

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

Die Regulation der Insulinsignalkaskade  
in aortalen valvulären Interstitialzellen  
unter diabetischer Stoffwechsellage

Dissertation

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

vorgelegt von  
Hannah Viviana Krug

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Margriet Ouwens

Für Maximilian.

## Zusammenfassung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung (CAVD) ist ein häufiges Erkrankungsbild in der westlichen Welt. Im Degenerationsprozess werden valvuläre Interstitialzellen (VIC) aktiviert und tragen somit zu progressiver Fibrosierung und Kalzifikation bei. Diabetes mellitus Typ 2 erhöht neben weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren das Risiko für die Entwicklung einer CAVD, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen Gegenstand aktueller Forschung sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hyperglykämie und -insulinämie inhibierend auf den AKT-Signalweg wirken und eine Insulinresistenz in VIC induzieren. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die der AKT nachgeschalteten Signalmoleküle MTOR und FOXO1 sowie ERK 42/44 aus dem MAPK-Signalweg auf ihre funktionelle Rolle im Rahmen degenerativer Veränderungen durch diabetische Bedingungen in VIC zu untersuchen. Darüber hinaus wird der Metabolismus von VIC unter diabetischen Bedingungen charakterisiert.

Für die Versuche wurden primäre VIC aus der Aortenklappe oviner Herzen isoliert und in einem zweidimensionalen *in vitro* Zellkulturmodell über sechs Tage mit hyperglykämien und hyperinsulinämien Bedingungen inkubiert. Darüber hinaus wurden der PI3K- und der MAPK-Signalweg über die spezifischen Inhibitoren Rapamycin (gegen MTOR) und U0126 (gegen ERK 42/44) blockiert. Zellysate sowie Zellkultur-Überstände wurden anschließend proteinbiochemisch und molekularbiologisch in Hinblick auf beteiligte Signalwege sowie auf die Expression von Markern der VIC-Differenzierung und des Matrixumbaus analysiert. Auswirkungen auf metabolische Prozesse unter den Behandlungsbedingungen wurden mithilfe eines *Seahorse* XFe96 Analysiergerätes untersucht.

Diabetische Bedingungen reduzieren die Phosphorylierung von MTOR im PI3K-Signalweg, während FOXO1 und ERK 42/44 weniger ausgeprägt reguliert werden. Rapamycin reduziert die Phosphorylierung von MTOR signifikant in allen Behandlungsgruppen, während U0126 die Phosphorylierung von ERK 42/44 nur in Abwesenheit von Insulin signifikant inhibiert. Beide Inhibitoren führen jedoch dazu, dass die Genexpression verschiedener Matrixproteine wie Dekorin, Biglykan sowie Matrix-Metalloproteinase-2 auf ein konstantes Level gebracht wird, während die Expression dieser Marker unter diabetischen Bedingungen hochreguliert ist. Die Analyse des Metabolismus im *Seahorse*-Assay zeigt eine Aktivierung durch die diabetischen Bedingungen, wobei der größte Anstieg unter der Kombinationsbehandlung von Hyperglykämie mit Hyperinsulinämie zu verzeichnen ist. Darüber hinaus zeigt sich unter Restriktion auf verschiedene Energiequellen eine Abhängigkeit von Glukose, insbesondere vermehrt unter diabetischen Bedingungen.

Hyperinsulinämie führt in VIC zu einem starken Effekt in Bezug auf die Aktivität von MTOR, aber weniger von FOXO1 und ERK 42/44. Eine Inhibition des MTOR-Signalwegs durch Rapamycin unterdrückt die mitogene Aktivität der Insulinsignalkaskade. Dieser Einfluss spiegelt sich auch in der Genexpression insbesondere extrazellulärer Matrixproteine wider, sodass anzunehmen ist, dass die MTOR-Signalkaskade an manchen dieser Prozesse beteiligt ist. Somit könnte der Inhibitor Rapamycin potenziell protektiv auf die Effekte wirken, welche diabetische Bedingungen im Rahmen der Entwicklung einer CAVD erwirken. Andere Komponenten der VIC-Differenzierung und des Matrixumbaus scheinen aber auch durch alternative Signalwege reguliert zu sein, sodass die Mechanismen über den Einfluss von Diabetes mellitus auf die Entwicklung einer CAVD Gegenstand zukünftiger Forschung sein werden.

## Summary

Calcific aortic valve disease (CAVD) is a common disease in Western society. During valvular degeneration valvular interstitial cells (VIC) are activated leading to progressive fibrosis and calcification. Type 2 diabetes mellitus, in addition to other cardiovascular risk factors, increases the risk of developing CAVD, whereby underlying molecular mechanisms are currently an active field of research. It has recently been shown that hyperglycemia and hyperinsulinemia inhibit AKT signaling and induce insulin resistance in VIC. The present work aims to investigate the functional roles of the signaling molecules downstream of AKT, MTOR and FOXO1, as well as ERK 42/44 from the MAPK pathway during the degeneration process induced by diabetic conditions in VIC. Additionally, the metabolism of VIC under diabetic conditions is characterized.

Therefore, primary aortic VIC were isolated from ovine hearts and incubated in a two dimensional *in vitro* cell culture for 6 days under hyperglycemic and hyperinsulinemic conditions. Rapamycin (against MTOR) and U0126 (against ERK 42/44) were applied as specific inhibitors in the PI3K and in the MAPK pathway. Cell lysates as well as cell culture supernatants were subsequently analyzed by protein biochemical analysis and molecular biological analysis with regard to the involved signaling pathways as well as expression of markers of VIC differentiation and matrix remodeling. Effects on metabolic processes under diabetic conditions were examined using a SeahorseXFe96 Analyzer.

Diabetic conditions reduce phosphorylation of MTOR in the PI3K pathway, whereas FOXO1 and ERK 42/44 are less regulated. Treatment with Rapamycin significantly reduces phosphorylation of MTOR in all treatment groups, whereas treatment with U0126 only reduces phosphorylation of ERK 42/44 in the absence of insulin. Both inhibitors keep different matrix proteins, like decorin, biglycan and matrix metalloproteinase 2, on a constant level, whereas diabetic conditions lead to an increased expression of these matrix proteins. The Seahorse assay shows an activated metabolism under diabetic conditions with the greatest increase under the combination of both hyperglycemia and hyperinsulinemia. Moreover, restriction of different energy sources shows a dependence of VIC on glucose especially under diabetic conditions.

Hyperinsulinemia leads to a strong regulation with regard to the activity of MTOR, but less strongly of FOXO1 and ERK 42/44. Inhibition of the MTOR pathway through Rapamycin treatment suppresses the mitogenic activity of the insulin signaling cascade. Additionally, Rapamycin regulates gene expression of extracellular matrix proteins, suggesting an involvement of the MTOR signaling cascade in these processes. In conclusion, MTOR might take part in some processes regarding matrix remodeling in VIC. Therefore, the inhibitor Rapamycin could potentially prevent effects of diabetic conditions in the development of CAVD. Further components of VIC differentiation and matrix remodeling also appear to be regulated through alternative signaling pathways. Thus, the mechanisms of the influence of diabetic conditions on the development of CAVD will be a subject of further research.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b><i>acta2</i></b>	Alpha-Glattmuskelaktin, engl.: <i>actin <math>\alpha</math> 2, smooth muscle</i>
<b>AI</b>	Akutinsulin
<b><i>alpl</i></b>	Alkalische Phosphatase
<b>AMPK<math>\alpha</math></b>	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase $\alpha$
<b>AK</b>	Aortenklappe
<b>AKT</b>	Proteinkinase B
<b>AKS</b>	Aortenklappenstenose
<b>AS1842856</b>	5-Amino-7-(cyclohexylamino)-1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b><i>bgn</i></b>	Biglykan
<b>BPTES</b>	Bis-2-(5-Phenylacetamid-1,3,4-Thiadiazol-2-yl)Ethylsulfid
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>c</b>	Konzentration
<b>CAVD</b>	Aortenklappendegeneration, engl.: <i>calcific aortic valve disease</i>
<b>cm<sup>2</sup></b>	Quadratzentimeter
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b><i>coll1<math>\alpha</math>1</i></b>	Kollagen Typ 1, $\alpha$ 1
<b>C<sub>T</sub></b>	Schwellenzyklus, engl.: <i>cycle threshold</i>
<b>d</b>	Tag
<b>DC</b>	Detergenz-kompatibel, engl.: <i>detergent compatible</i>
<b><i>dcn</i></b>	Dekorin
<b>dl</b>	Deziliter
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DMEM</b>	Engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>ECAR</b>	Extrazelluläre Ansäuerungsrate, engl.: <i>extracellular acidification rate</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure, engl.: <i>ethylen-diamin tetraacetic acid</i>
<b>ELISA</b>	Engl.: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<b><i>eln</i></b>	Elastin
<b>ERK 42/44</b>	Engl.: <i>extracellular-signal regulated kinase 42/44</i> ERK 42 = MAPK 42 = ERK 2; ERK 44 = MAPK 44 = ERK 1
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix
<b>f</b>	Vorwärtsgerichtet, engl.: <i>forward</i>
<b>FCCP</b>	Carbonyl-Cyanide-4-(Trifluoromethoxy)Phenylhydrazone
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum, engl.: <i>fetal calf serum</i>
<b>FOXO1</b>	Engl.: <i>forkhead box protein O1</i>
<b>FS</b>	Fettsäuren
<b>g</b>	Gramm
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>Glc</b>	Glukose, engl.: <i>glucose</i>
<b>Gln</b>	Glutamin

---

<b>GlykoPER</b>	Glykolytische Protonenaustauschrates
<b>GSK-3<math>\alpha/\beta</math></b>	Engl.: <i>glycogen synthase kinase-3<math>\alpha/\beta</math></i>
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>has2</b>	Hyaluronansynthase 2
<b>HG</b>	Hyperglykämie
<b>HI</b>	Hyperinsulinämie
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>IGF-1</b>	Engl.: <i>insulin-like growth factor 1</i>
<b>IGF-1R</b>	IGF1-Rezeptor
<b>InsR</b>	Insulinrezeptor
<b>IRS</b>	Insulin-Rezeptor-Substrat
<b>l</b>	Liter
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	Mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>μg</b>	Mikrogramm
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>Mio.</b>	Millionen
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mm<sup>2</sup></b>	Quadratmillimeter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mmp</b>	Matrix-Metalloprotease
<b>MTOR(C1)</b>	Engl.: <i>mammalian target of rapamycin (complex 1)</i>
<b>MW</b>	Mediumwechsel
<b>NADH</b>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrat
<b>NG</b>	Normoglykämie
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>mRNA</b>	Engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>
<b>OCR</b>	Sauerstoffverbrauchsrate, engl.: <i>oxygen consumption rate</i>
<b>opn</b>	Osteopontin
<b>p</b>	Phosphorylierte Proteinsynthese
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion, engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PD98059</b>	2'-Amino-3'-methoxyflavone
<b>PER</b>	Protonenaustauschrates, engl.: <i>proton exchange rate</i>
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase, engl.: <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>P70S6K</b>	Engl.: <i>ribosomal protein S6 kinase</i>
<b>R</b>	Rapamycin
<b>r</b>	Rückwärtsgerichtet, engl.: <i>reverse</i>

---

<b>RAF</b>	Engl.: <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
<b>RAS</b>	Engl.: <i>rat sarcoma</i>
<b>RIPA</b>	Radioimmunpräzipitationsassay
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure, engl.: <i>ribonucleic acid</i>
<b>rpl</b>	Ribosomales Protein L
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute, engl.: <i>revolutions per minute</i>
<b>s</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat, engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
<b>t</b>	Totale Proteinsynthese
<b>TBST</b>	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20, engl.: <i>tris-buffered saline with tween 20</i>
<b>T2D</b>	Diabetes mellitus Typ 2
<b>U</b>	U0126
<b>UK5099</b>	2-Cyano-3-(1-Phenyl-1H-Indol-3-yl)-2-Propenonsäure
<b>U0126</b>	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien
<b>V</b>	Volt
<b>VIC</b>	Valvuläre Interstitialzellen, engl.: <i>valvular interstitial cells</i>
<b>3D</b>	Dreidimensional
<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Rolle der Aortenklappe im Herzen.....	1
1.1.1 Anatomie und Funktionsweise der Herzklappen.....	1
1.1.2 Epidemiologie der Aortenklappendegeneration.....	1
1.1.3 Pathophysiologie der Aortenklappendegeneration.....	2
1.1.4 Die valvuläre Interstitialzelle.....	3
1.2 Diabetes mellitus.....	4
1.2.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus.....	4
1.2.2 Grundlegende Pathophysiologie des Diabetes mellitus.....	5
1.2.3 Signalkaskade von Insulin – mitogene Signalwege.....	5
1.2.4 Bedeutung der Insulinresistenz im Insulinsignalweg.....	8
1.3 Einfluss von Diabetes mellitus auf die Aortenklappendegeneration.....	8
1.4 Zellulärer Metabolismus.....	8
1.4.1 Energiegewinnung durch Glukose, Fettsäuren und Glutamin.....	8
1.4.2 Mitochondriale Atmung.....	9
1.4.3 Metabolismus valvulärer Interstitialzellen unter diabetischem Einfluss.....	10
1.5 Ziele der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.2 Chemikalien.....	13
2.1.3 Laborgeräte.....	15
2.1.4 Kits.....	16
2.1.5 Lösungen.....	16
2.1.5.1 Zellkulturmedien.....	16

---

2.1.5.2	Puffer.....	17
2.1.5.3	Gelelektrophorese-Gele .....	18
2.1.6	Antikörper.....	19
2.1.6.1	Primär-Antikörper.....	19
2.1.6.2	Sekundär-Antikörper.....	20
2.1.7	Inhibitoren.....	20
2.1.8	<i>Primer</i> .....	21
2.2	Methoden .....	22
2.2.1	Zellkultur.....	22
2.2.1.1	Arbeiten an der Sterilbank .....	22
2.2.1.2	Isolation und Kultivierung valvulärer Interstitialzellen .....	22
2.2.1.3	Lichtmikroskopische Untersuchung valvulärer Interstitialzellen unter Kultur.....	24
2.2.1.4	Aussaat und Behandlung valvulärer Interstitialzellen .....	24
2.2.1.5	Zellen auszählen mithilfe der Neubauer-Zählkammer.....	25
2.2.1.6	Inhibition mitogener Signalwege .....	25
2.2.1.7	Ernte und Erstellung von Zelllysaten für Western-Blot-Analysen .....	26
2.2.2	Western-Blot-Analyse von Zelllysaten.....	27
2.2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten.....	27
2.2.2.2	Aufbereitung der Proben.....	27
2.2.2.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	28
2.2.2.4	Western-Blot .....	28
2.2.2.5	Immundetektion der Proteine.....	28
2.2.2.6	Auswertung der detektierten Proteinmengen.....	29
2.2.3	Bestimmung der Insulin-Konzentration in Zellkultur-Überständen .....	29
2.2.4	Zytotoxizitätsmessung in Zellkultur-Überständen.....	29
2.2.5	Extraktion und Analyse von RNA aus valvulären Interstitialzellen .....	30
2.2.5.1	Photometrische Analyse zur RNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung .....	30
2.2.5.2	Reverse Transkription von RNA in komplementäre DNA .....	30
2.2.5.3	Analyse der Genexpression durch semi-quantitative Echtzeit-PCR.....	30
2.2.5.4	Auswertung und Quantifizierung der Genexpression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode .....	31

---

2.2.6	Analyse der metabolischen Aktivität im <i>Seahorse</i> -Assay .....	31
2.2.7	Datenerhebung und statistische Analyse.....	33
2.2.8	Ethikvotum.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Charakterisierung der Insulinsignalkaskade in valvulären Interstitialzellen .....	34
3.1.1	Nachweis der Insulinkonzentration unter Kultur.....	34
3.1.2	Etablierung einer spezifischen Stimulationskonzentration für Insulin .....	35
3.1.2.1	Phosphorylierung von AKT.....	35
3.1.2.2	Phosphorylierung von ERK 42 und ERK 44 .....	37
3.1.3	Phosphorylierung von GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ .....	41
3.1.4	Phosphorylierung von FOXO1 .....	43
3.1.5	Phosphorylierung von MTOR.....	44
3.1.6	Phosphorylierung von AMPK $\alpha$ .....	45
3.2	Etablierung von Inhibitoren im mitogenen Signalweg .....	45
3.2.1	FOXO1-Inhibitor AS1842856 .....	46
3.2.2	MTOR-Inhibitor Rapamycin.....	49
3.2.3	ERK 42/44-Inhibitor PD98059 .....	52
3.2.4	ERK 42/44-Inhibitor U0126 .....	55
3.3	Inhibition von MTOR mit Rapamycin.....	59
3.3.1	Nachweis der Inhibitorwirkung in Western-Blot-Analysen .....	59
3.3.1.1	Phosphorylierung von MTOR.....	59
3.3.1.2	Phosphorylierung von P70S6K.....	62
3.3.2	mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulären Matrix .....	64
3.3.3	mRNA-Expression und Aktivität von Degenerations- und Differenzierungsmarkern.....	68
3.4	Inhibition von ERK 42/44 mit U0126.....	70
3.4.1	Nachweis der Inhibitorwirkung in Western-Blot-Analysen .....	70
3.4.1.1	Phosphorylierung von ERK 42 und ERK 44 .....	70
3.4.1.2	Phosphorylierung von P70S6K.....	75
3.4.2	mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulären Matrix .....	77
3.4.3	mRNA-Expression und Aktivität von Degenerations- und Differenzierungsmarkern.....	80

---

3.5	Einfluss der Nährstoffquelle auf den zellulären Metabolismus von VIC .....	83
3.5.1	Mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle.....	83
3.5.2	Glykolytische Aktivität in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle.....	86
4	Diskussion.....	90
4.1	Evaluierung des Versuchsaufbaus .....	90
4.2	Kreuzreaktion von Insulinrezeptor und IGF-1-Rezeptor .....	90
4.3	Wirkung von Insulin auf die Insulinsignalkaskade in VIC.....	91
4.3.1	PI3K-Signalweg.....	91
4.3.2	AMPK $\alpha$ .....	92
4.3.3	MAPK-Signalweg.....	93
4.4	Wirkung von Insulin und Glukose auf die Genexpression in VIC .....	93
4.5	Wirksamkeit der Inhibitoren auf Proteinebene .....	95
4.5.1	AS1842856.....	95
4.5.2	Rapamycin .....	96
4.5.3	PD98059.....	97
4.5.4	U0126.....	98
4.6	Expressionsanalysen unter MTOR-Inhibition .....	99
4.7	Expressionsanalysen unter ERK 42/44-Inhibition.....	101
4.8	Analyse des Metabolismus.....	103
4.8.1	Einfluss von Glukose und Insulin auf die mitochondriale Atmung.....	104
4.8.2	Einfluss von Glukose und Insulin auf die glykolytische Aktivität .....	104
4.9	Limitationen der Arbeit.....	105
4.10	Schlussfolgerung.....	106
5	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	107
6	Danksagung .....	117

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Rolle der Aortenklappe im Herzen

### 1.1.1 Anatomie und Funktionsweise der Herzklappen

Die funktionelle Bedeutung des Herzens liegt darin, Sauerstoff, Nährstoffe und Hormone im Körper zu verteilen [1]. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, werden funktionell zwei Systeme unterschieden, die linke und die rechte Herzhälfte [2]. Anatomisch ist jede Herzhälfte aus einem Vorhof (Atrium) und einer Kammer (Ventrikel) aufgebaut. Der unidirektionale Blutfluss durch diese Kammern wird durch die Herzklappen gewährleistet [1].

Man unterscheidet die Atrioventrikularklappen von den halbmondförmigen Semilunarklappen. Die Atrioventrikularklappen ermöglichen den Blutfluss vom Atrium in den Ventrikel und werden im rechten Herzen als Trikuspidal- und im linken Herzen als Mitralklappe bezeichnet. Die Semilunarklappen ermöglichen den Blutfluss vom Ventrikel in die abgehenden Arterien und werden im rechten Herzen als Pulmonal- und im linken Herzen als Aortenklappe (AK) bezeichnet [1].

Insbesondere die AK ist durch die hohen Druckschwankungen zwischen Ventrikel und Aorta großer mechanischer Belastung ausgesetzt. An diese Belastung ist der Aufbau der AK angepasst [3]. Makroskopisch ist die humane AK aus drei Taschen aufgebaut [4, 5]. Mikroskopisch wird die differenzierte, humane AK in drei Schichten eingeteilt, diese heißen *Lamina ventricularis*, *Lamina spongiosa* und *Lamina fibrosa*. Zwischen der Extrazellulärmatrix (EZM) sind valvuläre Interstitialzellen (VIC, engl.: *valvular interstitial cells*) lokalisiert, welchen in der Klappenfunktion eine aktive Rolle zukommt. Zur Oberfläche hin wird die Klappe beidseits von einer einschichtigen Endothelzellschicht bedeckt [4].

### 1.1.2 Epidemiologie der Aortenklappendegeneration

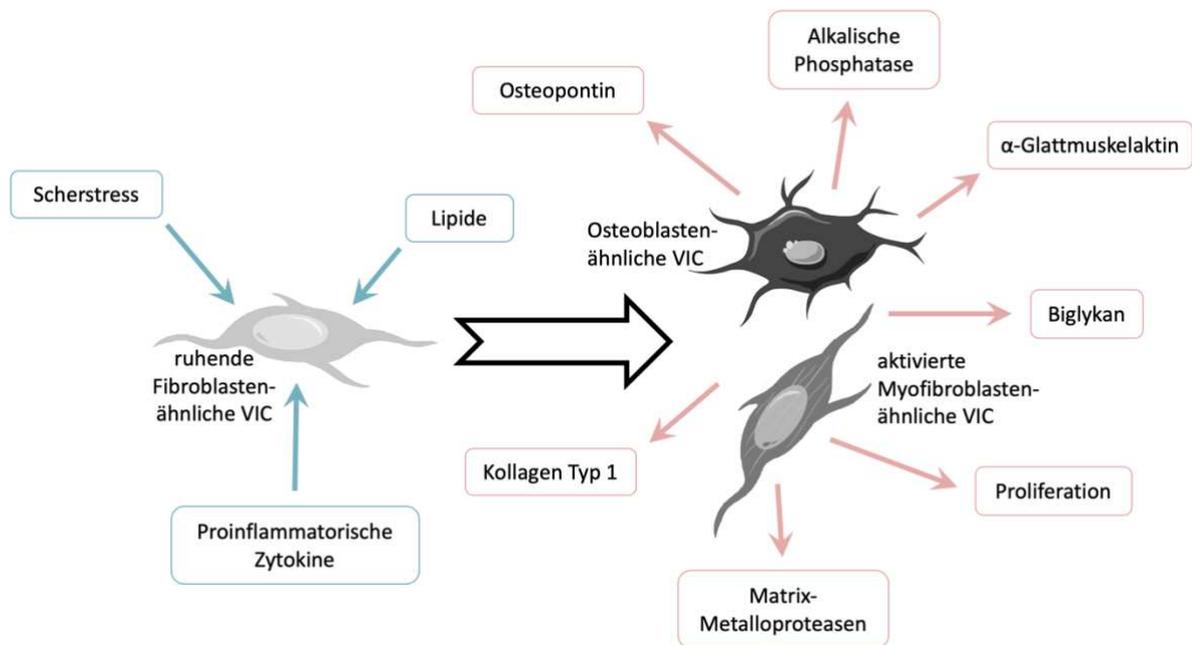
Die Aortenklappendegeneration (CAVD, engl.: *calcific aortic valve disease*) zählt neben der koronaren Herzerkrankung und der arteriellen Hypertonie zu einer der häufigsten Herzerkrankungen in der westlichen Welt [6]. Die AK-Stenose (AKS) ist die häufigste unter den Klappenerkrankungen und ist zu über 80 % degenerativen Ursprungs [7]. Von der AKS ist vor allem die ältere Bevölkerung betroffen, aktuell wird von einer Prävalenz der schweren AKS von etwa 3,4 % bei über 75-Jährigen ausgegangen [8, 9]. Die Prävalenz einer AK-Sklerosierung, der Vorstufe der AKS, wird auf 25 % geschätzt [6, 10]. Weltweit wird durch das Älterwerden der Bevölkerung eine drastische Steigerung der Prävalenz der AKS prognostiziert [9, 11].



### 1.1.4 Die valvuläre Interstitialzelle

Der vorherrschende Zelltyp im Bindegewebe der AK, die VIC, ist endothelialer Herkunft [19]. Im Rahmen der embryonalen Entwicklung kommt es zu einer Endothelial-Mesenchymalen Transition, in dessen Rahmen die embryonale Progenitorzelle zu einer ruhenden Fibroblasten-ähnlichen VIC mit mesenchymalen Charakteristika wird [19, 20]. Die ruhende Fibroblasten-ähnliche VIC kommt in allen drei Schichten der AK vor und spielt eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung der Klappenstruktur sowie der AK-Funktion. Sie synthetisiert die valvuläre EZM und bildet Enzyme zur Regulation und zum Umbau dieser [20, 21].

Im Rahmen pathologischer Prozesse in der AK kommt es zu einer Akkumulation von VIC durch einen Wandel des Phänotyps der ruhenden Fibroblasten-ähnlichen VIC [13, 20]. Diese differenzieren bei pathologischem Klappenschaden oder mechanischem Stress zu aktivierten Myofibroblasten-ähnlichen VIC, welche durch die Synthese von  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (*acta2*, engl.: *actin  $\alpha$  2, smooth muscle*) charakterisiert sind [20]. Des Weiteren ist dieser Zelltyp durch die vermehrte Produktion von Molekülen der EZM und Matrix-Metalloproteasen (*mmp*) sowie vermehrte Proliferation und Migration gekennzeichnet [20]. Die Rolle von Hyaluronan ist in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig verstanden. Hyaluronan wird als Molekül der EZM in Klappengewebe insbesondere durch die Hyaluronansynthase 2 (*has2*) synthetisiert [22]. Unter diabetischen Bedingungen ist *has2* in VIC vermindert exprimiert [22], während für fibrosierte sowie kalzifizierte AK bisher sowohl eine vermehrte wie auch eine verminderte Expression nachgewiesen wurde [22, 23]. Inflammatorische Prozesse in der Klappe führen zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, welche die Differenzierung der ruhenden Fibroblasten-ähnlichen VIC in osteoblastische VIC induzieren [6, 13]. Diese wiederum ist charakterisiert durch die Expression von Proteinen zur Chondro- und Osteogenese, wie alkalische Phosphatase (*alpl*) oder Osteopontin (*opn*) [20]. Eine schematische Darstellung vom Wandel des Phänotyps zeigt Abb. 2.



**Abb. 2: Wandel des Phänotyps valvulärer Interstitialzellen**

Ruhende VIC werden durch mechanische und chemische Belastungen im Rahmen der CAVD zu einem Wandel des Phänotyps angeregt. Es entstehen aktivierte oder osteoblastische VIC. Beide Zelltypen proliferieren in weiterer Folge und synthetisieren Degenerations- und Differenzierungsmarker sowie Moleküle der EZM, welche den Progress einer CAVD begünstigen. Abkürzungen: VIC = valvuläre Interstitialzellen. Erstellt mit [16], angelehnt an [19, 24].

## 1.2 Diabetes mellitus

### 1.2.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) ist eine Volkskrankheit und zeichnet sich durch eine Erhöhung der Blut-Glc aus. Die Krankheit kann in zwei Typen eingeteilt werden. DM Typ 1 ist durch eine autoimmun vermittelte Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas charakterisiert, während der DM Typ 2 (T2D) durch eine periphere Insulinresistenz mit erhöhter Insulinsekretion gekennzeichnet ist [25, 26]. Darüber hinaus wird der Prädiabetes als ein Stadium definiert, welcher mit gestörter Glc-Toleranz bzw. erhöhter Nüchtern-Blut-Glc einhergeht, jedoch in geringerem Ausmaß als der manifeste DM [27].

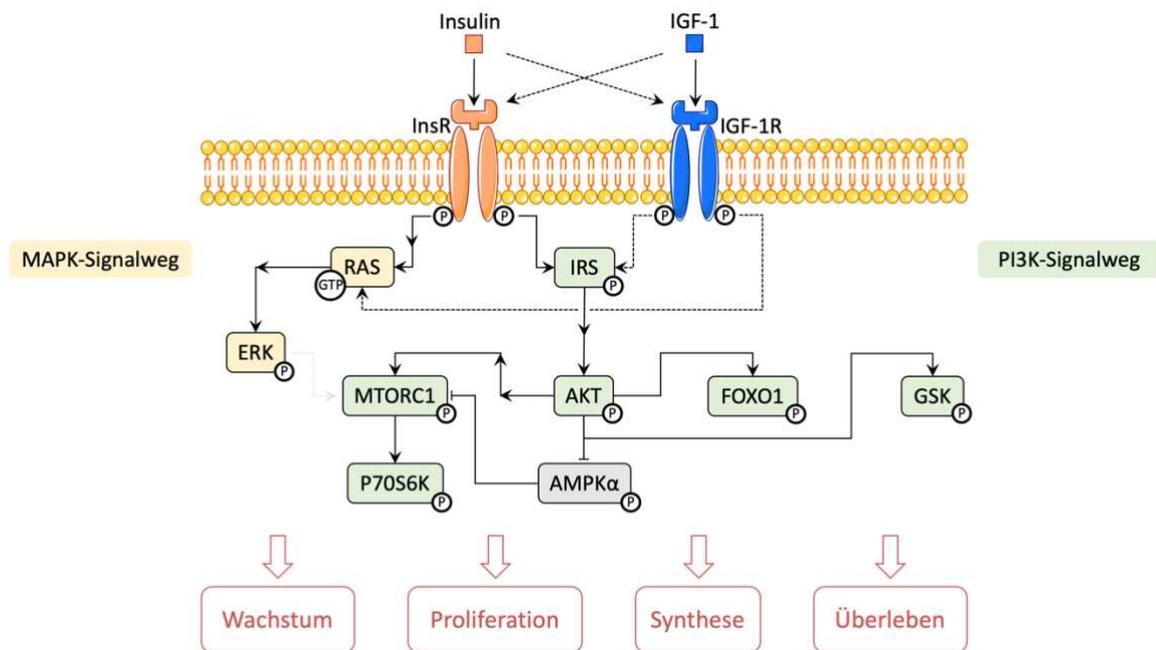
2017 waren 8,5 % der Weltbevölkerung an DM erkrankt [28]. In den vereinigten Staaten von Amerika wird die Zahl derer, welche an Prädiabetes oder an manifestem DM leiden, auf bis zu 50 % geschätzt [29]. 10 % der Gesamt mortalität wird durch DM verursacht, dies entspricht 5 Mio. Menschen jährlich [28]. Über 90 % aller DM Manifestationen entsprechen einem T2D [25, 26]. Berechnungen zufolge wird bis zum Jahr 2045 ein Prävalenzanstieg auf 10 % der Weltbevölkerung erwartet [28]. Damit ist die Erforschung des DM und der damit verbundenen Komorbiditäten von hoher sozioökonomischer Relevanz.

## 1.2.2 Grundlegende Pathophysiologie des Diabetes mellitus

Der physiologische Nüchtern-Blut-Glc-Spiegel liegt beim Menschen zwischen 70 und 100 mg/dl Glc [25]. Diese Regulation wird im Wesentlichen von den Hormonen Insulin und Glukagon gesteuert, welche in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas produziert werden. Insulin induziert die Senkung des Glc-Spiegels, indem die Aufnahme von Glc in die Zellen induziert wird. Glukagon hingegen erhöht den Glc-Spiegel bei Nahrungskarenz durch Abbau von Glykogen [25]. Genetische sowie Umweltfaktoren führen im DM zu einer Störung dieser hormonellen Regulation und zur klinischen Manifestation einer Hyperglykämie (HG). Ein manifester DM zeichnet sich durch Gelegenheits-Glc-Spiegel von  $\geq 200$  mg/dl aus [26]. Beim T2D ist der Hauptrisikofaktor die Adipositas. Die erhöhte Insulinsekretion durch Überernährung induziert eine periphere Insulinresistenz. Eine Chronifizierung führt zur Insulinsekretionsstörung und damit zu einem manifesten DM [25]. Vor diesem Hintergrund kann die steigende Prävalenz des DM unter anderem durch die steigende Prävalenz der Adipositas erklärt werden [30].

## 1.2.3 Signalkaskade von Insulin – mitogene Signalwege

Der Insulinrezeptor (InsR) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor. Der Rezeptor besteht aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei  $\beta$ -Untereinheiten. Erstere sind extrazellulär gelegen und für die Substratbindung verantwortlich. Letztere sind transmembrane Proteine und werden durch Insulinbindung aktiviert. Es folgt eine Transphosphorylierung mit Aktivierung der Kinasedomäne, welche die Regulation der zwei nachgeschalteten, weitgehend unabhängigen, Signalwege ermöglicht [31, 32]. Die komplexen Vorgänge im Rahmen der Insulinsignalkaskade sind vereinfacht in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3: Insulinsignalkaskade**

Die Aktivierung des InsR sowie des IGF-1R durch Insulin führen zu einer Aktivierung des PI3K- und des MAPK-Signalweges. Im PI3K-Signalweg wird AKT als zentrales Protein aktiviert und in weiterer Folge werden FOXO1, GSK-3 $\alpha/\beta$  und MTORC1 phosphoryliert. Im MAPK-Signalweg wird die MAPK ERK aktiviert. Diese kann im Sinne einer Kreuzaktivierung wiederum MTORC1 aktivieren. Effektiv wird durch die Aktivierung der beiden Signalwege Wachstum, Proliferation, Synthese und Zellüberleben induziert. Abkürzungen: AKT = Proteinkinase B; ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase; FOXO1 = *forkhead box protein O1*; GSK = Glykogensynthase-Kinase; GTP = Guanosintriphosphat; IGF-1 = *insulin-like growth factor 1*; IGF-1R = IGF-1-Rezeptor; InsR = Insulinrezeptor; IRS = Insulin-Rezeptor-Substrat; MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MTORC1 = *mammalian target of rapamycin complex 1*; P = Phosphat; P70S6K = *ribosomal protein S6 kinase*; PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase; RAS = *rat sarcoma*. Erstellt mit [16], angelehnt an [33-37].

