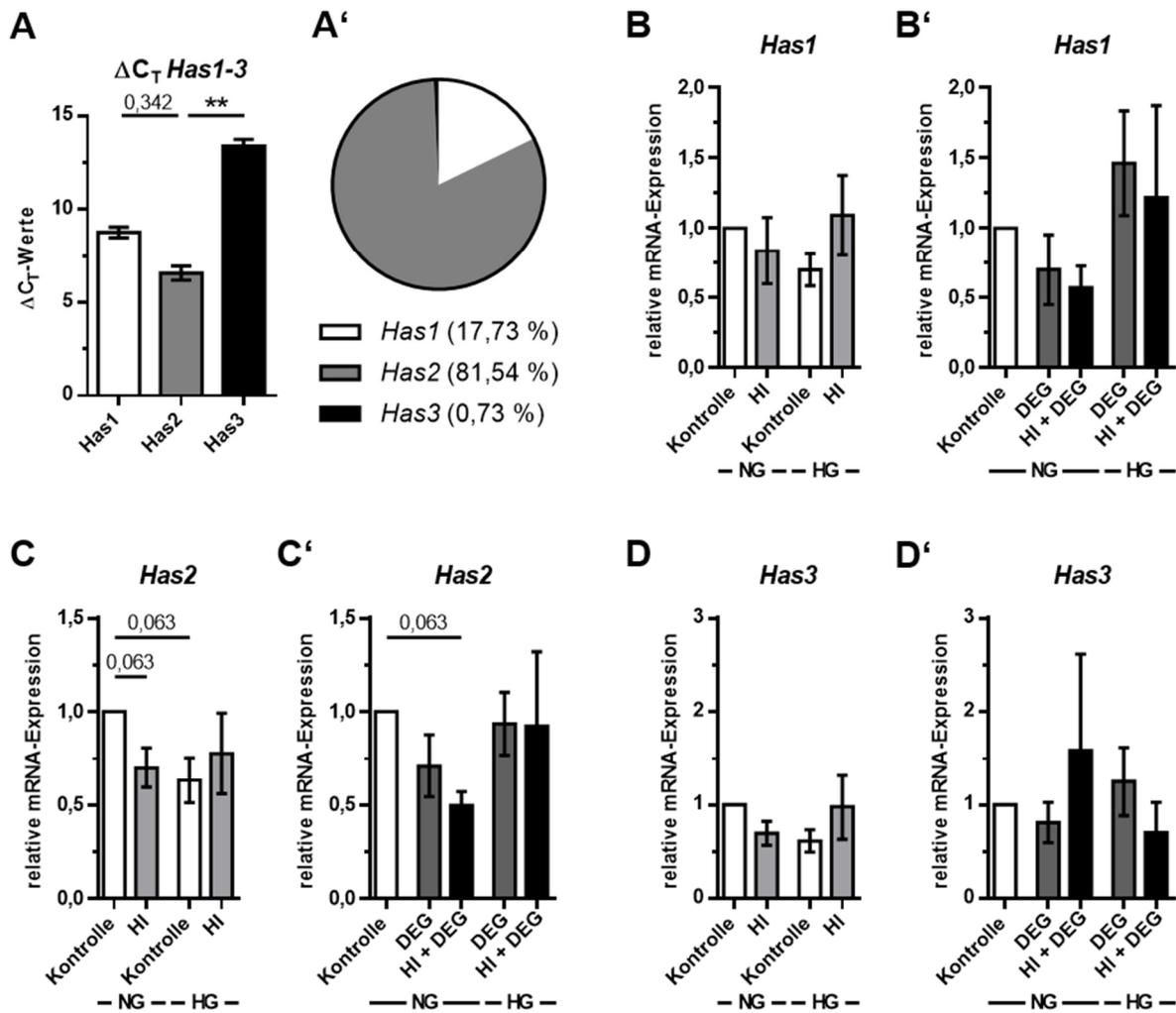


Abbildung 43: mRNA-Expression von HA-Synthasen in ovinen VIC *in vitro*

A: ΔC_T -Werte der drei HA-Synthase-Isoformen *Has1-3* (C_T *Has* - C_T *Rpl29*) in unbeeideten VIC unter NG-Bedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Friedman test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ** $p \leq 0,01$. **A':** Die ermittelten ΔC_T -Werte entsprechen den im Kreisdiagramm angegebenen Anteilen der jeweiligen Isoform an der Gesamtexpression (berechnet nach $2^{-\Delta C_T}$). **B-D:** Relative mRNA-Expression der HA-Synthase-Isoformen *Has1-3* in VIC mit HI- und DEG-Behandlung unter NG- und HG-Bedingungen. Für die Auswertung wurde zwischen VIC ohne (**B-D**) und mit chronischer DEG-Behandlung (**B'-D'**) unterschieden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$) relativ zur NG Kontrolle. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Paarweise Vergleiche zur NG Kontrolle wurden durchgeführt mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: p-Werte sind angegeben. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

Außerdem wurde die Menge an sezernierter HA im Überstand der VIC-Kulturen quantifiziert (Abbildung 44). Vom fünften auf den sechsten Tag in Kultur zeigten VIC, die mit DEG behandelt und unter HG-Bedingungen kultiviert wurden, eine signifikant erhöhte

HA-Konzentration im paarweisen Vergleich zu Kontrollzellen unter NG-Bedingungen (NG Kontrolle: 1017 ± 129 ng/mg; HG DEG: 1610 ± 200 ng/mg). Alle weiteren untersuchten Behandlungsmodalitäten hatten keinen Einfluss auf die Synthese von extrazellulärer HA.

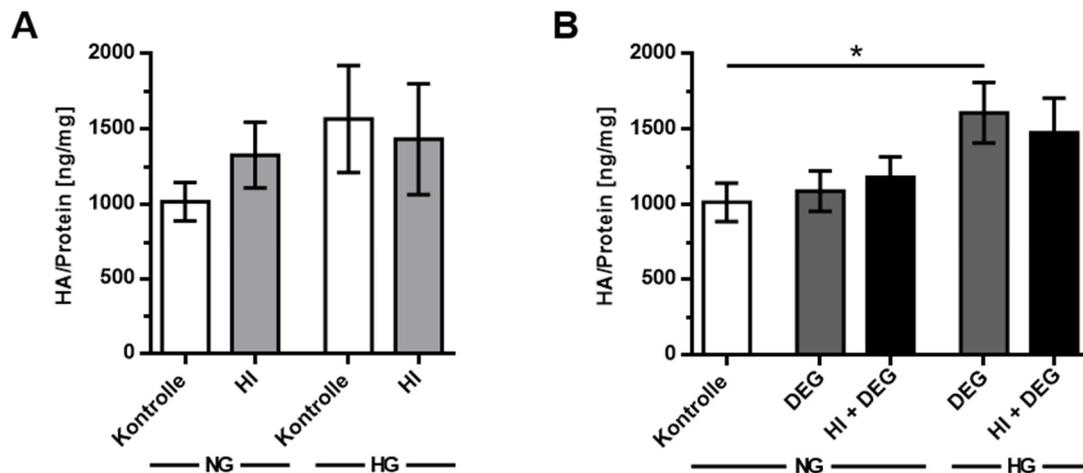


Abbildung 44: HA-Synthese in VIC unter diabetischen und degenerativen Bedingungen

Die Menge an synthetisierter HA im Überstand wurde nach chronischer Behandlung mit HI oder DEG in NG- oder HG-Medium quantifiziert. Verglichen wurden die verschiedenen diabetischen Bedingungen ohne (A) oder mit zusätzlicher DEG-Behandlung (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: * $p \leq 0,05$. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

Bei der DAVD ist die Fibrose und Kalzifizierung der AK-Taschen unter anderem mit einer Anreicherung von Kollagen in der EZM assoziiert (84). In der VIC-Kultur wurde im paarweisen Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte mRNA-Expression für α -1-Typ-1-Kollagen (*Colla1*, *collagen type 1 alpha 1*) in HI-behandelten Zellen detektiert (NG Kontrolle: $1,00 \pm 0,00$; NG HI: $1,83 \pm 0,17$). Im Trend ($p = 0,094$) konnte dies auch für HI-behandelte VIC unter HG-Bedingungen gezeigt werden (HG HI: $2,41 \pm 0,66$). Die DEG-Behandlung mit β -GP und CaCl_2 hatte wiederum keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *Colla1*, weder unter den beiden untersuchten Glukosekonzentrationen im Kulturmedium noch mit zusätzlicher HI-Behandlung (Abbildung 45).

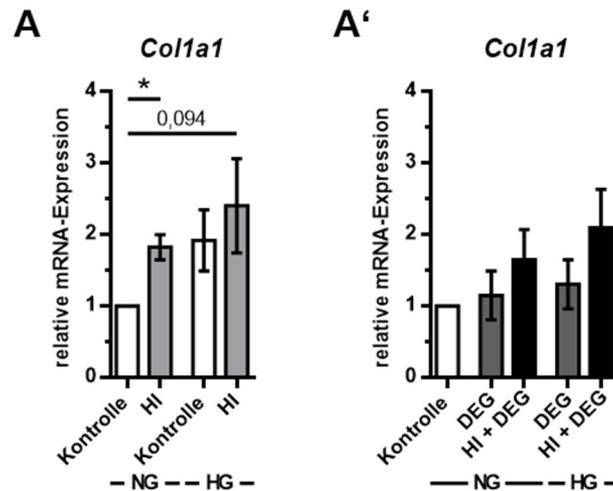


Abbildung 45: mRNA-Expression von Kollagen in ovinen VIC *in vitro*

Die relative mRNA-Expression von *Coll1a1* wurde in VIC nach der Behandlung mit HI und DEG unter NG- und HG-Kultivierungsbedingungen quantifiziert. Bei der Auswertung wurde zwischen Zellen ohne (A) und mit DEG-Behandlung (A') unterschieden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$) relativ zur NG Kontrolle. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Paarweise Vergleiche zur NG Kontrolle wurden durchgeführt mit *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*: * $p \leq 0,05$ bzw. p-Wert ist angegeben. Abkürzungen: NG - Normoglykämie, HG - Hyperglykämie, HI - Hyperinsulinämie, DEG - degenerative Bedingungen

3.3. DEGENERATION VON AK-PROTHESEN MATERIAL IN EINEM EKTOPEN DEGENERATIONSMODELL IN MÄUSEN

Nicht nur die Kalzifizierung nativer AK bei der DAVD, sondern auch die Degeneration von biologischen AK-Prothesen nach operativem AK-Ersatz stellt ein großes Problem des klinischen Alltags dar. Vor allem jüngere Patienten können aufgrund der geringen Haltbarkeit biologischer AK-Prothesen oft nicht von den Vorteilen eines biologischen Implantats profitieren. Daher ist es von besonderer Bedeutung, die Prozesse, die zur Degeneration biologischer Prothesen führen, genau zu verstehen und so die Entwicklung und Verbesserung neuer Prothesenmaterialien voranzutreiben. In dieser Arbeit wurde die Degeneration von Implantationsmaterial mit Hilfe eines ektopen Degenerationsmodells in Mäusen analysiert. Dabei wurde zum einen die Rolle des Proteoglykans BGN untersucht, dem in der Literatur eine pro-degenerative Rolle zugeschrieben wird, und zum anderen der Einfluss von Hyperglykämie als Risikofaktor für eine beschleunigte Prothesendegeneration eruiert.

3.3.1. ETABLIERUNG EINES HYPERGLYKÄMIE-MODELLS FÜR DIE DEGENERATION VON AK-PROTHESEN MATERIAL IN $BGN^{-/0}$ -MÄUSEN

Eine gängige Methode zur Induktion von Hyperglykämie bei Mäusen ist die Behandlung mit STZ. Dabei wird zwischen einem Niedrig-Dosis-Modell mit mehrfachen, niedrig-dosierten STZ-Injektionen und einem Hoch-Dosis-Modell mit einer einmaligen, hochkonzentrierten Dosis STZ unterschieden. Welches Modell zum Auslösen einer Hyperglykämie am effektivsten für den experimentellen Aufbau ist, hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab, wie beispielsweise dem verwendeten Mausstamm oder dem gewünschten Wirkmechanismus (112, 136). Nach Evaluierung einer Pilotgruppe mit 30 Mäusen wurde sich für die folgenden Untersuchungen für das Niedrig-Dosis-Modell mit fünf konsekutiven Injektionen von 55 mg/kg STZ/Körpergewicht entschieden. Der Behandlungserfolg wurde zwei und zehn Wochen nach der ersten STZ-Gabe durch Blutglukosemessungen in venösem Blut aus der Schwanzspitze überprüft (Abbildung 46). Eine Blutglukosekonzentration von ≥ 250 mg/dl nach vier Stunden Nahrungsentzug wurde dabei als hinreichend hyperglykämisch für die folgenden Experimente angenommen.

Sowohl WT- als auch $Bgn^{-/0}$ -Mäuse zeigten zwei bzw. zehn Wochen nach der ersten STZ-Behandlung signifikant erhöhte Blutglukosewerte (2 Wochen: WT STZ $352,7 \pm 14,4$ mg/dl; $Bgn^{-/0}$ STZ $396,4 \pm 42,1$ mg/dl; 10 Wochen: WT STZ $373,5 \pm 27,3$ mg/dl; $Bgn^{-/0}$

STZ $367,9 \pm 25,0$ mg/dl). Mäuse, die an Stelle des STZ nur das Vehikel Citratpuffer injiziert bekommen hatten, wiesen hingegen physiologische Blutglukosewerte auf (2 Wochen: WT Vehikel $156,2 \pm 6,1$ mg/dl; *Bgn*⁻⁰ Vehikel $141,5 \pm 7,3$ mg/dl; 10 Wochen: WT Vehikel $140,0 \pm 3,59$ mg/dl; *Bgn*⁻⁰ Vehikel $137,2 \pm 6,7$ mg/dl). Unterschiede in der STZ-Wirkung aufgrund des Genotyps der Mäuse wurden nicht detektiert. Zudem war der Blutglukosespiegel innerhalb der Untersuchungsgruppen zwischen den beiden gemessenen Zeitpunkten stabil.

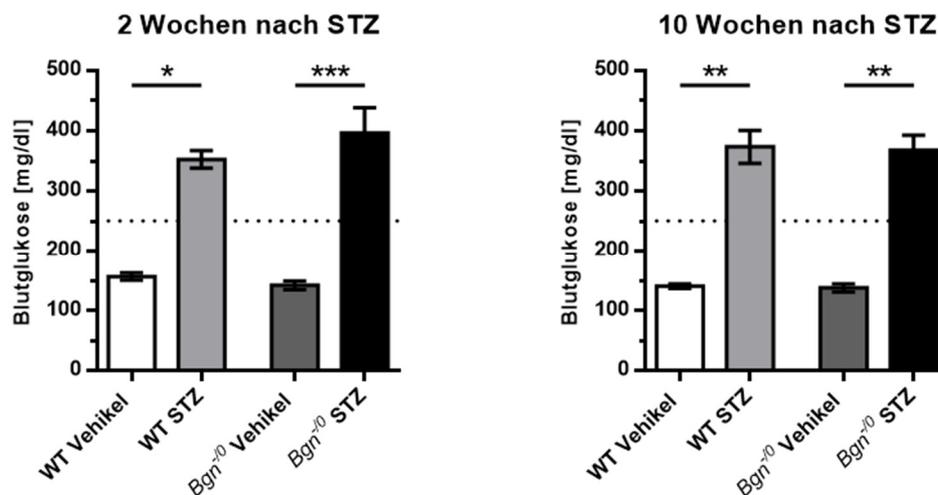


Abbildung 46: Blutglukosekonzentration zwei und zehn Wochen nach STZ-Injektion

Zwei bzw. zehn Wochen nach der ersten STZ-Injektion wurde der Behandlungserfolg durch Bestimmung der Blutglukosekonzentration nach vier Stunden Nahrungsentzug eruiert. Dabei galt eine Nüchtern-Blutglukosekonzentration ≥ 250 mg/dl (gepunktete Linie) als hinreichend hyperglykämisch für die weiteren Analysen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 7/11/9/6$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Abkürzungen: STZ - Streptozocin, WT - Wildtypmäuse, *Bgn*⁻⁰ - *Bgn*-defiziente Mäuse

3.3.2. RNA- UND PROTEINGEHALT DER PROTHESENSTANZEN

Die Re-Besiedlung von biologischen Herzklappen-Prothesen mit Zellen gilt als Grundvoraussetzung für den langfristigen Erhalt der Gewebematrix und damit für die Beständigkeit der AK-Prothese (137). Als Maß für eingewanderte Zelle und deren RNA- und Proteinsynthese wurde hier der RNA- und Proteingehalt der explantierten Prothesenstanzen quantifiziert (Abbildung 47). Dafür wurden die Prothesenstanzen unmittelbar nach der Explantation von dem umgebenden Gewebe befreit und das Prothesenmaterial von der gebildeten Zellkapsel frei präpariert. Für die RNA- und Proteinquantifizierung wurden zwei unabhängige Prothesenstanzen der gleichen Maus verwendet.

Die RNA-Konzentration der explantierten Prothesenstanzen war im Trend ($p = 0,073$) bei STZ-behandelten WT-Mäusen verringert im Vergleich zu WT mit Vehikel-Applikation (WT Vehikel: $855,7 \pm 53,6$ ng/ μ l; WT STZ: $411,7 \pm 70,9$ ng/ μ l). *Bgn*⁻⁰-Mäuse zeigten hingegen keinen Unterschied aufgrund der STZ-Behandlung und wiesen ähnliche RNA-Konzentration wie WT der Vehikelgruppe auf (*Bgn*⁻⁰ Vehikel: $1047,6 \pm 103,8$ ng/ μ l; *Bgn*⁻⁰ STZ: $1047,9 \pm 355,0$ ng/ μ l; Abbildung 47A).

Die Proteinkonzentration war ebenfalls durch die STZ-Behandlung bei WT-Mäusen beeinflusst. Prothesenstanzen aus WT mit STZ-Behandlung hatten eine signifikant geringere Proteinkonzentration verglichen mit WT der Vehikelgruppe (WT Vehikel: $5,11 \pm 0,20$ μ g/ μ l; WT STZ: $2,95 \pm 0,32$ μ g/ μ l). Die Proteinkonzentration der Prothesenstanzen aus *Bgn*⁻⁰-Mäusen wurde durch die STZ-Behandlung nicht beeinflusst und lag in ähnlicher Höhe wie die Proteinkonzentration von Prothesenstanzen aus WT mit Vehikel-Applikation (*Bgn*⁻⁰ Vehikel: $4,26 \pm 0,32$ μ g/ μ l; *Bgn*⁻⁰ STZ: $3,83 \pm 0,48$ μ g/ μ l; Abbildung 47B).

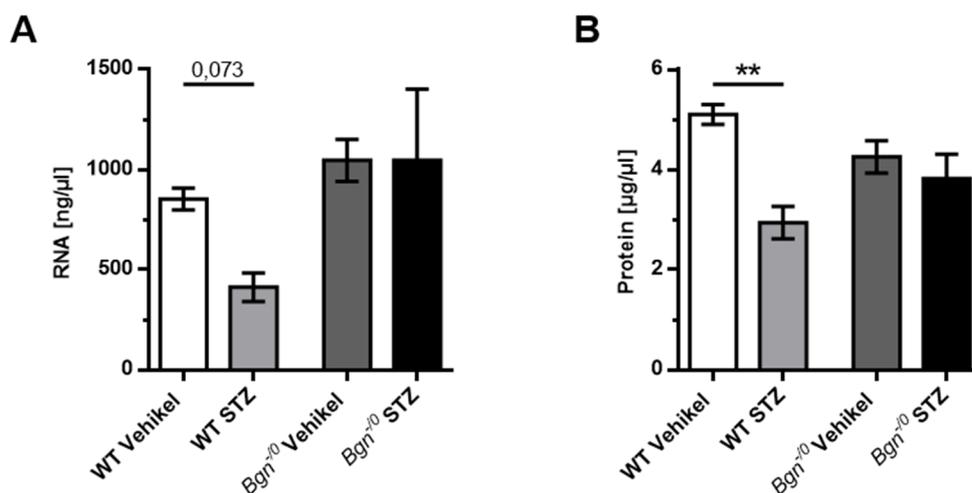


Abbildung 47: RNA- und Proteingehalt der explantierten Prothesenstanzen

Als Maß für die Migration von Zellen in das Prothesenmaterial wurde die RNA- (A) und Proteinkonzentration (B) der explantierten Prothesenstanzen quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 7/11/9/6$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ** $p \leq 0,01$. Abkürzungen: STZ - Streptozocin, WT - Wildtypmäuse, *Bgn*⁻⁰ - *Bgn*-defiziente Mäuse

3.3.3. INFLAMMATION

3.3.3.1. mRNA-EXPRESSION VON INFLAMMATIONSMARKERN

Degenerative Prozesse in Bioprothesen sind oft mit Inflammation und körpereigenen Abwehrmechanismen auf das wirtsfremde Material verbunden (138). Um die Immunantwort der Mäuse unter den verschiedenen Versuchsmodalitäten nachzuvollziehen, wurde die relative mRNA-Expression gängiger Zytokine sowie die Expression der an der angeborenen Immunantwort beteiligten Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*) untersucht (Abbildung 48 und Abbildung 49). Dafür wurden die explantierten Prothesenstanzen vom umliegenden Gewebe befreit und die RNA der in das Material eingewanderten Zellen aufgereinigt.

Die Zytokine *Il-1 β* und Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (*Mcp1*, *monocyte chemotactic protein 1*) zeigten im paarweisen Vergleich von WT-Mäusen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression durch die STZ-Behandlung, die zwar auch in *Bgn*⁻⁰-Mäusen zu erkennen war, dort aber keine statistisch signifikante Ausprägung erreichte (*Il-1 β* : WT Vehikel $0,73 \pm 0,34$; WT STZ $1,94 \pm 0,35$; *Bgn*⁻⁰ Vehikel $0,79 \pm 0,32$; *Bgn*⁻⁰ STZ $1,78 \pm 0,62$; *Mcp1*: WT Vehikel $1,02 \pm 0,37$; WT STZ $1,97 \pm 0,40$; *Bgn*⁻⁰ Vehikel $0,84 \pm 0,23$; *Bgn*⁻⁰ STZ $1,95 \pm 0,56$). Die relative mRNA-Expression von *Inf- γ* war im paarweisen Vergleich von *Bgn*⁻⁰-Mäusen durch die STZ-Behandlung signifikant vermindert, wohingegen in WT-Mäusen eine leicht erhöhte *Inf- γ* -Expression durch die STZ-Applikation detektiert wurde, die jedoch nicht signifikant war (WT Vehikel: $7,15 \pm 2,23$; WT STZ: $14,18 \pm 4,80$; *Bgn*⁻⁰ Vehikel: $14,51 \pm 5,62$; *Bgn*⁻⁰ STZ: $3,63 \pm 1,72$). Für das Zytokin *Tnf- α* wurden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression bestimmt (WT Vehikel $0,61 \pm 0,14$; WT STZ $1,25 \pm 0,25$; *Bgn*⁻⁰ Vehikel $1,37 \pm 0,67$; *Bgn*⁻⁰ STZ $3,84 \pm 2,69$; Abbildung 48).

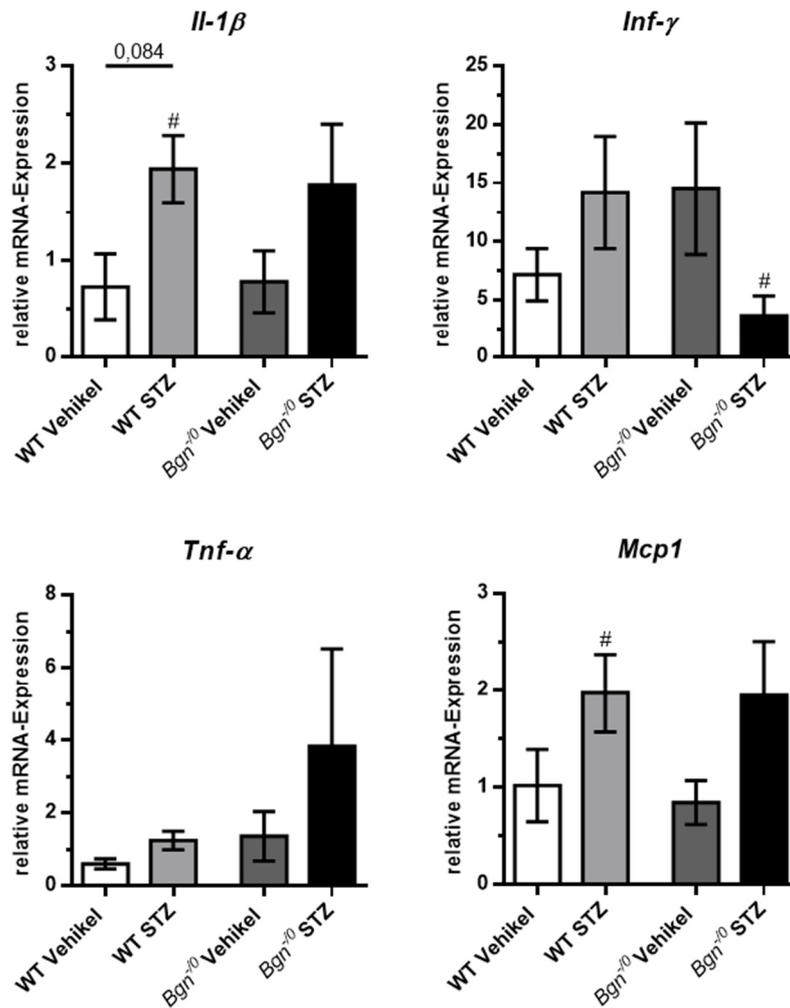


Abbildung 48: mRNA-Expression von Zytokinen

Acht Wochen nach Implantation der Prothesenstanzen wurde die relative mRNA-Expression der Zytokine *Il-1 β* , *Inf- γ* , *Tnf- α* und *Mcp1* der in das Prothesenmaterial eingewanderten Zellen quantifiziert. Dabei wurde zum einen der Einfluss der STZ-Behandlung als auch die Bedeutung von BGN auf die Zytokin-Expression beurteilt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 7/11/9/6$) relativ zu einer Probe der WT Vehikel Gruppe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: p-Werte sind angegeben. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: # $p \leq 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Vehikelgruppe des gleichen Genotyps. Abkürzungen: STZ - Streptozocin, WT - Wildtypmäuse, *Bgn*^{-/-} - *Bgn*-defiziente Mäuse

Die relative mRNA-Expression des Toll-ähnlichen Rezeptors *Tlr2* war durch die STZ-Behandlung sowohl in WT- als auch in *Bgn*^{-/-}-Mäusen im paarweisen Vergleich zur entsprechenden Vehikelgruppe signifikant erhöht (WT Vehikel: $0,70 \pm 0,17$; WT STZ: $1,78 \pm 0,39$; *Bgn*^{-/-} Vehikel: $1,42 \pm 0,72$; *Bgn*^{-/-} STZ: $2,73 \pm 1,31$). Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Genotypen wurden bei gleicher Behandlung nicht detektiert. Die mRNA-Expression von *Tlr4* war hingegen weder durch die STZ-Behandlung noch durch den

Genotyp der Mäuse reguliert (WT Vehikel: $0,62 \pm 0,09$; WT STZ: $0,88 \pm 0,22$; $Bgn^{-/0}$ Vehikel: $0,65 \pm 0,05$; $Bgn^{-/0}$ STZ: $0,78 \pm 0,09$; Abbildung 49).

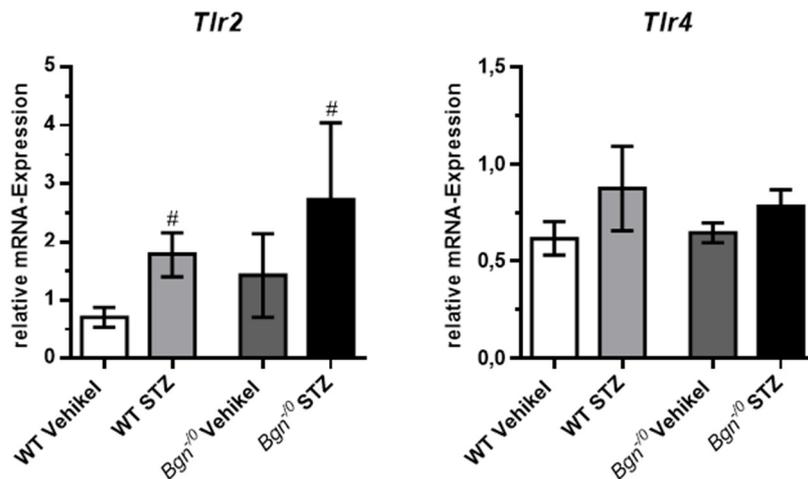


Abbildung 49: mRNA-Expression von *Tlr2* und *Tlr4*

Die relative mRNA-Expression der Toll-ähnlichen Rezeptoren *Tlr2* und *Tlr4* wurde für die in das Prothesenmaterial eingewanderten Zellen bestimmt und der Einfluss der STZ-Behandlung sowie die Bedeutung von BGN auf die Expression eruiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 7/11/9/6$) relativ zu einer Probe der WT Vehikel Gruppe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: # $p \leq 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Vehikelgruppe des gleichen Genotyps. Abkürzungen: STZ - Streptozocin, WT - Wildtypmäuse, $Bgn^{-/0}$ - *Bgn*-defiziente Mäuse

3.3.3.2. BESTIMMUNG ZIRKULIERENDER ZYTOKINE

Neben der mRNA-Expression von Zytokinen innerhalb der Prothesenstanzen wurde die Konzentration verschiedener zirkulierender Zytokine im Plasma der Mäuse mittels Multiplexanalyse quantifiziert. Dabei wurde zum einen der Einfluss des chirurgischen Eingriffs in Vehikel-behandelten WT-Mäusen untersucht (Abbildung 50), zum anderen wurden die Auswirkungen der STZ-Behandlung in WT- und $Bgn^{-/0}$ -Mäusen gegenübergestellt (Abbildung 51).

Acht Wochen nach der Implantation wurden nur geringe Unterschiede zwischen Vehikel-behandelten WT-Mäusen ohne und mit Operation (OP) gemessen, wobei die Streuung der Daten zwischen den einzelnen Tieren sehr hoch war. Für die Zytokine IL-10 und TNF- α wurde in operierten Mäusen ein leichter Trend (IL-10: $p = 0,158$; TNF- α : $p = 0,109$) zu einer erhöhten Expression im Vergleich zu Mäusen ohne OP detektiert (IL-10: ohne OP $60,3 \pm$

13,1 pg/ml; mit OP 101,5 ± 20,2 pg/ml; TNF- α : ohne OP 248 ± 51 pg/ml; mit OP 542 ± 115 pg/ml). Außerdem zeigten Tiere mit Implantation eine signifikant erhöhte Konzentration an GM-CSF verglichen mit Mäusen ohne chirurgischen Eingriff (ohne OP: 23,0 ± 4,6 pg/ml; mit OP: 51,6 ± 9,3 pg/ml). Die Plasmakonzentration der Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-5 und INF- γ war von der Implantation der Prothesenstanzen zum gemessenen Zeitpunkt nicht beeinflusst (IL-1 β : ohne OP 550 ± 386 pg/ml; mit OP 328 ± 53 pg/ml; IL-2: ohne OP 16,2 ± 3,9 pg/ml; mit OP 17,7 ± 2,1 pg/ml; IL-5: ohne OP 23,9 ± 9,9 pg/ml; mit OP 31,7 ± 4,6 pg/ml; INF- γ : ohne OP 50,9 ± 2,7 pg/ml; mit OP 93,5 ± 19,9 pg/ml; Abbildung 50).

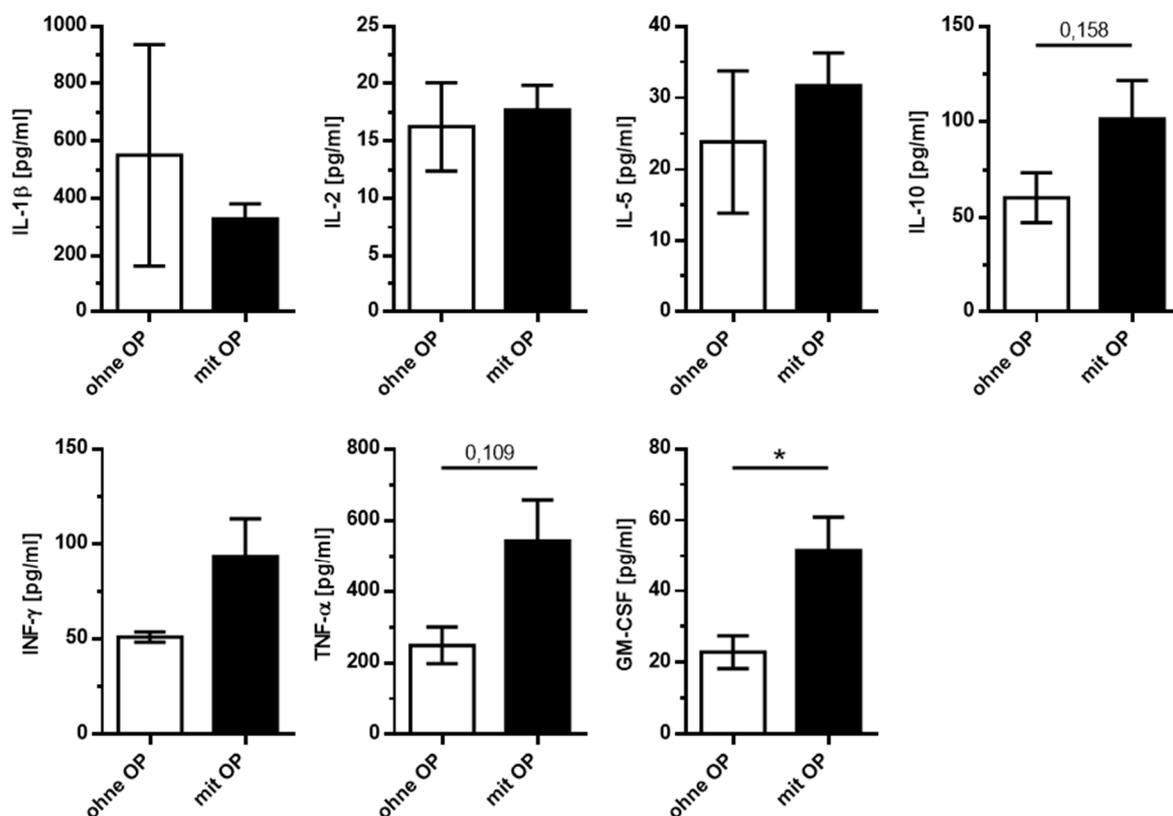


Abbildung 50: Einfluss des operativen Eingriffs auf zirkulierende Zytokine

Die Konzentration zirkulierender Zytokine wurde in Vehikel-behandelten WT-Mäusen acht Wochen nach der Implantation der Prothesenstanzen gemessen und mit der von nicht-operierten Mäusen verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n = 7/4). Signifikanz wurde berechnet mit *Mann-Whitney U test*: * p ≤ 0,05. Abkürzung: OP - Operation

Auch bei einem Vergleich der operierten Mäuse schwankte die Konzentration der zirkulierenden Zytokine stark zwischen den einzelnen Tieren der Untersuchungskohorten,

wodurch keine signifikanten Unterschiede aufgrund der STZ-Behandlung oder des Genotyps festgestellt werden konnten (Abbildung 51).

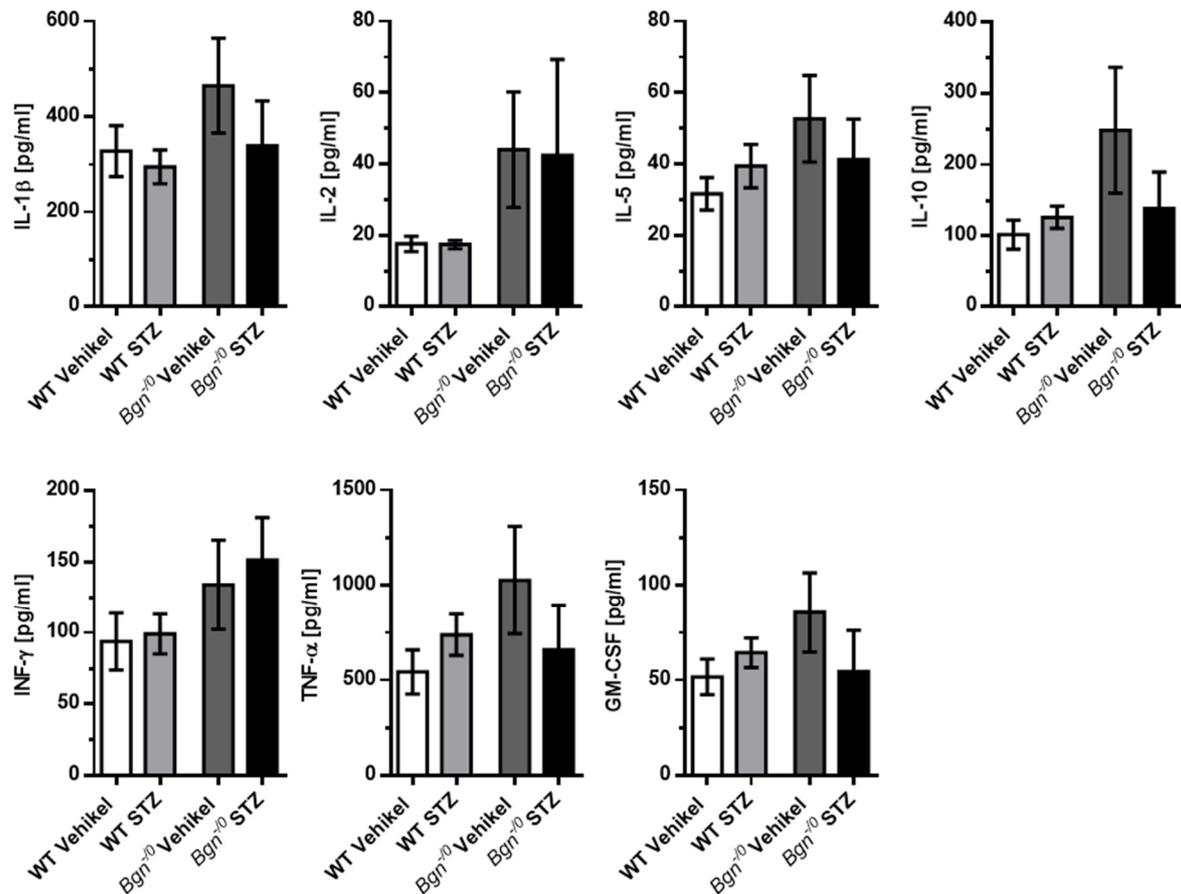


Abbildung 51: Einfluss der *Bgn*-Defizienz und Hyperglykämie auf zirkulierende Zytokine

Acht Wochen nach der Implantation der Prothesenstanzen wurde die Konzentration zirkulierender Zytokine mittels Multiplexanalysen bestimmt. Dabei wurden sowohl die Auswirkungen einer Hyperglykämie durch vorherige STZ-Behandlung als auch der Einfluss des Proteoglykans BGN unter Verwendung *Bgn*-defizienter Mäuse untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 7/10/9/4$). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: ns. Abkürzungen: STZ - Streptozocin, WT - Wildtypmäuse, *Bgn*⁻⁰ - *Bgn*-defiziente Mäuse

3.3.4. DEGENERATION UND KALZIFIZIERUNG DER PROTHESENSTANZEN

3.3.4.1. mRNA-EXPRESSION VON DEGENERATIONSMARKERN UND EZM-KOMPONENTEN

Zusätzlich zu inflammatorischen Prozessen beeinflussen die in Bioprothesen eingewanderten Zellen die Degeneration des Prothesenmaterials durch Sekretion spezifischer Proteine oder den Umbau der EZM. Für das von *Spp1* codierte Protein Osteopontin wurde beispielsweise eine

protektive Rolle im Kontext der Bioprothesendegeneration in Mäusen festgestellt (117, 139). Expressionsanalysen der in das Prothesenmaterial eingewanderten Zellen zeigten acht Wochen nach der Implantation eine mRNA-Expression von *Spp1*, diese war jedoch weder von der STZ-Behandlung noch von dem Genotyp der Tiere abhängig (WT Vehikel: $0,85 \pm 0,17$; WT STZ: $0,80 \pm 0,12$; *Bgn*⁻⁰ Vehikel: $1,03 \pm 0,26$; *Bgn*⁻⁰ STZ: $1,65 \pm 1,01$; Abbildung 52).