Die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweges (PI3K) wird durch die Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates induziert. In weiterer Folge wird die Proteinkinase B (AKT) phosphoryliert, welche einen Knotenpunkt in dieser Signalkaskade darstellt und als Surrogat-Parameter für die Aktivierung des PI3K-Signalweges dient [31, 32, 35]. Über die Phosphorylierung von FOXO1 (engl.: *forkhead box protein O1*), Glykogensynthase-Kinase 3- $\alpha$  und - $\beta$  (GSK-3 $\alpha/\beta$ ) sowie MTOR (engl.: *mammalian target of rapamycin*) werden metabolische und mitogene Wirkungen induziert [32, 38].

### FOXO1

FOXO1 ist in aktivem, unphosphoryliertem Zustand dafür verantwortlich, Lipogenese herunter und Glukoneogenese hochzuregulieren. Durch die Phosphorylierung wird das Protein inaktiviert und Lipogenese findet anstelle der Glukoneogenese vermehrt statt [34]. Neben den genannten metabolischen Wirkungen wird durch die Phosphorylierung von FOXO1 die Apoptose inhibiert und der Zellzyklusarrest aufgehoben [38].

### GSK-3 $\alpha$ / $\beta$

Wie FOXO1 wird auch GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  durch Phosphorylierung inaktiviert. Die Inaktivierung induziert auf mitogener Ebene antiapoptotische und proliferative Effekte, auf metabolischer Ebene eine gesteigerte Glykogen- und Lipidsynthese [38].

### MTOR

MTOR kommt in zwei Formen vor, Komplex eins und Komplex zwei. Komplex eins (MTORC1, engl.: *MTOR complex 1*) ist als Substrat von AKT und in weiterer Folge als Effektor zur Wirkungsvermittlung von Relevanz. Als Wachstumsregulator begünstigt die aktivierende Phosphorylierung von MTORC1 Zellwachstum und Proliferation. Außerdem wird die Glc-Aufnahme in die Zellen gesteigert. Weiterhin kommt es über die Phosphorylierung der P70S6K (engl.: *ribosomal protein S6 kinase*) zu einer Protein-, Lipid- und Nukleotidsynthese [35, 38, 39].

### ERK 42/44

Die Aktivierung des MAPK-Signalweges (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) wird ebenfalls durch die Insulinbindung an den InsR induziert. Die Phosphorylierung von Guanosindiphosphat an RAS (engl.: *rat sarcoma*) ermöglicht die Phosphorylierung an RAF (engl.: *rapidly accelerated fibrosarcoma*). Diese phosphoryliert ihrerseits die MAPK-Kinase, welche ERK 42/44 (Extrazelluläre signalregulierte Kinase) phosphoryliert. In weiterer Folge werden das Zellwachstum und -überleben sowie die Differenzierung gesteigert [31, 32, 34]. Außerdem wird in der Fachliteratur eine Aktivierung von MTORC1 durch ERK 42/44 beschrieben, sodass oben beschriebene Wirkungen von MTORC1 durch ERK 42/44 induziert werden [35, 39].

### AMPK

Die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK $\alpha$ ) stellt einen eigenständigen Signalweg dar, interferiert jedoch mit der Insulinsignalkaskade. Im Rahmen der Aktivierung der Insulinsignalkaskade wird die AMPK $\alpha$  durch AKT inaktiviert [40]. Die phosphorylierte, aktive Form der AMPK $\alpha$  führt hingegen zu einer Hemmung des MTORC1 und wirkt mitogenen Effekten so entgegen [41].

### IGF-1-Rezeptor

Eine wichtige Kreuzaktivierung in Zusammenhang mit Insulin ist die Aktivierung des IGF-1-Rezeptors (IGF-1R, engl.: *insulin-like growth factor 1 receptor*) durch Insulin. Die Rezeptoren sind zwei verwandte Tyrosinkinase-Rezeptoren. Durch die hohe Substrat- und Rezeptor-Homologie wird eine Kreuzaktivierung mit reduzierter Affinität ermöglicht [31]. Dabei werden die gleichen nachgeschalteten Signalwege, PI3K- und MAPK-Signalweg, aktiviert [35].

## 1.2.4 Bedeutung der Insulinresistenz im Insulinsignalweg

Untersuchungen an insulinsensitivem Gewebe (Leber-, Muskel- und Fettgewebe) legen nahe, dass chronische HG, Hyperinsulinämie (HI) sowie Inflammation eine Insulinresistenz induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch im Rahmen einer Insulinantwort der PI3K-Signalweg vermindert aktiviert wird [31, 35, 39]. Nicht nur in Gewebe aus T2D-Patienten, sondern bereits in Gewebe aus adipösen Patienten ohne manifesten T2D konnte eine verminderte Lipogenese und Glc-Aufnahme im Rahmen einer Insulinantwort gezeigt werden [42]. In einem *in vitro* Zellkulturmodell für VIC konnte gezeigt werden, dass HG und HI über einen kurzen Kultivierungszeitraum von fünf Tagen bereits eine veränderte Insulin-Sensitivität initiieren [43].

## 1.3 Einfluss von Diabetes mellitus auf die Aortenklappendegeneration

DM stellt einen klassischen Risikofaktor zur Entstehung und Progression einer CAVD dar. Metaanalysen haben gezeigt, dass die klassischen Charakteristika eines T2D nicht nur mit degenerativen Prozessen im kardiovaskulären System einhergehen, sondern auch spezifisch mit der Entwicklung einer AKS assoziiert sind [44-46]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Proteoglykane, wie *bgn*, in kalzifizierten AK von T2D-Patienten signifikant erhöht ist [15]. Mausmodelle ließen einen Zusammenhang von DM mit vermehrten Kalziumablagerungen in der AK vermuten [47, 48]. Es wird davon ausgegangen, dass DM unabhängig von anderen Risikofaktoren die Entwicklung einer AKS voraussagt [49]. Bereits für Prädiabetes mit den Charakteristika HG und HI wurde eine Assoziation mit erhöhter Mortalität und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen hergestellt [27]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es durch DM im Rahmen einer CAVD zu einer vermehrten Expression von Matrixmolekülen wie *bgn* oder Kollagen Typ 1,  $\alpha$  1 (*colla1*), sowie von Kalzifikationsmarkern wie *opn* kommt [15, 43].

## 1.4 Zellulärer Metabolismus

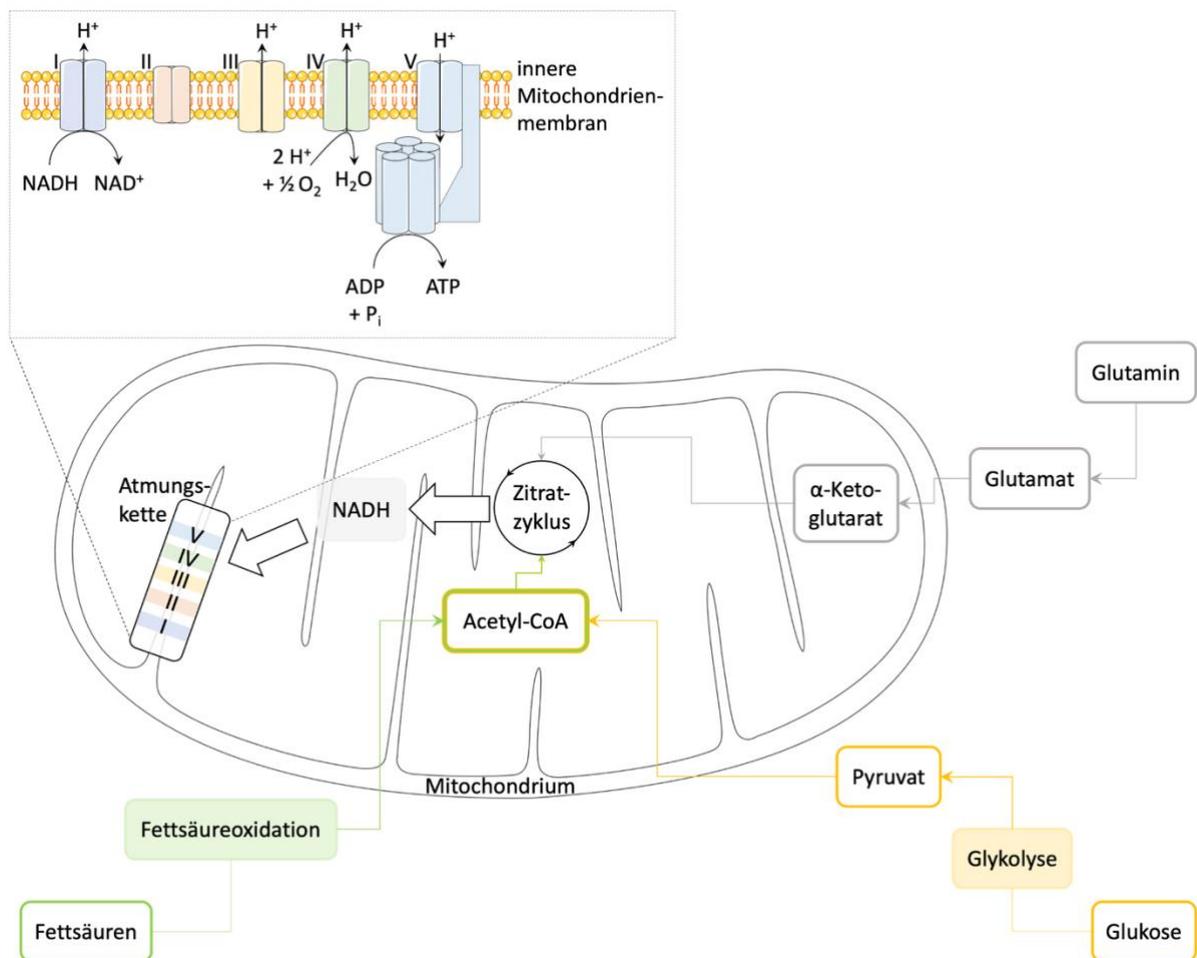
### 1.4.1 Energiegewinnung durch Glukose, Fettsäuren und Glutamin

Grundlegende Energiequelle für alle menschlichen Zellen ist die Nahrung. Kohlenhydrate, Fettsäuren (FS) und Aminosäuren werden vom Darm aufgenommen und zur Energiegewinnung oxidiert. Die komplexe Energiegewinnung von Zellen ist vereinfacht in Abb. 4 dargestellt. Kohlenhydrate werden zu Glc oder Metaboliten der Glykolyse abgebaut. In der Glykolyse wird Glc zu Pyruvat oxidiert. Dieses wird durch das Transportenzym *Pyruvat-Carrier* in die Mitochondrien transportiert und in Acetyl-Coenzym A (CoA) umgewandelt. FS werden durch das Transportenzym *Carnitin-Carrier* in die

Mitochondrien transportiert und zu Acetyl-CoA oxidiert. Acetyl-CoA ist Ausgangsstoff des Zitratzyklus, in welchem Nahrungsbestandteile zu Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) oxidiert werden, wodurch Elektronen in Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH) generiert werden. Aminosäuren werden über viele verschiedene Wege abgebaut. Einige werden zu Pyruvat oder Acetyl-CoA, andere zu Metaboliten des Zitratzyklus abgebaut. Ein Beispiel hierfür ist Glutamin (Gln), welches nach Aufnahme durch die Glutaminase zu Glutamat umgebaut wird. Glutamat wird weiter zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgebaut, welches einen Metaboliten im Zitratzyklus darstellt [50, 51].

## 1.4.2 Mitochondriale Atmung

Das in der Oxidation der Nahrungsbestandteile gewonnene NADH wird im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung zur Generierung des Energielieferanten Adenosintriphosphat (ATP) genutzt. Die oxidative Phosphorylierung findet in der inneren Mitochondrienmembran statt und wird deshalb auch als mitochondriale Atmung oder Atmungskette bezeichnet. Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen, welche durch römische Zahlen gekennzeichnet werden. NADH gibt Elektronen an Komplex I ab und induziert damit einen Protonenfluss in den Intermembranraum in Komplex I, III und IV. In Komplex IV wird Sauerstoff durch die Elektronen zu Wasser reduziert. Komplex V ist als ATP-Synthase für die Generierung von ATP verantwortlich. Die Protonen fließen entlang des Konzentrationsgefälles zurück in die mitochondriale Matrix und induzieren eine Konformationsänderung der ATP-Synthase, welche die Katalyse von ATP ermöglicht [51].



**Abb. 4: Energiegewinnung von Zellen**

Verschiedene Nährstoffquellen werden aus der Nahrung aufgenommen und zur Energiegewinnung oxidiert. Das gebildete NADH wird in der Atmungskette zur Bildung von ATP genutzt. Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat; CoA = Coenzym A;  $H^+$  = Proton;  $H_2O$  = Wasser;  $NAD^+$  = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; NADH = NAD-Hydrid;  $O_2$  = Sauerstoff;  $P_i$  = anorganisches Phosphat; Erstellt mit [16], angelehnt an [50-53].

### 1.4.3 Metabolismus valvulärer Interstitialzellen unter diabetischem Einfluss

Über den Einfluss von DM auf VIC im Rahmen des Metabolismus ist aktuell wenig bekannt. Man weiß, dass DM in myokardialen Zellen die mitochondriale Funktion einschränkt und in reduzierter ATP-Bildung resultiert. Außerdem wird die Flexibilität der Energienutzung durch DM im Myokard eingeschränkt, wobei die Oxidation von FS unter physiologischen Bedingungen die Hauptenergiequelle darstellt [54]. Neueste Untersuchungen zeigen, dass diabetische Bedingungen in VIC *in vitro* zu einer katabolen Stoffwechsellage führen. Dabei werden die Glykolyse sowie die mitochondriale Atmung angeregt [43].

## 1.5 Ziele der Arbeit

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass DM sowie diabetische Bedingungen in humanen AK sowie in VIC *in vitro* zu Veränderungen in der Expression verschiedener Matrixmoleküle führen [43]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass VIC über einen kurzen Kultivierungszeitraum von fünf Tagen unter diabetischen Bedingungen durch Aktivierung des klassischen Insulinsignalweges eine Insulinresistenz entwickeln. Vorarbeiten zeigten außerdem, dass der Metabolismus von VIC unter diabetischen Bedingungen verändert ist [43]. In der vorliegenden Arbeit sollen nun alternative mitogene Signalwege wie FOXO1, MTOR und ERK 42/44 untersucht und ihre funktionelle Rolle in degenerativen Veränderungen im Rahmen von DM geklärt werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, welche Metaboliten von VIC unter diabetischen Bedingungen verstoffwechselt werden.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes durchgeführt. Das Projekt hat die Zielsetzung, durch ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Signalwege und Mechanismen, zukünftige therapeutische Ansätze zur Primär- und Sekundärprävention einer CAVD in prädiabetischen Stadien zu finden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Blottingpapiere 1,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	CL75.1
Glaskassetten 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	1653312
Gelkassetten 1,5 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham	NC2015
Gelkassettenkämme 10 <i>Well</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	1653365
Gelkassettenkämme 10 <i>Well</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham	NC3510
Gelkassettenkämme 15 <i>Well</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	1653366
Gelkassettenkämme 15 <i>Well</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham	NC3515
Kryokonservierungsröhrchen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt	390708
Makroplatte 6 <i>Well</i>	Greiner Bio-One, Kremsmünster	657160
MircoAmp™ Klebefolie	Thermo Fisher Scientific, Waltham	4311971
Mikroplatte 96 <i>Well</i>	Greiner Bio-One, Kremsmünster	655180
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	1620115
<i>QIAshredder</i>	QIAGEN N.V., Venlo	79656
<i>Seahorse</i> XFe96 FluxPak	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara	102416-100
Vakuumfiltrationseinheit	VWR International, Radnor	514-0332
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Kremsmünster	690125
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Kremsmünster	658175
Zellkulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Kremsmünster	660175
Zellkulturschale	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht	83.3902
96 <i>Well</i> Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham	4346906

## 2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	8076.3
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis	248614
Ampuwa 1000 ml Plastipur®	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg	1088811
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis	B0126
<i>cOmplete</i> ™	Sigma-Aldrich, St. Louis	11836153001
Deionisiertes Wasser	Merck KGaA, Darmstadt	1153332500
Diethiothreitol	Thermo Fisher Scientific, Waltham	R0862
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis	D8418
DMSO (für <i>Seahorse</i> )	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1584
DMEM (4,5 g/l Glc, HG) (engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham	31966047
DMEM (1 g/l Glc, NG)	Thermo Fisher Scientific, Waltham	21885108
D(+)-Glc wasserfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0883
Ethanol ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich, St. Louis	34852
Ethanol 70 %	VWR International, Radnor	85825.360
Fetales Kälberserum (FCS, engl.: <i>fetal calf serum</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis	F7524 Lot: BCBX1250
Gelatine aus Rinderhaut	Sigma-Aldrich, St. Louis	G9391
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3783.2
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	23390.03
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis	I3021
Insulin aus dem Schwein	Sigma-Aldrich, St. Louis	I5523
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis	G8540
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis	70166 Lot: BCCB3332

---

Methanol	VWR International, Radnor	20847.320
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	9265.2
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt	1065040250
Natriumpyruvat	AppliChem GmbH, Darmstadt	A4859
Nichtessentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St. Louis	M7145
Nukleasefreies Wasser	Promega GmbH, Walldorf	P119
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham	26619
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham	15140122
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham	14190094
PhosSTOP™	Sigma-Aldrich, St. Louis	4906837001 Lot: 069279339
RNAse Away®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	A998.3
Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	A515.1
SDS Pellets (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	CN30.4
<i>Seahorse XF Calibrant</i>	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara	100840-000
<i>Seahorse XF DMEM</i>	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara	103575-100
Tetramethylethyldiamin	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	1610801
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4855.5
Tritisol-Salzsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis	1099700001
Trypanblau 4 g/l	VWR International, Radnor	K940-100ML
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham	25200056 Lot: SLCC9276
<i>Tween® 20</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis	P1379
2-Propanol	VWR International, Radnor	20839.366

### 2.1.3 Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Autoklav	SysTec GmbH, Bergheim	VX-95
Bildanalyse-Software	GE Healthcare, Chicago	<i>ImageQuant</i> TL Version 8.1
<i>Imager</i>	GE Healthcare, Chicago	Amersham <i>Imager</i> 600
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham	Heracell 240i
Echtzeit PCR System (Polymerase-Kettenreaktion, engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham	<i>StepOnePlus</i>
Elektrophorese Stromquelle	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	PowerPac 200
Gelelektrophorese-Kammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham	Novex Mini-Cell
Inversmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	DM IL LED
Mikroskopkamera Mikroskop-Software Leica <i>Application Suite</i> v3.8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	DFC425 C
Mikrotiterplatten Lesegerät Tecan.AT.XFluor Software Software Magellan v7.2	Tecan Group AG, Männedorf	<i>Infinite</i> M1000 PRO
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön	
<i>Seahorse</i> Analysiergerät <i>Seahorse Wave</i> Desktop Software	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara	XFe96
Statistikprogramm	GraphPad Software, Inc., San Diego	GraphPad Prism Version 8.4
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham	HERAsafe KS 18
Thermozykler <i>StepOnePlus</i> Software v2.3	Biometra GmbH, Göttingen	T3000
Western-Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	Mini Trans-Blot <i>Cell</i>
Vakuumpumpe	Sigma-Aldrich, St. Louis	KNF Laboport

## 2.1.4 Kits

Kit	Hersteller	Katalognummer
CyQUANT™ LDH <i>Cytotoxicity Assay</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham	C20301
DC-Assay-Kit (Detergenzkompatibel, engl.: <i>detergent compatible</i> )	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	5000116
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega GmbH, Walldorf	A6002
QuantiTect <i>Reverse</i> <i>Transcription Kit</i>	QIAGEN N.V., Venlo	205313
Ratteninsulin-ELISA (engl.: <i>enzyme linked immosorbent assay</i> )	RayBiotech, Inc., Peachtree Corners	ELR-Insulin
RNase-freies DNase Set	QIAGEN N.V., Venlo	79254
<i>RNeasy</i> Mini Kit	QIAGEN N.V., Venlo	74106
<i>Western Bright™ Quantum</i>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	541015

## 2.1.5 Lösungen

### 2.1.5.1 Zellkulturmedien

#### Basales Zellkulturmedium (Vollmedium)

- DMEM mit 1 g/l (Normoglykämie = NG) oder 4,5 g/l (HG) Glc
- + 10 % FCS
- + 1 % nichtessentielle Aminosäuren
- + 1 % Penicillin/Streptomycin

#### Einfriermedium

- FCS
- + 10 % DMSO

#### Gelatine

- PBS
- + 1 % Gelatine
- autoklavieren und steril filtrieren

### Seahorse-Medium

Seahorse XF DMEM  
+ 5 mM Glc  
+ 2 mM Gln  
+ 1 mM Natriumpyruvat

### Zellkulturmedium ohne Serumzusatz (Hungermedium)

DMEM mit 1 g/l (NG) oder 4,5 g/l (HG) Glc  
+ 1 % nichtessentielle Aminosäuren  
+ 1 % Penicillin/Streptomycin

### Zellkulturmedium für chronische HI

Basales Zellkulturmedium  
+ 100 nM Insulin

## 2.1.5.2 Puffer

### BSA (bovines Serumalbumin) - Blockierlösung

TBST (TRIS-gepufferte Salzlösung mit *Tween*<sup>®</sup> 20, engl.: *tris buffered saline*)  
+ 5 % BSA

### Laufpuffer

25 mM TRIS  
190 mM Glycin  
0,1 % SDS

### Ladepuffer

375 mM TRIS  
60 % Glycerin  
12,6 % SDS  
600 mM Diethiothreitol  
0,09 % Bromphenolblau

### Lysepuffer für RNA (Ribonukleinsäure, engl.: *ribonucleic acid*) - Extraktion

RLT-Puffer  
100 mM Diethiothreitol

### Lysepuffer für Western-Blot

RIPA (Radioimmunpräzipitationsassay) - Puffer  
+ 10 % PhosSTOP<sup>™</sup>  
+ 14,3 % *cOmplete*<sup>™</sup>

#### Magermilch-Blockierlösung

TBST  
+ 5 % Magermilchpulver

#### RIPA-Puffer

150 mM Natriumchlorid  
50 mM TRIS  
1,0 % IGEPAL®  
0,5 % Natriumdesoxycholat  
0,1 % SDS

#### Sammelgelpuffer

0,5 M TRIS  
pH-Wert 6,8

#### TBST

20 mM TRIS  
150 mM Natriumchlorid  
0,1 % Tween® 20  
pH-Wert 7,6

#### Transferpuffer

25 mM TRIS  
190 mM Glycin  
20 % Methanol

#### Trenngelpuffer

1,5 M TRIS  
pH-Wert 8,8

### 2.1.5.3 Gelelektrophorese-Gele

#### Sammelgel 4 %

63,6 % H<sub>2</sub>O (doppelt destilliert)  
10 % Rotiphorese® Gel 40  
25,2 % Trenngelpuffer  
1 % SDS  
0,5 % Ammoniumpersulfat  
0,1 % Tetramethylethylendiamin

## Trenngel 8 %

53,45 % H<sub>2</sub>O (doppelt destilliert)  
 20 % Rotiphorese® Gel 40  
 25 % Trenngelpuffer  
 1 % SDS  
 0,5 % Ammoniumpersulfat  
 0,05 % Tetramethylethylendiamin

## Trenngel 10 %

48,45 % H<sub>2</sub>O (doppelt destilliert)  
 25 % Rotiphorese® Gel 40  
 25 % Trenngelpuffer  
 1 % SDS  
 0,5 % Ammoniumpersulfat  
 0,05 % Tetramethylethylendiamin

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Primär-Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
Anti-AKT (pan)	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (C67E7) #4691; monoklonal
Anti-AMPK $\alpha$	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (23A3) #2603; monoklonal
Anti- $\beta$ -AKTIN	Kaninchen	1:2000 (BSA)	Cell Signaling #4957; polyklonal
Anti-ERK 1/2	Maus	1:500 (Magermilchpulver)	Santa Cruz Biot. sc-514302; monoklonal
Anti-FOXO1	Kaninchen	1:500 (BSA)	Cell Signaling (C29H4) #2880; monoklonal
Anti-GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)	Kaninchen	1:2000 (BSA)	Cell Signaling (14C10) #2118; monoklonal
Anti-GSK-3 $\alpha/\beta$	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (D75D3) #5676; monoklonal

Anti-MTOR	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (7C10) #2983; monoklonal
Anti-Phospho-AKT	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (D9E) #4060; monoklonal
Anti-Phospho-AMPK $\alpha$	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (40H9) #2535; monoklonal
Anti-Phospho-FOXO1	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling #9461; polyklonal
Anti-Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Lifespan Bioscience LS-C7154; polyklonal
Anti Phospho-MTOR	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (7C10) #2971; polyklonal
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen	1:2000 (BSA)	Cell Signaling (D13.14.4E) #4370; monoklonal
Anti-P70S6-Kinase	Kaninchen	1:1000 (BSA)	Cell Signaling (49D7) #2708; monoklonal
Anti-Phospho-P70S6-Kinase	Kaninchen	1:500 (BSA)	Cell Signaling (108D2) #9234; monoklonal

### 2.1.6.2 Sekundär-Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Kennzeichnung
Anti-Kaninchen	Ziege	1:10000 (BSA)	Jackson Immunoresearch 111-035-003; HRP-gekoppelt
Anti-Maus	Ziege	1:10000 (BSA)	Jackson Immunoresearch 115-035-044; HRP-gekoppelt

### 2.1.7 Inhibitoren

Inhibitor	Lösungsmittel	Kennzeichnung
Antimycin A	DMSO	Sigma-Aldrich; A8674

AS1842856	DMSO	Sigma-Aldrich; 344355 Lot: 3270723
BPTES	DMSO	Sigma-Aldrich; SML0601
Etomoxir	DMSO	Sigma-Aldrich; E1905
FCCP	DMSO	Sigma-Aldrich; C2920
Oligomycin	DMSO	Sigma-Aldrich; O4876
PD98059	DMSO	Cell Signaling; #9900 Lot: 17
Rapamycin (R)	DMSO	Cell Signaling; #9904 Lot: 8
Rotenon	DMSO	Sigma-Aldrich; R8875
UK5099	DMSO	Sigma-Aldrich; PZ0160
U0126 (U)	DMSO	Promega; V1121 Lot: 0000385479

### 2.1.8 *Primer*

Gen	Sequenz
<i>acta2</i> bovin <i>forward</i> (f)	5' - GAT AGA GCA CGG CAT CAT CA - 3'
<i>acta2</i> bovin <i>reverse</i> (r)	5' - GAA GGG TTG GAT GCT CTT CA - 3'
<i>alpl</i> bovin f	5' - GAC ATC GCC TAC CAG CTC AT - 3'
<i>alpl</i> bovin r	5' - CAC ATC GGT TCT GTT CTT GG - 3'
<i>alpl</i> ovin f	5' - CAA CAC CAA CGT GGC TAA GA - 3'
<i>alpl</i> ovin r	5' - GTT GTG GTG GAG CTG ACC TT - 3'
<i>bgn</i> ovin f	5' - TCT GCT CCG CTA CTC CAA GT - 3'
<i>bgn</i> ovin r	5' - TTG TTG TCC AAG TGC AGC TC - 3'
<i>coll1a1</i> ovin f	5' - AAG ACA TCC CAC CAG TCA CC - 3'
<i>coll1a1</i> ovin r	5' - TAA GTT CGT CGC AGA TCA CG - 3'
<i>dcn</i> ovin f	5' - CCA AAG TGC GAA AGT CTG TG - 3'
<i>dcn</i> ovin r	5' - TTC AAT GCC TGA GCT CTT CA - 3'

<i>eln</i> (Elastin) ovin f	5' - AGT TCC TGG AGG CGT CTT CT - 3'
<i>eln</i> ovin r	5' - CAC CTG GCT TAG CTG GTT TC - 3'
<i>has2</i> bovin f	5' - TCA CCC AGT TGG TCT TGT CC - 3'
<i>has2</i> bovin r	5' - GGT CAA GCA TGG TGT CTG AA - 3'
<i>mmp2</i> ovin f	5' - TGA CAA GGA CGG CAA GTA TG - 3'
<i>mmp2</i> ovin r	5' - GTA AGA TGT GCC CTG GAA GC - 3'
<i>mmp9</i> 3.0 ovin f	5' - TAG CAC GCA CGA CAT CTT TC - 3'
<i>mmp9</i> 3.0 ovin r	5' - GCC CAC ATA GTC CAC CTG AT - 3'
<i>opn</i> ovin f	5' - GAT GGC CGA GGT GAT AGT GT - 3'
<i>opn</i> ovin r	5' - TCG TCT TCT TAG GTG CGT CA - 3'
<i>rpl13a</i> human f (Ribosomales Protein L)	5' - GTT GGT GTT CAT CCG CTT G - 3'
<i>rpl13a</i> human r	5' - GTA CGC TGT GAA GGC ATC AA - 3'
<i>rpl29</i> ovin f	5' - CCA AGT CCA AGA ACC ACA CC - 3'
<i>rpl29</i> ovin r	5' - TAT CGT TGT GAT CGG GGT TT - 3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Arbeiten an der Sterilbank

Für die Zellkultur wurde unter bestmöglich sterilen Bedingungen gearbeitet, um eine Kontamination des Kulturgutes zu verhindern. Hierfür wurden alle Tätigkeiten im Zusammenhang mit den Zelllinien in Kultur unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle nicht steril verpackten Utensilien wurden durch Autoklavieren sterilisiert oder mit 70 %igem Ethanol gründlich abgespült.

#### 2.2.1.2 Isolation und Kultivierung valvulärer Interstitialzellen

Die Isolation primärer VIC erfolgte aus ovinen Herzen etwa zwölf Monate alter Schafe, welche von einem lokalen Schlachthof (Laame GmbH & Co. KG, Wuppertal) bezogen wurden. Es wurden Zellen aus sieben Schafen isoliert. An den frisch geschlachteten Herzen wurde die AK unter weitgehend sterilen Bedingungen präpariert und anschließend die drei Taschen exzidiert. Im weiteren Verlauf erfolgte eine Spülung der Taschen in 3 ml PBS und die Überführung der Taschen in eine Zellkulturschale mit 3 ml HG-Vollmedium. Mit einer Präparierschere wurden die drei Taschen einer

AK in etwa 1 mm<sup>2</sup> kleine Stücke geschnitten und gemeinsam mit dem Medium in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt (Abb. 5).

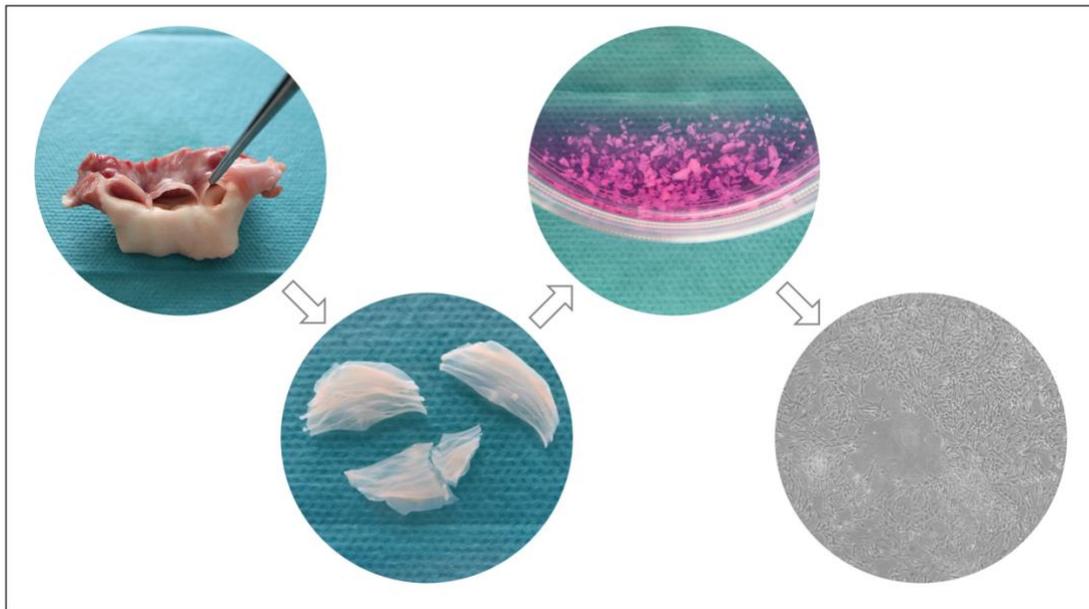
Die Inkubation erfolgte standardmäßig bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 5 % unter humider Atmosphäre. Vor der Nutzung wurden die Zellkulturflaschen mit 1 %iger Gelatine beschichtet und für mindestens 10 min inkubiert. Alle Flüssigkeiten, welche mit den Zellen unter Kultur in Verbindung kamen, wurden in einem Wasserbad auf 37 °C angewärmt.

Unter diesen Bedingungen migrierten die VIC aus den Aortenklappentaschenfragmenten in das Vollmedium und waren am Boden der Flasche adhärent. Nach sieben Tagen wurden die VIC zum ersten Mal passagiert. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 500 µl 0,25 %iger Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert, um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Im Anschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von Vollmedium im Verhältnis 1:1 inhibiert und die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 in 15 ml Röhrchen aufgeteilt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1500 Umdrehungen pro min (rpm, engl.: *revolutions per minute*) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Vollmedium resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Zelllinie eines Schafes war nun geteilt worden. Eine Hälfte wurde in NG-Vollmedium und die andere Hälfte in HG-Vollmedium inkubiert. Diese Aufteilung wurde über die gesamte Kultivierungsdauer der Zellen aufrechterhalten und unter der Behandlung nicht mehr verändert.