Auch für den Degenerationsmarker *Tgf-β* wurden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression bestimmt (WT Vehikel $0,79 \pm 0,11$; WT STZ $1,38 \pm 0,41$; *Bgn*⁻⁰ Vehikel $0,94 \pm 0,17$; *Bgn*⁻⁰ STZ $0,98 \pm 0,08$; Abbildung 52).

Außerdem wurde die mRNA-Expression von *Dcn* analysiert, welches ein dem BGN strukturell- und funktionell-ähnliches Proteoglykan codiert. Im paarweisen Vergleich war die mRNA-Expression von *Dcn* in STZ-behandelten Mäusen signifikant höher als in Vehikel-behandelten Tieren des gleichen Genotyps (WT Vehikel: $0,55 \pm 0,12$; WT STZ: $1,13 \pm 0,19$; *Bgn*⁻⁰ Vehikel: $0,51 \pm 0,27$; *Bgn*⁻⁰ STZ: $1,70 \pm 0,41$). Bei *Bgn*⁻⁰-Mäusen war der Expressionsunterschied aufgrund der STZ-Behandlung auch im Untersuchungsgruppen-übergreifenden Vergleich signifikant (Abbildung 52).

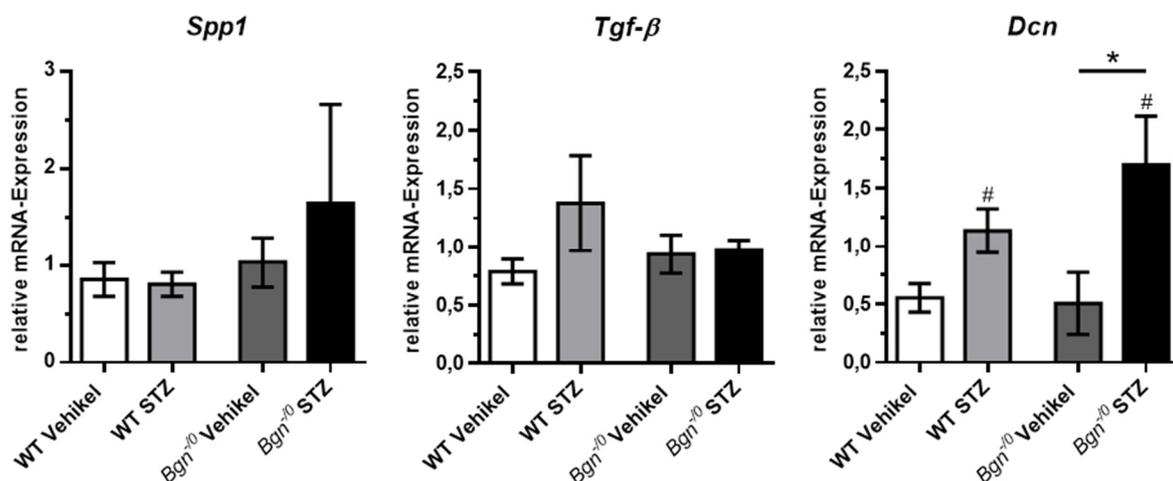


Abbildung 52: mRNA-Expression von *Spp1*, *Tgf-β* und *Dcn*

Die relative mRNA-Expression der Degenerationsmarker *Spp1* und *Tgf-β* sowie des Proteoglykans *Dcn* wurde in den explantierten Prothesenstanzen gemessen und der Einfluss der STZ-Behandlung sowie das Fehlen von BGN auf die Expression der Zielgene eruiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 7/11/9/6$) relativ zu einer Probe der WT Vehikel Gruppe. Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * $p \leq 0,05$. Paarweise Vergleiche wurden durchgeführt mit *Mann-Whitney U test*: # $p \leq 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Vehikelgruppe des gleichen Genotyps. Abkürzungen: STZ - Streptozocin, WT - Wildtypmäuse, *Bgn*⁻⁰ - *Bgn*-defiziente Mäuse

3.3.4.2. KALZIUMAKKUMULATION IN DEM AK-PROTHESENATERIAL

Eine starke Degeneration von Bioprothesen ist mit der Akkumulation von Kalzium verbunden, die zum Funktionsverlust der Prothese führen kann. In den explantierten Prothesenstanzen der STZ-behandelten WT-Mäuse wurde eine signifikant erhöhte Kalziumkonzentration im Vergleich zu den Stanzen aus WT-Tieren mit Vehikel-Behandlung gemessen (WT Vehikel: $8,96 \pm 1,95 \mu\text{g}/\text{mg}$; WT STZ: $18,54 \pm 2,42 \mu\text{g}/\text{mg}$). *Bgn*⁻⁰-Mäuse wiesen hingegen keine Unterschiede in der Kalziumakkumulation aufgrund der STZ-Behandlung auf (*Bgn*⁻⁰ WT: $9,84 \pm 1,76 \mu\text{g}/\text{mg}$; *Bgn*⁻⁰ STZ: $12,97 \pm 2,62 \mu\text{g}/\text{mg}$). Sowohl Prothesenstanzen von STZ- als auch von Vehikel-behandelte *Bgn*⁻⁰-Mäuse hatten einen ähnlichen Kalziumgehalt wie die Stanzen aus WT der Kontrollgruppe (Abbildung 53).

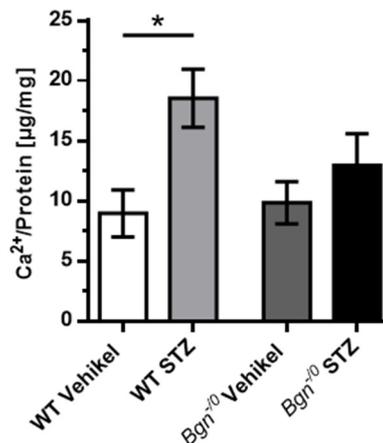


Abbildung 53: Kalziumgehalt der explantierten Prothesenstanzen

Die Kalziumakkumulation in den Prothesenstanzen wurde mit einem kommerziellen *Calcium Assay Kit* quantifiziert. Dabei wurden WT- und *Bgn*⁻⁰-Mäuse mit Vehikel- oder STZ-Behandlung verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 7/11/9/6). Signifikanzen wurden berechnet mit *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple comparisons test*: * p \leq 0,05. Abkürzungen: STZ - Streptozocin, WT - Wildtypmäuse, *Bgn*⁻⁰ - *Bgn*-defiziente Mäuse

4. DISKUSSION

4.1. *EX-VIVO*-ANALYSEN ZUM EZM-UMBAU IN HUMANEN AK

Verschiedene Proteoglykane und das Glykosaminoglykan HA stehen im Verdacht durch ihre vielfältigen Funktionen und Eigenschaften an der Entwicklung und Progression der DAVD beteiligt zu sein (84). Dennoch fehlt es an detaillierten Daten zur Verteilung einzelner Proteoglykane in den verschiedenen Stadien der DAVD. In dieser Arbeit wurde in umfassenden Patientenkohorten die Expression spezifischer Proteoglykane in Abhängigkeit des Degenerationsgrads in humanen AK untersucht sowie die Expression der einzelnen HA-Synthase-Isoformen näher beschrieben.

Darüber hinaus ist bekannt, dass die Verteilung von Proteoglykanen und HA in verschiedenen Geweben durch T2D verändert wird (101-103). Jedoch sind trotz des stetig wachsenden Einflusses von T2D als kardiovaskulärer Risikofaktor die Auswirkungen einer T2D-Erkrankung auf die EZM-Zusammensetzung in humanen AK nicht bekannt. Daher wurde im zweiten Teil der *Ex-vivo*-Analysen die Expression einzelner Proteoglykane und der HA-Synthase-Isoformen in AK von Diabetikern der von Nicht-Diabetikern gegenübergestellt.

4.1.1. MORPHOLOGISCHE EINTEILUNG DES AK-GEWEBES UND VALIDIERUNG DURCH CHONDRO-OSTEOGENE DIFFERENZIERUNGSMARKER

4.1.1.1. EINTEILUNG DES AK-GEWEBES NACH MORPHOLOGISCHEM DEGENERATIONSGRAD

Die Klassifizierung des AK-Gewebes erfolgte nach makroskopischer Beurteilung unabhängig von der medizinischen Indikation des AK-Ersatzes. Dabei wurde das Gewebe in unveränderte, fibrotische und kalzifizierte AK eingeteilt (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Im Gegensatz zur Klinik, die auf Grundlage echokardiografischer Daten zwischen AK-Sklerose und AK-Stenose verschiedene funktionelle Stadien der DAVD unterscheidet, spiegelt die hier verwendete Klassifizierung entsprechend der Morphologie der AK-Taschen die Struktur des Gewebes während der Progression der DAVD wider. Einen ähnlichen Ansatz zur Einteilung von AK-Gewebe wählten bereits auch andere Arbeitsgruppen (140-142). Bei den zugrundeliegenden Untersuchungen wurden zum einen komplette AK-Taschen mit einheitlicher Morphologie verschiedener Patienten verglichen oder fibrotische und kalzifizierte Bereiche derselben AK-Tasche gegenübergestellt.

4.1.1.2. VALIDIERUNG DER DEGENERATIONSGRADE KOMPLETTER AK-TASCHEN

Validiert wurde die Einteilung der AK durch die Analyse der mRNA-Expression bekannter Degenerationsmarker, die im Zusammenhang mit der DAVD stehen (143, 144). Bei der Analyse kompletter AK-Taschen wiesen die Degenerationsmarker *ALPL*, *SPP1* und *TGF- β* eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in fibrotischen und kalzifizierten AK im Vergleich zu unveränderten AK auf. *BGLAP* zeigte in kalzifizierten AK eine nah-signifikant erhöhte mRNA-Expression verglichen mit unveränderten AK. Damit ließen sich degenerierte AK auch auf molekularer Ebene klar von strukturell unveränderten AK abgrenzen.

Zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen wurde nur für den Degenerationsmarker *SPP1* ein signifikanter Anstieg in der mRNA-Expression detektiert. Alle weiteren Degenerationsmarker zeigten keine Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK-Taschen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression der anderen untersuchten Degenerationsmarker nicht vom Degenerationsgrad des Gewebes abhängt, sondern unabhängig von der Stärke des strukturellen Umbaus während der Degeneration der AK erfolgt.

Die Klassifizierung der AK-Taschen wurde zudem durch von Kossa-Färbungen bestätigt (unveröffentlichte Daten von Dr. Mareike Barth, Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). In einem repräsentativen Set von drei AK-Taschen pro Gruppe wurde gezeigt, dass die als fibrotisch deklarierten AK kaum Mineralisierungen aufwiesen, während AK der kalzifizierten Gruppe stark mit Kalziumeinlagerungen durchsetzt waren.

4.1.1.3. VALIDIERUNG DER DEGENERATIONSGRADE INNERHALB DERSELBEN AK-TASCHE

Im Gegensatz zu den Analysen mit kompletten AK-Taschen wiesen fibrotische und kalzifizierte Bereiche derselben AK-Tasche deutliche mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Degenerationsgraden auf. Alle Degenerationsmarker waren im kalzifizierten Bereich signifikant höher exprimiert als im fibrotischen Bereich. Dies zeigt, dass Expressionsunterschiede zwischen den beiden unterteilten Degenerationsgraden innerhalb einer Tasche besser herausgearbeitet werden können, als beim Vergleich kompletter AK-Taschen unterschiedlicher Patienten. Patientenspezifische Parameter wie Vorerkrankungen, Medikamente oder genetische Faktoren könnten hier die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsgruppen unter Verwendung kompletter AK-Taschen beeinflusst haben und müssen bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

4.1.2. BEURTEILUNG DER PATIENTENKOHORTE

Die Proben- bzw. Patientenauswahl erfolgte retrospektiv und entsprechend der unter 2.2. bis 2.4. aufgeführten Kriterien nicht-randomisiert. Viele der zwischen den Untersuchungskohorten nachgewiesenen Unterschiede lassen sich daher schon mit der Probenauswahl begründen. Unveränderte AK-Taschen stammen größtenteils von Patienten nach orthotoper Herztransplantation, während Patienten mit degenerierten AK meist auf einen AK-Ersatz aufgrund einer schweren AK-Stenose oder einer Regurgitation der Klappe angewiesen waren.

Empfänger von Herztransplantationen leiden oft an moderaten bis schweren chronischen Nierenerkrankungen, was im kardiorenalem Syndrom begründet liegt. Dabei ruft der akute oder chronische Funktionsverlust des einen Organs die Funktionseinschränkung des anderen Organs hervor (145). Außerdem müssen Patienten, die bis zur Transplantation auf ein künstliches Herzunterstützungssystem angewiesen sind, mit oralen Langzeit-Antikoagulanzen behandelt werden, um einer Thrombenbildung entgegenzuwirken (146). Diese Besonderheiten bei Herztransplantationspatienten zeigten sich auch in der hier untersuchten Patientenkohorte zwischen unveränderten und degenerierten AK (siehe Tabelle 9).

Patienten mit degenerierten AK, die auf einen AK-Ersatz angewiesen waren, sind hingegen deutlich älter als Herztransplantationsempfänger und wiesen gängige kardiovaskuläre Risikofaktoren wie einen erhöhten Körpermasseindex, arterielle Hypertonie oder Dyslipoproteinämie auf. Diese klinischen Parameter sind ebenfalls mit der Entwicklung und Progression der DAVD assoziiert (22). Unterschiede zwischen fibrotischen und kalzifizierten AK wurden nicht detektiert, was die Homogenität zwischen den Untersuchungskohorten trotz der rein auf makroskopischen Kriterien beruhenden Auswahl untermauert und eine wichtige Voraussetzung für die durchgeführten Analysen darstellte.

Eine weitere Unterteilung der degenerierten AK in Patienten ohne und mit T2D offenbarte Unterschiede in den klinischen Parametern der Patienten aufgrund der T2D-Erkrankung. Diabetiker hatten eine deutlich erhöhte Blutglukosekonzentration und zeigten in der kalzifizierten Gruppe einen höheren Körpermasseindex. Beide Parameter sind eng mit T2D verbunden und bestätigen die Einteilung der Untersuchungskohorten (78). Zudem zeigten sich zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern Unterschiede in den Komorbiditäten und der Medikation, die sich auf die Analysen ausgewirkt haben könnten.

4.1.3. EXPRESSION VON EZM-MOLEKÜLEN IN ABHÄNGIGKEIT DES DEGENERATIONSGRADS DER AK

4.1.3.1. EXPRESSION VON PROTEOGLYKANEN

Diverse Studien untersuchten bereits die Verteilung verschiedener Proteoglykane und HA in humanen AK, jedoch mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen und oft nur unter Verwendung geringer Stichprobengrößen (85, 88, 89, 147, 148). Durch die Verwendung einer umfangreichen Probenanzahl von 158 AK-Taschen und einer differenzierten Unterteilung der Morphologie der Taschen sollen die hier dargestellten Ergebnisse die bisherige Datenlage in der Literatur komplementieren.

Die durchgeführten Expressionsanalysen verschiedener Vertreter der Proteoglykane zeigten eine deutliche Hochregulation an *BGN* und *VCAN* in degenerierten humanen AK-Taschen, während *DCN* und *LUM* keine Unterschiede zwischen morphologisch unveränderten und degenerierten AK aufzeigten. Eine Anreicherung von *BGN* in degenerierten AK wurde bereits mehrfach beschrieben (88, 89, 148) und könnte auf die ebenfalls erhöhte *TGF-β*-Expression in degenerierten AK zurückzuführen sein. Von kardialen Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen ist bekannt, dass eine Behandlung mit *TGF-β* zu einer erhöhten Expression von *BGN* führt (149, 150). Diese Anreicherung von *BGN* in degenerierten AK könnte zu einer verstärkten Akkumulation von Lipoproteinen niedriger Dichte beitragen und so die Progression der DAVD unterstützen (86). Obwohl generell eine erhöhte Synthese von Proteoglykanen mit Chondroitinsulfat- oder Dermatan-sulfat-Seitenketten durch die Stimulation mit *TGF-β* beschrieben ist (151), konnte in der untersuchten Kohorte keine erhöhte mRNA-Expression für *DCN* in degenerierten AK-Taschen detektiert werden. Die Verteilung von *VCAN* in humanen AK ist in der Literatur divers diskutiert. Während Derbali *et al.* keine Unterschiede in der *VCAN*-mRNA-Expression zwischen Kontroll-AK und degenerierten AK quantifizieren konnten (89), wiesen Stephens *et al.* auf eine starke *VCAN*-Ansammlung in direkter Umgebung von Kalzifizierungsherden hin (85). Darüber hinaus konnte in humanen VIC eine erhöhte *VCAN*-Sekretion nach Entzündung festgestellt werden (152), die auch ursächlich für die beobachtete Hochregulation in degenerierten AK sein könnte.

Beim Vergleich degenerierter AK wurde für *BGN* und *DCN* eine signifikant höhere mRNA-Expression in fibrotischen AK-Taschen im Vergleich zu kalzifizierten AK bestimmt. Die Expression von *LUM* und *VCAN* war hingegen unabhängig von der Stärke der Degeneration. Außerdem wurden die mRNA-Expressionsdaten für *BGN* auf Proteinebene durch Nachweis des *BGN*-Kernproteins validiert. Auch hier zeigte sich eine deutliche

Überexpression von BGN in fibrotischen AK. Diese Ergebnisse decken sich mit einer kürzlich veröffentlichten Proteom-Studie, in der unterschiedlich stark degenerierte Bereiche einer AK-Tasche untersucht wurden (148). Im fibrotischen Anteil der AK-Taschen stellten BGN und DCN die beiden Stadien-spezifisch am stärksten exprimierten Proteine dar (148). LUM und VCAN wurden hingegen nicht näher aufgeführt (148).

In unterschiedlich stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche war die mRNA-Expression von *BGN*, *LUM* und *VCAN* im kalzifizierten Anteil höher als im fibrotischen. Dabei deckt sich die *BGN*-Expression mit der mRNA-Expression von *TGF- β* , die ebenfalls im kalzifizierten Anteil der AK-Taschen erhöht war. Diese Korrelation unterstützt die Hypothese, dass eine Anreicherung von *BGN* in degenerierten AK in der Überexpression von *TGF- β* begründet liegt. Eine erhöhte mRNA-Expression von *DCN* konnte wie bereits bei den Untersuchungen mit kompletten AK-Taschen nicht belegt werden. Außerdem könnte die erhöhte mRNA-Expression von *VCAN* in der gesteigerten Expression von *BGN* begründet sein, da eine enge Korrelation beider Proteoglykane in degenerierten AK bereits durch immunhistochemische Färbungen dargelegt wurde (85). Unterschiede in der mRNA-Expression von *LUM* können an dieser Stelle nicht begründet werden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Beim direkten Vergleich der mRNA-Expressionen kompletter AK-Taschen mit den Ergebnissen innerhalb derselben AK-Tasche zeigten sich ambivalente Expressionsmuster für die einzelnen Proteoglykane, was die Komplexität der Proteoglykanexpression und ihrer Regulation in humanen AK unterstreicht. Die Unterschiede zwischen den beiden Analysen könnten in dem experimentellen Aufbau an sich begründet sein. Bei den Untersuchungen an kompletten AK-Taschen stammten die Vergleichsgruppen aus verschiedenen Patienten mit individuellen Vorerkrankungen und klinischen Charakteristika, die die Expression beeinflussen haben könnten. Dieser patientenabhängige Einfluss konnte bei den Analysen innerhalb derselben AK-Tasche ausgeschlossen werden, jedoch wurden hier verschiedene Regionen einer Tasche für die Analyse verwendet, die aufgrund unterschiedlicher, vorherrschender Strömungs- und Druckverhältnisse ebenfalls die Expressionsergebnisse der einzelnen Proteoglykane beeinflusst haben könnten.

4.1.3.2. EXPRESSION DER HA-SYNTHASE-ISOFORMEN

In unveränderten humanen AK-Taschen ist *HAS2* die am stärksten exprimierte Isoform, während *HAS1* und *HAS3* mit einem Expressionsanteil von nur etwa 5 % deutlich

unterrepräsentiert sind. Die getroffenen Aussagen unterliegen der Prämisse, dass die Primereffizienz in der semi-quantitativen qPCR 100 % betrug, werden jedoch von der Literatur bekräftigt, in der ebenfalls deutlich niedrigere mRNA-Expressionslevel für *HAS1* und *HAS3* in porcinen VIC detektiert wurden (153). Die Synthese von HA durch *HAS2* ist für die embryonale Entwicklung des Herzens und seiner Klappen essentiell (154). Bei Mäusen führt eine *Has2*-Defizienz zu schweren kardialen und vaskulären Fehlbildungen und ist in der Embryonalentwicklung an Tag 9,5 bis 10 letal (154). Dabei ist die Entwicklung des atrio-ventrikulären Kanals in *Has2*-defizienten Mäusen durch Ausbleiben der epithelial-mesenchymalen Transition gestört (154).

Beim Vergleich kalzifizierter humaner AK-Taschen mit fibrotischen AK-Taschen konnte für *HAS2* und *HAS3* eine verminderte mRNA-Expression nachgewiesen werden. *HAS1* unterlag keinen Expressionsunterschieden aufgrund des Degenerationsgrads der AK. Auch Krishnamurthy *et al.* hat in immunhistochemischen Färbungen Expressionsunterschiede für Proteine des HA-Systems in humanen AK nachgewiesen (153). Dabei zeigte *HAS2* eine verminderte Expression in erkrankten AK verglichen mit normalen AK (153), die den in dieser Arbeit beobachteten, degenerationsabhängigen Expressionsunterschieden der *HAS2* ähneln. Zudem wurde in immunhistochemischen Färbungen humaner AK gezeigt, dass HA in stark kalzifizierten Bereichen vermindert vorliegt (85, 155).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an kompletten AK-Taschen stieg die mRNA-Expression aller drei HA-Synthese-Isoformen in unterschiedlich stark degenerierten Bereichen derselben AK-Tasche mit dem Grad der Degeneration an. Dies widerspricht dem in der Literatur beschriebenen negativen Zusammenhang der Expression von *HAS2* bzw. HA und der Stärke der Kalzifizierung (85, 153, 155). Dieser Anstieg der *HAS*-Expression könnte in der ebenfalls erhöhten mRNA-Expression von *TGF-β* begründet sein. So zeigten porcine AK nach zweiwöchiger Kultivierung mit TGF-β eine signifikant erhöhte mRNA-Expression für *HAS2* im Vergleich zu nativen AK und kultivierten AK ohne TGF-β-Behandlung (153). Darüber hinaus wurde für ovine VIC eine gesteigerte HA-Synthese nach TGF-β-Stimulation nachgewiesen (156).

4.1.4. ÄNDERUNGEN IN DER EXPRESSION VON EZM-MOLEKÜLEN AUFGRUND EINER T2D-ERKRANKUNG

4.1.4.1. EINFLUSS VON T2D AUF DIE EXPRESSION VON DEGENERATIONSMARKERN

Unterschiede aufgrund einer T2D-Erkrankung wurden in der mRNA-Expression der Degenerationsmarker nicht detektiert. Weder bei den Untersuchungen an kompletten AK-Taschen noch bei den Analysen innerhalb derselben AK-Tasche zeigte sich eine Regulation in der mRNA-Expression durch die Unterteilung in Nicht-Diabetiker und Diabetiker. Dies weist darauf hin, dass T2D *per se* keinen Einfluss auf die Expression chondro-osteogener Degenerationsmarker hat, sondern sich eventuell indirekt durch Beeinflussung anderer Prozesse, wie beispielsweise die Expression von EZM-Molekülen oder die Aktivierung von T2D-abhängigen Signalwegen, negativ auf die Integrität der AK auswirkt.

4.1.4.2. EXPRESSION VON PROTEOGLYKANEN

Nach der Unterteilung der Patientenkohorten in Nicht-Diabetiker und Diabetiker ergab sich für die mRNA-Expression der untersuchten Proteoglykane ein divergentes Bild. Während die mRNA-Expression der Proteoglykane *BGN*, *DCN* und *VCAN* bei Nicht-Diabetikern eine signifikante Herunterregulation in kalzifizierten im Vergleich zu fibrotischen AK-Taschen zeigte, war diese degenerationsabhängige Regulation bei Diabetikern nicht zu beobachten. Zudem wurden innerhalb eines Degenerationsgrads Unterschiede zwischen Patienten ohne und mit T2D detektiert. So war die mRNA-Expression von *BGN* und *VCAN* in kalzifizierten AK von Diabetikern erhöht, während in fibrotischen AK keine Expressionsunterschiede detektiert wurden. Für *LUM* wurde hingegen in fibrotischen AK-Taschen eine verminderte mRNA-Expression bei Diabetikern nachgewiesen, jedoch keine Unterschiede in kalzifizierten AK. Auch bei den Analysen in Abhängigkeit des HbA_{1c} und den Untersuchungen von verschieden stark degenerierten Bereichen derselben AK-Taschen war die mRNA-Expression der Proteoglykane heterogen und ließ keine offensichtlichen Rückschlüsse auf den Einfluss einer T2D-Erkrankung auf die Gesamtheit der Proteoglykanexpression zu.

Aus der Atheroskleroseforschung ist bekannt, dass Hyperglykämie zu einer erhöhten TGF- β -Ausschüttung führt und dass TGF- β wiederum durch seine aktivierende Wirkung auf die EZM-Synthese eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose spielt (150, 157, 158). Aufgrund des gemeinsamen Risikofaktors T2D und der ähnlichen Pathologien von Atherosklerose und DAVD lassen sich analoge Mechanismen auch bei der Entstehung der

DAVD vermuten. Die hier untersuchten Patientenkohorten zeigten jedoch keine Expressionsunterschiede für TGF- β zwischen Nicht-Diabetikern und Diabetikern, was andeutet, dass TGF- β nicht der alleinige Grund für Expressionsunterschiede aufgrund einer T2D-Erkrankung darstellen kann. Weitere T2D-spezifische Faktoren wie erhöhter oxidativer Stress oder Dyslipoproteinämie könnten die mRNA-Expression der Proteoglykane beeinflusst haben. Es bedarf weiterführender Analysen mit klar voneinander abgegrenzten Untersuchungskohorten, um die genauen Mechanismen hinter der veränderten Proteoglykanexpression durch T2D zu verstehen.

Zusätzlich zu den Transkriptionsdaten wurden für BGN Unterschiede in der Expression des Kernproteins detektiert. Dabei wiesen fibrotische AK-Taschen von Nicht-Diabetikern sowohl bei der Beurteilung der absoluten Menge als auch nach Normalisierung auf die Gesamtproteinkonzentration eine signifikant erhöhte Expression auf. Dies untermauert die Hypothese, dass sich T2D auf die Expression von BGN auswirkt, wobei der genaue Mechanismus aufzuklären bleibt. Differenzen zwischen Transkriptions- und Proteinebene weisen auf eine potentielle Beteiligung von degradierenden Enzymen oder Unterschiede in stabilisierenden bzw. destabilisierenden, posttranslationalen Modifikationen hin.

4.1.4.3. EXPRESSION DER HA-SYNTHASE-ISOFORMEN

Unterschiede in der mRNA-Expression der HA-Synthase-Isoformen aufgrund einer T2D-Erkrankung wurden sowohl bei den Untersuchungen mit kompletten AK-Taschen als auch bei den Analysen innerhalb derselben AK-Tasche aufgedeckt. Während bei Nicht-Diabetikern deutliche Regulationen zwischen fibrotischen und kalzifizierten Geweben detektiert wurden, wiesen die mRNA-Expressionen von *HAS1*, *HAS2* und *HAS3* bei Diabetikern keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Degenerationsgraden auf. Dies weist darauf hin, dass T2D die HA-Synthese in humanen AK beeinflusst und sich so auf die Entwicklung und Progression einer DAVD auswirken könnte. Ähnliche Wechselwirkungen zwischen T2D und dem HA-System sind auch für Atherosklerose postuliert (159). Neben der allgemeinen Substratverfügbarkeit wird die HAS2-vermittelte HA-Synthese von posttranslationalen Kontrollmechanismen beeinflusst. So führt die Glykosylierung von HAS2 mit O-verknüpftem N-Acetylglucosamin (O-GlcN-Acylierung) zu einer erhöhten Stabilität und Aktivität der HAS2 (159, 160). Außerdem kann HAS2 durch die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK), ein Enzym der zellulären Energiehomöostase, phosphoryliert und damit inaktiviert werden (159, 161). Beide

Mechanismen könnten potentielle Verknüpfungen zwischen dem Glukosemetabolismus der Zellen und der HA-Synthese darstellen (159, 162) und sich ebenfalls auf die mRNA-Expressionsmuster der HA-Synthase-Isoformen auswirken.

Weiterhin wurde die mRNA-Expression von *HAS2* in Abhängigkeit des HbA_{1c}-Werts untersucht, um den Einfluss einer manifestierten Hyperglykämie und der damit verbundenen erhöhten Substratverfügbarkeit auf das HA-System humaner AK zu evaluieren. Dabei wurde für Diabetiker mit einer guten Blutglukosekontrolle (HbA_{1c} < 6,5 %) eine signifikant erhöhte *HAS2*-Expression im Vergleich zu Kontrollpatienten (Nicht-Diabetiker, HbA_{1c} < 5,5 %) und Diabetikern mit pathologisch erhöhten HbA_{1c}-Werten (> 6,5%) detektiert. In der Literatur wurde in verschiedenen Modellen beschrieben, dass Diabetes oder diabetesähnliche Zustände mit einer gesteigerten HA-Synthese einhergehen (163-166). Beispielsweise wurde in insulinresistenten Ratten eine erhöhte HA-Synthese in der Aortenwand nach Verletzung detektiert (163). Bei Diabetikern wurde eine erhöhte HA-Konzentration im Serum quantifiziert, die zum einen mit dem HbA_{1c} korrelierte und zum anderen mit kardiovaskulären Komplikationen assoziiert war (164). Die hier beobachtete erhöhte mRNA-Expression von *HAS2* bei Diabetikern mit guten HbA_{1c}-Werten im Vergleich zu Diabetikern mit erhöhtem HbA_{1c} kann nicht erklärt werden, deckte sich jedoch mit den Expressionen von *SPP1* und *BGN*. Dies ist eventuell auf eine mangelhafte Zusammenstellung der Untersuchungskohorten zurückzuführen. Beispielsweise wurde der Degenerationsgrad der AK-Taschen bei der Probenauswahl für diese Analysen nicht berücksichtigt und könnte die Expressionsergebnisse beeinflusst haben.

4.1.5. LIMITIERUNGEN UND AUSBLICK DER *EX-VIVO*-ANALYSEN AN HUMANEN AK

Die Forschung an primärem, humanem Gewebe hat viele Vorteile, da sie direkte Rückschlüsse auf die *In-vivo*-Situation im Patienten bzw. während der Erkrankung zulässt und die Komplexität des Zellverbandes samt den systemischen Einflussfaktoren widerspiegelt. Jedoch bergen Untersuchungen mit Patientenproben auch Unwägbarkeiten wie der schwer abzuschätzende Einfluss patientenspezifischer Charakteristika. Auch der limitierte Zugang zu adäquaten Kontrollgruppen stellt bei Arbeiten mit humanen Proben eine Herausforderung dar. Die hier verwendeten, unveränderten AK-Taschen stammen größtenteils von Herztransplantationspatienten und zeigten keinerlei morphologische Veränderungen, die auf eine DAVD hinweisen. Dennoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich um

gesunde AK handelt. Zum einen erhalten die Herztransplantationspatienten oft eine komplexe Medikation. Zum anderen kann es aufgrund der Herzunterstützungssysteme zu ungewöhnlichen Strömungsverhältnissen und mechanischem Stress an der AK gekommen sein (167). Inwiefern sich diese Umstände auf die mRNA-Expression in den unveränderten AK ausgewirkt haben, kann an dieser Stelle nicht abgeschätzt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

In weiterführenden Analysen könnte zudem eine differenzierte Unterteilung der Diabetiker erwogen werden. T2D ist eine komplexe Erkrankung mit verschiedenen lokalen, aber auch systemischen Effekten, die sich in der Stärke ihrer Ausprägung zwischen den Patienten unterscheiden. Außerdem wird T2D oft von weiteren Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Nephropathie oder Dyslipoproteinämie begleitet, die für sich allein bereits Einfluss auf die AK haben können (96, 98, 99). Bei den hier durchgeführten Analysen erfolgte die Einstufung der Diabetiker allein durch die Diagnose eines behandelnden Arztes oder nach Beurteilung des HbA_{1c}-Werts. Nähere Betrachtungen zum Gesundheitszustand, der Dauer oder der Ausprägung der T2D-Erkrankung wurden nicht angestellt. In weiterführenden Untersuchungen könnte sich daher eine differenzierte Gruppierung der Diabetiker entsprechend ihrer klinischen Parameter lohnen, um die Bedeutung spezifischer, mit T2D-assoziiierter klinischer Symptome zu evaluieren. So wäre beispielsweise eine genauere Beurteilung des Einflusses von Hyperglykämie oder Insulinresistenz auf die Expression von EZM-Molekülen in der AK möglich. Zudem könnten durch Komorbiditäten oder Medikamente verursachte Expressionsunterschiede aufgedeckt und gezielt ausgeschlossen werden.

Trotz der umfangreichen Probenanzahl von 158 kompletten AK-Taschen bzw. 44 Taschen mit fibrotischen und kalzifizierten Bereichen, bedürfen die hier dargestellten Ergebnisse weiterer Validierung. Durch die retrospektive, nicht-randomisierte Probenauswahl sind Aussagen zur Kausalität der ermittelten Ergebnisse nicht möglich. Auch weiterführende Korrelationen zwischen den Expressionsdaten der EZM-Moleküle und den erhobenen Patientendaten (z. B. kardiovaskuläre Risikofaktoren oder Blutlaborwerte) sind mit besonderer Vorsicht durchzuführen, da mögliche Störfaktoren oder Konfundierungseffekte bei der Probenauswahl nicht ausgeschlossen werden konnten. Dies sollte bei der Planung weiterführender Analysen berücksichtigt und optimiert werden. Zudem beruhen die hier dargestellten Ergebnisse ausschließlich auf Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf zwischen 2010 und 2017. Regionale Effekte auf die erhobenen Daten sind daher möglich und könnten nur durch multizentrische Kohortenstudien mit unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen vermieden werden.

Darüber hinaus beschränkt sich der Großteil der hier dargelegten Daten auf die Transkriptionsebene und sollte mit quantitativen Messungen auf Proteinebene untermauert werden. Auch die Expression EZM-degradierender Enzyme, die posttranslationale Modifikationen der Moleküle und die Länge der Glykosaminoglykanketten sollten dabei Berücksichtigung finden, da sie die Funktion der Moleküle wesentlich beeinflussen können (151, 153, 168, 169).

Trotzdem geben die dargestellten Ergebnisse einen umfassenden Überblick über die EZM-Expression humaner AK in Abhängigkeit des Degenerationsgrads und beleuchten zum ersten Mal den Einfluss von T2D auf die molekulare Zusammensetzung von humanem Klappengewebe. Die dargestellten Ergebnisse können damit den Weg detaillierter Untersuchungen ebnen und zur Entwicklung therapeutischer Ansätze beitragen.