Von nun an erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel (MW) sowie regelmäßige Kontrollen der Konfluenz in den Flaschen unter dem Mikroskop. Nach sieben Tagen Inkubation wurden die VIC bei einer Konfluenz von über 90 % zum zweiten Mal passagiert. Für beide Gruppen, NG und HG, wurden die sieben Replikate je nach Konfluenz in den Flaschen im Verhältnis 2:1 oder 3:1 in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen vereinzelt.

Erneut erfolgte unter der Inkubation alle zwei Tage ein MW sowie regelmäßige Kontrollen der Konfluenz in den Flaschen.

Nach neun Tagen erfolgte bei einer Konfluenz von über 90% die Kryokonservierung der VIC. Hierfür wurden die Zellen zum dritten Mal passagiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in Einfriermedium resuspendiert, sodass sich in etwa 1,5 Mio. Zellen pro ml befunden haben. In jedes Kryokonservierungsröhrchen wurde 1 ml der Suspension überführt und sofort bei -80 °C weggefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die VIC in einem Stickstofftank gelagert.



**Abb. 5: Präparation der Aortenklappe**

Aus ovinen Herzen wurde die AK herauspräpariert. Die einzelnen Klappen wurden exzidiert und in 1 mm<sup>2</sup> kleine Fragmente zerschnitten. Unter Inkubation erfolgte die Auswanderung der VIC sowie deren Adhäsion am Boden der Zellkulturflasche.

### 2.2.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchung valvulärer Interstitialzellen unter Kultur

Zur Beurteilung der Konfluenz sowie der Morphologie der VIC wurden regelmäßig lichtmikroskopische Kontrollen mit einem Inversmikroskop durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte über Fotografie der VIC zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur.

### 2.2.1.4 Aussaat und Behandlung valvulärer Interstitialzellen

Für die *in vitro* Experimente wurden ausschließlich primäre ovine VIC in der Passage vier verwendet. Insgesamt erfolgte die Behandlung an sieben Replikaten, wobei ein Replikat immer aus den Zellen einer ovinen AK bestand.

Zur Vorbereitung der Behandlung wurden die Zellen im Einfriermedium durch Zugabe von Vollmedium aufgetaut und wie in 2.2.1.2 beschrieben pelletiert und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt, in welche 5 ml Vollmedium bereits eingefüllt waren.

Die Zellen wurden über drei Tage mit MW an Tag zwei inkubiert. An Tag drei erfolgte bei einer Konfluenz von über 90 % die Aussaat der Zellen zur Behandlung. Hierfür wurden die VIC zum vierten Mal passagiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Aussaat erfolgte an Tag 0 in gelatinebeschichtete Mikrotiterplatten mit sechs Kavitäten, wobei in jede Kavität etwa 75.000 Zellen gegeben wurden. In jeder Kavität befanden sich über den Zeitraum der Behandlung 2 ml des entsprechenden Vollmediums.

Die Behandlung begann an Tag eins und bestand aus den Bedingungen NG und HG sowie der Kombination mit HI (100 nM Insulin). Es erfolgte ein MW an Tag drei und an Tag fünf, nach Möglichkeit alle 48 h. An Tag sechs erfolgte die Ernte der Zellen zur weiteren Analyse. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 6 skizziert.

#### 2.2.1.5 Zellen auszählen mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Zum Auszählen der Zellen wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl 0,4 %iger Trypanblaulösung verdünnt. Über die Ausatemluft wurde die Deckplatte an der Zählkammer adhären. Das Vorhandensein der Newtonringe bestätigt die Adhäsion und legt die Höhe der Zählkammer von 0,1 mm fest [55]. Es wurden 10 µl der zuvor verdünnten Probe in jede Seite der Kammer pipettiert. Anschließend erfolgte die Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop. Alle großen Eckquadrate beider Seiten der Zählkammer wurden ausgezählt und der Mittelwert aus den acht Werten gebildet. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch Verrechnung mit der Verdünnung (Faktor 2) und dem Volumen der Kammer (Faktor 10<sup>4</sup>). Mittels Dreisatz wurde im Anschluss die benötigte Menge Zellsuspension errechnet.

#### 2.2.1.6 Inhibition mitogener Signalwege

##### Etablierung der Inhibitoren AS1842856, PD98059, U0126 und Rapamycin

Zur Bestimmung der bestmöglichen Inhibitorkonzentration wurden die Inhibitoren AS1842856 (gegen FOXO1), PD98059 (gegen ERK 42/44), U0126 (gegen ERK 42/44) und Rapamycin (gegen MTOR) etabliert. Es wurde eine Solubilisierung mit DMSO durchgeführt und jeweils nach Herstellerangaben vorgegangen. Analog zu 2.2.1.4 wurden vier Replikate der NG-Zelllinie aufgetaut und über drei Tage inkubiert. Während der Behandlung wurden je vier Inhibitor-Konzentrationen ohne und mit Akutinsulin-Stimulation (AI) am Tag der Ernte getestet. Dabei wurde stets eine NG-Kontrolle sowie eine Vehikelkontrolle mit DMSO entsprechend der höchsten verwendeten Inhibitormenge mitgeführt. Die Festlegung der Konzentrationsreihe für jeden Inhibitor erfolgte in Anlehnung an die aktuelle Fachliteratur [56-67].

Die Wirkstärke der Inhibitoren wurde mittels Western-Blot-Analysen näher untersucht. Für die Inhibitoren AS1842856 und PD98059 konnte keine ausreichende Inhibition nachgewiesen werden, sodass diese in weiteren Versuchen nicht mehr verwendet wurden.

##### Inhibition mit Rapamycin

Die in der Etablierung festgelegte Konzentration von 10 nM Rapamycin wurde in einem weiteren Versuchsteil für die Behandlungsbedingungen NG, NG+HI, HG und HG+HI angewandt. Dabei wurde für jede der vier Bedingungen eine unbehandelte Kontrolle sowie eine Vehikelkontrolle mit 0,01 %

DMSO mitgeführt. Als Vergleichspunkt wurde bei der späteren Auswertung stets die Vehikelkontrolle mit DMSO herangezogen. Die Inhibition erfolgte an sieben Replikaten. Für den Nachweis der Inhibition in Western-Blot-Analysen wurden die Zellen analog zu 2.2.1.7 4 h in Hungermedium inkubiert und im Anschluss mit AI stimuliert. Für alle weiteren Analysen wurden die Zelllysate ohne AI-Stimulus hergestellt. Der Phosphorylierungsgrad von MTOR wurde an sieben Replikaten analysiert. Nachdem in den ersten Western-Blot-Analysen von P70S6K keine Unterschiede detektiert wurden, wurde der Phosphorylierungsgrad von P70S6K an nur vier Replikaten analysiert.

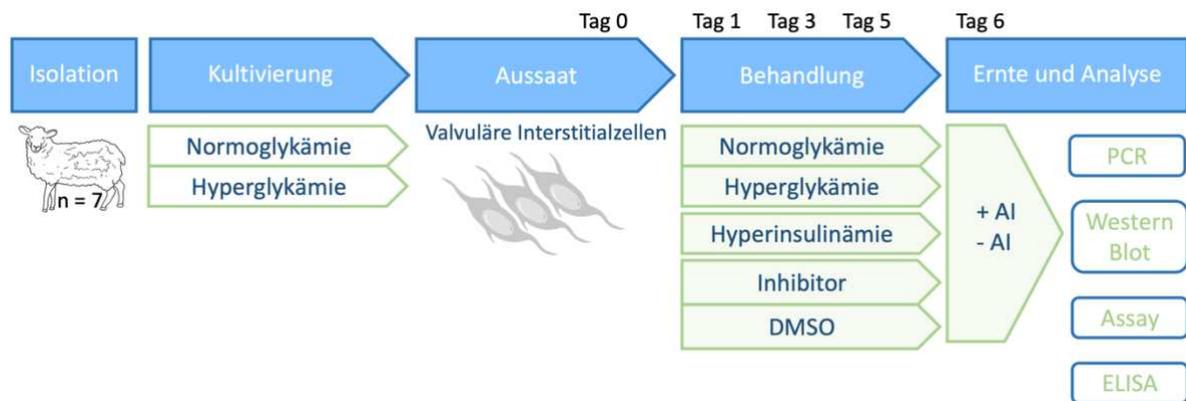
#### Inhibition mit U0126

Die in der Etablierung festgelegte Konzentration von 10  $\mu$ M U0126 wurde in einem weiteren Versuchsteil für die Behandlungsbedingungen NG, NG+HI, HG und HG+HI angewandt. Dabei wurde für jede der vier Bedingungen eine unbehandelte Kontrolle sowie eine Vehikelkontrolle mit 0,1 % DMSO mitgeführt. Im weiteren Verlauf wurde analog zur Inhibition mit Rapamycin vorgegangen. Der Phosphorylierungsgrad von ERK 42, ERK 44 sowie P70S6K an sieben Replikaten analysiert.

#### 2.2.1.7 Ernte und Erstellung von Zelllysaten für Western-Blot-Analysen

Für die Ernte zur Signalweganalyse wurden die VIC zweimal in PBS gewaschen und 4 h in 1 ml Hungermedium inkubiert. Im Anschluss wurde bei der Hälfte der Zellen eine AI-Stimulation durchgeführt, indem die Zellen mit 10 nM oder 100 nM Insulin für 10 min inkubiert wurden. Im Anschluss wurden Zelllysate von den VIC hergestellt, um die Proteinmodifikationen der Zellen in Western-Blot-Analysen untersuchen zu können. Hierfür wurden die Zellen nach der Insulinstimulation zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 120  $\mu$ l des Lysepuffers für Western-Blot-Analysen auf die Zellen gegeben und bei -20 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Mikrotiterplatten aufgetaut und die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Zellen gleicher Bedingungen wurden in einem Mikroreaktionsgefäß gesammelt.

Die Lysate wurden für 2 bis 4 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert und im Anschluss für 15 min bei 4 °C mit 13000 rpm zentrifugiert. Die Lysate wurden in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und das Pellet wurde verworfen. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.



**Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau der Zellkultur**

VIC wurden aus sieben ovinen AK isoliert und unter NG- und HG-Bedingungen kultiviert. Die Behandlung erfolgte über sechs Tage mit MW alle zwei Tage. Die Behandlung bestand aus NG und HG in Kombination mit HI und/oder Inhibitoren. Für Western-Blot-Analysen wurde eine AI-Stimulation durchgeführt. Weitere Analysen waren PCR, LDH-Assay und Insulin-ELISA. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; DMSO = Dimethylsulfoxid; ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay*; LDH = Laktatdehydrogenase; PCR = Polymerasekettenreaktion.

## 2.2.2 Western-Blot-Analyse von Zelllysaten

### 2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten

Die Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde mithilfe eines kommerziellen DC-Proteinassays nach Herstellerangaben bestimmt. Das Testprinzip wurde 1951 von Lowry et al. beschrieben und beruht auf der Bindung von zweiwertigen Kupferionen an die Peptidbindungen der Proteine in alkalischem Milieu. In einem zweiten Schritt wird das zugegebene Folin-Ciocalteu-Reagenz reduziert, woraus ein Farbumschlag von gelb zu blau resultiert, welcher über photometrische Analyse die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration ermöglicht [68].

Es wurde in Dreifachbestimmung eine Standardreihe aus BSA und RIPA-Puffer erstellt. Dabei wurden acht verschiedene Konzentrationen zwischen 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verwendet. Die verwendeten Konzentrationen waren 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Zelllysate erfolgte in Doppelbestimmung. Zur Auswertung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät quantifiziert und die Proteinkonzentrationen anhand des Standards errechnet.

### 2.2.2.2 Aufbereitung der Proben

Zur Vereinheitlichung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten und der farblichen Kennzeichnung der Proben im Gel wurden die Zelllysate zunächst vorbereitet. Hierbei wurde durch Verdünnung der Zelllysate mit RIPA-Puffer eine einheitliche Proteinkonzentration für jedes Replikat geschaffen und im Anschluss Ladepuffer in der Verdünnung 1:6 hinzugegeben. Die Proteinkonzentration der Probe wurde

mittels Dreisatz berechnet. Die Proben wurden im Anschluss einmalig für 5 min bei 95 °C unter Schütteln aufgeköcht und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur quantitativen Auswertung wurden die Proteine der Zellysate über die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wurde eine Gelkonzentration von 10 % gewählt. Bei der Detektion von Anti-MTOR und Anti-Phospho-MTOR wurde aufgrund der höheren Proteingröße eine Gelkonzentration von 8 % gewählt. Es wurden stets 5 µl des Proteingrößenstandards und zwischen 10 und 15 µg des Proteins in das Sammelgel pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 70 V begonnen und mit Erreichen der Trenngel-Sammelgel-Grenze auf 120 V erhöht. Im Trenngel wurden die Proteine durch die angelegte Spannung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt [69].

### 2.2.2.4 Western-Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran zur Detektion und Quantifizierung dieser nach dem *Tank-Blot*-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurden Gel und Membran zwischen Chromatographiepapier in ein stabiles Kunststoffgitter eingespannt und der Elektroblotter mit Transferpuffer befüllt. Für eine vollständige Übertragung der Proteine wurde die Membran dem Gel exakt angelegt und etwaige Luftblasen vollständig entfernt [70]. Der Proteintransfer wurde 100 min bei konstant 100 V durchgeführt. Im Anschluss wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 5 %iger BSA-Blockierlösung blockiert.

### 2.2.2.5 Immundetektion der Proteine

Zur Detektion der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit einem Zielprotein spezifischen Primär-Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran dreimal mit je 5 ml TBST für je 5 min gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 30 min mit einem spezifischen Sekundär-Antikörper inkubiert. Es erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschrift mit TBST. Unter Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates Western-Bright-Quantum nach Herstellerangaben wurden im Anschluss die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran mit dem *Imager* detektiert.

Die Ladekontrolle wurde mit GAPDH oder mit β-AKTIN durchgeführt. Hierfür wurde die Membran nach der Detektion für 30 bis 60 min mit einem GAPDH- bzw. β-AKTIN-spezifischen Primär-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit TBST. Im Anschluss wurde die Membran für weitere 30 min mit einem spezifischen Sekundärantikörper gegen

die Ladekontrolle inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift mit TBST wurden die Proteinbanden der Ladekontrolle auf der Nitrozellulosemembran mit dem *Imager* detektiert.

#### 2.2.2.6 Auswertung der detektierten Proteinmengen

Die Quantifizierung der Proteinbanden wurde mithilfe des Programms *ImageQuant* durchgeführt. Dabei wurde die Intensität der Banden um den Hintergrund korrigiert und das Integral der Intensität als Mengenmaß verwendet. Im Anschluss wurde die Intensität der Proteinbanden unter Verwendung der Ladekontrollen durch Verrechnung korrigiert und eine Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle bzw. die Vehikelkontrolle mit AI-Stimulation durchgeführt. Für die Inhibitorversuche musste die Analyse von NG und HG getrennt erfolgen. Gemeinsam dargestellte Abbildungen wurden auf eine Kalibrierungsprobe NG+AI normalisiert.

### 2.2.3 Bestimmung der Insulin-Konzentration in Zellkultur-Überständen

Um das Ausmaß möglicher Schwankungen der Insulin-Konzentration in den Behandlungsgruppen zu detektieren, wurden Überstände aus der Zellkultur mithilfe eines Insulin-ELISA analysiert. Im angewandten Versuchsaufbau wurde mit deutlich überphysiologischen Konzentrationen gearbeitet [71, 72], sodass die Analyse und Auswertung der Insulinkonzentrationen in der Verdünnung 1:100 erfolgte. Der ELISA wurde strikt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Standard wurde in Doppelbestimmung in die mit für Insulin spezifischen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten pipettiert. Die Überstände aus vier von sieben Replikaten wurden in Einfachbestimmung analysiert. Darüber hinaus wurden bei jedem MW Proben des neu zugegebenen Vollmediums entnommen und in Einfachbestimmung analysiert. Zur Auswertung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät mit der Magellan-Software quantifiziert und die Insulinkonzentration anhand des Standards berechnet.

### 2.2.4 Zytotoxizitätsmessung in Zellkultur-Überständen

Für die Zytotoxizitätsmessung wurden am Tag der Ernte die Überstände jeder Bedingung abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C eingefroren. Die Zytotoxizität wurde anhand der Menge von Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand bestimmt. LDH ist ein Enzym im Zytoplasma, welches bei Beschädigung der Zellmembran durch Apoptose oder andere zellschädigende Prozesse in den Überstand freigesetzt wird [73]. Die Messung erfolgte mithilfe des CyQUANT LDH *Cytotoxicity Assay*. Dabei wurden 50 µl Probe mit derselben Menge Reaktionsmix zusammengeführt und für 30 min bei Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe der Stop-Lösung erfolgte die Messung im

Mikrotiterplatten-Lesegerät zur photometrischen Analyse. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm und 680 nm gemessen und voneinander subtrahiert. Es wurden stets eine Positivkontrolle sowie eine NG- und eine HG-Leerwertprobe mitgeführt. Die Auswertung der LDH-Konzentration erfolgte durch Reduktion zur entsprechenden Leerwertprobe mit anschließender Normalisierung auf den Proteingehalt.

## 2.2.5 Extraktion und Analyse von RNA aus valvulären Interstitialzellen

### 2.2.5.1 Photometrische Analyse zur RNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung

Für die RNA-Extraktion aus den Zellen wurden diese am Tag der Ernte zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 350 µl Lysepuffer für die RNA-Extraktion zu den Zellen gegeben. Das Lysat wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zu einer Woche bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde das Lysat wieder aufgetaut und die RNA mithilfe des *RNeasy* Mini Kits nach Herstellerangaben extrahiert. Für die Referenz-Probe (engl.: *inter-run calibration sample*), welche Unterschiede zwischen unabhängigen Analysen detektiert, wurde RNA verwendet, welche durch eine Bachelor-Studentin aus einer humanen Herzspitze extrahiert wurde. Bis zur weiteren Verwendung der RNA erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte in Doppelbestimmung mithilfe des Mikrotiterplatten Lesegerätes über photometrische Analyse. Die Absorption wurde bei 260 nm gemessen. Es wurde eine Leerwertreduktion mit RNase-freiem Wasser durchgeführt.

### 2.2.5.2 Reverse Transkription von RNA in komplementäre DNA

Mithilfe des *QuantiTect Reverse Transcription* Kits wurde die extrahierte RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl.: *deoxyribonucleic acid*) umgewandelt. Dafür wurden zwischen 500 ng und 1000 ng RNA in einem Zyklus nach Herstellerangaben umgeschrieben und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.5.3 Analyse der Genexpression durch semi-quantitative Echtzeit-PCR

Die Genexpressionsanalyse durch semi-quantitative PCR in Echtzeit erfolgte mithilfe des *GoTaq* PCR Master Mix nach Herstellerangaben. Dabei wurden 10 µg komplementäre DNA und jeweils 3 pmol vorwärts- und rückwärtsgerichtete Primer zum Reaktionsgemisch gegeben.

Der Ablauf der PCR startete mit einem initialen Schritt von 2 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen mit je 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Zum Abschluss erfolgten die drei Einzelschritte 15 s bei 95 °C, 1 min bei 60 °C und nochmals 15 s bei 95 °C.

Die Analyse der Proben erfolgte in Doppelbestimmung. Zudem wurde auf jeder Platte eine Wasserkontrolle sowie eine *inter-run*-Kalibrierung mit dem Primer für *rpl13a* mitgeführt.

#### 2.2.5.4 Auswertung und Quantifizierung der Genexpression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Zur Auswertung der Genexpression wurde die Amplifikation mithilfe der *StepOnePlus* Software analysiert. Zur Quantifizierung wurde der Schwellenwertzyklus ( $C_T$ -Wert, engl.: *cycle threshold*) herangezogen. Dabei war die Schwelle für alle Proben eines Gens konstant. Als Ausschlusskriterien wurden Abweichungen in der Doppelbestimmung von  $\Delta C_T > 1$  sowie  $C_T$ -Werte  $> 34$  festgelegt. Auch Phasenverschiebungen in der Schmelzkurve führten zum Ausschluss der Werte. Für die Statistische Auswertung wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode verwendet.

#### 2.2.6 Analyse der metabolischen Aktivität im *Seahorse*-Assay

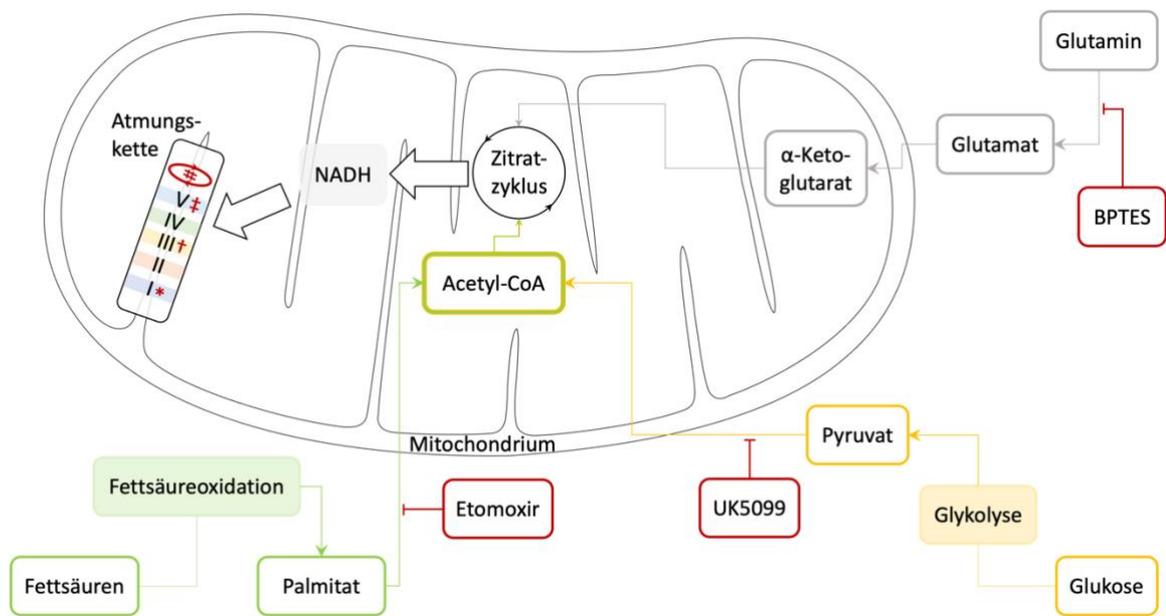
In Kooperation mit Frau Prof. Dr. Ouwens (Deutsches Diabetes Zentrum) wurde ein *Seahorse*-Assay durchgeführt, um die mitochondriale Funktion sowie die Glykolyse in vitalen VIC in Abhängigkeit von den Energielieferanten Glc, FS und Gln näher zu charakterisieren. Dabei wurden die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, engl.: *oxygen consumption rate*) sowie die extrazelluläre Ansäuerung (ECAR, engl.: *extracellular acidification rate*) gemessen. Unter Berücksichtigung der Pufferkapazität des *Seahorse*-Mediums sowie der Geometrie der Mikrotiterplatte wurde zu Beginn der Messung die ECAR in eine Protonen-Austauschrate (PER, engl.: *proton exchange rate*) umgerechnet. Anhand dieser Messungen wurden folgende Parameter berechnet [74, 75]:

Respiratorische Reservekapazität	max. OCR nach FCCP-Injektion – basale OCR Inhibitor
ATP-Produktion	basale OCR Inhibitor – min. OCR nach Oligomycin-Injektion
Basale PER	letzte PER vor erster Injektion
Basale Glykolyse	letzte glykolytische PER (glykoPER) vor erster Injektion
Basale OCR Inhibitor	letzte OCR vor Oligomycin-Injektion
Basale Zellatmung	letzte OCR vor erster Injektion – nicht-mitochondriale Atmung
GlykoPER	PER – mitochondriale PER
Induzierte Glykolyse	letzte glykoPER nach erster Injektion
Kompensatorische Glykolyse	max. glykoPER nach Rotenon-/Antimycin A-Injektion
Maximale Zellatmung	max. OCR nach FCCP-Injektion – nicht-mitochondriale Atmung

Mitochondriale PER	CO <sub>2</sub> -Faktor* x basale Zellatmung (*ist für XFe96 <i>Seahorse</i> -Platten definiert als 0,61 [76])
Nicht-mitochondriale Atmung	min. OCR nach Rotenon-/Antimycin A-Injektion

Zur Kultivierung wurden Zellen aus sechs Replikaten wie in 2.2.1.4 beschrieben aufgetaut und am dritten Tag in eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten ausgesät. Dabei wurden etwa 750 Zellen in jede Kavität gegeben und es erfolgte eine Kultivierung unter den vier Behandlungsbedingungen NG, NG+HI, HG, HG+HI mit 200 µl Vollmedium in jeder Kavität. Jede Behandlungsbedingung wurde mit 24 Kavitäten repräsentiert. Der MW erfolgte nach Möglichkeit alle 48 h mit Beginn an Tag eins. Am Tag fünf wurde die Platte in das Deutsche Diabetes Zentrum gebracht, wo sie weiter kultiviert wurde. Ebenfalls an Tag fünf wurde eine spezifische *Seahorse*-Mikrotiterplatte (engl.: *Cartridge*) in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten mit je 200 µl Kalibrierungsmedium hydriert und über Nacht bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag des Assays wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl *Seahorse*-Medium gewaschen und im Anschluss 180 µl *Seahorse*-Medium in jede Kavität gegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 45 bis 60 min bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>.

Durchgeführt wurde ein *Mito Fuel Flex Test*, welcher mit einem *Mito Stress Test* kombiniert wurde. Hierbei wurden die Inhibitoren UK5099 (2 µM) zur Inhibition von Glc, Etomoxir (4 µM) zur Inhibition von FS sowie BPTES (3 µM) zur Inhibition von Gln verwendet [50]. Die Inhibitoren wurden dabei so kombiniert, dass den Zellen ausschließlich eine der drei Energiequellen zur Verfügung stand. Der *Mito Stress Test* wurde im Anschluss nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde Oligomycin (1 µM) zur Inhibition von Komplex V der Atmungskette eingesetzt. FCCP (2,5 µM) führte im Anschluss zu einer Entkopplung des Protonengradienten über dem Intermembranraum und damit zu einer maximalen mitochondrialen Atmung. Zuletzt führte die Inhibition von Komplex I und Komplex III durch Rotenon (0,5 µM) und Antimycin A (0,5 µM) zu einem völligen Stillstand der mitochondrialen Atmung, sodass eine Beurteilung der nicht-mitochondrialen Atmung ermöglicht wurde. [52] Die optimale Konzentration von FCCP wurde titriert. Die optimale Konzentration der anderen Inhibitoren des *Mito Stress Tests* war bereits aus Vorexperimenten bekannt [43]. Eine repräsentative Darstellung der Inhibitorwirkungen zeigt Abb. 7. Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Ouwens. Die Rohdaten wurden auf die Proteinkonzentration in den Kavitäten normalisiert. Hierfür wurde nach dem Assay 50 µl RIPA-Puffer in jede Kavität der Mikrotiterplatte gegeben. Im Anschluss wurde die Platte dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Die aufgetaute Platte wurde für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und die Proteinkonzentration mithilfe des DC-Assay-Kits nach Herstellerangaben mit 20 µl Probe aus jeder Kavität bestimmt.



**Abb. 7: Inhibitorwirkungen im Seahorse-Assay**

Im *Seahorse*-Assay wurden verschiedene Inhibitoren verwendet, um eine Inhibition der Nährstoffversorgung oder der mitochondrialen Atmung zu erzielen. \* = Hemmung durch Rotenon; † = Hemmung durch Antimycin A; ‡ = Hemmung durch Oligomycin; # = Entkopplung durch FCCP. Abkürzungen: CoA = Coenzym A; NADH = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid. Erstellt mit [16], angelehnt an [50, 52].

### 2.2.7 Datenerhebung und statistische Analyse

Die Aufbereitung der Rohdaten erfolgte in Excel. Die statistische Auswertung aller erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware *GraphPad Prism* Version 8.4.2. Dargestellt wurden die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler mit dazugehörigen p-Werten. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Analyse von Vergleichsgruppen mit zwei Variablen erfolgte mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem *Sidak's multiple comparisons test*.

Die statistische Analyse von mehr als zwei Gruppen erfolgte mithilfe des *Kruskal-Wallis test* mit anschließendem *Dunns's multiple comparisons test*.

### 2.2.8 Ethikvotum

Humane Proben wurden mit der Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität verwendet. Die zugehörige Studiennummer lautet 2018-298-bio.

## 3 Ergebnisse

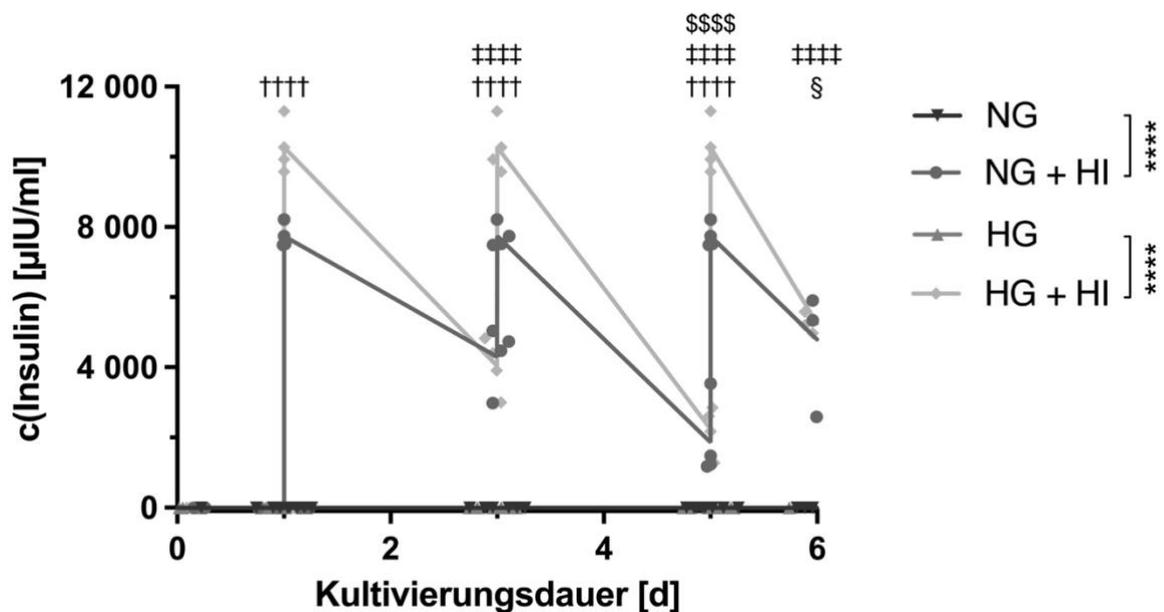
### 3.1 Charakterisierung der Insulinsignalkaskade in valvulären Interstitialzellen

Die Insulinsignalkaskade wird durch Bindung von Insulin an den InsR aktiviert. In weiterer Folge werden nachgeschaltete Signalproteine durch Phosphorylierung aktiviert [31]. Dieser Signalweg wurde in ovinen VIC näher charakterisiert, indem der Phosphorylierungsgrad verschiedener Signalproteine mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht wurde. Dafür wurden die Zellen sechs Tage unter NG-, HG- und HI-Bedingungen kultiviert und am Tag der Ernte mit 10 nM oder 100 nM AI stimuliert.

#### 3.1.1 Nachweis der Insulinkonzentration unter Kultur

Die Insulinkonzentration unter Kultur wurde aus Überständen bestimmt (Abb. 8). Zu jedem Zeitpunkt lag die Insulinkonzentration in den HI-Gruppen deutlich höher als jene der NG- und HG-Kontrollgruppe ( $p < 0,0001$  für NG gegen NG+HI zu jedem Zeitpunkt;  $p < 0,0001$  für HG gegen HG+HI zu jedem Zeitpunkt).

Darüber hinaus unterschieden sich die Insulinkonzentrationen der HI-Gruppen nach dem MW signifikant von jenem vor den nächsten MW im Sinne einer deutlichen Verringerung der Insulinkonzentration über den Zeitraum der Kultur ( $p < 0,0001$  für NG+HI nach MW Tag 1, Tag 3 und Tag 5 gegen NG+HI vor MW Tag 3, Tag 5 und Tag 6;  $p < 0,0001$  für HG+HI nach MW Tag 1, Tag 3 und Tag 5 gegen HG+HI vor MW Tag 3, Tag 5 und Tag 6). Dabei war festzustellen, dass unter HG+HI nach dem MW eine signifikant höhere Insulinkonzentration zu messen war als unter NG+HI ( $p < 0,0001$  für NG+HI nach MW Tag 1, Tag 3 und Tag 5 gegen HG+HI nach MW Tag 1, Tag 3 und Tag 5), während es vor dem nächsten MW keine Unterschiede mehr in der Insulinkonzentration zwischen den genannten Gruppen gab. Außerdem lag die gemessene Insulinkonzentration an Tag 5 vor dem MW signifikant unter jener an Tag 3 und Tag 6. Dies galt sowohl für NG+HI ( $p < 0,0001$ ) als auch für HG+HI ( $p < 0,0001$ ). Während sich die Insulinkonzentration unter NG+HI-Behandlung zwischen Tag 3 vor MW und Tag 6 nicht unterschied, lag die Insulinkonzentration unter HG+HI-Behandlung am Tag der Ernte signifikant über jener an Tag 3 vor MW ( $p = 0,0165$ ). Für die NG- und die HG-Gruppen war zu jedem Zeitpunkt kein Insulin in den Überständen zu detektieren.