4.2. CHARAKTERISIERUNG VON VIC UNTER DIABETISCHEN UND DEGENERATIVEN BEDINGUNGEN

Ein genaues Verständnis des Einflusses diabetischer Bedingungen auf die Zellen der AK ist eine wichtige Voraussetzung, um die Zusammenhänge zwischen DAVD und T2D aufzudecken und entsprechende therapeutische Ansätze zu entwickeln. Wesentliche Charakteristika des T2D umfassen Hyperinsulinämie in frühen Stadien und Hyperglykämie beim manifestierten T2D. Neben grundlegenden Untersuchungen zur Insulinantwort und dem Glukoseverbrauch von VIC wurde in dieser Arbeit die Wirkung dieser diabetischen Bedingungen auf mitogene Prozesse und den Umbau der EZM sowohl ohne als auch mit zusätzlichen degenerativen Bedingungen untersucht.

4.2.1. NACHWEIS DER INSULINANTWORT OVINER VIC

4.2.1.1. DIE INSULINSIGNALKASKADE

Die Wirkung von Insulin auf Zellen wird durch die beiden Rezeptoren INSR und IGF1R vermittelt, wobei die Affinität von Insulin zu seinem eigenen Rezeptor, dem INSR, um das einhundertfache höher ist (133). Außerdem kann IGF1, ein dem Insulin strukturell sehr ähnliches Protein und der Hauptligand des IGF1R, an den INSR binden, wenn auch nur mit einer geringen Affinität von $1,25 \times 10^{-3}$ im Vergleich zum IGF1R (133). In ovinen VIC wurden durch mRNA-Expressionsanalysen sowohl die beiden Rezeptoren, als auch das insulinähnliche IGF1 nachgewiesen. Damit verfügen VIC über die grundsätzliche Voraussetzung, auf Insulin zu reagieren. Expressionsunterschiede aufgrund verschiedener Behandlungsmodalitäten wurden auf mRNA-Ebene nicht detektiert.

Neben den verschiedenen Insulin-sensitiven Rezeptoren wurde die mRNA-Expression verschiedener Glukosetransporter-Typen untersucht. Dabei wurde ausschließlich GLUT-1 in ovinen VIC und AK nachgewiesen, während die Isoformen GLUT-2 und GLUT-4 auf mRNA-Ebene nicht exprimiert wurden. GLUT-1 fungiert mit seiner hohen Affinität zu Glukose und seiner niedrigen Michaelis-Konstante von $K_m = 1$ mmol/l als Basaltransporter und stellt in vielen Geweben unabhängig von Insulin die ständige Aufnahme von Glukose sicher (133). Die Expression des GLUT-1 war in VIC sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene unabhängig von den untersuchten diabetischen und degenerativen Bedingungen.

4.2.1.2. INSULINSENSITIVITÄT VON VIC

Die Insulinantwort oviner VIC wurde nach zehnminütiger Stimulation mit 100 nM Insulin anhand der Phosphorylierung von AKT ermittelt. Dabei zeigten Zellen der Kontrollgruppe eine deutliche AKT-Phosphorylierung aufgrund der AI-Behandlung, was die Insulinsensitivität oviner VIC belegt. Die Insulinantwort der Zellen war durch die fünftägige Behandlung mit HI um etwa 50 % reduziert, was wiederum eine verminderte Insulinsensitivität von VIC aufgrund erhöhter Insulinkonzentrationen widerspiegelt. Diese Daten belegen zum einen, dass der Hauptzelltyp von AK hochsensitiv auf Insulin reagiert und weisen zum anderen darauf hin, dass bereits ein prädiabetischer Zustand wie eine kompensatorische Hyperinsulinämie Veränderungen in intrazellulären Signalwegen von VIC auslöst.

Dieser Effekt einer chronischen HI-Behandlung auf die Insulinsensitivität von VIC zeigte sich in ähnlicher Ausprägung auch in Zellen unter HG-Bedingungen, wodurch zunächst nicht von einer verschlechternden Wirkung hoher Glukosekonzentrationen ausgegangen werden konnte. Jedoch deckte ein direkter Vergleich von Kontrollzellen unter NG und HG nach AI eine um etwa 25 % verminderte AKT-Phosphorylierung in Zellen unter HG-Bedingungen auf. Dies legt nahe, dass sich eine hohe Glukosekonzentration ebenfalls negativ auf die Insulinsensitivität der Zellen auswirkt und dass eine Hyperglykämie, wie sie für spätere Stadien des T2D bekannt ist, Auswirkungen auf die Insulinantwort der VIC hat.

Die osteogene Differenzierung der VIC hatte wiederum keinen Einfluss auf die Insulinantwort der Zellen. Weder allein noch in Kombination mit HI zeigten sich signifikante Veränderungen in der AKT-Phosphorylierung aufgrund der DEG-Behandlung. Dies lässt vermuten, dass die Insulinsensitivität und -antwort der Zellen unabhängig von deren Differenzierung ist und dass der Einfluss von T2D autonom vom Degenerationsgrad der Klappe die Progression der DAVD antreibt.

Validiert wurde die Insulinsensitivität von VIC durch Western-Blot-Analysen zur Phosphorylierung von GSK-3, eine der AKT nachgeschaltete Proteinkinase. Durch die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine ist GSK-3 an diversen intrazellulären Signalwegen beteiligt, die unter anderem den Glukosemetabolismus, die Zellproliferation und das Zellüberleben regulieren (170). Wie bei AKT führt die AI-Stimulation von VIC bei allen Behandlungsmodalitäten zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von GSK-3 α und GSK-3 β , was die Sensitivität von VIC auf Insulin bestätigt. Darüber hinaus wurde die eingeschränkte Insulinantwort von VIC nach chronischer HI-Behandlung durch eine verminderte Phosphorylierung von GSK-3 α verifiziert. Bei GSK-3 β wurde dieser Effekt nicht

beobachtet, wobei die Detektion von phosphoryliertem GSK-3 β relativ schwach war und Unterschiede entsprechend schwer herausgearbeitet werden konnten. DEG-Bedingungen hatten wiederum keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von GSK-3 α und GSK-3 β und somit auf die Insulinwirkung.

Zusammenfassend belegen die dargelegten Western-Blot-Daten, dass VIC sensitiv für Insulin sind und dass die Insulinantwort durch chronisch erhöhte Insulin- und Glukosespiegel reduziert wird, wohingegen die osteogene Differenzierung der Zellen keine Folgen auf die Wirkung von Insulin hat. Insulin und seine nachgeschalteten Signalwege stellen daher interessante Untersuchungsziele dar, um die pathologische Wirkung von T2D auf die Klappe zu verstehen.

4.2.2. GLUKOSEVERBRAUCH VON VIC UNTER DIABETISCHEN BEDINGUNGEN

Die Wirkung chronisch erhöhter Insulinlevel auf den Glukoseverbrauch von VIC wurde durch Messung der Glukosekonzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Dabei zeigten sich unter NG-Bedingungen signifikante Konzentrationsabnahmen über die Dauer der Kultur, was auf den deutlichen Verbrauch von Glukose durch die Zellen hinweist. Nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz am fünften Tag verbrauchten die VIC unter NG-Kontrollbedingungen etwa 50 mg/dl Glukose innerhalb von 24 Stunden. Dies entspricht der Hälfte der zur Verfügung stehenden Glukose unter NG und verdeutlicht den hohen Umsatz von Glukose in proliferierenden VIC.

Unter HG-Bedingungen wurden zwischen den einzelnen Messungen keine signifikanten Unterschiede detektiert, wobei die einzelnen Messpunkte hohen Standardfehlern unterlagen und dadurch nur eingeschränkt Aussagen über den Glukoseverbrauch der Zellen zuließen. Die hohen Schwankungen sind vermutlich auf Messungenauigkeiten des Blutglukosemessgeräts zurückzuführen. Der Hersteller des Messgeräts gibt eine Messgenauigkeit von $\pm 15\%$ bei Werten über ≥ 100 mg/dl an (171). Dies entspricht bei 450 mg/dl einer Toleranz von $\pm 67,5$ mg/dl und macht eine Evaluation der Daten schwierig. Außerdem lagen die gemessenen Glukosekonzentrationen der HG-Kulturen deutlich über der vom Hersteller des Kulturmediums angegebenen Glukosekonzentration von 450 mg/dl. Ob diese Differenzen ebenfalls von dem Blutglukosemessgerät herrühren oder ob es sich um Abweichungen bei der Herstellung des Mediums handelt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Für die experimentellen Untersuchungen ist dies jedoch zweitrangig, da die erhöhten Glukosekonzentrationen über den gesamten Verlauf der Kulturen vergleichbar waren.

Neben der Bestimmung des Glukoseverbrauchs im Zellkulturüberstand wurde die Glukoseaufnahme der Zellen mit Hilfe eines kommerziellen, Luciferase-basierten *Glucose Uptake Assays* quantifiziert. Sowohl die Behandlung der VIC mit HI als auch die Stimulation mit AI hatte unter NG-Bedingungen keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme. Diese Beobachtungen sind konsistent mit den bereits beschriebenen Untersuchungen zur Expression von Glukosetransportern in VIC. Dabei wurde ausschließlich GLUT-1 nachgewiesen, dessen Expression ebenfalls unbeeinflusst von den verschiedenen Behandlungen der VIC war. Zudem gilt GLUT-1 als insulinunabhängig und hat eine hohe Affinität zu Glukose, wodurch eine konstante Versorgung der Zellen mit Glukose sichergestellt wird (133).

Unter HG führte die AI-Stimulation bei HI-behandelten VIC wiederum zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Zelle, obwohl die Expression von GLUT-1 in den Western-Blot-Analysen auch hier statistisch gleich war. Dies ist eventuell auf eine erhöhte Translokation des Transporters von intrazellulären Vesikeln an die Zellmembran zurückzuführen. Dieser Mechanismus ist hauptsächlich für GLUT-4 beschrieben, wobei einige Veröffentlichungen auch auf eine Insulin-induzierte Translokation von GLUT-1 hinweisen (172-174). Ob VIC nach HI-Behandlung in Kombination mit HG zu einer solchen Insulinantwort auf einen Akutstimulus befähigt sind, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, beispielsweise mit immunhistochemischen Färbungen oder Western-Blot-Analysen, die zwischen Zellfraktionen des Zytoplasmas und der Zellmembran unterscheiden.

Zudem wurde die basale Glukoseaufnahme der VIC unter NG- und HG-Bedingungen gegenübergestellt, wobei eine verminderte Glukoseaufnahme HI-behandelter Zellen unter HG detektiert wurde. Ob diese verminderte Glukoseaufnahme eventuell auf eine Absättigung der Zellen mit Glukose aufgrund der chronischen HI-Behandlung unter HG zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nur vermutet werden. Um die Zusammenhänge zwischen diabetischen Bedingungen und dem Glukosestoffwechsel von VIC besser zu verstehen, sollten weiterführende Experimente daher auf die molekularen Mechanismen hinter der Regulation des Glukosemetabolismus abzielen. Darüber hinaus beziehen sich die hier beschriebenen Daten ausschließlich auf Glukose. Der Bedarf und die Wirkung anderer Energiequellen wie Glutamin oder Fettsäuren auf die Physiologie von VIC wären ebenfalls interessante Forschungsansätze.

4.2.3. PROLIFERATION UND OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG UNTER DIABETISCHEN UND DEGENERATIVEN BEDINGUNGEN

Neben seiner bedeutenden Wirkung auf den Glukosemetabolismus beeinflusst Insulin viele mitogene Prozesse wie die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Diese Prozesse können ebenfalls direkt oder indirekt mit der Ausbildung oder Verschlechterung von Diabetes-assoziierten Krankheiten verbunden sein. In durchlichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich am Tag der Ernte keine offensichtlichen, morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsmodalitäten, jedoch begannen die VIC bereits einen Tag später in mit DEG-Bedingungen behandelten Kulturen mit der Ausbildung knötchenartiger Strukturen. Diese Aggregationen von VIC in sogenannten „Kalzifizierungsknötchen“ gelten als etabliertes *In-vitro*-Modell der DAVD, mit dessen Hilfe bereits verschiedene pathologische Mechanismen aufgedeckt wurden (175-177). Jedoch weisen andere Publikationen ebenfalls darauf hin, dass die Degeneration von VIC *in vitro* nur begrenzt den *In-vivo*-Phänotyp der Zellen während der Entstehung und Progression der DAVD widerspiegelt (178, 179).

Für die hier dargelegten Analysen wurden die VIC am sechsten Tag in Kultur kurz vor Bildung der Zellaggregate geerntet und aufgearbeitet. Eine Aufreinigung von RNA und Proteinen war bei längerer Kultivierung der VIC nicht mehr möglich. Dies ist vermutlich auf apoptotische und nekrotische Prozesse zurückzuführen, die den Untergang der Zellen innerhalb der Aggregate bewirken (129, 176). In der mRNA-Expression gängiger Degenerations- und Differenzierungsmarker zeigten sich am Tag der Ernte keine signifikanten Unterschiede aufgrund der DEG-Behandlung, was auf potentielle Schwächen des verwendeten *In-vitro*-Modells hinweist. Eventuell war das Zeitfenster der Analysen zu früh gewählt oder die DEG-Behandlung nicht stark genug, wodurch keine ausreichende Differenzierung stattfinden konnte oder die Zellpopulation zu heterogen war. Dennoch wurden am Tag der Ernte deutliche Kalziumablagerungen in DEG-behandelten VIC-Kulturen mittels Alizarinrot-Färbung nachgewiesen, die sich ebenfalls bei der Quantifizierung des Kalziumgehalts zeigten.

Unterschiede infolge von diabetischen Bedingungen, in diesem Modell simuliert durch HI und HG, wurden weder in den durchlichtmikroskopischen Aufnahmen, noch bei der mRNA-Expression von Degenerationsmarkern oder der Akkumulation von Kalzium in den VIC-Kulturen detektiert. Auch in Kombination mit einer zusätzlichen DEG-Behandlung hatten diabetische Bedingungen keinen Einfluss auf die VIC. Allerdings waren die Zellzahl und die mRNA-Expression von *Coll1A1* und *Acta2* durch die chronisch erhöhten Insulinlevel beeinflusst. Unter NG wiesen VIC mit HI-Behandlung eine erhöhte Zellzahl in Kombination

mit einer gesteigerten *Coll1A1*-Expression auf, was als Zeichen einer Fibrosierung der Kultur gedeutet werden kann. Wohingegen die verminderte *Acta2*-Expression auf eine reduzierte Myofibroblasten-Differenzierung hinweist. Insulin-vermittelte Effekte auf die Proliferation, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen sind in der Literatur umfassend beschrieben und werden auf die Aktivierung mitogener Signalwege wie den MAP-Kinase-Signalweg (*mitogen-activated protein*) und den mTOR-Signalweg (*mechanistic target of rapamycin*) zurückgeführt (79). Dass der HI-Effekt unter HG verloren geht, könnte wiederum in der unter 4.2.1.2 beschriebenen verminderten Insulinsensitivität von VIC unter HG begründet sein.

4.2.4. EINFLUSS DIABETISCHER UND DEGENERATIVER BEDINGUNGEN AUF DEN EZM-UMBAU *IN VITRO*

Ein Umbau der EZM ist Teil der Fibrose und Kalzifizierung nativer AK und ein wesentliches Charakteristikum der DAVD. Aus anderen Geweben, wie beispielsweise der Niere, ist bekannt, dass sich diabetische Bedingungen auf die Zusammensetzung der EZM auswirken können und dabei möglicherweise die pathogene Wirkung von T2D verstärken (180). Der Einfluss diabetischer Bedingungen auf die Regulation DAVD-assoziiierter EZM-Moleküle wurde hier mittels mRNA-Expression-Analysen eruiert, wobei keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsmodalitäten der VIC detektiert wurden. Weder die untersuchten Proteoglykane noch die HA-Synthase-Isoformen zeigten aufgrund der HI-Behandlung oder der HG-Bedingungen mRNA-Expressionsunterschiede. Dies suggeriert, dass diabetische Bedingungen wie erhöhte Insulin- oder Glukoselevel keinen Einfluss auf die EZM-Expression von VIC haben.

Auch die Kultivierung unter DEG-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von EZM-Bestandteilen, obwohl der Umbau der EZM für native AK im Verlauf der DAVD umfassend beschrieben ist (84, 85, 88). Zusammen mit den nicht-regulierten mRNA-Expressionsdaten bekannter Degenerationsmarker (siehe 4.2.3) muss das verwendete *In-vitro*-Modell zur Analyse EZM-basierter pathologischer Mechanismen der DAVD in Frage gestellt werden. Die Expression verschiedener EZM-Moleküle ist oft miteinander assoziiert und bedingt sich gegenseitig (85). Das Fehlen einer bestehenden Matrix und die zweidimensionale Struktur der *In-vitro*-Kulturen könnte sich daher auf die Expression der VIC ausgewirkt haben. Zudem weisen verschiedene Veröffentlichungen darauf hin, dass die Synthese von EZM-Molekülen von valvulären Zellen durch mechanische Belastung verstärkt wird (181-183). Dies legt nahe, dass die Einbettung der Zellen in einen dreidimensionalen Raum, der für eine

kontinuierliche Zugspannung an der Zelloberfläche sorgt, ebenfalls notwendig sein könnte, um einen möglichst nativen Phänotyp der VIC *in vitro* nachzuahmen und damit zur Analyse EZM-basierter pathologischer Mechanismen der DAVD besser geeignet wäre.

Dennoch wurde im Überstand der Kulturen unter HG-Bedingungen mit DEG-Behandlung eine Anreicherung von HA und im Trend auch von BGN nachgewiesen, was auf einen beginnenden Umbau der EZM hinweist. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass sich HG in Kombination mit degenerativen Stimuli auf die VIC-Matrix auswirkt. Die Auswertung an Tag sechs vor Ausbildung eines deutlichen degenerativen Phänotyps könnte jedoch zu früh sein, um EZM-Umbauprozesse in Gänze nachzuweisen. Zudem wurde in dieser Arbeit bei der DEG-Behandlung auf die Verwendung von TGF- β verzichtet. TGF- β verstärkt die Differenzierung von VIC in Myofibroblasten und greift in verschiedene Signalwege und Mechanismen der DAVD ein (109), wovon eine potentielle degenerative Wirkung diabetischer Bedingungen unter Umständen nicht hätte abgegrenzt werden können. Zudem beeinflusst TGF- β die Synthese von Proteoglykanen (149-151), deren Expression unter diabetischen Bedingungen in dieser Arbeit als wesentlicher Untersuchungsschwerpunkt gilt.

4.2.5. LIMITIERUNGEN UND AUSBLICK DER *IN-VITRO*-ANALYSEN MIT OVINEN, PRIMÄREN VIC

Die standardisierten Versuchsbedingungen in Zellkulturexperimenten ermöglichen es, grundlegende Eigenschaften von Zellen schnell und effektiv zu untersuchen und die direkte Wirkung von äußeren Einflussfaktoren und Behandlungen nachzuvollziehen. Dennoch handelt es sich bei *In-vitro*-Kulturen um artifizielle Systeme, die nur bedingt die *In-vivo*-Situation widerspiegeln. Mit der Übertragung der hier erzielten Ergebnisse der aus tierischen AK gewonnenen VIC auf den Menschen muss daher vorsichtig verfahren werden. Dennoch stellen ovine VIC ein verlässliches Untersuchungsmodell der Grundlagenforschung dar, da sie im Vergleich zu humanen VIC deutlich unabhängiger von Spender-assoziierten Einflussfaktoren, wie beispielsweise Komorbiditäten, sind.

Außerdem kann das komplexe Krankheitsbild der DAVD nur vereinfacht in der Zellkultur nachgebildet werden. Einerseits wird die Beteiligung anderer Zellen wie Endothel- oder Immunzellen und die Wirkung von zirkulierenden Zytokinen oder Wachstumsfaktoren in der hier durchgeführten VIC-Monokultur vernachlässigt. Andererseits bleibt durch den zweidimensionalen Charakter der Zellkulturexperimente die räumliche Orientierung der Zellen

im Gewebe und die damit verbundene Interaktion mit der EZM unberücksichtigt. Die Validierung der erzielten Ergebnisse in Gewebekulturen, möglichst in einem Bioreaktorsystem, das ebenfalls die mechanische Belastung der AK im Blutfluss nachahmt, wäre daher erstrebenswert.

Darüber hinaus wurde die Insulinresistenz und Insulinantwort der Zellen mit einer physiologisch deutlich erhöhten Insulinkonzentration hervorgerufen. Obwohl es sich dabei um ein weit verbreitetes Modell der Diabetesforschung handelt (184), liegt die verwendete Insulinkonzentration von 100 nM um ein Vielfaches höher als der physiologische Insulinspiegel von 0,18 bis 0,9 nM (133). Von bovinen Endothelzellen weiß man, dass physiologische Insulinkonzentrationen selektiv den INSR aktivieren, während überhöhte Insulinkonzentrationen zusätzlich den IGF1R sowie Hybridformen beider Rezeptoren stimulieren (185). In weiterführenden Versuchen sollten daher verschiedene Insulinkonzentrationen und ihre Wirkung auf VIC getestet sowie der jeweils verantwortliche Rezeptor identifiziert werden, um die hier beschriebene Insulinwirkung zu bestätigen.

Die klinische Bedeutung der *In-vitro*-Ergebnisse zur Insulinantwort von VIC im Kontext der DAVD bleibt zudem in humanen AK zu überprüfen. Dabei sind zum einen Untersuchungen zur Insulinsensitivität humaner AK von Diabetikern in Abhängigkeit ihrer Insulinspiegel interessant, aber auch Korrelationen zwischen dem Degenerationsgrad der AK und der Insulinantwort der Zellen. Außerdem ist es von besonderer Bedeutung, die Zusammenhänge zwischen beiden Erkrankungen zu verstehen und die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken, um therapeutische Ansätze zu entwickeln.

4.3. DEGENERATION VON AK-PROTHESEN MATERIAL IN EINEM EKTOPEN DEGENERATIONSMODELL IN MÄUSEN

Die Hauptursache für den Funktionsverlust biologischer AK-Prothesen liegt in der Degeneration und Biomineralisierung des Prothesenmaterials und wird oft von inflammatorischen Prozessen, dem Umbau des Gewebes und dystropher Kalzifizierung begleitet (38). Die genauen biologischen Mechanismen hinter der Prothesendegeneration sind noch nicht vollständig aufgeklärt, wobei Gemeinsamkeiten zur ektopen Kalzifizierung von kardiovaskulären Geweben vermutet werden (117). Daran angelehnt wurde in den hier durchgeführten Experimenten die Bedeutung des Proteoglykans BGN auf die Prothesendegeneration unter hyperglykämischen Bedingungen untersucht.

4.3.1. ETABLIERUNG EINES HYPERGLYKÄMIE-MODELLS FÜR DIE DEGENERATION VON AK-PROTHESEN MATERIAL IN $BGN^{0/0}$ -MÄUSEN

Die Behandlung der Versuchstiere mit STZ löste unabhängig vom Genotyp der Mäuse eine stabile Hyperglykämie aus, die sowohl zwei Wochen als auch zehn Wochen nach der ersten STZ-Injektion zu signifikant erhöhten Blutglukosekonzentrationen führte. Dabei wurden entsprechend des Niedrig-Dosis-Modells 55 mg/kg Körpergewicht STZ an fünf konsekutiven Tagen injiziert (112). Im Vergleich zum Hoch-Dosis-Modell, bei dem durch Injektion einer einmaligen, hochkonzentrierten Dosis STZ eine schnelle Betazellnekrose verursacht wird, wird beim Niedrig-Dosis-Modell eine für die Betazellen subtoxische Dosis verwendet, die jedoch in den meisten Mausstämmen eine Insulitis hervorruft (115, 186). Diese STZ-Applikationsform wird in der Literatur oft als Typ-1-Diabetesmodell bezeichnet, wobei die dem Typ-1-Diabetes zugrundeliegende Autoimmunreaktion durch die STZ-Behandlung nicht vollständig nachgeahmt werden kann (115). Im Gegensatz zum Typ-1-Diabetes bedarf der im Niedrig-Dosis-Modell hervorgerufene Untergang der Betazellen keiner funktionsfähigen T- und B-Lymphozyten (115, 187, 188). Daher wurde hier die Bezeichnung Hyperglykämie-Modell präferiert.

Die Integrität des verwendeten Modells wird durch die stabilen Blutglukosekonzentrationen innerhalb, aber auch zwischen den Vergleichsgruppen deutlich. Der durch die STZ-Behandlung hervorgerufene Anstieg in der Blutglukosekonzentration war unabhängig vom Genotyp des Versuchstiers und blieb über den Verlauf des Versuches stabil, was sicherstellte, dass die

beobachteten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen nicht auf Unterschiede in der Ausprägung der Hyperglykämie zurückzuführen sind.

4.3.2. RNA- UND PROTEINGEHALT DER PROTHESENSTANZEN

Quantifizierungen des RNA- und Proteingehalts explantierter Prothesenstanzen zeigten in WT-Mäusen mit STZ-Behandlung eine geringere RNA- und Proteinkonzentration als bei WT der Vehikelgruppe. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass unter Hyperglykämie weniger Zellen in das Prothesenmaterial migrieren bzw. die migrierten Zellen weniger Proteine synthetisieren oder vorhandene Proteine degradieren. Dieser Hyperglykämie-Effekt zeigte sich nicht in *Bgn*⁻⁰-Mäusen und deutet auf einen Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und BGN hin. Ob die Veränderungen in der RNA- und Proteinkonzentration auf migrierte Zellen zurückzuführen sind und welche Mechanismen dem zugrunde liegen, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

In immunhistochemischen Färbungen der Prothesenstanzen gegen MAC-2 (Galectin-3) konnte ein Teil der migrierten Zellen sowie Zellen der Fremdkörperkapsel als Makrophagen identifiziert werden (unveröffentlichte Daten von Franziska Japes, Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Dies deckt sich mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Cecilia M. Giachelli, die in ihrem Mausmodell ebenfalls Makrophagen und vielkernige Riesenzellen in der Fremdkörperkapsel des Prothesenmaterials nachwies (117, 189). Zudem waren auch MAC-2-negative Zellen in der Fremdkörperkapsel und den Prothesenstanzen ersichtlich, was nahelegt, dass weitere Zelltypen an der Fremdkörperreaktion und möglicherweise auch am Erhalt oder der Degradation des Prothesenmaterials beteiligt sind.

4.3.3. INFLAMMATORISCHE PROZESSE

Am Tag der Explantation wurde zusätzlich zu den Prothesenstanzen das Blut der Mäuse entnommen und auf zirkulierende Zytokine untersucht. Dabei zeigten sich kaum signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen. Beim Vergleich nicht operierter zu operierten WT-Mäusen wurde ausschließlich für GM-CSF eine erhöhte Konzentration detektiert, was auf eine gesteigerte Immunantwort und eine vermehrte Anzahl an pro-inflammatorischen Makrophagen in operierten Mäusen hinweist (190). Innerhalb der operierten Mäuse wurden weder Unterschiede aufgrund des Genotyps der Tiere noch infolge der STZ-Behandlung bestimmt. Die Daten unterlagen jedoch hohen Schwankungen, die

eventuell auf die Qualität der Proben zurückzuführen sind. Während der Probenaufarbeitung kam es teilweise zur Hämolyse, welche sich möglicherweise auf die Multiplexanalyse auswirkte. Insgesamt lagen die Zytokinkonzentrationen aber im unteren Nachweisbereich, wodurch von einer geringen inflammatorischen Belastung der Tiere acht Wochen nach der Implantation der Prothesenstanzen ausgegangen werden kann.

Außerdem wurde die RNA der Prothesenstanzen aufgereinigt und die mRNA-Expression ausgewählter Zytokine bestimmt, wobei ausschließlich Unterschiede im paarweisen Vergleich innerhalb eines Genotyps ersichtlich wurden. Hyperglykämie führte in WT-Mäusen zu einer erhöhten *Il-1 β* - und *Mcp1*-Expression, in *Bgn*⁻⁰-Mäusen hingegen zu einer erniedrigten mRNA-Expression von *Inf- γ* . Dass Hyperglykämie weitreichende Folgen auf inflammatorische Prozesse hat, ist hinreichend in der Literatur belegt (191-193). Die genaue Bedeutung der hier beschriebenen Veränderungen im Expressionsprofil spezifischer Zytokine auf die Degeneration von AK-Prothesenmaterial kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Für detaillierte Aussagen zur Wirkung von Zytokinen bei der Degeneration von biologischem Prothesenmaterial wäre in Anschlussprojekten eine Verlaufsanalyse der Zytokin-Expression mit frühen Zeitpunkten kurz nach der Implantation bis hin zur Explantation der Prothesenstanzen zu erwägen.

Darüber hinaus führte die STZ-Behandlung bei beiden Genotypen zu einer erhöhten mRNA-Expression von *Tlr2* im Vergleich zur entsprechenden Vehikelgruppe, während *Tlr4* weder vom Genotyp noch von der Behandlung der Tiere in seiner mRNA-Expression beeinflusst wurde. Als Teil der angeborenen Immunantwort ist die Hochregulation der *Tlr* unter Hyperglykämie bereits für verschiedene Zelltypen wie aortale Endothelzellen oder Monozyten beschrieben (194, 195). Im Kontext der DAVD ist bekannt, dass extrazelluläres BGN über die TLR die Expression der osteogenen Faktoren BMP-2, ALPL und TGF- β stimuliert und auf dieser Weise Einfluss auf die osteogene Differenzierung von VIC nimmt (87, 196). Außerdem induziert lösliches BGN in VIC die Expression der pro-inflammatorischen Proteine ICAM-1 und MCP-1 via TLR2 und TLR4 und ist damit auch an der Immunantwort der Zellen beteiligt (197). Die hier beschriebene Hochregulation von *Tlr2* in STZ-behandelten Mäusen könnte daher Teil der degenerativen Wirkung von Hyperglykämie sein und eine mögliche Verbindung zwischen BGN, Hyperglykämie und Prothesendegeneration darstellen.

4.3.4. FOLGEN DER HYPERGLYKÄMIE UND *BGN*-DEFIZIENZ AUF DIE INTEGRITÄT DES PROTHESENATERIALS

Als Maß für die Degeneration der Prothesenstanzen wurde die Menge an akkumuliertem Kalzium in dem Gewebe quantifiziert. Dabei wiesen Prothesenstanzen von STZ-behandelten WT-Mäusen acht Wochen nach der Implantation eine signifikant erhöhte Kalziumeinlagerung im Vergleich zu Vehikel-behandelten WT-Mäusen auf. Dies untermauert die Hypothese, dass Hyperglykämie die Degeneration und Verkalkung von AK-Prothesen fördert und deckt sich mit Beobachtungen aus klinischen Studien, die T2D als Prädiktor für die Degeneration biologischer AK-Prothesen beschreiben bzw. ein erhöhtes Mortalitätsrisiko von Diabetikern nach AK-Ersatz aufzeigen (198-200).

Diese pro-kalzifizierende Wirkung der STZ-Behandlung zeigte sich nicht in *Bgn*⁻⁰-Mäusen, was eine Beteiligung von BGN an der durch die Hyperglykämie-vermittelten Kalzifizierung nahelegt. In der Literatur für verschiedene Zelltypen und Gewebe eine Anreicherung von BGN unter Hyperglykämie oder T2D beschrieben (157, 180, 201, 202). In Anbetracht dessen, dass BGN im Kontext der DAVD aufgrund seiner Affinität zu Lipoproteinen niedriger Dichte und damit indirekten Wirkung auf die Infiltration von Makrophagen als pro-degenerativ beschrieben ist (143), könnte eine Anreicherung von BGN unter Hyperglykämie eine potentielle Erklärung für die erhöhte Kalziumakkumulation in den Prothesenstanzen darstellen.

Auffällig war zudem der antiproportionale Verlauf der Kalziummessungen zu den RNA- und Proteindaten der Prothesenstanzen. Die verminderte Kalziumakkumulation in Kombination mit der erhöhten RNA- und Proteinkonzentration könnte ein Hinweis darauf sein, dass die in die Prothesenstanzen migrierten Zellen protektiv auf das Gewebe wirken. Um welche Zelltypen es sich dabei handelt und welche Mechanismen der protektiven Wirkung zugrunde liegen, bedarf jedoch weiterer Forschung.

Bei Expressionsanalysen der in die Prothesenstanzen migrierten Zellen wurde die mRNA-Expression der Degenerationsmarker *Spp1* und *Tgf-β* nachgewiesen, jedoch zeigten sich keine Unterschiede aufgrund der STZ-Behandlung oder des Genotyps der Versuchstiere. Dies lässt vermuten, dass die erhöhte Kalziumeinlagerung in den Prothesenstanzen hyperglykämischer WT-Mäuse unabhängig von diesen beiden Molekülen verläuft.

Darüber hinaus wurde für *Dcn* eine erhöhte mRNA-Expression in Prothesenstanzen von hyperglykämischen Mäusen detektiert. Diese Regulation war unabhängig vom Genotyp in STZ-behandelten WT- als auch in *Bgn*⁻⁰-Mäusen zu beobachten. *Dcn* und *Bgn* entstanden höchstwahrscheinlich durch Genduplikation und weisen hohe Strukturähnlichkeiten sowie ein

gemeinsames Expressionsprofil auf (202, 203). Untersuchungen mit *Bgn*- , *Dcn*- und *Bgn/Dcn*-defizienten Mäusen legen zudem nahe, dass diese beiden Proteoglykane redundante Funktionen erfüllen (202, 204). Zusammen mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen legt diese Hochregulation von *Dcn* unter Hyperglykämie die Vermutung nahe, dass diese beiden Proteoglykane mit Diabetes assoziiert sind und beschleunigend auf die Degeneration von biologischen AK-Prothesen wirken könnten.

4.3.5. LIMITIERUNGEN UND AUSBLICK DER *IN-VIVO*-ANALYSEN ZUR DEGENERATION VON AK-PROTHESEN MATERIAL IN MÄUSEN

Die Degeneration biologischer AK-Prothesen beruht auf einem komplexen Zusammenspiel wirtseigener Prozesse und Mechanismen, die in ihrer Gesamtheit nur in tierexperimentellen *In-vivo*-Analysen erfasst werden können. Nur so lassen sich die Zusammenhänge zwischen Prothesendegeneration und der Immunantwort des Wirtes unter definierten Bedingungen nachvollziehen und entsprechende Therapiestrategien entwickeln. Dennoch muss angesichts artspezifischer Unterschiede beispielsweise im Stoffwechsel oder des Immunsystems mit der Übertragung tierexperimenteller Erkenntnisse auf den Menschen vorsichtig verfahren werden. Als Limitation des hier verwendeten ektopen Degenerationsmodells für AK-Prothesen ist insbesondere die nicht-physiologische Implantation der Prothesenstanzen subkutan in der oberen Rückenpartie der Mäuse festzuhalten. Zum einen wird durch die statische Befestigung am Gewebe jegliche mechanische Belastung, der eine implantierte AK-Prothese standhalten muss, außer Acht gelassen. Zum anderen weist das die Prothesenstanzen umgebende Gewebe am Rücken der Tiere andere Zelltypen auf, als es der Aortenursprung und das Blut physiologischerweise tun.

Die hier beschriebenen Beobachtungen des STZ-induzierten Hyperglykämie-Modells geben einen guten Einblick zum Einfluss erhöhter Blutglukosekonzentrationen auf die Degeneration von AK-Prothesenmaterial und ermöglichen genauere Aussagen über diesen spezifischen Parameter des T2D. In weiterführenden Analysen sollten daher weitere Charakteristika des T2D, wie eine Insulinresistenz oder Dyslipoproteinämie des Wirtes, näher beleuchtet werden, um ein umfassendes Bild über die Auswirkungen der einzelnen Faktoren einer T2D-Erkrankung zu erlangen. So könnten spezifische therapeutische Ansätze entwickelt werden, die gezielt an den Schlüsselmechanismen der Prothesendegeneration angreifen.

Darüber hinaus wären Untersuchungen mit *Bgn/Dcn*-doppeldefizienten Mäusen interessant, um in der Literatur postulierte kompensatorische oder synergistische Effekte dieser beiden nahverwandten Proteoglykane aufzudecken. Ein genaues Verständnis über die Funktion und Wirkung dieser beiden EZM-Bestandteile könnte dabei helfen neue, widerstandsfähigere Prothesenmaterialien zu entwickeln.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Morphologische Veränderungen während der degenerativen Aortenklappenerkrankung führen zum Funktionsverlust der Klappe und schweren körperlichen Einschränkungen. Dabei geht die Degeneration eng mit der Aktivierung valvulärer Interstitialzellen und dem Umbau der extrazellulären Matrix einher. Klinische Studien belegen, dass die Entstehung und Progression der degenerativen Aortenklappenerkrankung durch Diabetes begünstigt wird, wobei die molekularen Mechanismen bisher unzureichend untersucht sind. In dieser Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen der Degeneration der Aortenklappe, dem Umbau der extrazellulären Matrix und dem Einfluss von Diabetes unter Verwendung ausgewählter Untersuchungsmodelle analysiert.

In humanem Aortenklappengewebe wurde gezeigt, dass die Gen- und Proteinexpression spezifischer Degenerationsmarker und extrazellulärer Matrixmoleküle wie Proteoglykane und Hyaluronsäuresynthasen stark vom Degenerationsgrad des Gewebes abhängen, aber auch durch Typ-2-Diabetes beeinflusst werden. Die Expressionsprofile einzelner Gene unterschieden sich dabei in vollständigen Klappentaschen mit einheitlicher Morphologie von denen in verschiedenen stark degenerierten Bereichen derselben Aortenklappentasche.

Zudem wurde ein *In-vitro*-Modell mit ovinen valvulären Interstitialzellen entwickelt, um den Einfluss diabetischer Bedingungen wie Hyperinsulinämie und Hyperglykämie auf die Zellen zu eruieren. Der Hauptzelltyp der Aortenklappe wies dabei eine hohe Sensitivität für Insulin auf. Sowohl die Kultivierung unter chronischer Hyperinsulinämie als auch unter Hyperglykämie führte zu einer Insulinresistenz der Zellen. Die Auswirkungen diabetischer Kultivierungsbedingungen auf die Glukoseaufnahme sowie auf die Genexpression von Degenerationsmarkern und extrazellulären Matrixmolekülen waren hingegen gering.