**Abb. 8: Insulinkonzentrationsbestimmung mit Insulin-ELISA**

Die Insulinkonzentrationen vier verschiedener Bedingungen unter Kultur wurden in einem Insulin-ELISA ermittelt. HI-Gruppen zeigten eine erhöhte Insulinkonzentration gegenüber den Kontrollgruppen NG und HG. Über den Zeitraum der Kultivierung kam es zu einem Abfall der Insulinkonzentration in den HI-Gruppen. Abgebildet sind lineare Zusammenhänge der Einzelwerte. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ††††  $p < 0,0001$  zwischen NG+HI und HG+HI in frischem Medium; ‡‡‡‡  $p < 0,0001$  zwischen frischem Medium und zwei Tage altem Medium innerhalb der gleichen Behandlung (NG+HI; HG+HI); \$\$\$\$  $p < 0,0001$  zwischen Tag 5 vor MW und Tag 3 vor MW/Tag 6 Ernte innerhalb der gleichen Behandlung (NG+HI; HG+HI); §  $p < 0,05$  zwischen HG+HI Tag 3 vor MW und HG+HI Tag 6 Ernte. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie.

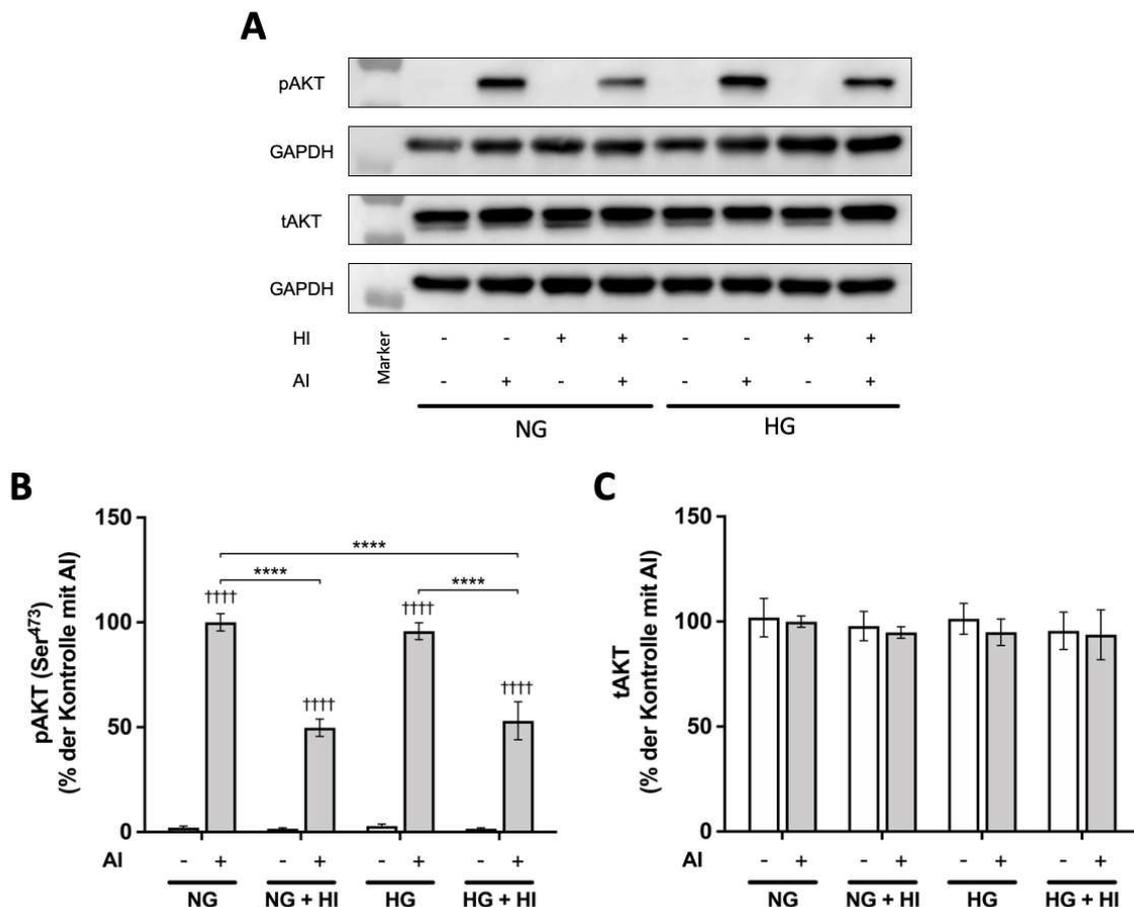
### 3.1.2 Etablierung einer spezifischen Stimulationskonzentration für Insulin

Insulin bindet mit einer hohen Affinität an den InsR. In hohen Konzentrationen kann jedoch eine Kreuzaktivierung von Insulin am IGF-1R stattfinden [77]. Um eine potenzielle Aktivierung des IGF-1R zu testen, wurden die Zellen am Tag der Ernte mit AI-Konzentrationen von 100 nM oder 10 nM stimuliert. Im Anschluss wurde die Phosphorylierung der Signalproteine AKT, ERK 42 und ERK 44 untersucht.

#### 3.1.2.1 Phosphorylierung von AKT

Bei einer Konzentration von 100 nM (Abb. 9) führte der AI-Stimulus in allen Behandlungsgruppen zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung ( $p < 0,0001$  für NG-AI gegen NG+AI;  $p < 0,0001$  für NG+HI-AI gegen NG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für HG-AI gegen HG+AI;  $p < 0,0001$  für HG+HI-AI gegen HG+HI+AI). Unter AI-Stimulation führte eine HI-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten NG- und HG-Kontrollbedingung ( $p < 0,0001$  für

NG+AI gegen NG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für HG+AI gegen HG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für NG+AI gegen HG+HI+AI). Die Phosphorylierungsgrade von AKT unterschieden sich ohne AI-Stimulation zwischen den einzelnen Behandlungsbedingungen nicht. Die Gesamtsynthese von AKT blieb unverändert.

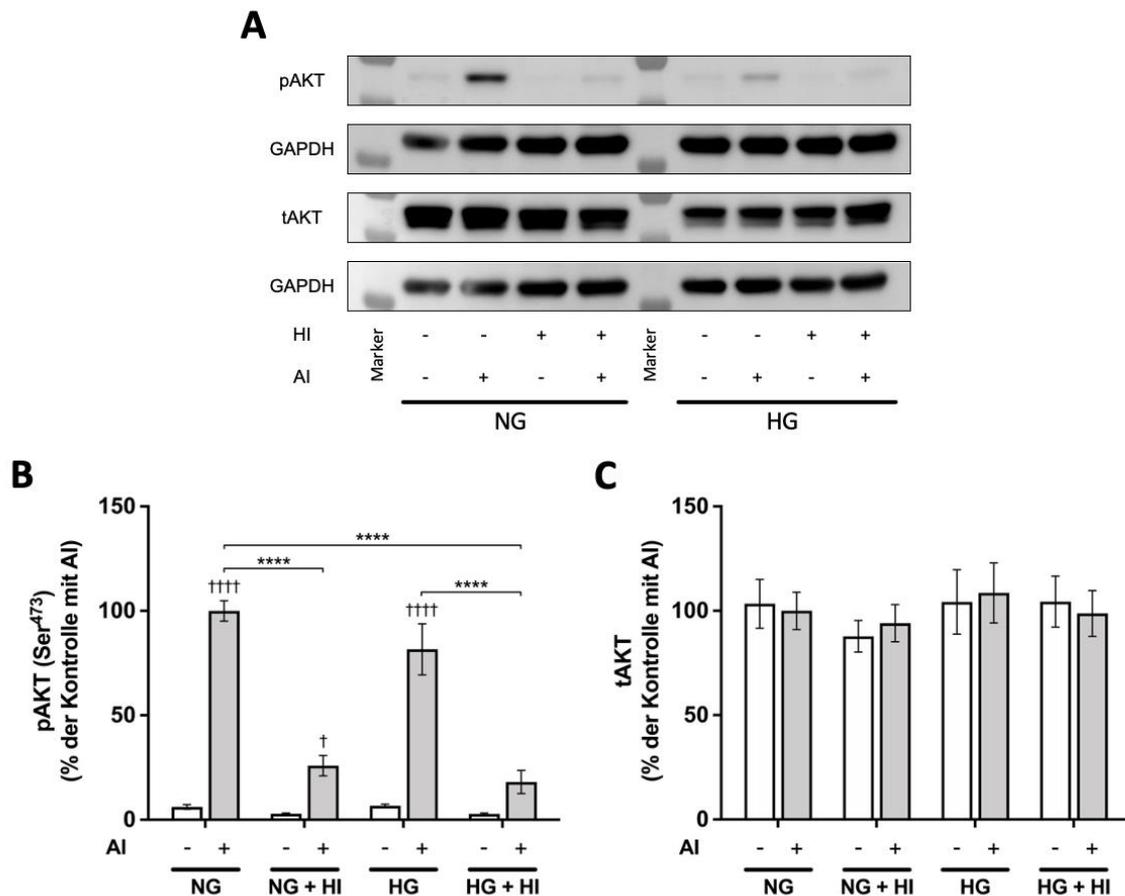


**Abb. 9: Phosphorylierung von AKT nach 100 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von AKT (Ser<sup>473</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Am Tag der Ernte wurden die Zellen mit 100 nM AI stimuliert. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pAKT (Ser<sup>473</sup>) und tAKT unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von AKT (Ser<sup>473</sup>) unter AI-Stimulation in allen Gruppen, wobei diese unter HI-Behandlung geringer war (B). Für tAKT gab es keine Unterschiede in der Proteinbiosynthese (C). Marker pAKT und tAKT: 70 kDa und 55 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; †††  $p < 0,0001$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI-Stimulus. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

Bei einer Konzentration von 10 nM (Abb. 10) führte der AI-Stimulus zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von AKT unter NG-, NG+HI- und HG-Behandlung ( $p < 0,0001$  für NG-AI gegen NG+AI;  $p = 0,0153$  für NG+HI-AI gegen NG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für HG-AI gegen HG+AI). Unter HG+HI-Behandlung zeigte der Vergleich ohne und mit AI-Stimulation keinen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von AKT war bei AI-Stimulation durch HI-Behandlung signifikant vermindert im Vergleich zu den NG- und HG-Kontrollbedingungen ( $p < 0,0001$  für NG+AI

gegen NG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für HG+AI gegen HG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für NG+AI gegen HG+HI+AI). Ohne AI-Stimulation gab es zwischen den einzelnen Behandlungsbedingungen keine Unterschiede. Die Gesamtsynthese von AKT blieb unverändert.



**Abb. 10: Phosphorylierung von AKT nach 10 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von AKT (Ser<sup>473</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Am Tag der Ernte wurden die Zellen mit 10 nM AI stimuliert. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pAKT (Ser<sup>473</sup>) und tAKT unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von AKT (Ser<sup>473</sup>) unter AI-Stimulation in der NG- und HG-Bedingung, während es unter HI-Behandlung nicht mehr oder nur noch vermindert zu einer vermehrten Phosphorylierung von AKT (Ser<sup>473</sup>) kam (B). Für tAKT gab es keine Unterschiede in der Proteinbiosynthese (C). Marker pAKT und tAKT: 70 kDa und 55 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; †  $p < 0,05$ ; ††††  $p < 0,0001$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

### 3.1.2.2 Phosphorylierung von ERK 42 und ERK 44

Bei einer Konzentration von 100 nM (Abb. 11) führte der AI-Stimulus zu einer Zunahme der Phosphorylierung von ERK 42 unter NG-, NG+HI- und HG-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ohne AI-Stimulus ( $p = 0,0024$  für NG-AI gegen NG+AI;  $p = 0,0119$  für NG+HI-AI gegen NG+HI+AI;

$p = 0,0138$  für HG-AI gegen HG+AI). Ein AI-Stimulus unter HG+HI-Behandlung führte nur im Trend zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK 42 ( $p = 0,0748$ ). In der Gesamtsynthese von ERK 42 und ERK 44 sowie im Phosphorylierungsgrad von ERK 44 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

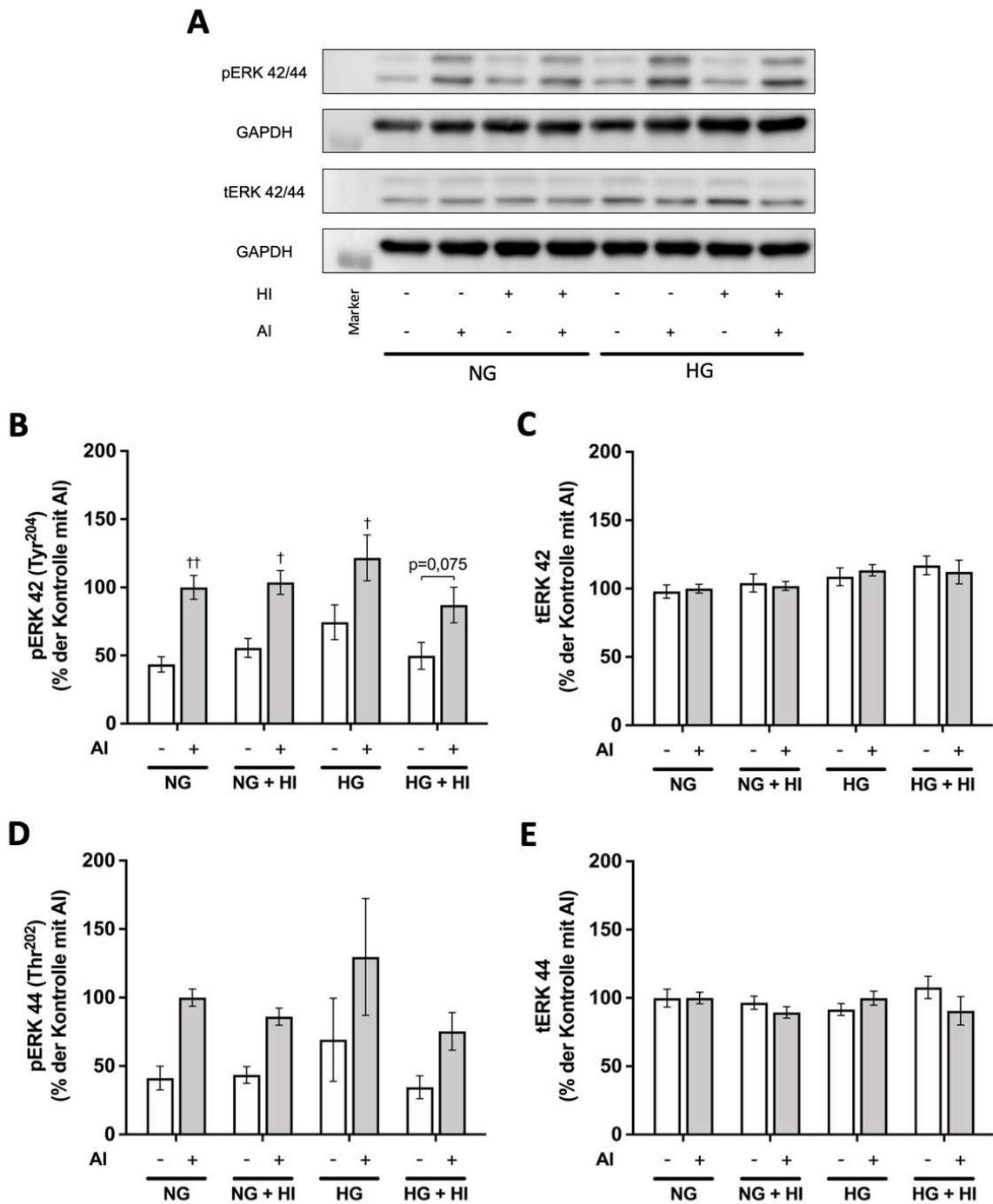
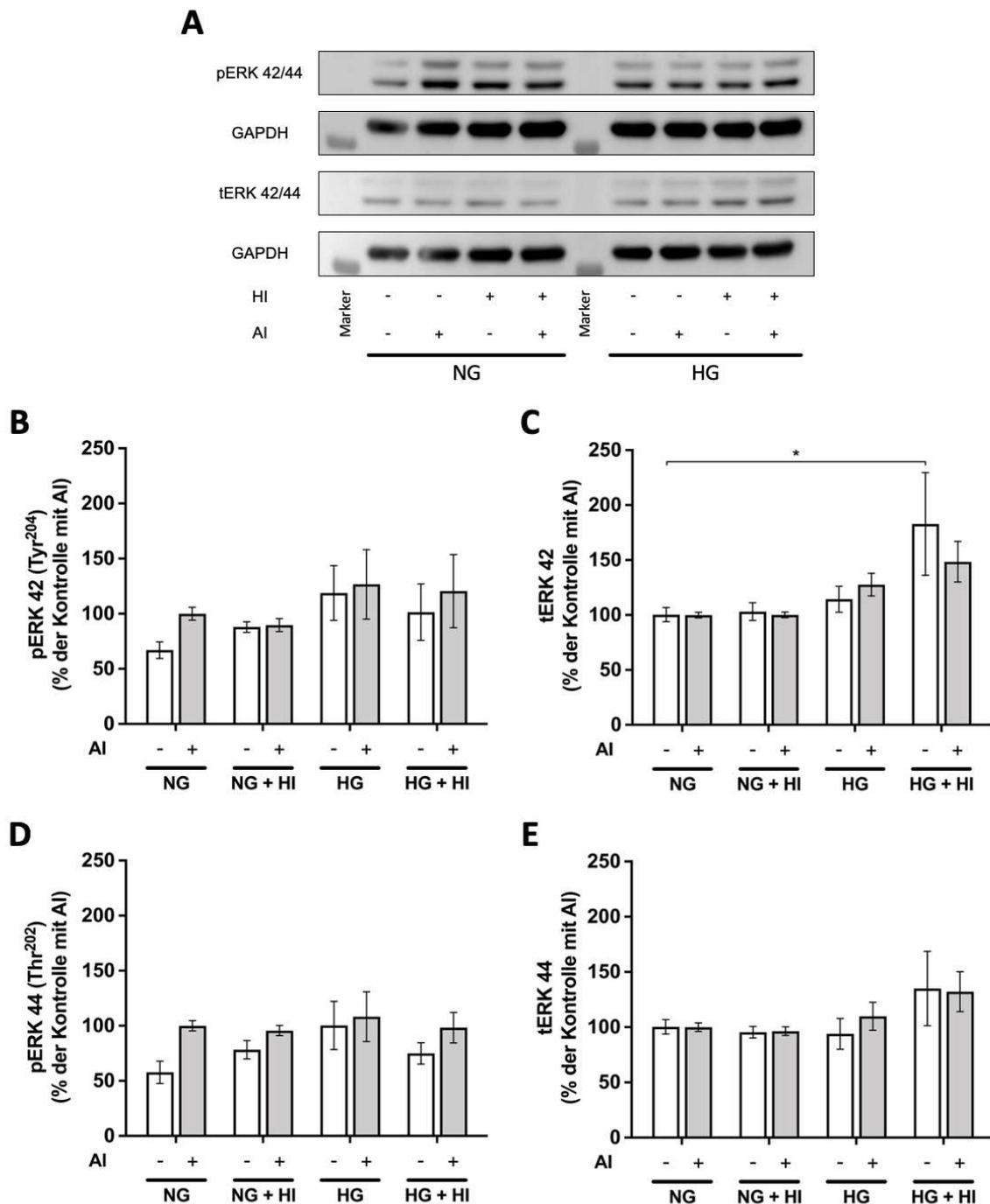


Abb. 11: Phosphorylierung von ERK 42/44 nach 100 nM AI-Stimulation

**Abb. 11: Phosphorylierung von ERK 42/44 nach 100 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Am Tag der Ernte wurden die Zellen mit 100 nM AI stimuliert. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) und tERK unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von ERK 42 (Tyr<sup>204</sup>) unter AI-Stimulation (B). Für pERK 44 und tERK 42/44 gab es keine Unterschiede in der Proteinbiosynthese (C, D, E). Marker GAPDH: 35 kDa. Die Marker-Banden von pERK und tERK liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin; Tyr = Tyrosin.

Bei einer Konzentration von 10 nM (Abb. 12) führte der AI-Stimulus zu keinen signifikanten Unterschieden im Phosphorylierungsgrad von ERK 42 und ERK 44 zwischen den einzelnen Behandlungsbedingungen. ERK 42 zeigte eine signifikant höhere Proteinbiosynthese unter HG+HI-Behandlung verglichen mit der NG-Kontrolle jeweils ohne AI-Stimulus ( $p = 0,0213$ ). In der Gesamtsynthese von ERK 44 traten keine signifikanten Unterschiede auf.



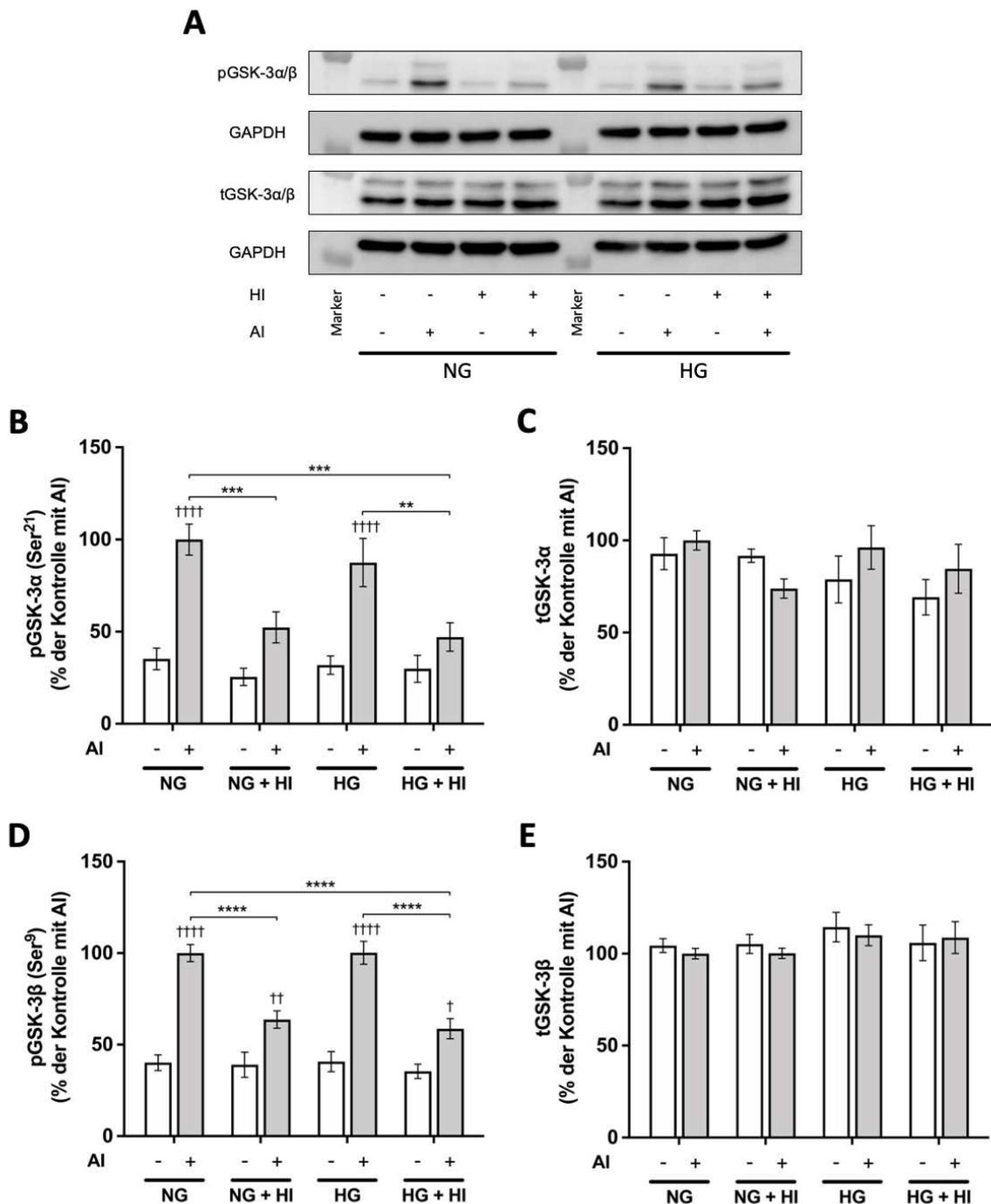
**Abb. 12: Phosphorylierung von ERK 42/44 nach 10 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Am Tag der Ernte wurden die Zellen mit 10 nM AI stimuliert. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) und tERK unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte keine signifikanten Veränderungen in der Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) (B, D). Marker GAPDH: 35 kDa. Die Marker-Banden von pERK und tERK liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*  $p < 0,05$ . Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin; Tyr = Tyrosin.

### 3.1.3 Phosphorylierung von GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$

Im Rahmen der Konzentrationsversuche für die AI-Stimulation am Tag der Ernte wurde im Folgenden eine Konzentration von 10 nM festgelegt. Die Analyse weiterer Signalproteine wurde mit der festgelegten Konzentration durchgeführt.

Die Western-Blot-Analysen für GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  sind in Abb. 13 dargestellt. Eine AI-Stimulation unter NG- und HG-Behandlung führte für GSK-3 $\alpha$  zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollgruppen ( $p < 0,0001$  für NG-AI gegen NG+AI;  $p < 0,0001$  für HG-AI gegen HG+AI). Unter HI-Behandlung kam es durch den AI-Stimulus nicht mehr zu einer signifikant vermehrten Phosphorylierung von GSK-3 $\alpha$ . Der Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen mit AI-Stimulus zeigte eine signifikant verminderte Phosphorylierung von GSK-3 $\alpha$  unter HI-Behandlung ( $p = 0,0006$  für NG+AI gegen NG+HI+AI;  $p = 0,0047$  für HG+AI gegen HG+HI+AI;  $p = 0,0001$  für NG+AI gegen HG+HI+AI). Für GSK-3 $\beta$  zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Unter allen Behandlungsbedingungen kam es zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung durch den AI-Stimulus ( $p < 0,0001$  für NG-AI gegen NG+AI;  $p = 0,007$  für NG+HI-AI gegen NG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für HG-AI gegen HG+AI;  $p = 0,0125$  für HG+HI-AI gegen HG+HI+AI). Auch für GSK-3 $\beta$  zeigte der Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen mit AI-Stimulus eine signifikant verminderte Phosphorylierung unter HI-Behandlung ( $p < 0,0001$  für NG+AI gegen NG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für HG+AI gegen HG+HI+AI;  $p < 0,0001$  für NG+AI gegen HG+HI+AI). Die Gesamtsynthese von GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  wurde durch die Behandlungsbedingungen nicht beeinflusst.

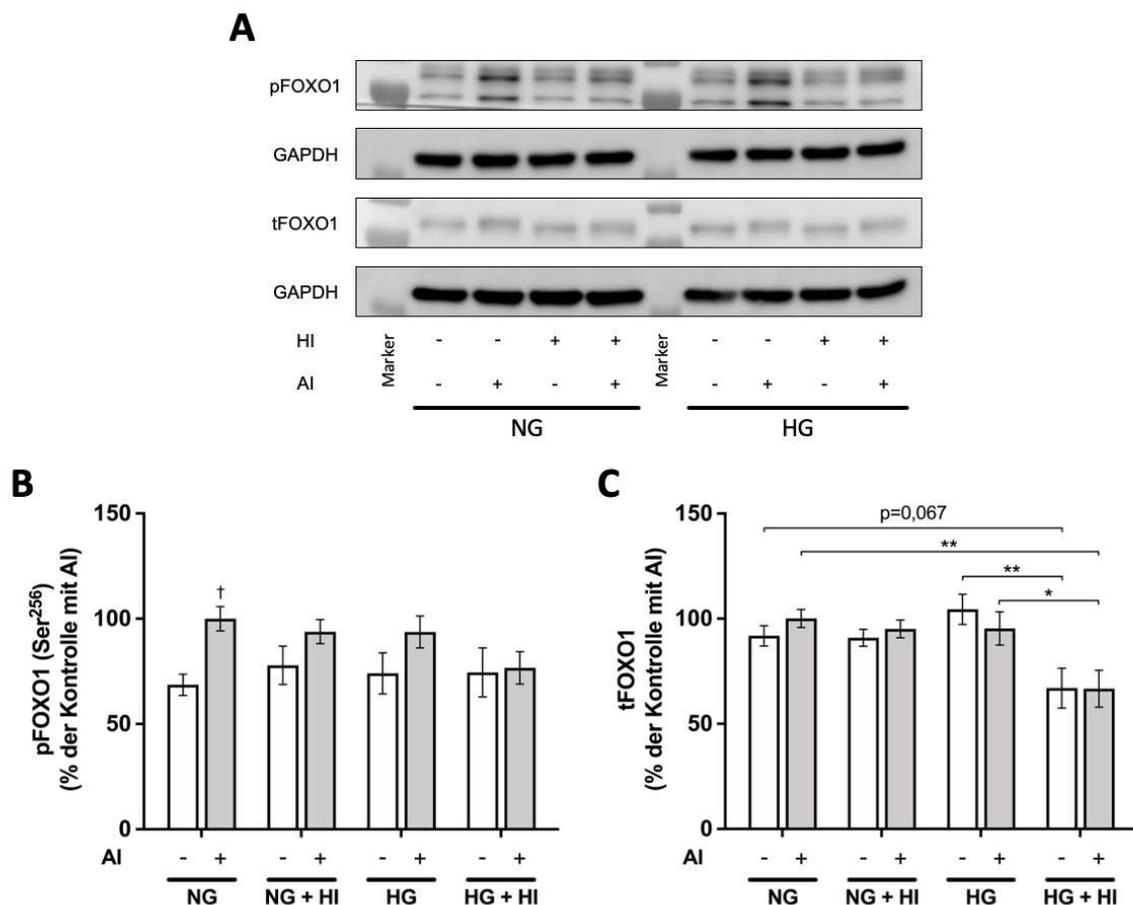


**Abb. 13: Phosphorylierung von GSK-3α/β nach 10 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von GSK-3α/β (Ser<sup>21</sup>/Ser<sup>9</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pGSK-3α/β (Ser<sup>21</sup>/Ser<sup>9</sup>) und tGSK-3α/β unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von GSK-3α/β (Ser<sup>21</sup>/Ser<sup>9</sup>) unter AI-Stimulation in der NG- und HG-Bedingung, während diese unter HI abgeschwächt war (B, D). Für tGSK-3α/β gab es keine Unterschiede in der Proteinbiosynthese (C, E). Marker pGSK-3α/β und tGSK-3α/β: 55 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; ††††  $p < 0,0001$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

### 3.1.4 Phosphorylierung von FOXO1

Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen von FOXO1 (Abb. 14) zeigte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung unter NG-Bedingungen durch den AI-Stimulus ( $p = 0,0337$ ). Die Gesamtsynthese von FOXO1 war sowohl mit als auch ohne AI-Stimulus unter HG+HI-Behandlung signifikant bzw. im Trend vermindert im Vergleich zur entsprechenden NG- und HG-Kontrolle ( $p = 0,0673$  für NG-AI gegen HG+HI-AI;  $p = 0,0055$  für NG+AI gegen HG+HI-AI;  $p = 0,0015$  für HG-AI gegen HG+HI-AI;  $p = 0,0230$  für HG+AI gegen HG+HI-AI).

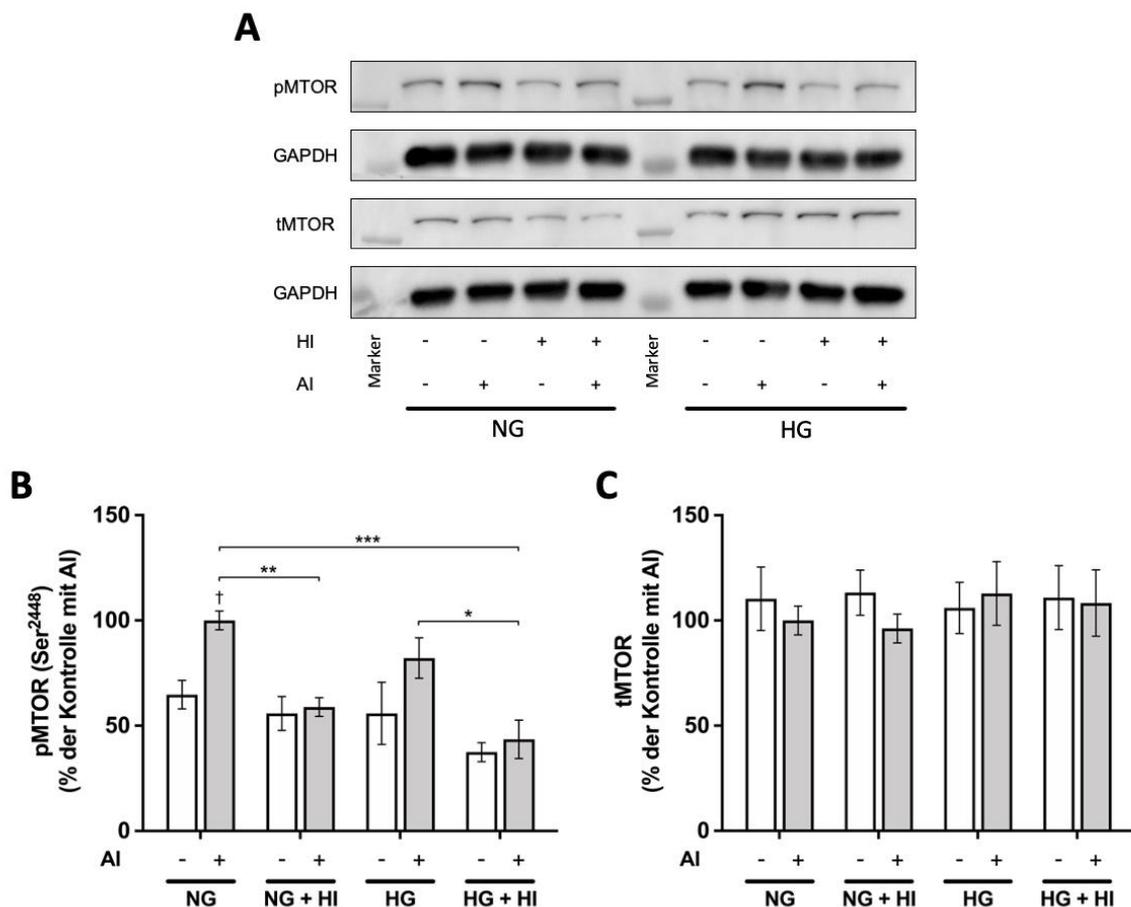


**Abb. 14: Phosphorylierung von FOXO1 nach 10 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von FOXO1 (Ser<sup>256</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pFOXO1 (Ser<sup>256</sup>) und tFOXO1 unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von FOXO1 (Ser<sup>256</sup>) unter AI-Stimulation in der NG-Bedingung (B). Marker pFOXO1 und tFOXO1: 100 kDa und 70 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; †  $p < 0,05$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

### 3.1.5 Phosphorylierung von MTOR

Abb. 15 bildet die Western-Blot-Analysen für MTOR ab. Eine AI-Stimulation mit 10 nM führte unter NG-Bedingungen zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von MTOR ( $p = 0,0188$ ). Unter HG-Bedingungen sowie HI-Behandlung ließ sich dieser Unterschied nicht nachweisen. Der Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen mit AI-Stimulation zeigte sowohl für NG- als auch für HG-Bedingungen eine signifikant geringere Phosphorylierung unter HI-Behandlung ( $p = 0,0069$  für NG+AI gegen NG+HI+AI;  $p = 0,0128$  für HG+AI gegen HG+HI+AI;  $p = 0,0001$  für NG+AI gegen HG+HI+AI). Die Gesamtsynthese von MTOR unterschied sich zwischen den Behandlungsgruppen nicht signifikant.