Außerdem wurde die Rolle von Hyperglykämie und Biglycan auf die ektope Degeneration von Aortenklappen-Prothesenmaterial in Mäusen untersucht. In Wildtypmäusen führte Hyperglykämie nach acht Wochen zu einem verminderten Proteingehalt und zu einer stärkeren Biomineralisierung des Prothesenmaterials. Prothesenstanzen aus Biglycan-defizienten Mäusen zeigten wiederum keine Veränderungen aufgrund der Hyperglykämie, wodurch eine pro-degenerative Wirkung von Biglycan im Kontext von Diabetes angenommen werden kann.

Die dargestellten Ergebnisse belegen die komplexe Wirkung von Diabetes auf die Degeneration der Aortenklappe und deuten auf eine Beteiligung der extrazellulären Matrix hin, was neue potenzielle therapeutische Ansätze eröffnet.

6. SUMMARY

Morphological changes during degenerative aortic valve disease result in the loss of valve function and severe physical limitations. The degeneration is closely associated with activation of valvular interstitial cells and remodeling of the extracellular matrix. Clinical trials have demonstrated that onset and progression of degenerative aortic valve disease are promoted by diabetes, however, the underlying molecular mechanisms are still poorly understood. In this work, the connection between aortic valve degeneration, extracellular matrix remodeling and the influence of diabetes was investigated using selected research models.

In human aortic valve tissue, gene and protein expression of specific degeneration markers and extracellular matrix molecules depended heavily on the degree of degeneration of the tissue and was also affected by type 2 diabetes. The expression profiles of particular genes differed between entire aortic valve cusps with uniform morphology from that of differently degenerated areas of the same aortic valve cusp.

Furthermore, an *in vitro* model with ovine valvular interstitial cells was developed, in order to determine the influence of diabetic conditions like hyperinsulinemia and hyperglycemia on aortic valve cells. The most abundant cell type in aortic valves showed high sensitivity to insulin. Cultivation under chronic hyperinsulinemia as well as under hyperglycemia led to insulin resistance of the cells. In turn, the effects of diabetic cultivation conditions on glucose uptake and on gene expression of degeneration markers and extracellular matrix molecules were minor.

In addition, the role of hyperglycemia and biglycan in ectopic degeneration of aortic valve prosthesis material was investigated in mice. In wild type mice, hyperglycemia led to a reduced amount of protein and greater biomineralisation of the prostheses material eight weeks post implantation. In contrast, prosthesis punches from biglycan-deficient mice did not show any changes due to hyperglycemia, suggesting a pro-degenerative effect of biglycan in the context of diabetes.

The presented results highlight the complex effects of diabetes on aortic valve degeneration and suggest that the extracellular matrix is involved in these processes, which offers new potential therapeutic approaches.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. HGNC-Guidelines for Human Gene Nomenclature. 2018 - <https://www.genenames.org/about/guidelines>.
2. MGI-Guidelines for Nomenclature of Genes, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat. 2018 - <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>.
3. Schleich JM, Abdulla T, Summers R, Houyel L. An overview of cardiac morphogenesis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2013;106(11):612-23.
4. Hinton RB, Jr., Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, Benson DW, et al. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res.* 2006;98(11):1431-8.
5. Combs MD, Yutzy KE. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ Res.* 2009;105(5):408-21.
6. Renz-Polster H, Bätge B. *Basislehrbuch innere Medizin kompakt - greifbar - verständlich.* München: Elsevier, Urban & Fischer; 2013.
7. Les Laboratoires Servier. *Smart Servier Medical Art 2018* - <https://smart.servier.com/>.
8. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation.* 2011;124(16):1783-91.
9. Duran CMG, Gunning AJ. The Vascularization of the Heart Valves: A Comparative Study. *Cardiovasc Res.* 1968;2(3):290-6.
10. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1407-18.
11. Misfeld M, Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007;362(1484):1421-36.
12. Poggio P, Sainger R, Branchetti E, Grau JB, Lai EK, Gorman RC, et al. Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Res.* 2013;98(3):402-10.
13. Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2007;28(2):230-68.
14. Daniel WG, Baumgartner H, Gohlke-Barwolf C, Hanrath P, Horstkotte D, Koch KC, et al. Leitlinien: Klappenvitien im Erwachsenenalter. *Clin Res Cardiol.* 2006;95(11):620-41.
15. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med.* 1999;341(3):142-7.
16. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(3):630-4.
17. Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Eur Cardiol.* 2015;10(2):108-12.
18. Mulholland DL, Gotlieb AI. Cell biology of valvular interstitial cells. *Can J Cardiol.* 1996;12(3):231-6.
19. Hughes BR, Chahoud G, Mehta JL. Aortic stenosis: Is it simply a degenerative process or an active atherosclerotic process? *Clin Cardiol.* 2005;28(3):111-4.
20. Rajamannan NM. Calcific aortic stenosis: lessons learned from experimental and clinical studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(2):162-8.
21. Kamath AR, Pai RG. Risk factors for progression of calcific aortic stenosis and potential therapeutic targets. *Int J Angiol.* 2008;17(2):63-70.

22. Katz R, Wong ND, Kronmal R, Takasu J, Shavelle DM, Probstfield JL, et al. Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation*. 2006;113(17):2113-9.
23. Xu S, Liu AC, Gotlieb AI. Common pathogenic features of atherosclerosis and calcific aortic stenosis: role of transforming growth factor-beta. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(4):236-47.
24. Milin AC, Vorobiof G, Aksoy O, Ardehali R. Insights into aortic sclerosis and its relationship with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(5):e001111.
25. Newby DE, Cowell SJ, Boon NA. Emerging medical treatments for aortic stenosis: statins, angiotensin converting enzyme inhibitors, or both? *Heart*. 2006;92(6):729-34.
26. Dweck MR, Khaw HJ, Sng GK, Luo EL, Baird A, Williams MC, et al. Aortic stenosis, atherosclerosis, and skeletal bone: is there a common link with calcification and inflammation? *Eur Heart J*. 2013;34(21):1567-74.
27. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005;111(24):3316-26.
28. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 1994;90(2):844-53.
29. Small A, Kiss D, Giri J, Anwaruddin S, Siddiqi H, Guerraty M, et al. Biomarkers of Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(4):623-32.
30. Towler DA. Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circ Res*. 2013;113(2):198-208.
31. Pawade TA, Newby DE, Dweck MR. Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(5):561-77.
32. Czarny MJ, Resar JR. Diagnosis and management of valvular aortic stenosis. *Clin Med Insights Cardiol*. 2014;8(Suppl 1):15-24.
33. Frank S, Johnson A, Ross Jr J. Natural history of valvular aortic stenosis. *Br Heart J*. 1973;35(1):41.
34. Chizner MA, Pearle DL, deLeon AC. The natural history of aortic stenosis in adults. *Am Heart J*. 1980;99(4):419-24.
35. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*. 2017;38(36):2739-91.
36. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(23):2440-92.
37. Butany J, Ahluwalia MS, Munroe C, Fayet C, Ahn C, Blit P, et al. Mechanical heart valve prostheses:: identification and evaluation (erratum). *Cardiovasc Pathol*. 2003;12(6):322-44.
38. Giachelli CM. Ectopic Calcification. *The American Journal of Pathology*. 1999;154(3):671-5.
39. Ruel M, Kulik A, Rubens FD, Bedard P, Masters RG, Pipe AL, et al. Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25(3):364-70.
40. Phillips SJ. Selecting the best heart valve for your patient: mechanical or tissue. *Am Heart Hosp J*. 2004;2(3):149-52.
41. Blome-Eberwein SA, Mrowinski D, Hofmeister J, Hetzer R. Impact of Mechanical Heart Valve Prosthesis Sound on Patients' Quality of Life. *Ann Thorac Surg*. 1996;61(2):594-602.
42. Hoffmann G, Lutter G, Cremer J. Durability of bioprosthetic cardiac valves. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105(8):143-8.

43. Jorge-Herrero E, Paez JG, Del Castillo-Olivares Ramos J. Tissue heart valve mineralization: review of calcification mechanisms and strategies for prevention. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*. 2005;3(2):67-82.
44. Okamura K, Chiba C, Iriyama T, Itoh T, Maeta H, Ijima H, et al. Antigen depressant effect of glutaraldehyde for aortic heterografts with a valve, with special reference to a concentration right fit for the preservation of grafts. *Surgery*. 1980;87(2):170-6.
45. Cribier A. Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis: First Human Case Description. *Circulation*. 2002;106(24):3006-8.
46. Eltchaninoff H, Zajarias A, Tron C, Litzler PY, Baala B, Godin M, et al. Transcatheter aortic valve implantation: technical aspects, results and indications. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008;101(2):126-32.
47. Kuck KH, Eggebrecht H, Elsässer A, Hamm C, Haude M, Ince H, et al. Qualitätskriterien zur Durchführung der kathetergestützten Aortenklappenimplantation (TAVI). *Der Kardiologe*. 2016;10(5):282-300.
48. Chakos A, Wilson-Smith A, Arora S, Nguyen TC, Dhoble A, Tarantini G, et al. Long term outcomes of transcatheter aortic valve implantation (TAVI): a systematic review of 5-year survival and beyond. *Ann Cardiothorac Surg*. 2017;6(5):432-43.
49. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4195-200.
50. Behonick DJ, Werb Z. A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mech Dev*. 2003;120(11):1327-36.
51. Michel JB, Jondeau G, Milewicz DM. From genetics to response to injury: vascular smooth muscle cells in aneurysms and dissections of the ascending aorta. *Cardiovasc Res*. 2018;114(4):578-89.
52. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:4-27.
53. Siasos G, Tousoulis D, Kioufis S, Oikonomou E, Siasou Z, Limperi M, et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(10):1132-48.
54. Couchman JR, Pataki CA. An introduction to proteoglycans and their localization. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(12):885-97.
55. Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 2(2):193-205.
56. Vecino E, Kwok J. Extracellular Matrix in the Nervous System: The good and the bad aspects. In: Travascio F, editor. *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*: INTECH; 2016. p. 1-35.
57. Hassell JR, Kimura JH, Hascall VC. Proteoglycan core protein families. *Annu Rev Biochem*. 1986;55(1):539-67.
58. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol*. 2015;42:11-55.
59. Lindahl U, Couchman J, Esko JD. *Essentials of Glycobiology - Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
60. Hubbard C, McNamara JT, Azumaya C, Patel MS, Zimmer J. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol*. 2012;418(1-2):21-31.
61. Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*. 2002;54(4):195-9.
62. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties. *J Biol Chem*. 1999;274(35):25085-92.
63. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242(1):27-33.

64. Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltes L. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. *Curr Med Chem*. 2009;16(14):1718-45.
65. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*. 2011;91(1):221-64.
66. Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vigetti D, Makkonen K, et al. Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J*. 2011;278(9):1419-28.
67. Nauck M, Petermann A, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller U, Landgraf R, et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel*. 2017;12(S 02):S94-S100.
68. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13-S27.
69. World Health Organization & International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organization; 2006.
70. Mortensen HB, Christophersen C. Glucosylation of human haemoglobin a in red blood cells studied in vitro. Kinetics of the formation and dissociation of haemoglobin A1c. *Clin Chim Acta*. 1983;134(3):317-26.
71. Danne T, Freckmann G, Kautzky-Willer A, Lang U, Lehmann R, Pfohl M, et al. Typ-1-Diabetes. In: Schatz H, Pfeiffer AFH, editors. *Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 57-106.
72. Deutsche Diabetes Gesellschaft. S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes, 2. Auflage. 2018.
73. Tabak AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimaki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012;379(9833):2279-90.
74. Huang YL, Cai XY, Mai WY, Li MJ, Hu YZ. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. *Bmj-Brit Med J*. 2016;355.
75. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*. 2016;387(10027):1513-30.
76. World Health Organization. Global report on diabetes. 2016.
77. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas - Eighth edition*. 2017.
78. Diabetes-Hilfe DDGDudD. *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2017 - Die Bestandsaufnahme*. 2017.
79. Godsland IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2009;118(5):315-32.
80. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin Degradation: Progress and Potential. *Endocr Rev*. 1998;19(5):608-24.
81. Goldstein BJ. Protein-tyrosine phosphatases and the regulation of insulin action. *J Cell Biochem*. 1992;48(1):33-42.
82. Frojdo S, Vidal H, Pirola L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(2):83-92.
83. Czech MP, Corvera S. Signaling Mechanisms That Regulate Glucose Transport. *J Biol Chem*. 1999;274(4):1865-8.
84. Chen JH, Simmons CA. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ Res*. 2011;108(12):1510-24.
85. Stephens EH, Saltarrelli JG, Baggett LS, Nandi I, Kuo JJ, Davis AR, et al. Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves. *Cardiovasc Pathol*. 2011;20(6):334-42.

86. Neufeld EB, Zadrozny LM, Phillips D, Aponte A, Yu Z-X, Balaban RS. Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):113-21.
87. Song R, Zeng Q, Ao L, Jessica AY, Cleveland JC, Zhao K-s, et al. Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2. *Arterio Thromb Vasc Biol*. 2012;32(11):2711-20.
88. Martin-Rojas T, Mourino-Alvarez L, Alonso-Orgaz S, Rosello-Lleti E, Calvo E, Lopez-Almodovar LF, et al. iTRAQ proteomic analysis of extracellular matrix remodeling in aortic valve disease. *Sci Rep*. 2015;5:17290.
89. Derbali H, Bossé Y, Côté N, Pibarot P, Audet A, Pépin A, et al. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *The American journal of pathology*. 2010;176(6):2638-45.
90. Macri L, Silverstein D, Clark RA. Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(13):1366-81.
91. Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconjugate J*. 2002;19(4-5):249-55.
92. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(5):1159-65.
93. Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, et al. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest*. 2001;108(7):1031-40.
94. Kim HD, Valentini RF. Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res*. 2002;59(3):573-84.
95. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):83.
96. Yan AT, Koh M, Chan KK, Guo H, Alter DA, Austin PC, et al. Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(12):1523-32.
97. Kamalesh M, Ng C, El Masry H, Eckert G, Sawada S. Does diabetes accelerate progression of calcific aortic stenosis? *Eur J Echocardiogr*. 2009;10(6):723-5.
98. Larsson SC, Wallin A, Hakansson N, Stackelberg O, Back M, Wolk A. Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases. *Int J Cardiol*. 2018;262:66-70.
99. Ljungberg J, Johansson B, Engstrom KG, Albertsson E, Holmer P, Norberg M, et al. Traditional Cardiovascular Risk Factors and Their Relation to Future Surgery for Valvular Heart Disease or Ascending Aortic Disease: A Case-Referent Study. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5).
100. Yahagi K, Kolodgie FD, Lutter C, Mori H, Romero ME, Finn AV, et al. Pathology of Human Coronary and Carotid Artery Atherosclerosis and Vascular Calcification in Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(2):191-204.
101. Gowd V, Gurukar A, Chilkunda ND. Glycosaminoglycan remodeling during diabetes and the role of dietary factors in their modulation. *World J Diabetes*. 2016;7(4):67-73.
102. Hiebert LM, Han J, Mandal AK. Glycosaminoglycans, hyperglycemia, and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(7):1032-43.
103. Hiebert LM. Proteoglycans and Diabetes. *Curr Pharm Des*. 2017;23(10):1500-9.

104. Rees MD, Kennett EC, Whitelock JM, Davies MJ. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(12):1973-2001.
105. Chuang CY, Degendorfer G, Davies MJ. Oxidation and modification of extracellular matrix and its role in disease. *Free Radic Res.* 2014;48(9):970-89.
106. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191-4.
107. Atkins SK, Sucosky P. Etiology of bicuspid aortic valve disease: Focus on hemodynamics. *World J Cardiol.* 2014;6(12):1227-33.
108. Antonopoulos CA, Axelsson I, Heinegard D, Gardell S. Extraction and Purification of Proteoglycans from Various Types of Connective-Tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1974;338(1):108-19.
109. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stenslokken KO, et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(9).
110. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem.* 1969;17(2):110-24.
111. Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, et al. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 1998;20(1):78-82.
112. Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton).* 2007;12(3):261-6.
113. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.
114. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 1994;43(11):1326-33.
115. Chaudhry ZZ, Morris DL, Moss DR, Sims EK, Chiong Y, Kono T, et al. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Lab Anim.* 2013;47(4):257-65.
116. Giachelli CM. Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation. *Z Kardiol.* 2001;90 Suppl 3:31-7.
117. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin Inhibits Mineral Deposition and Promotes Regression of Ectopic Calcification. *The American Journal of Pathology.* 2002;161(6):2035-46.
118. Ohri R, Hahn SK, Hoffman AS, Stayton PS, Giachelli CM. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium. *J Biomed Mater Res A.* 2004;70(2):328-34.
119. Bio-Rad Laboratories Inc. Multiplex Immunoassays 2018 - <http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/multiplex-immunoassays>.
120. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
121. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-4.
122. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
123. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
124. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

125. Ghosh S, Gepstein S, Heikkila JJ, Dumbroff EB. Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues. *Anal Biochem.* 1988;169(2):227-33.
126. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
127. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
128. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
129. Jian B, Narula N, Li Q-y, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF- β 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *The Annals of Thoracic Surgery.* 2003;75(2):457-65.
130. Rodriguez KJ, Piechura LM, Masters KS. Regulation of valvular interstitial cell phenotype and function by hyaluronic acid in 2-D and 3-D culture environments. *Matrix Biol.* 2011;30(1):70-82.
131. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
132. Ighbariya A, Weiss R. Insulin Resistance, Prediabetes, Metabolic Syndrome: What Should Every Pediatrician Know? *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2017;9(Suppl 2):49-57.
133. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(2):19-39.
134. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1).
135. King GL, Park K, Li Q. Selective Insulin Resistance and the Development of Cardiovascular Diseases in Diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes.* 2016;65(6):1462-71.
136. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(1):F214-22.
137. Cheung DY, Duan B, Butcher JT. Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1155-72.
138. Pibarot P, Dumesnil JG. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation.* 2009;119(7):1034-48.
139. Ohri R, Tung E, Rajachar R, Giachelli CM. Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin. *Calcif Tissue Int.* 2005;76(4):307-15.
140. Nagy E, Eriksson P, Yousry M, Caidahl K, Ingelsson E, Hansson GK, et al. Valvular osteoclasts in calcification and aortic valve stenosis severity. *Int J Cardiol.* 2013;168(3):2264-71.
141. Nagy E, Andersson DC, Caidahl K, Eriksson MJ, Eriksson P, Franco-Cereceda A, et al. Upregulation of the 5-lipoxygenase pathway in human aortic valves correlates with severity of stenosis and leads to leukotriene-induced effects on valvular myofibroblasts. *Circulation.* 2011;123(12):1316-25.
142. Suzuki H, Chikada M, Yokoyama MK, Kurokawa MS, Ando T, Furukawa H, et al. Aberrant Glycosylation of Lumican in Aortic Valve Stenosis Revealed by Proteomic Analysis. *Int Heart J.* 2016;57(1):104-11.
143. O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1721-8.
144. Akat K, Borggrefe M, Kaden JJ. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart.* 2009;95(8):616-23.