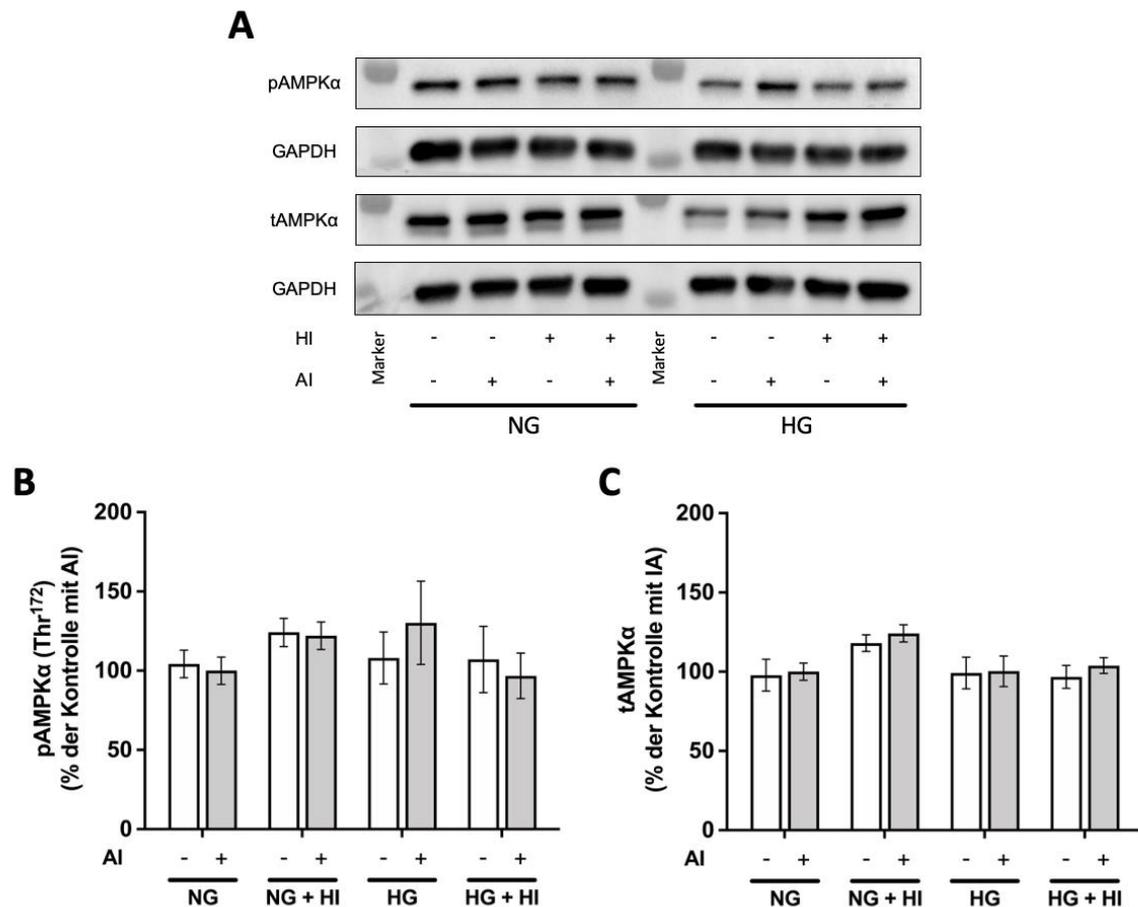


**Abb. 15: Phosphorylierung von MTOR nach 10 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pMTOR (Ser<sup>2448</sup>) und tMTOR unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine Erhöhung der Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) unter AI-Stimulation in der NG-Bedingung, während es unter HI-Behandlung zu einer verminderten Phosphorylierung kam (B). Für tMTOR gab es keine Unterschiede in der Proteinbiosynthese (C). Marker pMTOR und tMTOR: 250 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; †  $p < 0,05$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

### 3.1.6 Phosphorylierung von AMPK $\alpha$

Die Western-Blot-Analysen für AMPK $\alpha$  sind in Abb. 16 dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsbedingungen.



**Abb. 16: Phosphorylierung von AMPK $\alpha$  nach 10 nM AI-Stimulation**

Die Phosphorylierung von AMPK $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>) wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pAMPK $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>) und tAMPK $\alpha$  unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte keine signifikanten Veränderungen (B, C). Marker pAMPK $\alpha$  und tAMPK $\alpha$ : 70 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin.

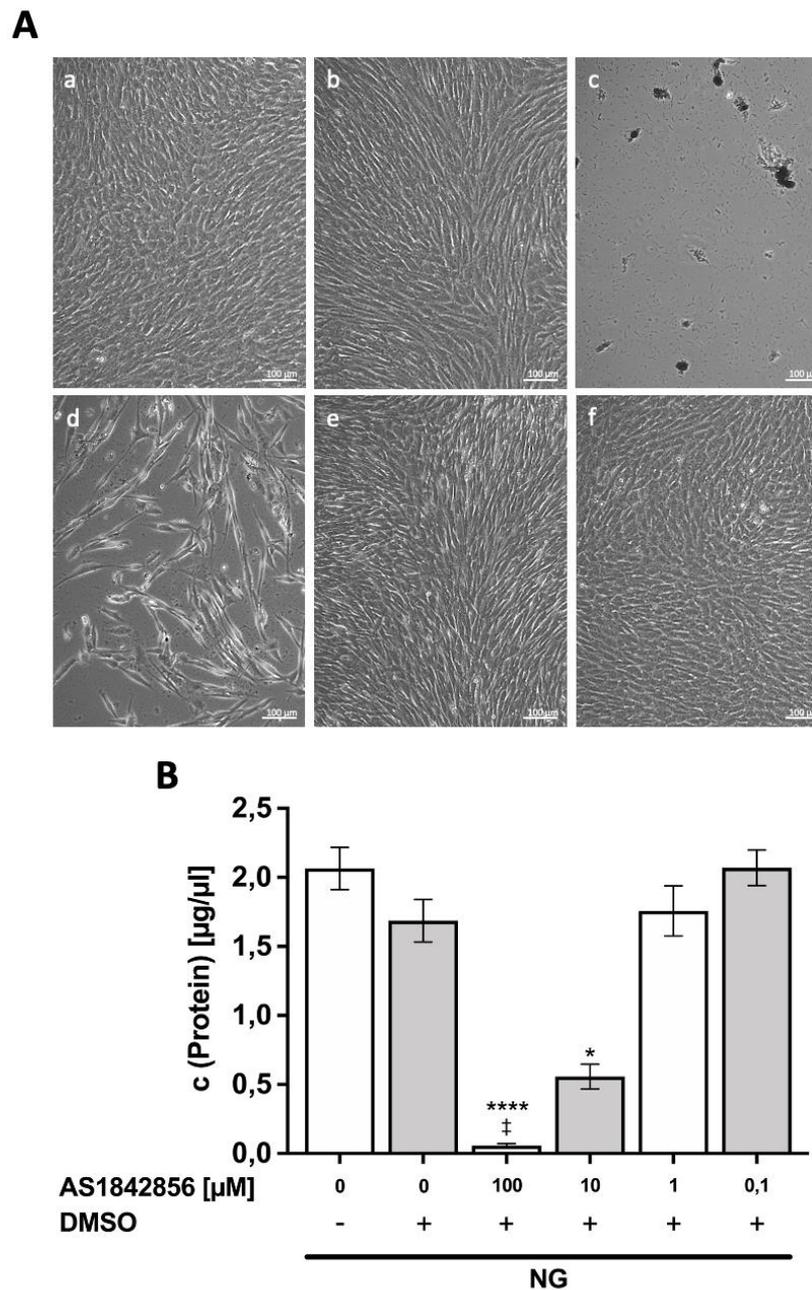
## 3.2 Etablierung von Inhibitoren im mitogenen Signalweg

Der Einfluss der Aktivierung verschiedener Signalproteine in der Insulinsignalkaskade wurde durch Inhibition dieser näher untersucht. Dafür wurden die Inhibitoren AS1842856 gegen FOXO1, Rapamycin gegen MTOR sowie PD98059 und U0126 gegen ERK 42 und ERK 44 etabliert. Um den Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf ovine VIC zu evaluieren, wurden Durchlichtmikroskopien

der Zellen durchgeführt und die Proteinkonzentration in den Lysaten bestimmt. Der Phosphorylierungsgrad der Signalproteine wurde mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht.

### 3.2.1 FOXO1-Inhibitor AS1842856

AS1842856 gilt als potenter und selektiver Inhibitor für FOXO1 und wurde in Anlehnung an die Fachliteratur in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  getestet [56, 60, 63, 66, 67]. Die Konzentrationsreihe erfolgte ausschließlich unter NG-Bedingungen. Dabei wurde eine Vehikelkontrolle mit 0,75 % DMSO mitgeführt (Abb. 17). Unter dem Mikroskop fiel in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  AS1842856 ein starker Zelluntergang auf. Auch eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  führte noch zu einer starken Inhibition der Proliferation. Geringe Inhibitor-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  führten zu keinem optisch sichtbaren Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowie zur Vehikelkontrolle. Die Proteinanalyse zeigte eine signifikante Reduktion der Proteinmenge bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  AS1842856 ( $p < 0,0001$  für NG gegen 100  $\mu\text{M}$ ;  $p = 0,0111$  für ND+DMSO gegen 100  $\mu\text{M}$ ). Auch bei einer Inhibitor-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war die Proteinmenge verglichen mit der unbehandelten Kontrolle signifikant geringer ( $p = 0,0104$ ). Zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Vehikelkontrolle zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge. Ebenso wies der Vergleich der Inhibitor-Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  mit den Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge auf.

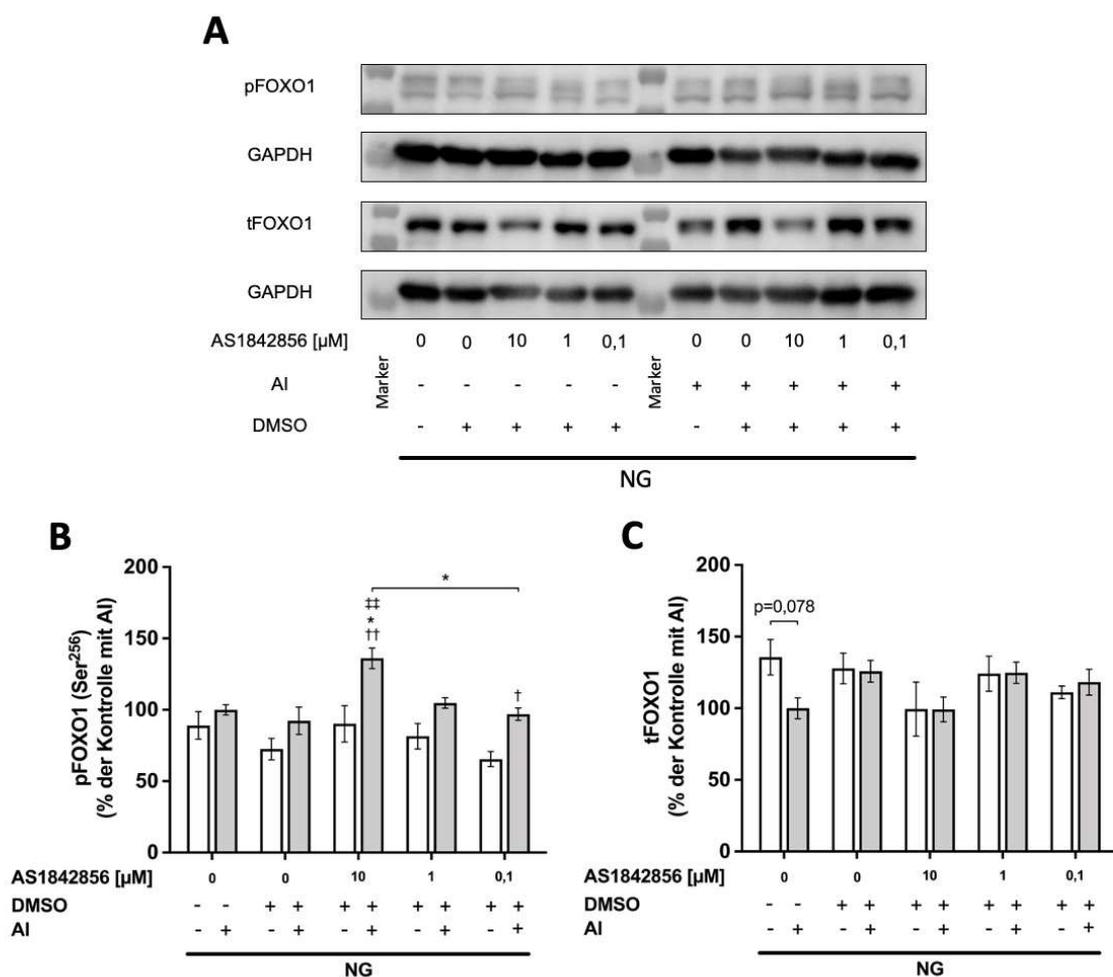


**Abb. 17: Einfluss des FOXO1-Inhibitors AS1842856 auf ovine VIC *in vitro***

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit AS1842856 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Morphologie und das Zellwachstum wurden mittels Durchlichtmikroskopie (A) sowie Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten (B) analysiert. In hohen Konzentrationen kam es zu einem Absterben der Zellen und reduzierten Proteinkonzentrationen (A c, A d, B). a: Kontrolle; b: DMSO, c: 100 µM; d: 10 µM; e: 1 µM; f: 0,1 µM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der unbehandelten Kontrolle; ‡  $p < 0,05$  verglichen mit der Vehikelkontrolle. Maßstab 100 µM; 10-fache Vergrößerung. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie.

Die Inhibition von FOXO1 durch AS1842856 in ovinen VIC wurde mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht (Abb. 18). Die Proteinkonzentrationen bei einer InhibitorKonzentration von 100 µM waren so gering, dass von dieser Behandlung keine Western-Blot-Analysen durchgeführt werden konnten. Bei

Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  zeigte sich im Phosphorylierungsgrad von FOXO1 ein signifikanter Anstieg durch AI-Stimulation ( $p = 0,0033$  für 10  $\mu\text{M}$ -AI gegen 10  $\mu\text{M}$ +AI;  $p = 0,0253$  für 0,1  $\mu\text{M}$ -AI gegen 0,1  $\mu\text{M}$ +AI). Darüber hinaus war die Phosphorylierung von FOXO1 unter 10  $\mu\text{M}$  mit AI-Stimulation signifikant höher als in der unbehandelten Kontrolle mit AI-Stimulation ( $p = 0,0315$ ), in der Vehikelkontrolle mit AI-Stimulation ( $p = 0,0053$ ) sowie in der Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  mit AI-Stimulation ( $p = 0,0158$ ). Zusammenfassend führte die Behandlung mit dem Inhibitor AS1842856 zu keiner Reduktion in der Phosphorylierung von FOXO1. In der Gesamtsynthese von FOXO1 zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

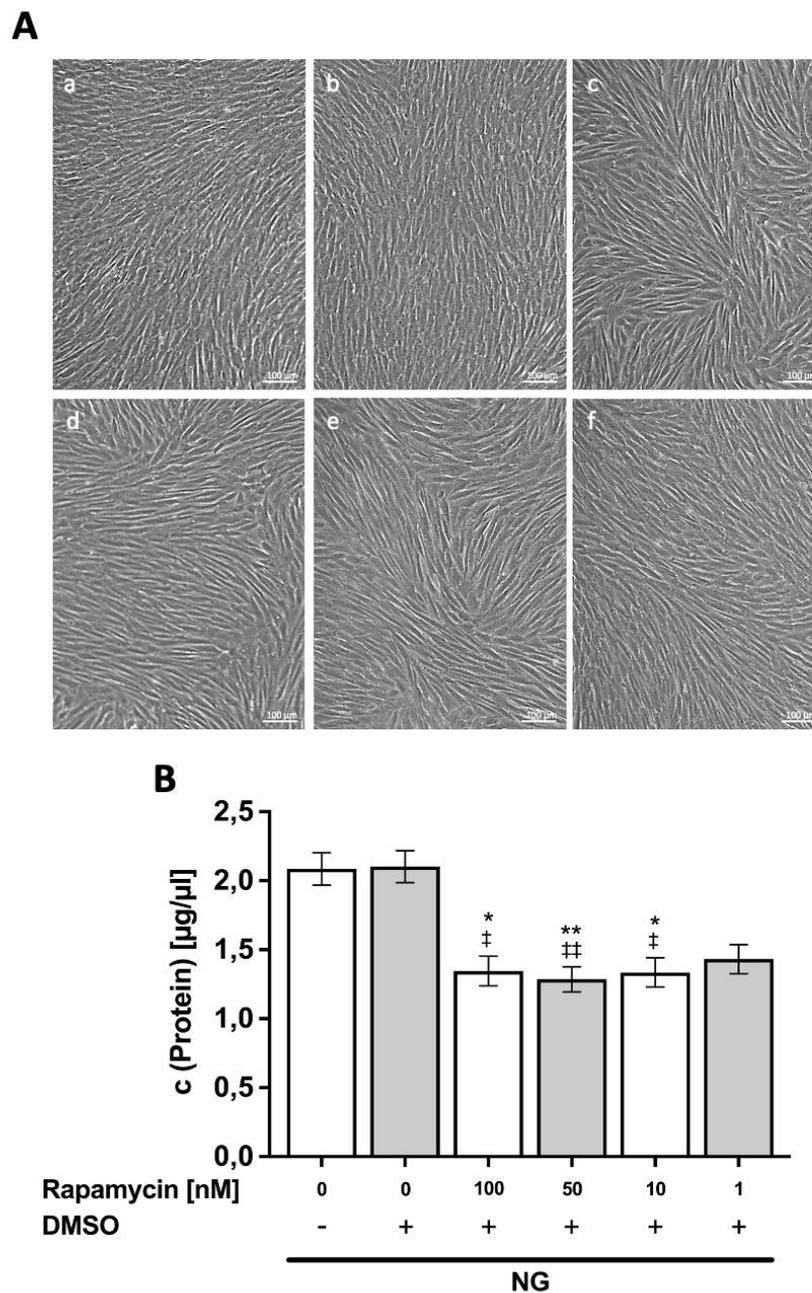


**Abb. 18: Phosphorylierung von FOXO1 unter AS1842856-Behandlung**

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit AS1842856 in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Phosphorylierung von FOXO1 (Ser<sup>256</sup>) untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pFOXO1 (Ser<sup>256</sup>) und tFOXO1 unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte vereinzelt Anstiege in der Phosphorylierung von FOXO1 (Ser<sup>256</sup>) unter AS1842856-Behandlung (B). Marker pFOXO1 und tFOXO1: 100 kDa und 70 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*  $p < 0,05$  verglichen mit der unbehandelten Kontrolle bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI; †††  $p < 0,01$  verglichen mit der Vehikelkontrolle. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

### 3.2.2 MTOR-Inhibitor Rapamycin

Rapamycin gilt als potenter Inhibitor von MTOR und ist in Anlehnung an die Fachliteratur in den Konzentrationen 100 nM, 50 nM, 10 nM und 1 nM getestet worden [61, 62, 65, 67]. Die Konzentrationsreihe erfolgte ebenso ausschließlich unter NG-Bedingungen. Dabei wurde eine Vehikelkontrolle mit 0,1 % DMSO mitgeführt (Abb. 19). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten ein reduziertes Zellwachstum unter allen Inhibitor-Konzentrationen. Dies galt sowohl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als auch zur Vehikelkontrolle. Die Analyse der Proteinkonzentrationen zeigte eine signifikante Reduktion der Proteinmenge unter Behandlung mit 100 nM, 50 nM sowie 10 nM im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen ( $p = 0,0393$  für NG gegen 100 nM;  $p = 0,0243$  für NG+DMSO gegen 100 nM;  $p = 0,0082$  für NG gegen 50 nM;  $p = 0,0048$  für NG+DMSO gegen 50 nM;  $p = 0,0339$  für NG gegen 10 nM;  $p = 0,0209$  für NG+DMSO gegen 10 nM). Eine Behandlung mit 1 nM Rapamycin führte zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Vehikelkontrolle zeigten sich keine Unterschiede.

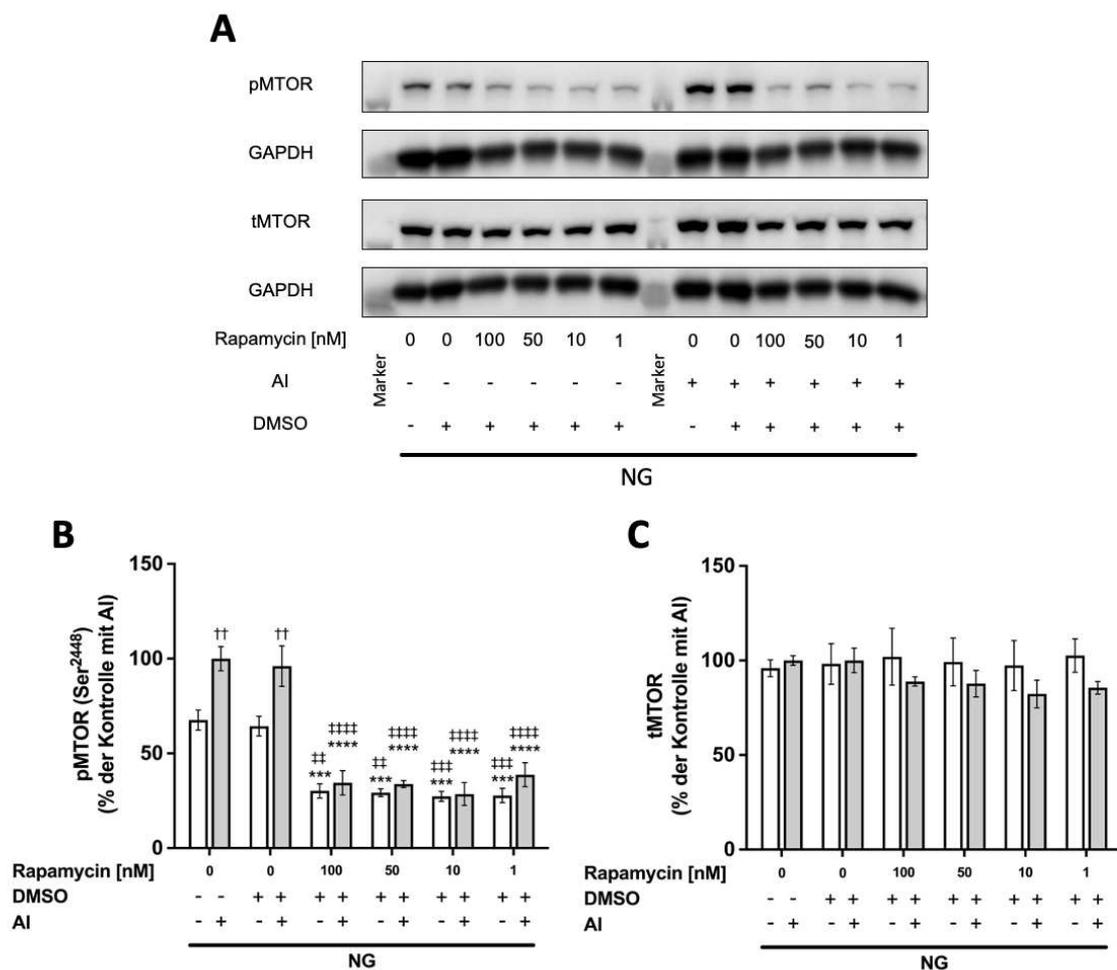


**Abb. 19: Einfluss des MTOR-Inhibitors Rapamycin auf ovine VIC *in vitro***

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit Rapamycin in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Morphologie und das Zellwachstum wurden mittels Durchlichtmikroskopie (A) sowie Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten (B) analysiert. Alle Konzentrationen führten zu einer reduzierten Zellzahl sowie Proteinkonzentration bei unveränderter Morphologie der Zellen (A c bis A f, B). a: Kontrolle; b: DMSO, c: 100 nM; d: 50 nM; e: 10 nM; f: 1 nM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  verglichen mit der unbehandelten Kontrolle; ‡  $p < 0,05$ ; †  $p < 0,01$  verglichen mit der Vehikelkontrolle. Maßstab 100  $\mu\text{M}$ ; 10-fache Vergrößerung. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie.

Die inhibierende Wirkung von Rapamycin auf die Phosphorylierung von MTOR wurde mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht (Abb. 20). Alle Konzentrationen von Rapamycin führten unabhängig von einer AI-Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von

MTOR verglichen mit beiden Kontrollbedingungen ( $p = 0,0005$  für NG-AI gegen 100 nM-AI;  $p = 0,0003$  für NG-AI gegen 50 nM-AI;  $p = 0,0002$  für NG-AI gegen 10 nM-AI;  $p = 0,0002$  für NG-AI gegen 1 nM-AI;  $p = 0,0016$  für NG+DMSO-AI gegen 100 nM-AI;  $p = 0,0011$  für NG+DMSO-AI gegen 50 nM-AI;  $p = 0,0005$  für NG+DMSO-AI gegen 10 nM-AI;  $p = 0,0006$  für NG+DMSO-AI gegen 1 nM-AI;  $p < 0,0001$  für alle entsprechenden Vergleiche +AI). Eine AI-Stimulation führte in der unbehandelten Kontrolle ( $p = 0,0013$ ) sowie in der Vehikelkontrolle ( $p = 0,0016$ ) zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von MTOR. Die Gesamtsynthese von MTOR zeigte keine signifikanten Veränderungen.



**Abb. 20: Phosphorylierung von MTOR unter Rapamycin-Behandlung**

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit Rapamycin in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pMTOR (Ser<sup>2448</sup>) und tMTOR unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) in allen Konzentrationsgruppen verglichen mit den Kontrollen (B). Für tMTOR gab es keine Unterschiede in der Proteinbiosynthese (C). Marker pMTOR und tMTOR: 250 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der entsprechenden unbehandelten Kontrolle; ††  $p < 0,01$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI; †††  $p < 0,01$ ; ††††  $p < 0,0001$  verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

### 3.2.3 ERK 42/44-Inhibitor PD98059

Der ERK 42/44-Inhibitor PD98059 wurde angelehnt an die Fachliteratur in den Konzentrationen 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  unter NG-Bedingungen getestet [57, 58]. Es wurde eine Vehikelkontrolle mit 0,25 % DMSO mitgeföhrt (Abb. 21). Unter dem Mikroskop waren keine Unterschiede zwischen einer Behandlung und den Kontrollbedingungen sichtbar. Auch in den Proteinkonzentrationen waren keine signifikanten Unterschiede sichtbar.

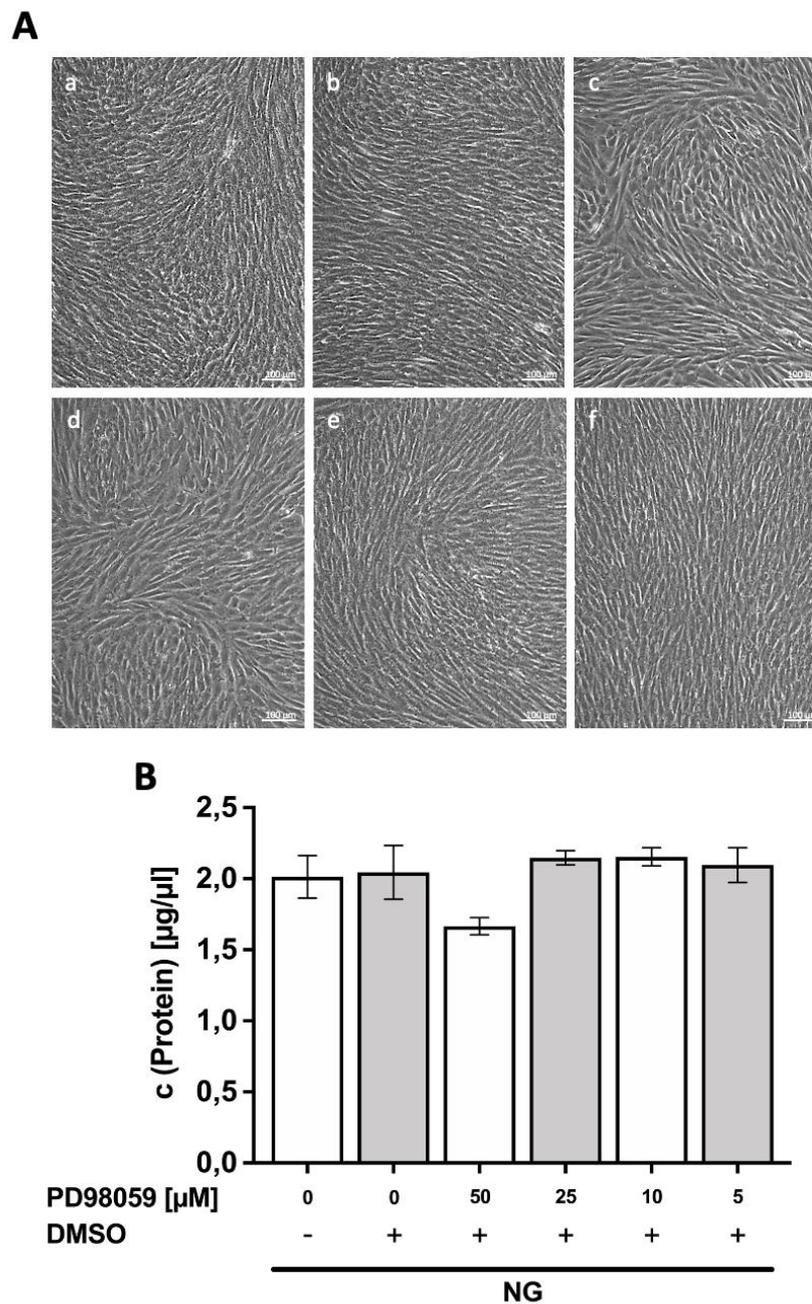


Abb. 21: Einfluss des ERK 42/44-Inhibitors PD98059 auf ovine VIC *in vitro*

**Abb. 21: Einfluss des ERK 42/44-Inhibitors PD98059 auf ovine VIC *in vitro***

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit PD98059 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Morphologie und das Zellwachstum wurden mittels Durchlichtmikroskopie (A) sowie Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten (B) analysiert. Es waren keine auffälligen Unterschiede sichtbar (A, B). a: Kontrolle; b: DMSO, c: 50  $\mu\text{M}$ ; d: 25  $\mu\text{M}$ ; e: 10  $\mu\text{M}$ ; f: 5  $\mu\text{M}$ . Maßstab 100  $\mu\text{M}$ ; 10-fache Vergrößerung. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie.

Die Inhibition von PD98059 auf die Phosphorylierung von ERK 42 und ERK 44 wurde mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht (Abb. 22). Es zeigten sich weder für ERK 42 noch für ERK 44 signifikante Unterschiede im Phosphorylierungsgrad und in der Gesamtsynthese.

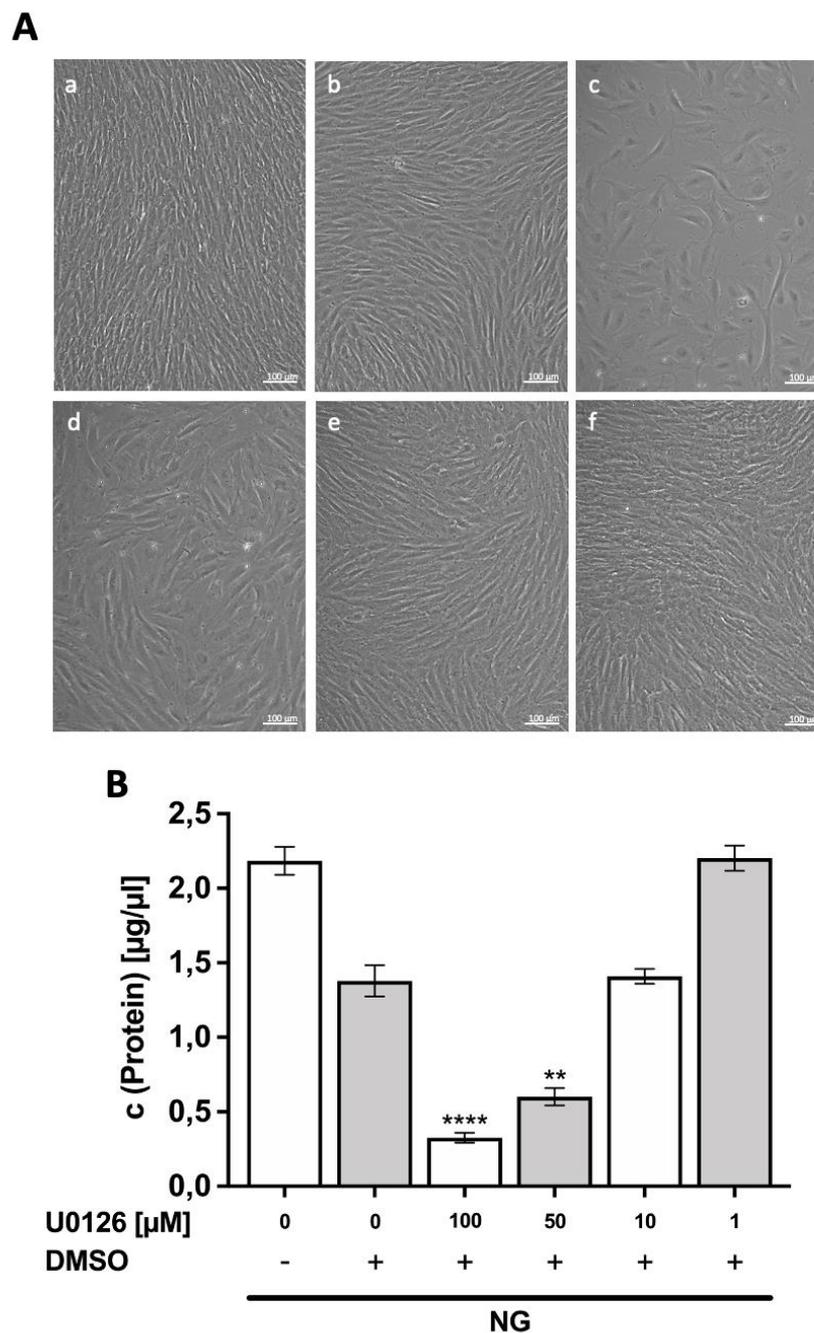


**Abb. 22: Phosphorylierung von ERK 42/44 unter PD98059-Behandlung**

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit PD98059 in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) und tERK 42/44 unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte keine signifikanten Veränderungen (B bis E). Marker GAPDH: 35 kDa. Die Marker-Banden von pERK und tERK liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin; Tyr = Tyrosin.

### 3.2.4 ERK 42/44-Inhibitor U0126

Alternativ zu PD98059 wurde U0126 als potenter Inhibitor von ERK 42 und ERK 44 und in Anlehnung an die Fachliteratur in den Konzentrationen 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 1  $\mu$ M getestet [58, 59, 64]. Die Kultivierung erfolgte ebenfalls ausschließlich unter NG-Bedingungen. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurde eine Vehikelkontrolle mit 1 % DMSO mitgeführt (Abb. 23). Unter Behandlung mit den beiden höchsten Konzentrationen zeigte sich in der Durchlichtmikroskopie ein reduziertes Zellwachstum sowie eine Abrundung der Zellen. Auch die DMSO-Behandlung sowie eine Behandlung mit 10  $\mu$ M U0126 führte mikroskopisch zu einer verminderten Zellzahl am Tag der Ernte. Die Auswertung der Proteinkonzentrationen zeigte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollbedingung eine signifikant verringerte Proteinkonzentration unter U0126-Konzentrationen von 100  $\mu$ M ( $p < 0,0001$ ) und 50  $\mu$ M ( $p = 0,001$ ). Zwischen allen weiteren Behandlungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 23: Einfluss des ERK 42/44-Inhibitors U0126 auf ovine VIC *in vitro***

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit U0126 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Morphologie und das Zellwachstum wurden mittels Durchlichtmikroskopie (A) sowie Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten (B) analysiert. Durch hohe Konzentrationen von U0126 kam es zu einer deutlich reduzierten Proteinkonzentration (A c, A d, B). a: Kontrolle; b: DMSO, c: 100 μM; d: 50 μM; e: 10 μM; f: 1 μM. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Maßstab 100 μM; 10-fache Vergrößerung. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie.

Die Wirkung von U0126 auf den Phosphorylierungsgrad von ERK 42 und ERK 44 wurde mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht (Abb. 24). Für eine Konzentration von 100 μM des Inhibitors konnten keine Western-Blot-Analysen durchgeführt werden, da die Proteinmenge zu gering war. In

allen anderen Konzentrationen führte U0126 sowohl für ERK 42 als auch für ERK 44 zu einer signifikant verminderten Phosphorylierung verglichen mit der unbehandelten Kontrolle mit AI-Stimulation (pERK 42:  $p = 0,0015$  für  $50 \mu\text{M}$ ;  $p = 0,0062$  für  $10 \mu\text{M}$ ;  $p = 0,0227$  für  $1 \mu\text{M}$ ; pERK 44:  $p = 0,0002$  für  $50 \mu\text{M}$ ;  $p = 0,0005$  für  $10 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$ ). Ohne eine Stimulation mit AI zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Phosphorylierungsgrad von ERK 42 und ERK 44 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Im Vergleich mit der Vehikelkontrolle zeigte sich sowohl mit als auch ohne AI-Stimulation eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von ERK 42 und ERK 44 (pERK 42-AI:  $p = 0,0001$  für  $50 \mu\text{M}$ ;  $p = 0,0003$  für  $10 \mu\text{M}$ ;  $p = 0,0004$  für  $1 \mu\text{M}$ ; pERK 42+AI:  $p < 0,0001$  für  $50 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$ ;  $p = 0,0001$  für  $1 \mu\text{M}$ ; pERK 44-AI:  $p = 0,0004$  für  $50 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$ ;  $p = 0,0002$  für  $1 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,0001$  für alle entsprechenden Vergleiche +AI). Innerhalb der unbehandelten Kontrolle führte die AI-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von ERK 44 ( $p = 0,0195$ ), während sich ein solcher Effekt in allen weiteren Behandlungsgruppen nicht zeigte. Die Gesamtsynthese von ERK 42 war unter Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  U0126 mit AI-Stimulation signifikant vermindert im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit AI-Stimulation ( $p = 0,0035$ ) und nahe signifikant vermindert im Vergleich zur Behandlung mit  $50 \mu\text{M}$  U0126 mit AI-Stimulation ( $p = 0,0563$ ). Auch die Gesamtsynthese von ERK 44 war unter Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  U0126 mit AI-Stimulation signifikant vermindert verglichen mit der Behandlung von  $50 \mu\text{M}$  U0126 mit AI-Stimulation ( $p = 0,0017$ ). Der Vergleich zwischen den übrigen Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtsynthese von ERK 42 und ERK 44.

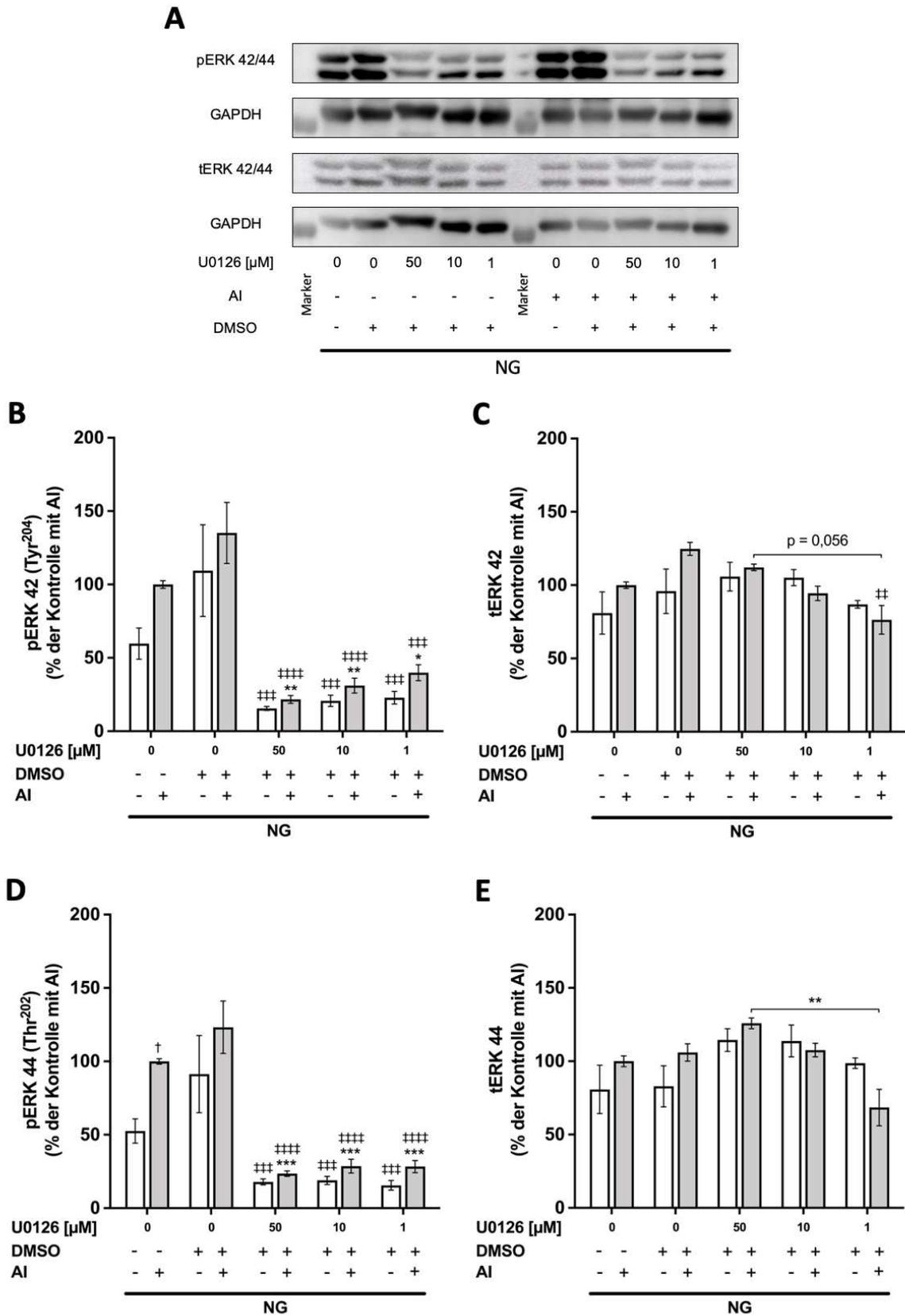


Abb. 24: Phosphorylierung von ERK 42/44 unter U0126-Behandlung

**Abb. 24: Phosphorylierung von ERK 42/44 unter U0126-Behandlung**

Ovine VIC wurden unter NG-Bedingungen mit U0126 in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) und tERK 42/44 unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) in allen Konzentrationsgruppen verglichen mit der Kontrolle (B, D). Marker GAPDH: 35 kDa. Die Marker-Banden von pERK und tERK liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  verglichen mit der entsprechenden unbehandelten Kontrolle bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI; ‡‡‡  $p < 0,001$ ; ‡‡‡‡  $p < 0,0001$  verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; DMSO = Dimethylsulfoxid; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin; Tyr = Tyrosin.

### 3.3 Inhibition von MTOR mit Rapamycin

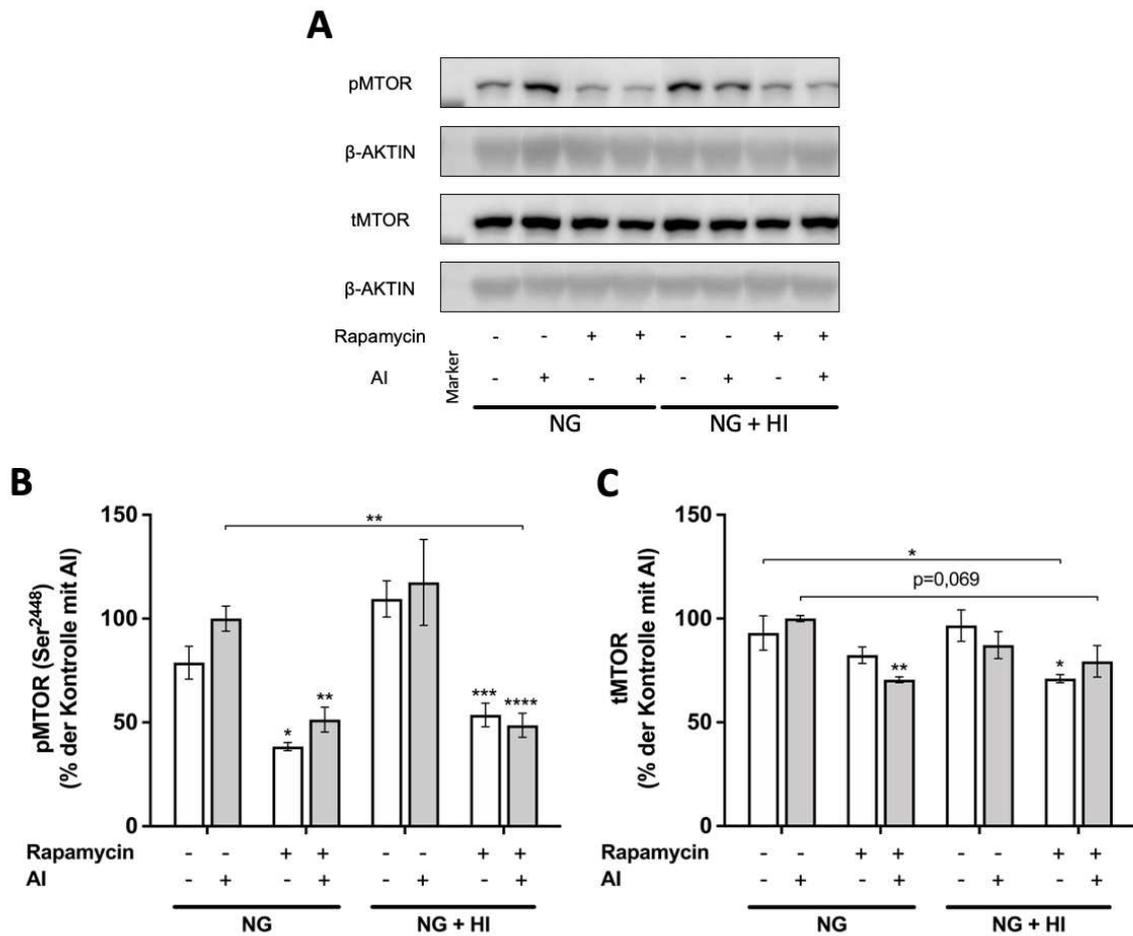
#### 3.3.1 Nachweis der Inhibitorwirkung in Western-Blot-Analysen

In der Etablierung der Inhibitoren wurde für Rapamycin eine optimale Konzentration von 10 nM festgelegt. Diese wurde im Folgenden auf den gesamten Versuchsaufbau mit NG-, HG- und HI-Bedingungen angewandt. Aufgrund der Menge der Proben musste die Analyse von NG und HG getrennt erfolgen. Als Vergleich diente in allen Gruppen jeweils die Vehikelkontrolle mit DMSO.

##### 3.3.1.1 Phosphorylierung von MTOR

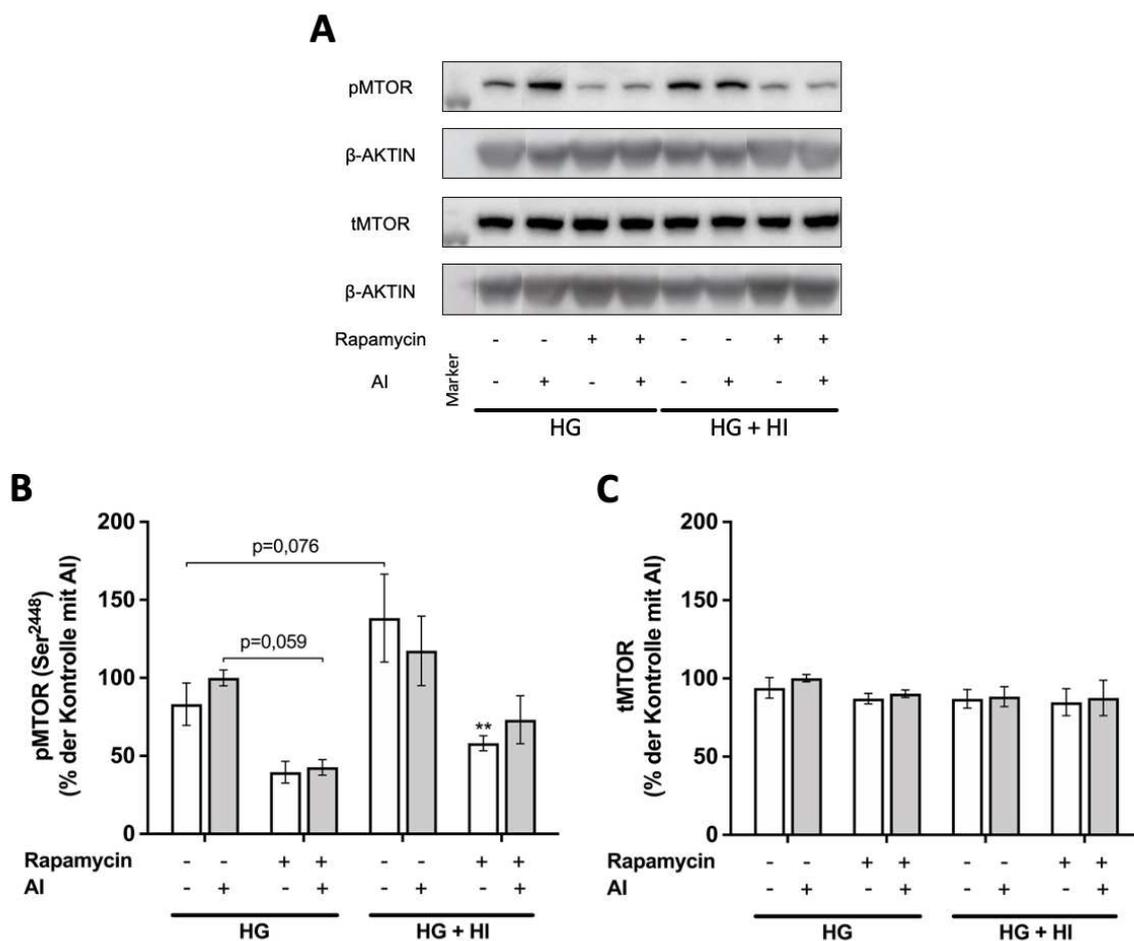
Der Nachweis der Inhibitor-Wirkung auf den Phosphorylierungsgrad von MTOR wurde mittels Western-Blot-Analyse näher untersucht (Abb. 25 und Abb. 26). Unter NG-Bedingungen (Abb. 25) war die Phosphorylierung von MTOR durch Rapamycin-Behandlung signifikant vermindert ( $p = 0,0231$  für NG-AI gegen NG+R-AI;  $p = 0,0038$  für NG+AI gegen NG+R+AI;  $p = 0,0007$  für NG+HI-AI gegen NG+HI+R-AI;  $p < 0,0001$  für NG+HI+AI gegen NG+HI+R+AI;  $p = 0,002$  für NG+AI gegen NG+HI+R+AI). Eine Stimulation mit AI führte zu keinen signifikanten Unterschieden im Vergleich zur gleichen Behandlungsgruppe ohne AI-Stimulation. Die Gesamtsynthese von MTOR war unter Rapamycin-Behandlung zum Teil ebenfalls signifikant oder im Trend vermindert ( $p = 0,003$  für NG+AI gegen NG+R+AI;  $p = 0,0127$  für NG+HI-AI gegen NG+HI+R-AI;  $p = 0,0435$  für NG-AI gegen NG+HI+R-AI;  $p = 0,0689$  für NG+AI gegen NG+HI+R+AI).

Unter HG-Bedingungen (Abb. 26) führte Rapamycin ebenfalls zu einer zum Teil signifikanten oder nahe signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von MTOR ( $p = 0,0029$  für HG+HI-AI gegen HG+HI+R-AI;  $p = 0,0594$  für HG+AI gegen HG+R+AI). Weitere signifikante Veränderungen zeigten sich nicht. Die Gesamtsynthese von MTOR zeigte unter HG-Bedingungen keine signifikanten Veränderungen.



**Abb. 25: Phosphorylierung von MTOR unter Rapamycin-Behandlung in NG und NG+HI**

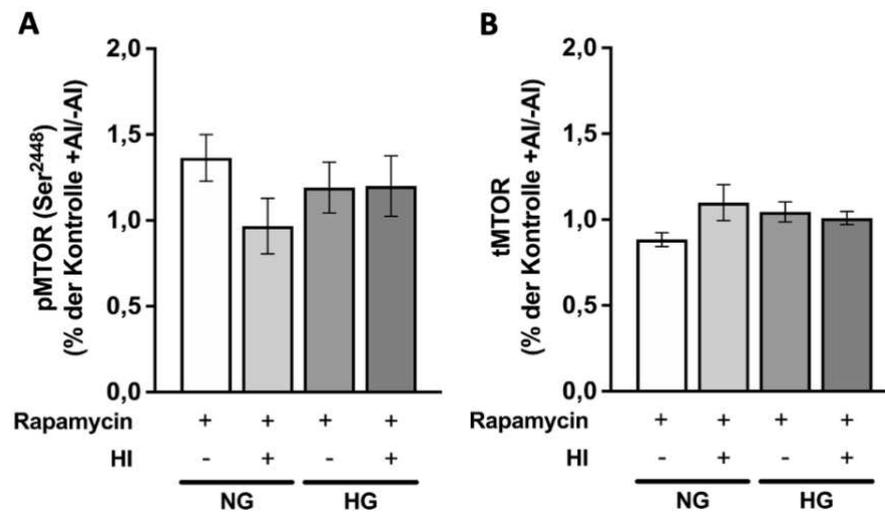
Die Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) mit 10 nM Rapamycin-Behandlung wurde unter NG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pMTOR (Ser<sup>2448</sup>) und tMTOR unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) durch Rapamycin-Behandlung (B). Marker pMTOR und tMTOR: 250 kDa. Die Marker-Banden von  $\beta$ -Aktin liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle bzw. wie eingezeichnet. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.



**Abb. 26: Phosphorylierung von MTOR unter Rapamycin-Behandlung in HG und HG+HI**

Die Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) mit 10 nM Rapamycin-Behandlung wurde unter HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pMTOR (Ser<sup>2448</sup>) und tMTOR unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine zum Teil signifikante Reduktion der Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) durch Rapamycin-Behandlung (B). Für tMTOR gab es keine Unterschiede in der Proteinbiosynthese (C). Marker pMTOR und tMTOR: 250 kDa. Die Marker-Banden von  $\beta$ -Aktin liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*\*  $p < 0,01$  verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

Relative Veränderungen in der Phosphorylierung von MTOR durch Rapamycin-Behandlung wurden untersucht, indem die verschiedenen diabetischen Kultivierungsbedingungen als Quotient aus +AI-Stimulus durch -AI-Stimulus gegeneinander aufgetragen wurden (Abb. 27). Weder im Phosphorylierungsgrad noch in der Gesamtsynthese von MTOR zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede.



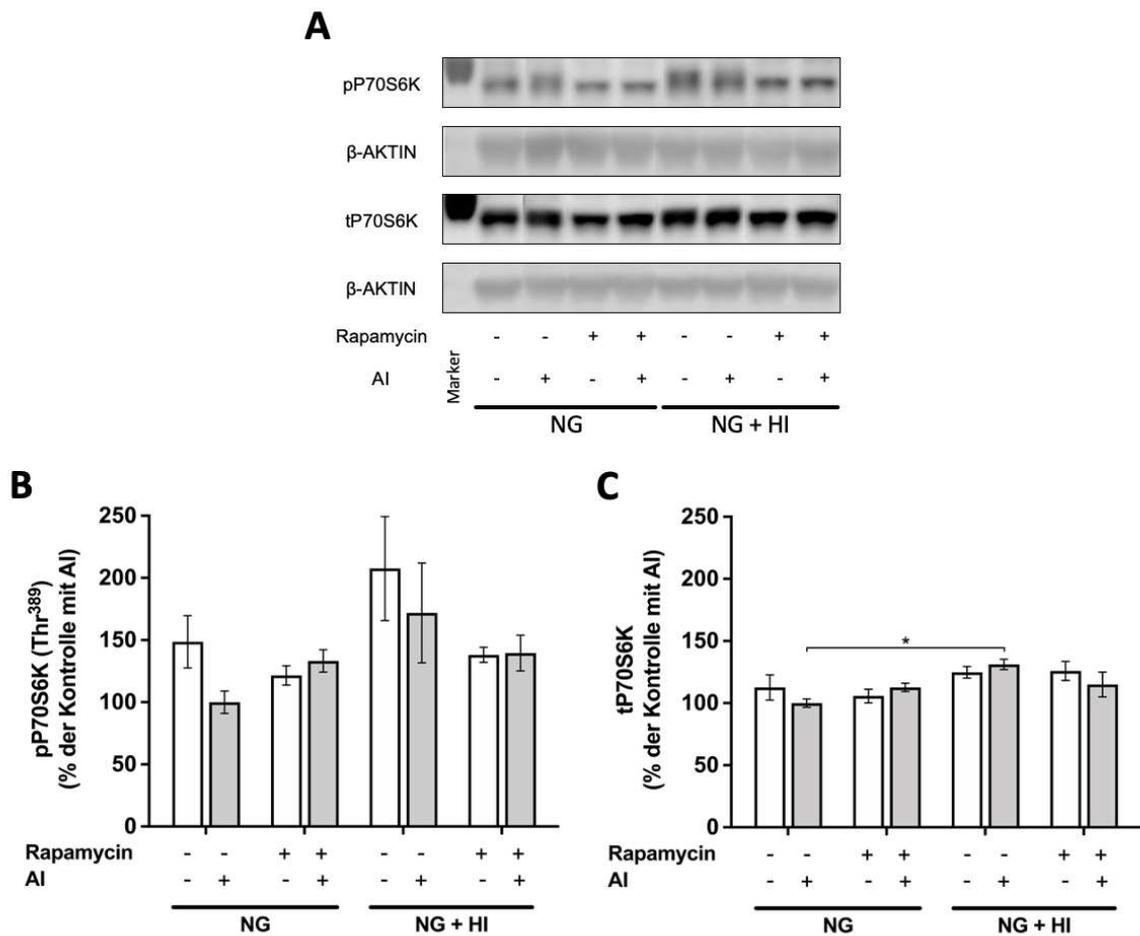
**Abb. 27: Relative Phosphorylierung von MTOR unter Rapamycin-Behandlung**

Die Phosphorylierung von MTOR (Ser<sup>2448</sup>) mit 10 nM Rapamycin-Behandlung wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (A, B). Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 25 und 26 dargestellt. Abgebildet ist der Quotient aus den +AI/-AI-Gruppen. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; Ser = Serin; t = total.

### 3.3.1.2 Phosphorylierung von P70S6K

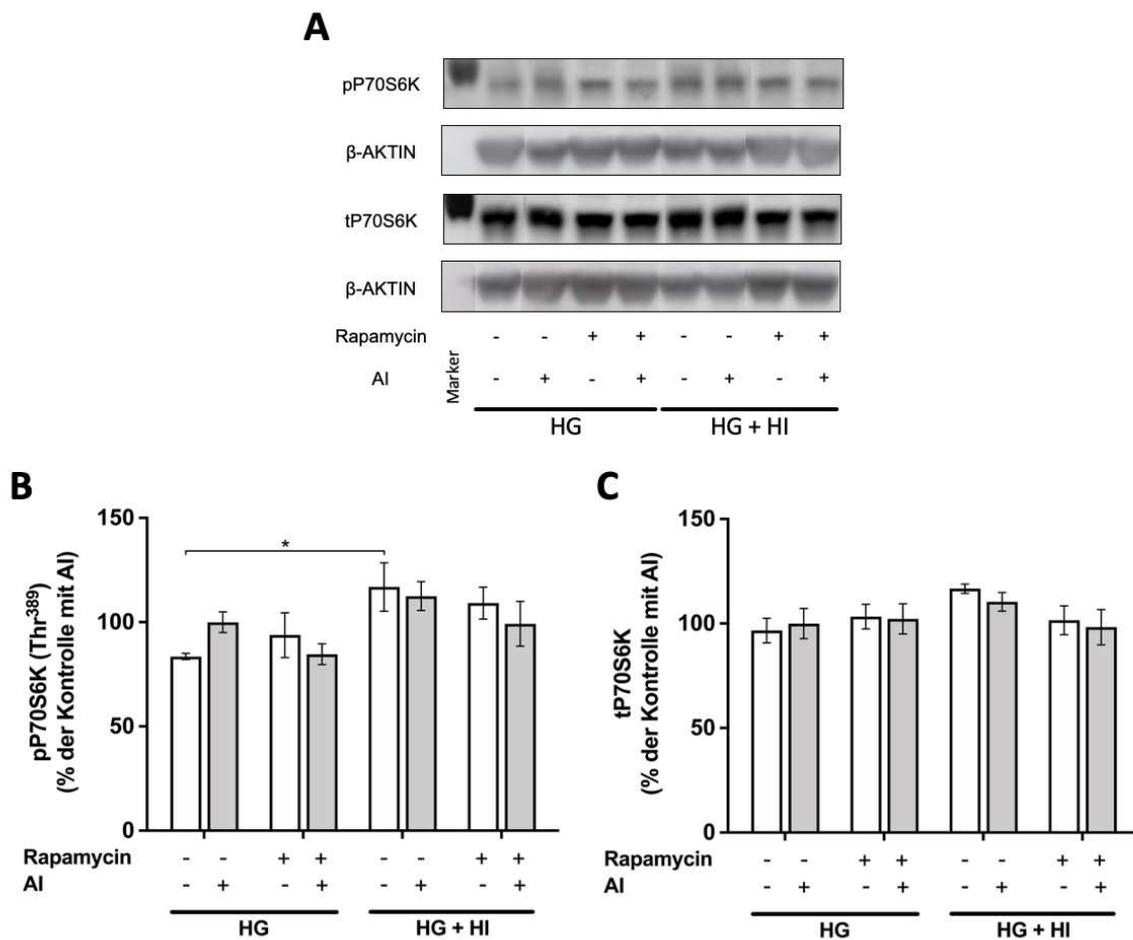
Inwiefern die Phosphorylierung von P70S6K als nachgeschaltetes Signalprotein von MTOR unter Rapamycin-Behandlung inhibiert wird, wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht (Abb. 28 und Abb. 29). Der Phosphorylierungsgrad von P70S6K wurde unter einer Behandlung mit Rapamycin sowohl unter NG- als auch unter HG-Bedingungen nicht signifikant verändert.

Unter HG-Bedingungen ohne AI-Stimulation zeigte sich eine signifikant erhöhte Phosphorylierung unter HI-Behandlung im Vergleich zur HG-Kontrolle ( $p = 0,0441$ ). Die Gesamtsynthese von P70S6K wies unter HG-Bedingungen keine signifikanten Veränderungen zwischen den Behandlungsbedingungen auf. Unter Behandlung mit NG+HI und AI-Stimulation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Gesamtsynthese von P70S6K verglichen mit der NG-Kontrolle mit AI-Stimulation ( $p = 0,0171$ ). Der Vergleich zwischen weiteren Behandlungsgruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 28: Phosphorylierung von P70S6K unter Rapamycin-Behandlung in NG und NG+HI**

Die Phosphorylierung von P70S6K (Thr<sup>389</sup>) mit 10 nM Rapamycin-Behandlung wurde unter NG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pP70S6K (Thr<sup>389</sup>) und tP70S6K unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte zwischen der Rapamycin-Behandlung und der entsprechenden Kontrolle keine signifikanten Unterschiede (B, C). Marker pP70S6K und tP70S6K: 70 kDa. Die Marker-Banden von  $\beta$ -Aktin liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*  $p < 0,05$ . Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin.