145. Ronco C, McCullough P, Anker SD, Anand I, Aspromonte N, Bagshaw SM, et al. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. *Eur Heart J.* 2010;31(6):703-11.
146. Willemsen D, Cordes C, Bjarnason-Wehrens B, Knoglinger E, Langheim E, Marx R, et al. Rehabilitation standards for follow-up treatment and rehabilitation of patients with ventricular assist device (VAD). *Clin Res Cardiol Suppl.* 2016;11 Suppl 1:2-49.
147. Martin-Rojas T, Gil-Dones F, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, Vivanco F, Barderas MG. Proteomic profile of human aortic stenosis: insights into the degenerative process. *J Proteome Res.* 2012;11(3):1537-50.
148. Schlotter F, Halu A, Goto S, Blaser MC, Body SC, Lee LH, et al. Spatiotemporal Multi-omics Mapping Generates a Molecular Atlas of the Aortic Valve and Reveals Networks Driving Disease. *Circulation.* 2018.
149. Tiede K, Melchior-Becker A, Fischer JW. Transcriptional and posttranscriptional regulators of biglycan in cardiac fibroblasts. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(1):99-108.
150. Burch ML, Yang SN, Ballinger ML, Getachew R, Osman N, Little PJ. TGF-beta stimulates biglycan synthesis via p38 and ERK phosphorylation of the linker region of Smad2. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(12):2077-90.
151. Little PJ, Tannock L, Olin KL, Chait A, Wight TN. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor-beta1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(1):55-60.
152. Carthy JM, Boroomand S, McManus BM. Versican and CD44 in in vitro valvular interstitial cell injury and repair. *Cardiovasc Pathol.* 2012;21(2):74-82.
153. Krishnamurthy VK, Stout AJ, Sapp MC, Matuska B, Lauer ME, Grande-Allen KJ. Dysregulation of hyaluronan homeostasis during aortic valve disease. *Matrix Biol.* 2017;62:40-57.
154. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* 2000;106(3):349-60.
155. Johansson B, Holmgren A, Hedstrom M, Engstrom-Laurent A, Engstrom KG. Evaluation of hyaluronan and calcifications in stenotic and regurgitant aortic valves. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;39(1):27-32.
156. Jian B, Xu J, Connolly J, Savani RC, Narula N, Liang B, et al. Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol.* 2002;161(6):2111-21.
157. Yang SN, Burch ML, Tannock LR, Evanko S, Osman N, Little PJ. Transforming growth factor-beta regulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle: contribution to lipid binding and accelerated atherosclerosis in diabetes. *J Diabetes.* 2010;2(4):233-42.
158. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnik BRC, et al. Increased Renal Production of Transforming Growth Factor- 1 in Patients with Type II Diabetes. *Diabetes.* 1997;46(5):854-9.
159. Fischer JW. Role of hyaluronan in atherosclerosis: Current knowledge and open questions. *Matrix Biol.* 2018.
160. Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, Karousou E, Viola M, Bartolini B, et al. Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis. *J Biol Chem.* 2012;287(42):35544-55.
161. Vigetti D, Clerici M, Deleonibus S, Karousou E, Viola M, Moretto P, et al. Hyaluronan synthesis is inhibited by adenosine monophosphate-activated protein kinase through the regulation of HAS2 activity in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2011;286(10):7917-24.

162. Vigetti D, Viola M, Karousou E, De Luca G, Passi A. Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol.* 2014;35:8-13.
163. Chajara A, Raoudi M, Delpech B, Leroy M, Basuyau JP, Levesque H. Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1480-7.
164. Mine S, Okada Y, Kawahara C, Tabata T, Tanaka Y. Serum Hyaluronan Concentration as a Marker of Angiopathy in Patients with Diabetes Mellitus. *Endocr J.* 2006;53(6):761-6.
165. Heickendorff L, Ledet T, Rasmussen LM. Glycosaminoglycans in the Human Aorta in Diabetes-Mellitus - a Study of Tunica Media from Areas with and without Atherosclerotic Plaque. *Diabetologia.* 1994;37(3):286-92.
166. Infante T, Forte E, Aiello M, Salvatore M, Cavaliere C. In Vivo and In Vitro Analysis in Coronary Artery Disease Related to Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:209.
167. Stephens EH, Han J, Trawick EA, Di Martino ES, Akkiraju H, Brown LM, et al. Left-Ventricular Assist Device Impact on Aortic Valve Mechanics, Proteomics and Ultrastructure. *Ann Thorac Surg.* 2018;105(2):572-80.
168. Grande-Allen KJ, Osman N, Ballinger ML, Dadlani H, Marasco S, Little PJ. Glycosaminoglycan synthesis and structure as targets for the prevention of calcific aortic valve disease. *Cardiovasc Res.* 2007;76(1):19-28.
169. Osman N, Grande-Allen KJ, Ballinger ML, Getachew R, Marasco S, O'Brien KD, et al. Smad2-dependent glycosaminoglycan elongation in aortic valve interstitial cells enhances binding of LDL to proteoglycans. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(2):146-55.
170. Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase-3: Properties, Functions, and Regulation. *Chem Rev.* 2001;101(8):2527-40.
171. MSP bodmann GmbH. Bedienungsanleitung Blutzuckermesssystem GlucoSmart Swing. 2014.
172. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Muñoz P, Becker C, Holman G, et al. Insulin-induced Recruitment of Glucose Transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in Isolated Rat Cardiac Myocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(11):7085-92.
173. Shen S, Wertheimer E, Sampson SR, Tennenbaum T. Characterization of glucose transport system in keratinocytes: insulin and IGF-1 differentially affect specific transporters. *J Invest Dermatol.* 2000;115(6):949-54.
174. Egert S, Nguyen N, Schwaiger M. Myocardial glucose transporter GLUT1: translocation induced by insulin and ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(7):1337-44.
175. Gwanmesia P, Ziegler H, Eurich R, Barth M, Kamiya H, Karck M, et al. Opposite effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor on the degeneration of aortic valvular interstitial cell are modified by the extracellular matrix protein fibronectin: implications for heart valve engineering. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(12):3737-46.
176. Fisher CI, Chen J, Merryman WD. Calcific nodule morphogenesis by heart valve interstitial cells is strain dependent. *Biomech Model Mechanobiol.* 2013;12(1):5-17.
177. Benton JA, Kern HB, Leinwand LA, Mariner PD, Anseth KS. Statins block calcific nodule formation of valvular interstitial cells by inhibiting alpha-smooth muscle actin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(11):1950-7.
178. Monzack EL, Masters KS. Can valvular interstitial cells become true osteoblasts?: A side-by-side comparison. *The Journal of Heart Valve Disease.* 2011;20(4):449-63.
179. Cloyd KL, El-Hamamsy I, Boonrungsiman S, Hedegaard M, Gentleman E, Sarathchandra P, et al. Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell 'calcified' nodules. *PLoS One.* 2012;7(10):e48154.

180. Thompson J, Wilson P, Brandewie K, Taneja D, Schaefer L, Mitchell B, et al. Renal accumulation of biglycan and lipid retention accelerates diabetic nephropathy. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1179-87.
181. Gupta V, Werdenberg JA, Mendez JS, Jane Grande-Allen K. Influence of strain on proteoglycan synthesis by valvular interstitial cells in three-dimensional culture. *Acta Biomater.* 2008;4(1):88-96.
182. Gupta V, Werdenberg JA, Lawrence BD, Mendez JS, Stephens EH, Grande-Allen KJ. Reversible secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans by cyclically stretched valvular cells in 3D culture. *Ann Biomed Eng.* 2008;36(7):1092-103.
183. Lehmann S, Walther T, Kempfert J, Rastan A, Garbade J, Dhein S, et al. Mechanical strain and the aortic valve: influence on fibroblasts, extracellular matrix, and potential stenosis. *Ann Thorac Surg.* 2009;88(5):1476-83.
184. Lo KA, Labadorf A, Kennedy NJ, Han MS, Yap YS, Matthews B, et al. Analysis of in vitro insulin-resistance models and their physiological relevance to in vivo diet-induced adipose insulin resistance. *Cell Rep.* 2013;5(1):259-70.
185. Li G, Barrett EJ, Wang H, Chai W, Liu Z. Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells. *Endocrinology.* 2005;146(11):4690-6.
186. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science.* 1976;193(4251):415-7.
187. Gerling IC, Friedman H, Greiner DL, Shultz LD, Leiter EH. Multiple low-dose streptozocin-induced diabetes in NOD-scid/scid mice in the absence of functional lymphocytes. *Diabetes.* 1994;43(3):433-40.
188. Reddy S, Wu D, Elliott RB. Low-Dose Streptozotocin Causes Diabetes in Severe Combined Immunodeficient (Scid) Mice without Immune Cell Infiltration of the Pancreatic-Islets. *Autoimmunity.* 1995;20(2):83-92.
189. Rajachar RM, Tung E, Truong AQ, Look A, Giachelli CM. Role of carbonic anhydrase II in ectopic calcification. *Cardiovasc Pathol.* 2009;18(2):77-82.
190. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol.* 2016;100(3):481-9.
191. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002;106(16):2067-72.
192. Stentz FB, Umpierrez GE, Cuervo R, Kitabchi AE. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises. *Diabetes.* 2004;53(8):2079-86.
193. Mahmoud F, Al-Ozairi E. Inflammatory cytokines and the risk of cardiovascular complications in type 2 diabetes. *Dis Markers.* 2013;35(4):235-41.
194. Pahwa R, Nallasamy P, Jialal I. Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial cell inflammation and perturbation of the endothelial glycocalyx. *J Diabetes Complications.* 2016;30(4):563-72.
195. Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes.* 2008;57(11):3090-8.
196. Song R, Fullerton DA, Ao L, Zheng D, Zhao KS, Meng X. BMP-2 and TGF-beta1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(4):403-12.

197. Song R, Ao L, Zhao KS, Zheng D, Venardos N, Fullerton DA, et al. Soluble biglycan induces the production of ICAM-1 and MCP-1 in human aortic valve interstitial cells through TLR2/4 and the ERK1/2 pathway. *Inflamm Res*. 2014;63(9):703-10.
198. Lorusso R, Gelsomino S, Luca F, De Cicco G, Bille G, Carella R, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with faster degeneration of bioprosthetic valve: results from a propensity score-matched Italian multicenter study. *Circulation*. 2012;125(4):604-14.
199. Rodriguez-Gabella T, Voisine P, Dagenais F, Mohammadi S, Perron J, Dumont E, et al. Long-Term Outcomes Following Surgical Aortic Bioprosthesis Implantation. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(13):1401-12.
200. Polomsky M, Kilgo PD, Puskas JD, Halkos ME, Thourani VH, Kelli HM, et al. Long-term survival for patients with metabolic syndrome after bioprosthetic or mechanical valve replacement. *J Card Surg*. 2014;29(1):26-34.
201. Chen CP, Chang SC, Vivian Yang WC. High glucose alters proteoglycan expression and the glycosaminoglycan composition in placentas of women with gestational diabetes mellitus and in cultured trophoblasts. *Placenta*. 2007;28(2-3):97-106.
202. Bolton K, Segal D, Walder K. The small leucine-rich proteoglycan, biglycan, is highly expressed in adipose tissue of *Psammomys obesus* and is associated with obesity and type 2 diabetes. *Biologics*. 2012;6:67-72.
203. Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem*. 1989;264(8):4571-6.
204. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res*. 2002;17(7):1180-9.

VERÖFFENTLICHUNGEN UND PROJEKTFÖRDERUNGEN

ORIGINALARBEITEN

Im Rahmen des Promotionsvorhabens wurde an den unten aufgeführten Originalarbeiten mitgewirkt. Zudem dienen Teile der erzielten Ergebnisse als Grundlage folgender Manuskripte.

Selig JI, Ouwens DM, Raschke S, Thoresen H, Fischer JW, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M *Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells - A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes*. Manuskript in Vorbereitung

Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, Kiene LS, Raschke S, Boeken U, Akhyari P, Fischer JW, Lichtenberg A (2018) *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. Diabetes and Vascular Disease Research, doi: 10.1177/1479164118817922

Weber A, Barth M, Selig JI, Raschke S, Dakaras K, Hof A, Hesse J, Schrader J, Lichtenberg A, Akhyari P (2018) *Enzymes of the purinergic signaling system exhibit diverse effects on the degeneration of valvular interstitial cells in a 3-D microenvironment*. FASEB Journal, 32 (8), 4356-4369. doi:10.1096/fj.201701326R

Hof A, Raschke S, Baier K, Nehrenheim L, Selig JI, Schomaker M, Lichtenberg A, Meyer H, Akhyari P (2016) *Challenges in developing a reseeded, tissue-engineered aortic valve prosthesis*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 50 (3), 446-455. doi:10.1093/ejcts/ezw057

KONGRESSBEITRÄGE

Ausgewählte Datensätze des Promotionsvorhabens wurden bei den folgenden wissenschaftlichen Kongressen und Fachtagungen vorgestellt und diskutiert.

Selig JI, Japes F, Fischer JW, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2018) *Ectopic calcification of prosthetic valve material - hyperglycaemia induces calcification, while loss of biglycan has a protective effect*. – Vortrag beim 8. zweijährigen Kongress für Herzklappenbiologie und Tissue Engineering

Akhyari P, Schomaker M, Weber A, Barth M, Hof A, Raschke S, Baier K, Nehrenheim L, Selig JI, Meyer H, Lichtenberg A (2018) *The Holy Grail of heart valve tissue engineering: creation of an uniformly repopulated tissue of dense interstitial cells - is laser manipulation the solution?* – Vortrag beim 5. Weltkongress der Internationalen Gesellschaft für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (TERMIS)

- Selig JI, Ouwens DM, Fischer JW, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2018) *Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells - A link between calcific aortic valve disease and type 2 diabetes*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 66 (S 01), S1-S110. doi:10.1055/s-0038-1627878 – Vortrag bei der 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)
- Selig JI, Ouwens DM, Akhyari P, Lichtenberg A, Barth M (2017) *Effect of high insulin levels and hyperglycemia on valvular interstitial cells*. Diabetologia, 60 (Suppl 1), 1-608. doi:10.1007/s00125-017-4350-z – Poster bei der 53. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Diabetesforschung (EASD)
- Selig JI, Sarter M, Barth M, Schomakers A, Seehaus S, Rütter U, Lichtenberg A, Akhyari P (2017) *Influence of the fat mass and obesity-associated (Fto) gene on the degeneration of heart valve prosthesis material*. Clinical Research in Cardiology, 106 (Suppl 1), 1. doi:10.1007/s00392-017-1105-2 – Poster bei der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK)
- Selig JI, Raschke S, Ouwens DM, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2017) *Can a valve become resistant to insulin? - Influence of type 2 diabetes mimicking conditions on valvular interstitial cells*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 65 (S 01), S1-S110. doi:10.1055/s-0037-1598846 – Vortrag bei der 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)
- Barth M, Selig JI, Klose S, Kiene LS, Raschke S, Akhyari P, Fischer JW, Lichtenberg A (2017) *Biglycan is involved in degenerative aortic valve disease in diabetic disorders*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 65 (S 01), S1-S110. doi:10.1055/s-0037-1598959 – Poster bei der 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG)
- Selig JI, Raschke S, Akhyari P, Lichtenberg A, Barth M (2016) *Insulin resistance in valvular interstitial cells: an in vitro model for type 2 diabetes in degenerative aortic valve disease*. Diabetologia, 59 (Suppl 1), 1-581. doi:10.1007/s00125-016-4046-9 – Poster bei der 52. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Diabetesforschung (EASD)
- Hof A, Raschke S, Baier K, Nehrenheim L, Selig JI, Schomaker M, Lichtenberg A, Meyer H, Akhyari P (2015) *Challenges in developing a reseeded, tissue engineered aortic valve prosthesis*. – Vortrag bei der 29. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Herz-Thorax-Chirurgie (EACTS)

PROJEKTFÖRDERUNGEN

Das Forschungsprojekt wurde durch die aufgelisteten Institutionen gefördert und Teile der dargelegten Ergebnisse zum Einwerben der Forschungsgelder verwendet.

Deutsche Forschungsgemeinschaft - Nachwuchsakademie Herzchirurgie (eingereicht 2018)
Matrix modulation in degenerative aortic valve disease due to metabolically-independent insulin action? Barth M

Deutsche Stiftung für Herzforschung und Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie - Dr. Rusche-Forschungsprojekt (2016) *Auswirkung von diabetischer Stoffwechsellage und Modulation der Extrazellulärmatrix bei der Entstehung und Progression der Aortenklappen-Degeneration.* Barth M

Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2013) *The role of hyaluronan, hyaluronic synthases and proteoglycans in degenerative aortic valve disease.* Barth M

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation „Die Rolle der extrazellulären Matrix in der degenerativen Aortenklappenerkrankung unter dem Einfluss von Diabetes“ von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Fassung keiner anderen als der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 06. Dezember 2018

Jessica Isabel Selig

DANKSAGUNG

Auf dieser nun letzten Seite ist Raum zurück zu blicken. Eine schöne, aufregende, lehrreiche, manchmal aber auch recht nervenaufreibende Zeit geht zu Ende. Großartige Jahre, die vor allem von außergewöhnlichen Menschen geprägt waren, denen ich meinen größten Dank ausdrücken möchte.

Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg möchte ich für die Möglichkeit, meine Promotion an seiner Klinik anfertigen zu können, danken. Die guten Arbeitsbedingungen, das entgegengebrachte Vertrauen und die fortwährende Unterstützung bei der Verwirklichung von Kongressreisen waren wichtige Voraussetzungen für die Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütter danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ihre vielen guten Hinweise und Anregungen haben mir oft einen anderen Blick vermittelt, mich zum wissenschaftlichen Denken angeregt und wesentlich zur Gestaltung des Projekts beigetragen. Es war gut, Sie als Mitglied des Fachbereichs Biologie an meiner Seite zu wissen.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari, der vom ersten Tag an den Fortschritt des Projekts im Auge hatte. Ihre fachliche Expertise sowie Ihr stetiger Einsatz für die Forschung waren wichtige Eckpfeiler für meine wissenschaftliche Arbeit. Zudem hat mich die von Ihnen geförderte enge Zusammenarbeit zwischen Labor und Klinik sehr begeistert.

Außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Mareike Barth, deren Engagement bei der Verwirklichung dieser Arbeit unverzichtbar war. Die enge Zusammenarbeit mit Dir gehört wohl zu den wertvollsten Erfahrungen meiner Promotionszeit. Nach all den Jahren schätze ich Dich nicht nur als herausragende Wissenschaftlerin, sondern auch als vertrauensvolle Mentorin.

Danken möchte ich auch allen weiteren Kollegen der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und die vielen schönen Erlebnisse, die manch einen langen Labortag oder noch längere HTX-Nacht verkürzt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer und Frau Prof. Dr. Maria Grandoch möchte ich mich für die gute und erfolgreiche Kooperation bedanken. Die „Pharma“ hat mich sowohl in meinem theoretischen als auch in meinem technischen Wissen sehr gefördert und ist für mich auch dank vieler langjähriger Weggefährten zu einem zweiten zu Hause geworden.

Frau Prof. Dr. Margriet D. Ouwens sei für all ihre Ideen, praktischen Ratschläge und angeregten Diskussionen zum Thema Insulinresistenz und Diabetes gedankt. Ihre Begeisterung für Wissenschaft ist ansteckend.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Euer unentwegtes Verständnis, bedingungsloser Beistand und stete Unterstützung waren nicht nur für diese Arbeit unverzichtbar.

Vielen Dank!