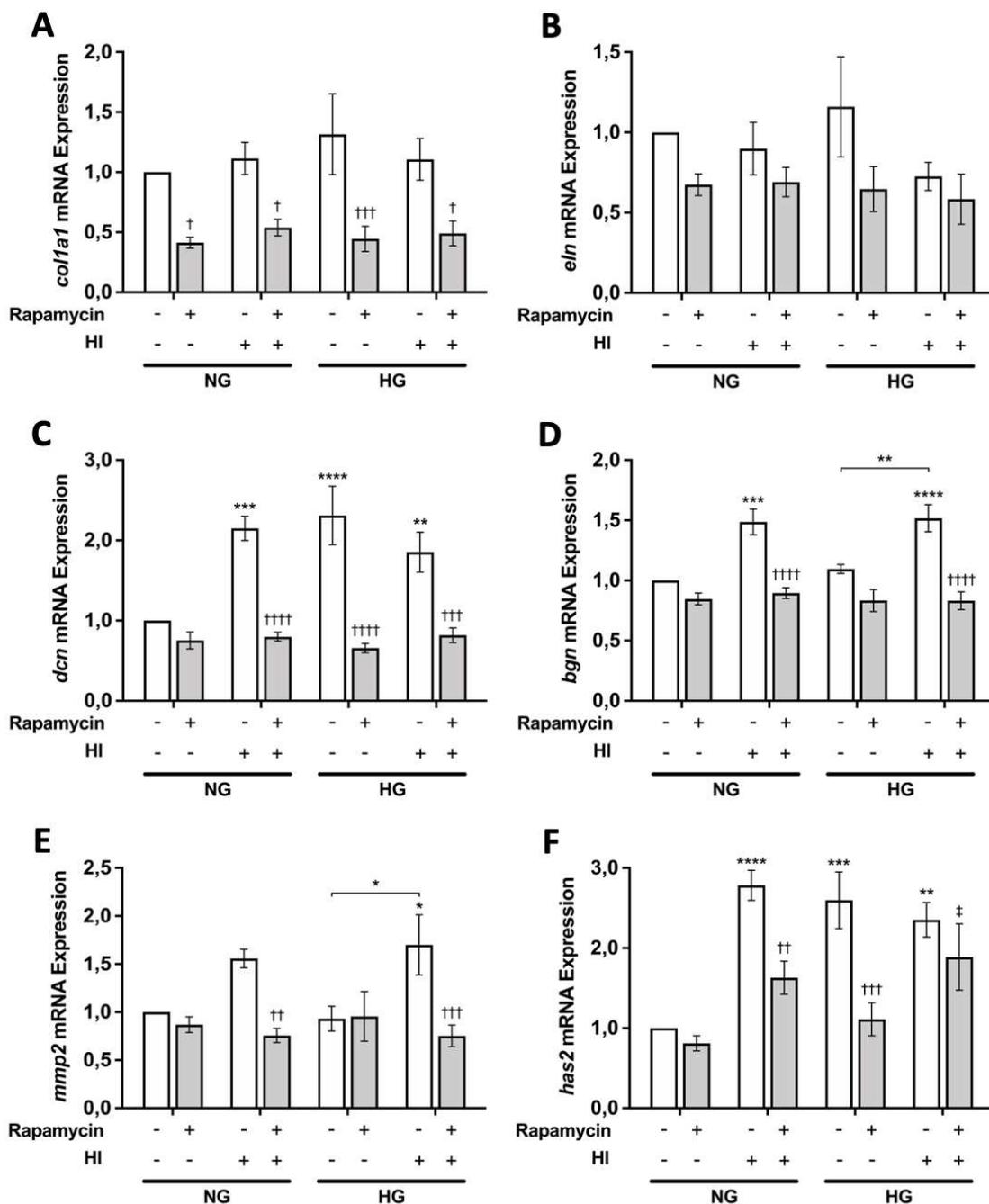
**Abb. 29: Phosphorylierung von P70S6K unter Rapamycin-Behandlung in HG und HG+HI**

Die Phosphorylierung von P70S6K (Thr<sup>389</sup>) mit 10 nM Rapamycin-Behandlung wurde unter HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pP70S6K (Thr<sup>389</sup>) und tP70S6K unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte zwischen der Rapamycin-Behandlung und der entsprechenden Kontrolle keine signifikanten Unterschiede (B, C). Marker pP70S6K und tP70S6K: 70 kDa. Die Marker-Banden von β-Aktin liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*  $p < 0,05$ . Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin.

### 3.3.2 mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulären Matrix

Der Effekt von Rapamycin auf die Expression von Molekülen der EZM wurde mittels PCR untersucht. Die mRNA-Expression der Gene *coll1a1*, *eln*, *dcn*, *bgn*, *mmp2*, *has2* sowie *mmp9* wurde hierbei näher beleuchtet (Abb. 30). Für *mmp9* konnte keine mRNA-Expression detektiert werden. Die mRNA-Expression von *eln* wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsbedingungen auf. Alle weiteren Gene zeigten unter Rapamycin-Behandlung eine reduzierte Genexpression in unterschiedlicher Ausprägung.

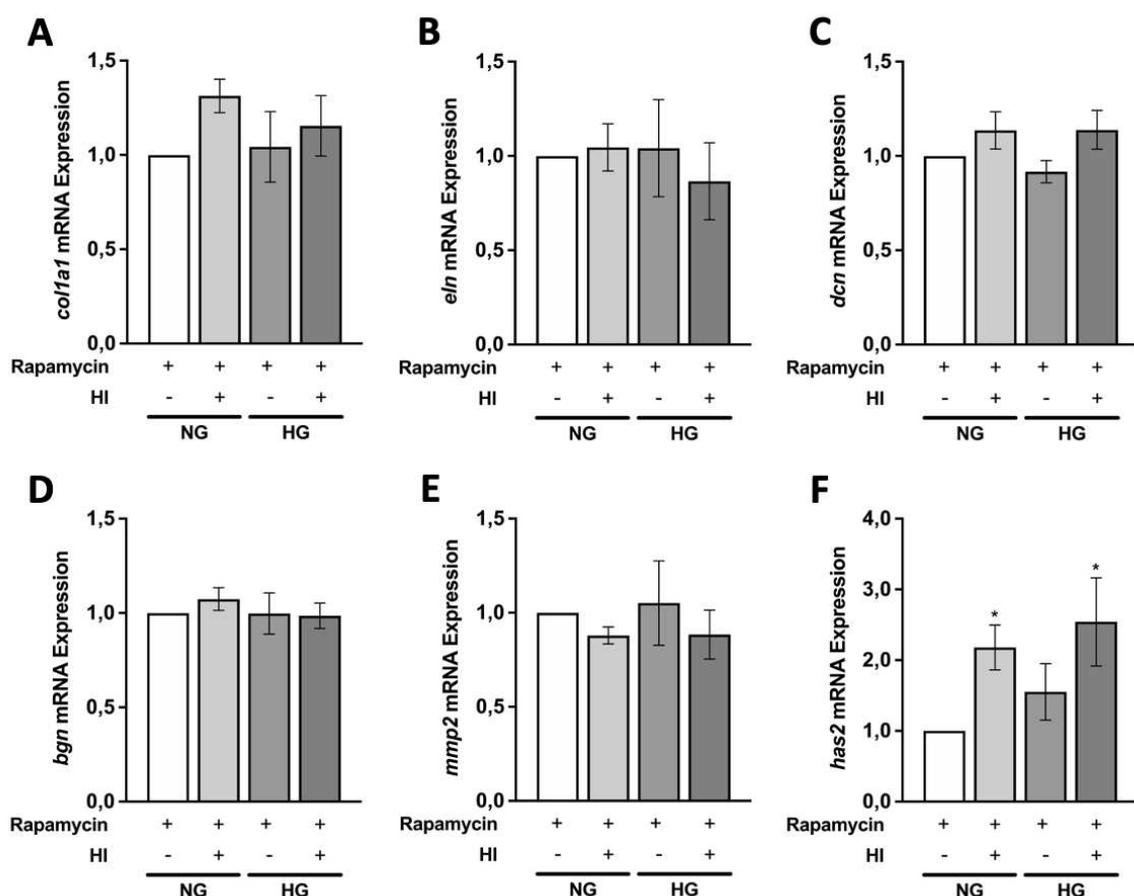
Die Expression von *coll1a1* wurde in allen Behandlungsbedingungen unter Rapamycin-Behandlung signifikant verringert ( $p = 0,0379$  für NG gegen NG+R;  $p = 0,0439$  für NG+HI gegen NG+HI+R;  $p = 0,0009$  für HG gegen HG+R;  $p = 0,0268$  für HG+HI gegen HG+HI+R). *Dcn* und *has2* wiesen durch Behandlung mit HG oder bzw. und HI eine signifikant erhöhte Genexpression im Vergleich zur NG-Kontrolle auf (*dcn*:  $p = 0,0002$  für NG gegen NG+HI;  $p < 0,0001$  für NG gegen HG;  $p = 0,0071$  für NG gegen HG+HI; *has2*:  $p < 0,0001$  für NG gegen NG+HI;  $p = 0,0002$  für NG gegen HG;  $p = 0,0016$  für NG gegen HG+HI). Unter Rapamycin-Behandlung war die Genexpression von *dcn* in den drei genannten Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne Rapamycin signifikant vermindert, während sich unter NG-Bedingungen durch Rapamycin-Behandlung keine signifikanten Unterschiede zeigten ( $p < 0,0001$  für NG+HI gegen NG+HI+R;  $p < 0,0001$  für HG gegen HG+R;  $p = 0,0005$  für HG+HI gegen HG+HI+R). Für *has2* war die Genexpression unter Rapamycin-Behandlung unter NG+HI-Bedingungen ( $p = 0,0063$ ) und unter HG-Bedingungen ( $p = 0,0003$ ) signifikant vermindert. Unter HG+HI-Bedingungen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression verglichen mit der NG-Kontrolle mit Rapamycin ( $p = 0,0175$ ). Die mRNA-Expression von *bgn* zeigte unter HI-Behandlung einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Kontrollgruppen NG und HG ( $p = 0,0002$  für NG gegen NG+HI;  $p = 0,0012$  für HG gegen HG+HI;  $p < 0,0001$  für NG gegen HG+HI). Unter einer Behandlung der Zellen mit Rapamycin wurde die mRNA-Expression von *bgn* unter HI-Bedingungen signifikant reduziert ( $p < 0,0001$  für NG+HI gegen NG+HI+R;  $p < 0,0001$  für HG+HI gegen HG+HI+R), während unter NG- und HG-Bedingungen keine signifikanten Unterschiede auftraten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für *mmp2*. Auch hier wurde die mRNA-Expression unter einer Behandlung mit Rapamycin unter HI-Bedingungen signifikant reduziert ( $p = 0,0047$  für NG+HI gegen NG+HI+R;  $p = 0,0007$  für HG+HI gegen HG+HI+R). Ohne Rapamycin-Behandlung führte eine Behandlung der Zellen mit HG+HI zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von *mmp2* verglichen mit der NG- ( $p = 0,0224$ ) sowie der HG-Kontrolle ( $p = 0,0107$ ).



**Abb. 30: Effekt von Rapamycin auf die mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulärmatix**

Der Einfluss Rapamycins auf die relative mRNA-Expression verschiedener Moleküle der Extrazellulärmatix wurde mittels PCR analysiert. Es zeigte sich eine zum Teil signifikante Reduktion der mRNA-Expression unter Rapamycin-Behandlung in verschiedenen Behandlungsbedingungen (A, C bis F). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der NG-Kontrolle bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ; ††††  $p < 0,0001$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne Rapamycin; ‡  $p < 0,05$  verglichen mit der Behandlung NG mit Rapamycin. Abkürzungen: *coll1a1* = Kollagen Typ 1; *bgn* = Biglykan; *dcn* = Dekorin; *eln* = Elastin; *has2* = Hyaluronsynthase 2; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *mmp* = Matrix-Metalloprotease; NG = Normglykämie.

Um den Einfluss diabetischer Bedingungen unter Rapamycin-Behandlung darzustellen, wurden im Folgenden isoliert die Gruppen NG+R, NG+HI+R, HG+R und HG+HI+R miteinander verglichen (Abb. 31). Hierbei zeigte sich für *has2* eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression unter HI-Bedingungen im Vergleich zur Behandlung NG+R ( $p = 0,0292$  für NG+R gegen NG+HI+R;  $p = 0,0357$  für NG+R gegen HG+HI+R). Alle anderen Moleküle der EZM, für welche in der PCR eine Genexpression nachgewiesen werden konnte (*coll1a1*, *eln*, *dcn*, *bgn*, *mmp2*), wiesen unter Rapamycin-Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression durch die verschiedenen diabetischen Bedingungen auf.



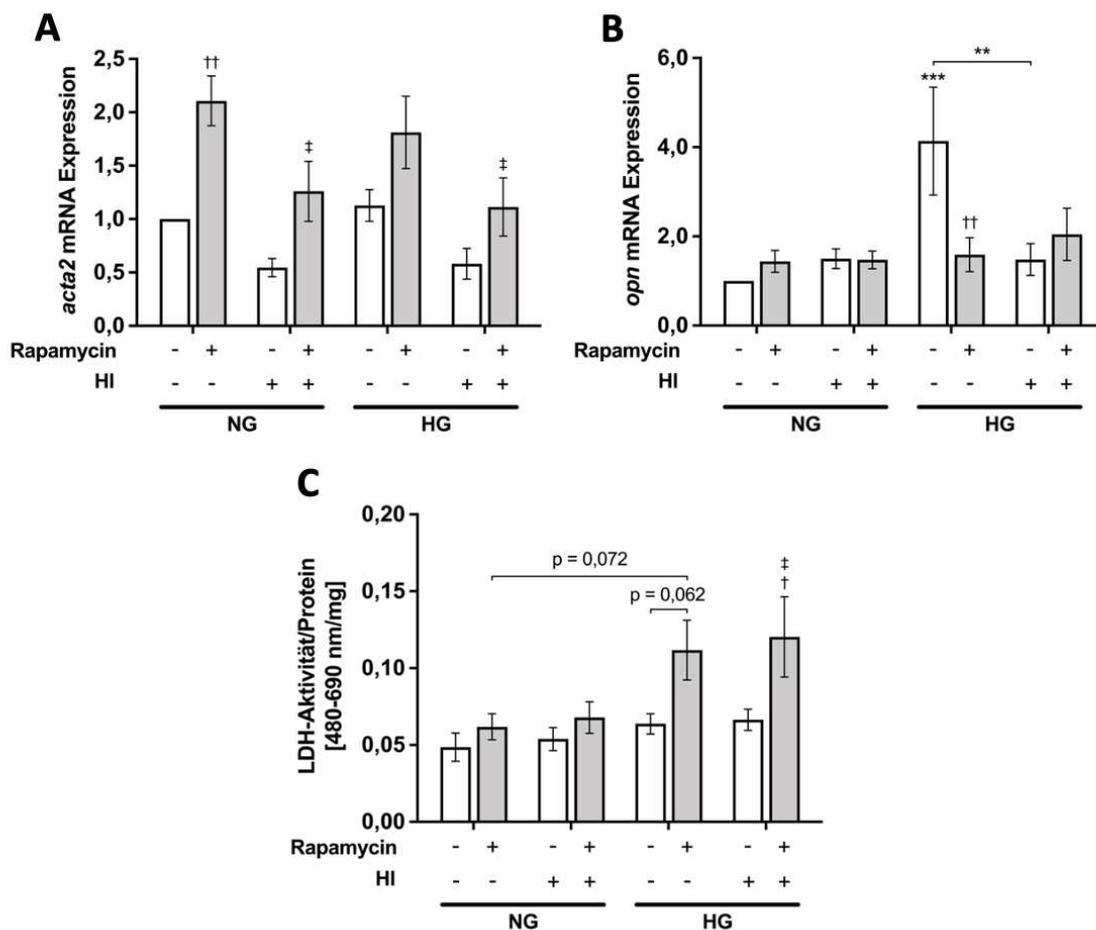
**Abb. 31: mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulärmatrix unter Rapamycin-Behandlung**

Die relative mRNA-Expression verschiedener Moleküle der Extrazellulärmatrix unter Rapamycin-Behandlung wurde unter NG-, HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression von *has2* unter HI-Behandlung (F). \*  $p < 0,05$  verglichen mit der Kontrollbehandlung NG+Rapamycin. Abkürzungen: *coll1a1* = Kollagen Typ 1; *bgn* = Biglykan; *dcn* = Dekorin; *eln* = Elastin; *has2* = Hyaluronansynthase 2; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *mmp* = Matrix-Metalloprotease; NG = Normoglykämie.

### 3.3.3 mRNA-Expression und Aktivität von Degenerations- und Differenzierungsmarkern

Ein Einfluss von Rapamycin auf die Degenerationsmarker *opn* und *alpl* sowie auf den Differenzierungsmarker *acta2* wurde ebenfalls mittels PCR analysiert (Abb. 32). Während für *alpl* keine Expression nachweisbar war, zeigte sich für *opn* eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression unter HG-Behandlung verglichen mit der NG-Behandlung ( $p = 0,0007$ ). Eine Behandlung mit Rapamycin führte unter jener Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der *opn* mRNA-Expression ( $p = 0,0052$ ). Ebenso war die Genexpression von *opn* unter HG+HI signifikant vermindert zur Behandlung mit HG ( $p = 0,0051$ ). Rapamycin führte hingegen für *acta2* unter NG-Bedingungen zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression ( $p = 0,0027$ ). Unter NG+HI- ( $p = 0,0454$ ) und HG+HI-Bedingungen ( $p = 0,0121$ ) zeigte sich demgegenüber eine signifikante Reduktion der Genexpression verglichen mit der Behandlung NG+R.

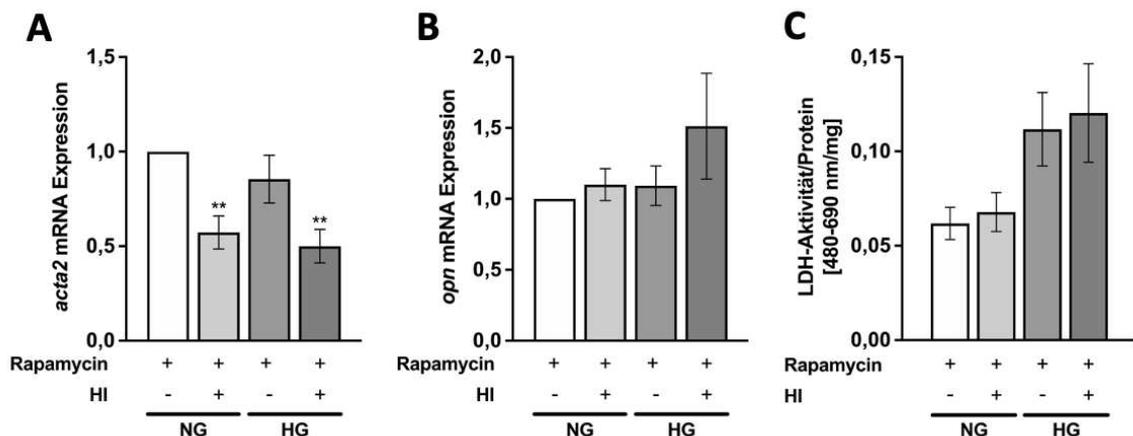
Ein potenzieller Einfluss von Rapamycin auf die Vitalität oviner VIC wurde mithilfe eines LDH-Assays untersucht (Abb. 32). Dabei führte eine Behandlung mit Rapamycin unter HG+HI-Behandlung zu einer signifikanten Zunahme der LDH-Aktivität sowohl im Vergleich zur gleichen Behandlung ohne Rapamycin ( $p = 0,0282$ ) als auch verglichen mit der Behandlung NG+R ( $p = 0,0221$ ). Unter HG-Bedingungen zeigte sich diese Zunahme der LDH-Aktivität ebenfalls als Trend ( $p = 0,0619$  für HG gegen HG+R).



**Abb. 32: Effekt von Rapamycin auf die mRNA-Expression und Aktivität von Differenzierungs- und Degenerationsmarkern**

Der Einfluss Rapamycins auf die relative mRNA-Expression von Differenzierungs- und Degenerationsmarkern wurde mittels PCR analysiert. Es zeigte sich eine zum Teil signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von *acta2* (A) sowie eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression von *opn* (B) unter Rapamycin-Behandlung. Der Einfluss auf die Vitalität oviner VIC durch Rapamycin-Behandlung wurde mithilfe eines LDH-Assays im Überstand der Zellen überprüft. Die Rapamycin-Behandlung erhöhte unter HG-Bedingungen die LDH-Aktivität (C). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  verglichen mit der NG-Kontrolle bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne Rapamycin; ‡  $p < 0,05$  verglichen mit der Behandlung NG+Rapamycin. Abkürzungen: *acta2* = Glattmuskelaktin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; LDH = Laktatdehydrogenase; NG = Normoglykämie; *opn* = Osteopontin.

Um den Einfluss diabetischer Bedingungen unter Rapamycin-Behandlung darzustellen, wurden im Folgenden die Gruppen NG+R, NG+HI+R, HG+R und HG+HI+R isoliert miteinander verglichen (Abb. 33). Es zeigte sich eine signifikante Verringerung des Differenzierungsmarkers *acta2* unter HI-Bedingungen verglichen mit der NG-Kontrolle mit Rapamycin ( $p = 0,0045$  für NG+R gegen NG+HI+R;  $p = 0,0022$  für NG+R gegen HG+HI+R). Für den Degenerationsmarker *opn* wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen nachgewiesen. Ebenso war die LDH-Aktivität als weiterer Degenerationsmarker nicht signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen diabetischen Bedingungen unter Rapamycin-Behandlung.



**Abb. 33: mRNA-Expression und Aktivität von Differenzierungs- und Degenerationsmarkern unter Rapamycin-Behandlung**

Die relative mRNA-Expression und Aktivität verschiedener Differenzierungs- und Degenerationsmarker unter Rapamycin-Behandlung wurde unter NG-, HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Verringerung der relativen mRNA-Expression von *acta2* unter HI-Behandlung (A). \*\*  $p < 0,01$  verglichen mit der Kontrollbehandlung NG+Rapamycin. Abkürzungen: *acta2* = Glattmuskelaktin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; LDH = Laktatdehydrogenase; NG = Normoglykämie; *opn* = Osteopontin.

## 3.4 Inhibition von ERK 42/44 mit U0126

### 3.4.1 Nachweis der Inhibitorwirkung in Western-Blot-Analysen

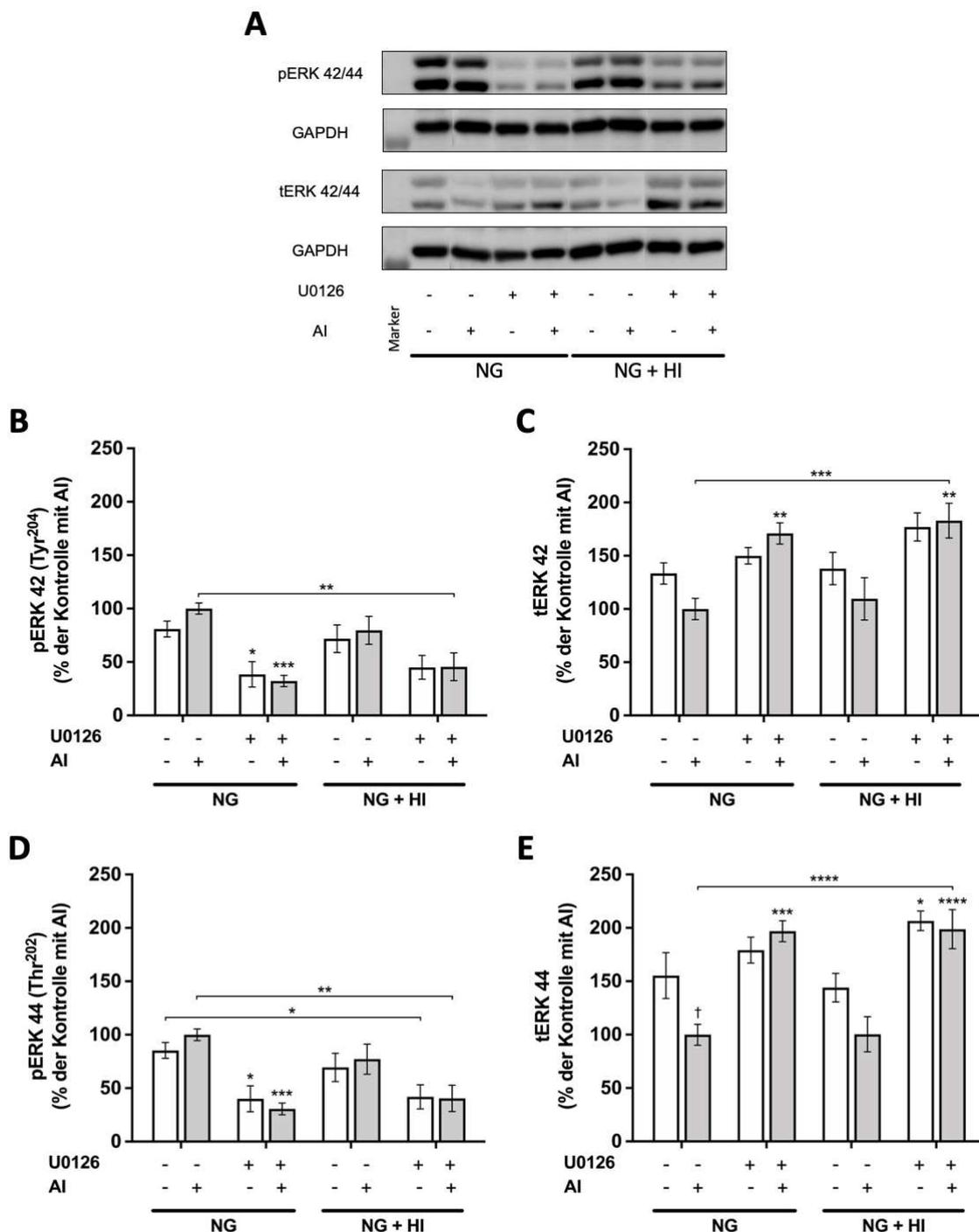
In der Etablierung der Inhibitoren wurde für U0126 eine optimale Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  festgelegt. Diese wurde im Folgenden auf den gesamten Versuchsaufbau mit NG-, HG- und HI-Bedingungen angewandt. Aufgrund der Menge der Proben musste die Analyse von NG und HG getrennt erfolgen. Als Vergleich diente in allen Gruppen jeweils die Vehikelkontrolle mit DMSO.

#### 3.4.1.1 Phosphorylierung von ERK 42 und ERK 44

Die Wirkung des Inhibitors U0126 auf den Phosphorylierungsgrad von ERK 42 und ERK 44 wurde mittels Western-Blot-Analysen näher untersucht (Abb. 34 und Abb. 35). Unter NG-Bedingungen führte U0126 zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von ERK 42 sowie ERK 44 im Vergleich zur NG-Kontrolle (pERK 42:  $p = 0,0364$  für NG-AI gegen NG+U-AI;  $p = 0,0002$  für NG+AI gegen NG+U+AI; pERK 44:  $p = 0,0257$  für NG-AI gegen NG+U-AI;  $p = 0,0002$  für NG+AI gegen NG+U+AI). Unter HI-Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede durch U0126 im Vergleich zur Behandlung NG+HI, allerdings waren die Phosphorylierungsgrade ebenfalls signifikant geringer verglichen mit der NG-Kontrolle ohne HI (pERK 42:  $p = 0,0036$  für NG+AI gegen NG+HI+U+AI; pERK 44:  $p = 0,0356$  für NG-AI gegen NG+HI+U-AI;  $p = 0,0015$  für NG+AI gegen

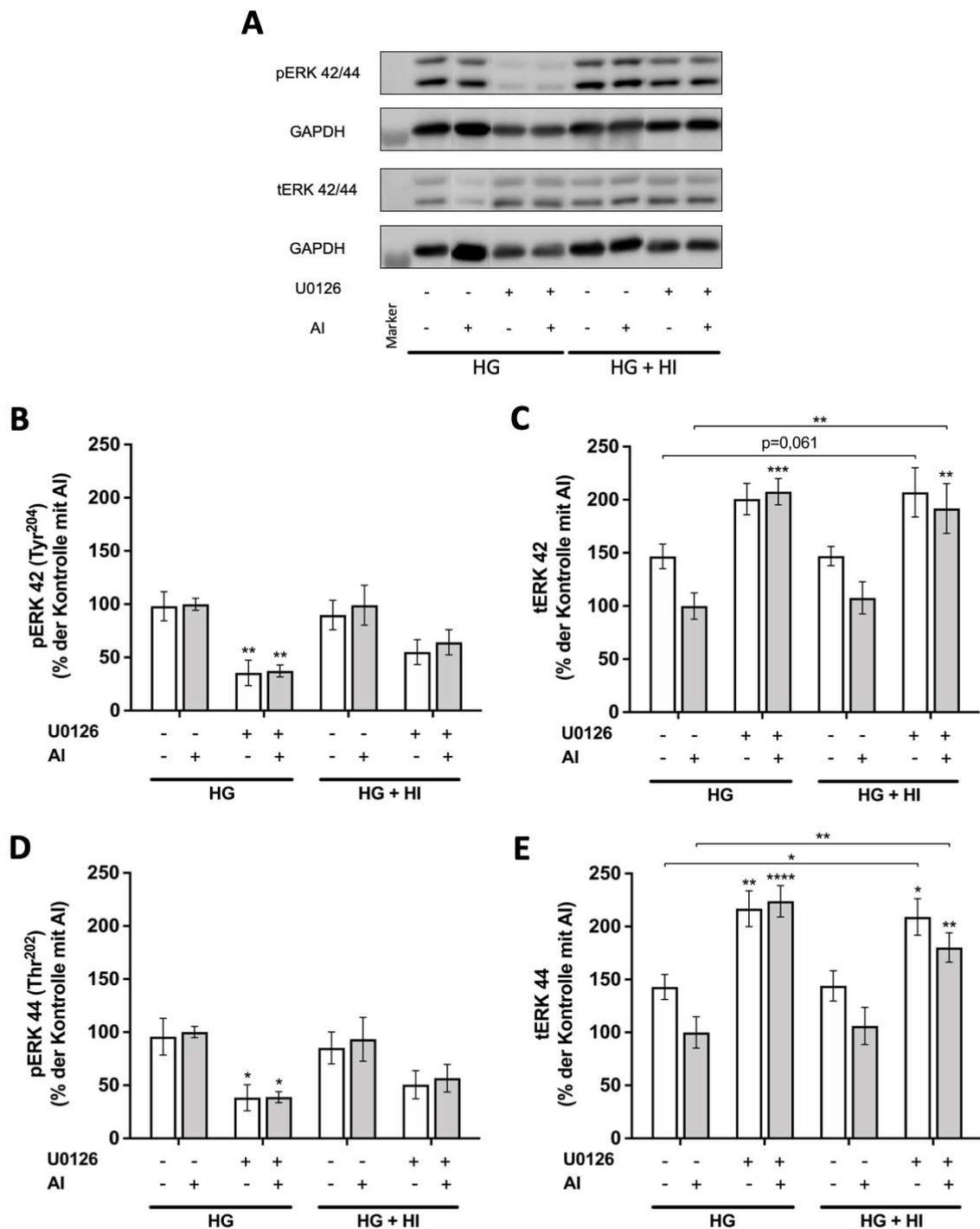
NG+HI+U+AI). Eine Stimulation mit AI führte zu keiner signifikanten Änderung der Phosphorylierung von ERK 42 oder ERK 44. Die Gesamtsynthese von ERK 42 und ERK 44 war unter Behandlung mit U0126 erhöht. Insbesondere mit AI-Stimulation waren die Unterschiede für beide Proteine unabhängig von einer Inkubation mit HI signifikant (tERK 42:  $p = 0,0028$  für NG gegen NG+U;  $p = 0,0004$  für NG gegen NG+HI+U;  $p = 0,0019$  für NG+HI gegen NG+HI+U; tERK 44:  $p = 0,0001$  für NG gegen NG+U;  $p < 0,0001$  für NG gegen NG+HI+U;  $p < 0,0001$  für NG+HI gegen NG+HI+U). Für tERK 44 zeigte sich unter HI-Bedingungen auch ohne AI-Stimulation ein signifikanter Anstieg der Gesamtsynthese unter U0126-Behandlung verglichen mit der Kontrolle NG+HI ( $p = 0,0213$ ). Darüber hinaus führte der AI-Stimulus in der Vehikelkontrolle zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtsynthese (tERK 44:  $p = 0,0367$ ).

Unter HG-Bedingungen führte eine Behandlung mit U0126 ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Phosphorylierung von ERK 42 sowie ERK 44 (pERK 42:  $p = 0,0044$  für HG-AI gegen HG+U-AI;  $p = 0,0043$  für HG+AI gegen HG+U+AI; pERK 44:  $p = 0,0275$  für HG-AI gegen HG+U-AI;  $p = 0,0158$  für HG+AI gegen HG+U+AI). Der zu beobachtende Effekt war unter zusätzlicher Inkubation mit HI nicht mehr signifikant. Wie auch unter NG-Bedingungen führte eine Stimulation mit AI zu keinem signifikanten Unterschied in der Phosphorylierung von ERK 42/44. Die Gesamtsynthese von ERK 42 und ERK 44 zeigte auch unter HG-Bedingungen einen signifikanten Anstieg unter Behandlung mit U0126. Für tERK 42 beschränkte sich diese Beobachtung ausschließlich auf die Behandlungsgruppen mit AI-Stimulation ( $p = 0,0001$  für HG gegen HG+U;  $p = 0,0011$  für HG gegen HG+HI+U;  $p = 0,0032$  für HG+HI gegen HG+HI+U). Ohne AI-Stimulation zeigte sich lediglich ein Trend zwischen den Bedingungen HG ohne U0126 und HG+HI mit U0126 ( $p = 0,0612$ ). Für tERK 44 war die Gesamtsynthese in allen Behandlungsgruppen unter der Inhibitor-Behandlung mit U0126 signifikant erhöht verglichen mit den Kontrollbehandlungen ohne U0126 ( $p = 0,0076$  für HG-AI gegen HG+U-AI;  $p = 0,0216$  für HG-AI gegen HG+HI+U-AI;  $p = 0,0244$  für HG+HI-AI gegen HG+HI+U-AI;  $p < 0,0001$  für HG+AI gegen HG+U+AI;  $p = 0,0031$  für HG+AI gegen HG+HI+U+AI;  $p = 0,0073$  für HG+HI+AI gegen HG+HI+U+AI).



**Abb. 34: Phosphorylierung von ERK 42/44 unter U0126-Behandlung in NG und NG+HI**

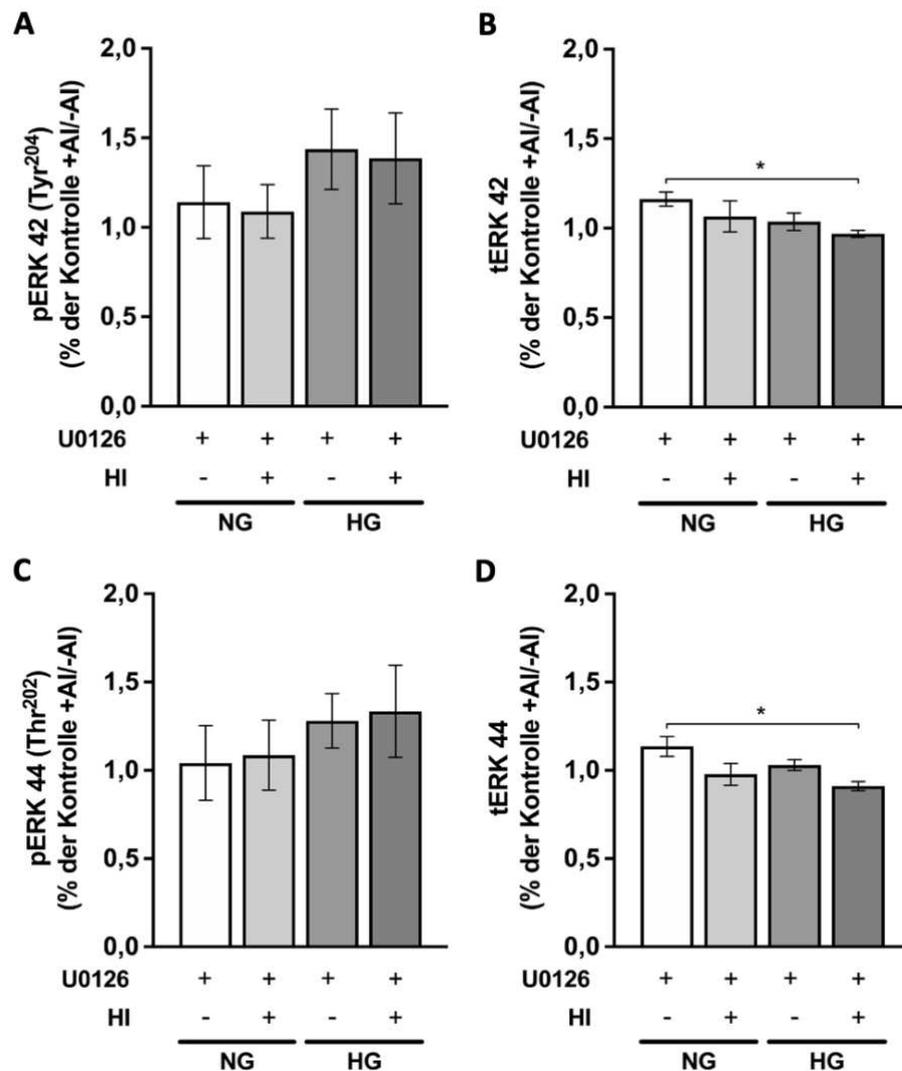
Die Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) mit 10  $\mu$ M U0126-Behandlung wurde unter NG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) und tERK 42/44 unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) durch U0126-Behandlung (B, D). Die Proteinbiosynthese von tERK 42/44 war unter U0126-Behandlung zum Teil signifikant erhöht (C, E). Marker GAPDH: 35 kDa. Die Marker-Banden von pERK und tERK liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$  verglichen mit der gleichen Bedingung ohne AI. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin; Tyr = Tyrosin.



**Abb. 35: Phosphorylierung von ERK 42/44 unter U0126-Behandlung in HG und HG+HI**

Die Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) mit 10  $\mu$ M U0126-Behandlung wurde unter HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) und tERK 42/44 unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte unter HG-Bedingungen eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) durch U0126-Behandlung (B, D). Die Proteinbiosynthese von tERK 42/44 war unter U0126-Behandlung erhöht (C, E). Marker GAPDH: 35 kDa. Die Marker-Banden von pERK und tERK liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle bzw. wie eingezeichnet. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin; Tyr = Tyrosin.

Relative Veränderungen in der Phosphorylierung von ERK 42/44 durch U0126-Behandlung wurden untersucht, indem die verschiedenen diabetischen Kultivierungsbedingungen als Quotient aus +AI-Stimulus durch -AI-Stimulus gegeneinander aufgetragen wurden (Abb. 36). Im Phosphorylierungsgrad zeigten sich hierbei weder für ERK 42 noch für ERK 44 signifikante Unterschiede. Sowohl für ERK 42 ( $p = 0,0420$ ) als auch für ERK 44 ( $p = 0,0207$ ) war hingegen die Gesamtsynthese unter HG+HI-Bedingungen signifikant vermindert verglichen mit der NG-Bedingung.



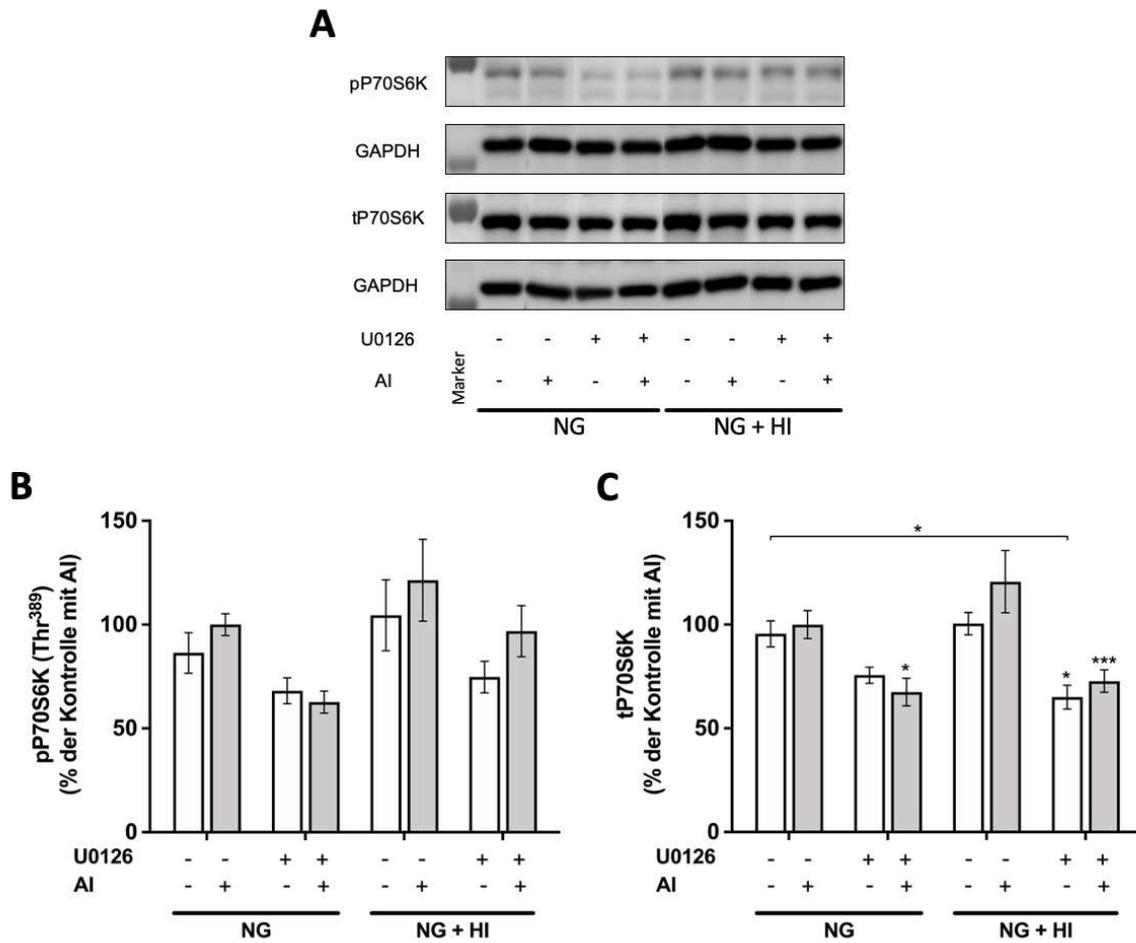
**Abb. 36: Relative Phosphorylierung von ERK 42/44 unter U0126-Behandlung**

Die Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) mit 10  $\mu$ M U0126-Behandlung wurde unter NG-, HG- und HI-Behandlung in ovinen VIC untersucht. Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung von ERK 42/44 (Tyr<sup>204</sup>/Thr<sup>202</sup>) zwischen den Behandlungsgruppen (A, C). Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 34 und 35 dargestellt. Abgebildet ist der Quotient aus den +AI/-AI-Gruppen. \*  $p < 0,05$ . Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin; Tyr = Tyrosin.

### 3.4.1.2 Phosphorylierung von P70S6K

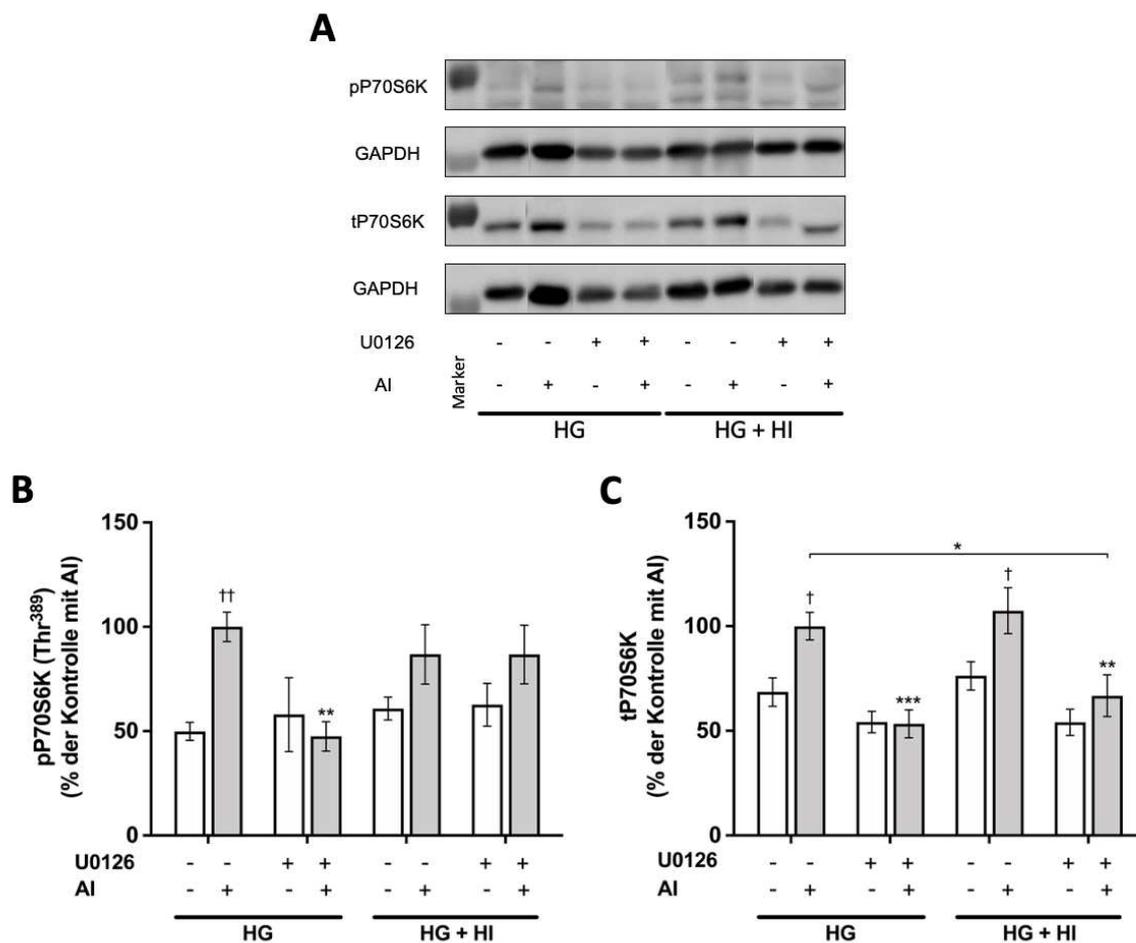
ERK 42 und ERK 44 können im Rahmen der Insulinsignalkaskade die Phosphorylierung von MTOR induzieren [35]. Inwiefern diese Kreuzaktivierung durch U0126 inhibiert wird, wurde anhand des Phosphorylierungsgrades von P70S6K, dem nachgeschalteten Signalproteinprotein von MTOR, analysiert (Abb. 37 und Abb. 38). In den Western-Blot-Analysen zeigten sich für die Phosphorylierung von P70S6K unter NG-Bedingungen keine signifikanten Unterschiede. Die Gesamtsynthese war hingegen unter Inhibitor-Behandlung mit U0126 zum Teil signifikant vermindert ( $p = 0,0374$  für NG-AI gegen NG+HI+U-AI;  $p = 0,0106$  für NG+HI-AI gegen NG+HI+U-AI;  $p = 0,0227$  für NG+AI gegen NG+U+AI;  $p = 0,0003$  für NG+HI+AI gegen NG+HI+U+AI). Ein signifikanter Unterschied durch eine AI-Stimulation zeigte sich nicht.

Unter HG-Bedingungen führte eine AI-Stimulation in der Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung ( $p = 0,009$ ). Darüber hinaus führte eine Behandlung mit U0126 unter HG-Bedingungen mit AI-Stimulation zu einer signifikanten Verringerung der Phosphorylierung von P70S6K im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0087$ ). Unter HI-Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Auch in der Gesamtsynthese führte der AI-Stimulus zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinbiosynthese sowohl mit als auch ohne HI-Behandlung ( $p = 0,0216$  für HG-AI gegen HG+AI;  $0,0235$  für HG+HI-AI gegen HG+HI+AI). Unter Behandlung mit U0126 zeigte sich demgegenüber eine signifikante Verringerung der Gesamtsynthese von P70S6K, wobei diese Beobachtung nur unter AI-Stimulation signifikant war ( $p = 0,0005$  für HG gegen HG+U;  $p = 0,0206$  für HG gegen HG+HI+U;  $p = 0,0028$  für HG+HI gegen HG+HI+U).



**Abb. 37: Phosphorylierung von P70S6K unter U0126-Behandlung in NG und NG+HI**

Die Phosphorylierung von P70S6K (Thr<sup>389</sup>) mit 10  $\mu$ M U0126-Behandlung wurde unter NG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pP70S6K (Thr<sup>389</sup>) und tP70S6K unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine verringerte Proteinbiosynthese von tP70S6K unter U0126-Behandlung (C), während die Phosphorylierung keine signifikanten Unterschiede zeigte (B). Marker pP70S6K und tP70S6K: 70 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle bzw. wie eingezeichnet. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin.



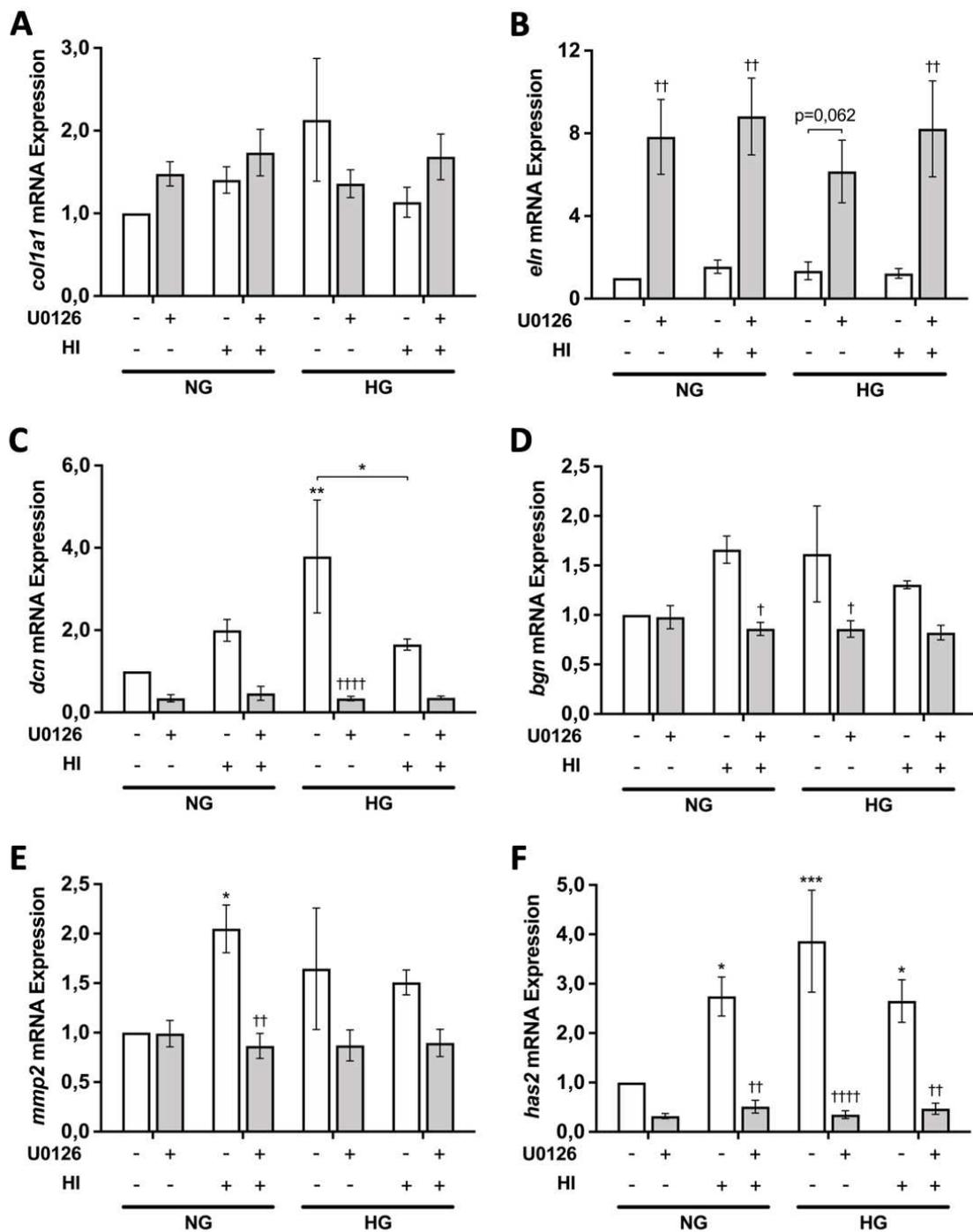
**Abb. 38: Phosphorylierung von P70S6K unter U0126-Behandlung in HG und HG+HI**

Die Phosphorylierung von P70S6K (Thr<sup>389</sup>) mit 10  $\mu$ M U0126-Behandlung wurde unter HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Repräsentative Abbildungen der Western-Blot-Analysen zeigen die Proteinbiosynthese von pP70S6K (Thr<sup>389</sup>) und tP70S6K unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (A). Die Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zeigte eine signifikante Reduktion der Proteinbiosynthese von pP70S6K (Thr<sup>389</sup>) und tP70S6K unter U0126-Behandlung (B, C). Marker pP70S6K und tP70S6K: 70 kDa. Marker GAPDH: 35 kDa. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 verglichen mit der entsprechenden Vehikelkontrolle bzw. wie eingezeichnet; † p < 0,05; †† p < 0,01 verglichen mit der gleichen Behandlung ohne AI. Abkürzungen: AI = Akutinsulin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; p = phosphoryliert; t = total; Thr = Threonin.

### 3.4.2 mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulären Matrix

Der Einfluss von U0126 auf die mRNA-Expression von Molekülen der EZM wurde mittels PCR näher untersucht. Die mRNA-Expression der Gene *colla1*, *eln*, *dcn*, *bgn*, *mmp2*, *has2* sowie *mmp9* wurde hierbei näher beleuchtet (Abb. 39). Für *mmp9* konnte keine mRNA-Expression detektiert werden. Die mRNA-Expression von *eln* wurde unter Behandlung mit U0126 signifikant gesteigert. Dies zeigte sich in der NG-Gruppe (p = 0,0034), in der NG+HI- (p = 0,0017) und in der HG+HI-Gruppe (p = 0,0027). Unter HG-Bedingungen war der beobachtete Effekt nur im Trend nachweisbar (p = 0,0615). Die mRNA-Expression von *colla1* wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den

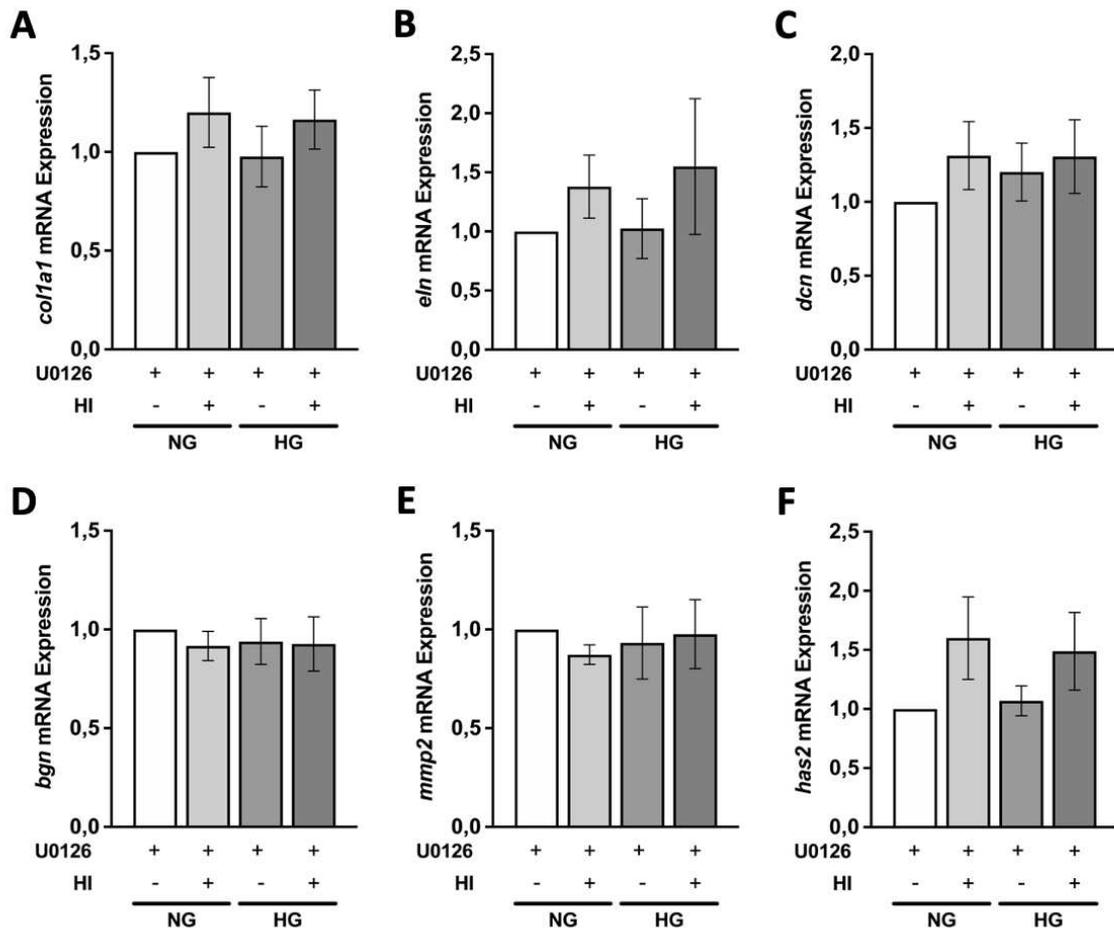
Behandlungsbedingungen auf. Die mRNA-Expression von *dcn* war unter HG-Behandlung ohne Inhibitor signifikant erhöht verglichen mit der NG-Kontrollbehandlung ( $p = 0,0016$ ). Unter zusätzlicher Behandlung mit HI zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression verglichen mit der HG-Bedingung ( $p = 0,0245$ ). Auffallend war zudem, dass U0126 unter HG-Bedingungen zu einer hoch signifikanten Reduktion der Genexpression von *dcn* führte ( $p < 0,0001$ ). Ebenso führte U0126 für *bgn* zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression unter HG-Bedingungen ( $p = 0,0265$ ), aber auch unter Behandlung mit NG+HI ( $p = 0,0172$ ). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für *mmp2* und *has2*. Die mRNA-Expression von *mmp2* war unter Behandlung mit NG+HI signifikant erhöht verglichen mit der NG-Kontrollbehandlung ( $p = 0,0339$ ). Eine Behandlung mit U0126 führte unter denselben Behandlungsbedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression ( $p = 0,0081$ ). Für *has2* zeigten sich beide Effekte in allen Behandlungsgruppen bis auf die NG-Kontrollgruppe ( $p = 0,0328$  für NG gegen NG+HI;  $p = 0,0001$  für NG gegen HG;  $p = 0,0489$  für NG gegen HG+HI;  $p = 0,0021$  für NG+HI gegen NG+HI+U;  $p < 0,0001$  für HG gegen HG+U;  $p = 0,0027$  für HG+HI gegen HG+HI+U). Auffallend war zudem für alle detektierten Gene der EZM mit Ausnahme von *eln*, dass unter NG-Kontrollbedingungen eine Behandlung mit U0126 zu keinen signifikanten Unterschieden in der Genexpression führte.



**Abb. 39: Effekt von U0126 auf die mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulärmatrix**

Der Einfluss von U0126 auf die relative mRNA-Expression verschiedener Moleküle der Extrazellulärmatrix wurde mittels PCR analysiert. Es zeigte sich eine zum Teil signifikante Reduktion der mRNA-Expression unter U0126-Behandlung in verschiedenen Behandlungsbedingungen (C bis F). Die Expression von *eln* war unter allen Behandlungsbedingungen durch U0126 signifikant gesteigert (B). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  verglichen mit der NG-Kontrolle bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,0001$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne U0126. Abkürzungen: *colla1* = Kollagen Typ 1; *bgn* = Biglykan; *dcn* = Dekorin; *eln* = Elastin; *has2* = Hyaluronansynthase 2; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *mmp* = Matrix-Metalloprotease; NG = Normoglykämie.

Um den Einfluss diabetischer Bedingungen unter U0126-Behandlung darzustellen, wurden im Folgenden isoliert die Gruppen NG+U, NG+HI+U, HG+U und HG+HI+U miteinander verglichen (Abb. 40). Hierbei wiesen alle analysierten Moleküle der EZM, für welche in der PCR eine Genexpression nachgewiesen werden konnte (*coll1a1*, *eln*, *dcn*, *bgn*, *mmp2*, *has2*), keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression durch die verschiedenen diabetischen Bedingungen auf.



**Abb. 40: mRNA-Expression von Molekülen der Extrazellulärmatrix unter U0126-Behandlung**

Die relative mRNA-Expression verschiedener Moleküle der Extrazellulärmatrix unter U0126-Behandlung wurde unter NG-, HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Abkürzungen: *coll1a1* = Kollagen Typ 1; *bgn* = Biglykan; *dcn* = Dekorin; *eln* = Elastin; *has2* = Hyaluronansynthase 2; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *mmp* = Matrix-Metalloprotease; NG = Normoglykämie.

### 3.4.3 mRNA-Expression und Aktivität von Degenerations- und Differenzierungsmarkern

Ein Einfluss von U0126 auf die Degenerationsmarker *opn* und *alpl* sowie auf den Differenzierungsmarker *acta2* wurde ebenfalls mittels PCR analysiert (Abb. 41). Während für *alpl* keine

Expression nachweisbar war, zeigte sich für *opn* eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression unter HG-Behandlung verglichen mit der NG-Behandlung ( $p = 0,0056$ ). Eine Behandlung mit U0126 führte unter HG-Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der *opn* mRNA-Expression ( $p = 0,0028$ ). Ebenso war die Genexpression von *opn* unter HG+HI signifikant vermindert zur Behandlung mit HG allein ( $p = 0,0096$ ). Für *acta2* führte die Behandlung mit U0126 zu einer zum Teil signifikanten Zunahme der Genexpression ( $p = 0,0351$  für NG gegen NG+U;  $p = 0,0335$  für HG+HI gegen HG+HI+U). Unter NG+HI-Bedingungen war der beobachtete Unterschied nahe signifikant ( $p = 0,0513$ ).

Ein potenzieller Einfluss von U0126 auf die Vitalität von ovinen VIC wurde mithilfe eines LDH-Assays untersucht (Abb. 41). Die verschiedenen Behandlungsbedingungen führten zu keinen signifikanten Unterschieden in der LDH-Aktivität.

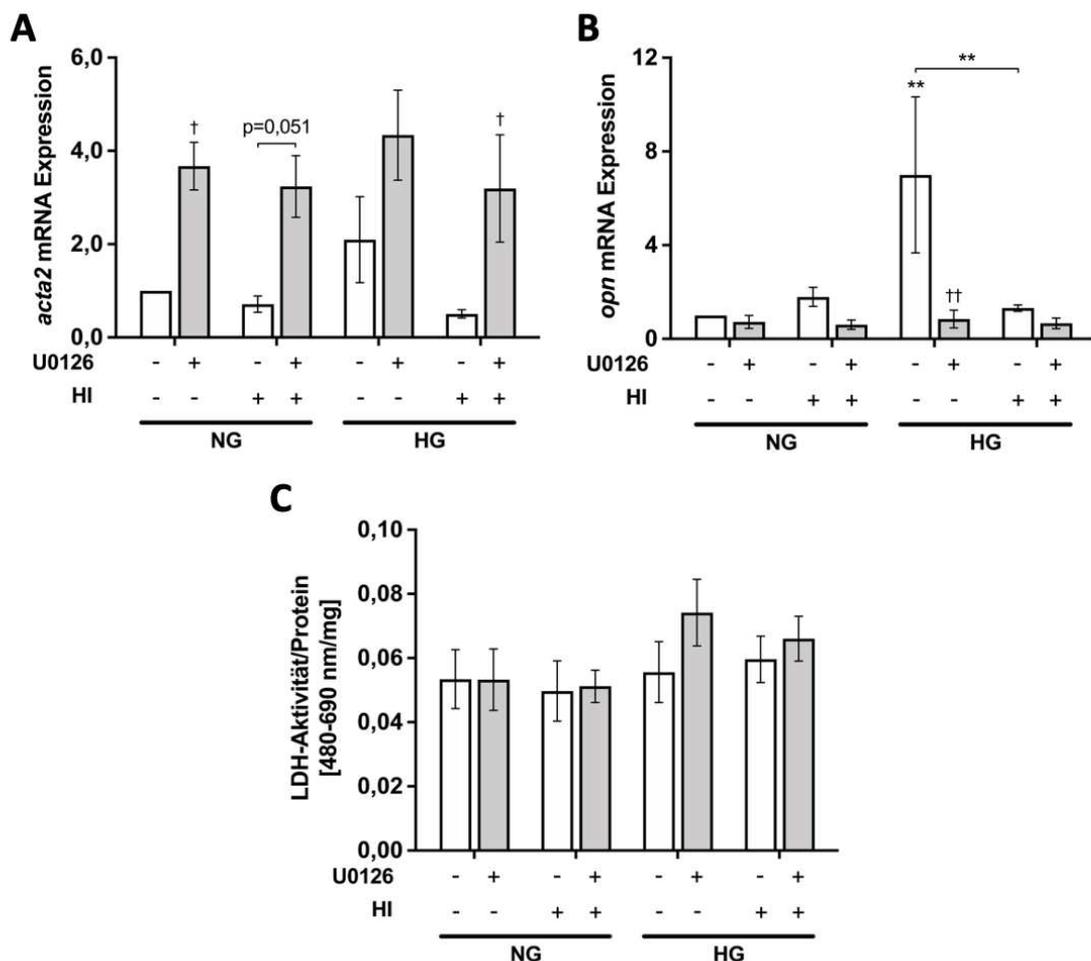
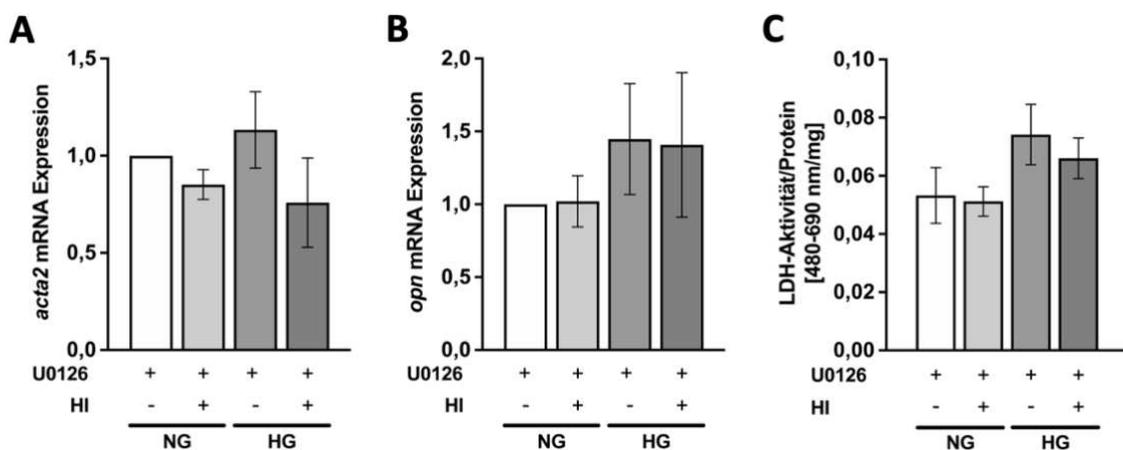


Abb. 41: Effekt von U0126 auf die mRNA-Expression und Aktivität von Differenzierungs- und Degenerationsmarkern

#### Abb. 41: Effekt von U0126 auf die mRNA-Expression und Aktivität von Differenzierungs- und Degenerationsmarkern

Der Einfluss von U0126 auf die relative mRNA-Expression von Differenzierungs- und Degenerationsmarkern wurde über PCR analysiert. Es zeigte sich eine zum Teil signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von *acta2* (A) sowie eine zum Teil signifikante Verringerung der mRNA-Expression von *opn* (B) unter U0126-Behandlung. Der Einfluss einer Behandlung mit U0126 auf die Vitalität oviner VIC wurde mithilfe eines LDH-Assays im Überstand der Zellen überprüft. Die U0126-Behandlung zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf die LDH-Aktivität (C). \*\*  $p < 0,01$  verglichen mit der NG-Kontrolle bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$  verglichen mit der gleichen Behandlung ohne U0126. Abkürzungen: *acta2* = Glattmuskelaktin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; LDH = Laktatdehydrogenase; NG = Normoglykämie; *opn* = Osteopontin.

Um den Einfluss diabetischer Bedingungen unter U0126-Behandlung darzustellen, wurden im Folgenden die Gruppen NG+U, NG+HI+U, HG+U und HG+HI+U isoliert miteinander verglichen (Abb. 42). Auch hier zeigten sich analog zu den Molekülen der EZM keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen unter Behandlung mit U0126. Dies galt für den Differenzierungsmarker *acta2* ebenso wie für den Degenerationsmarker *opn*. Auch die LDH-Aktivität war als weiterer Degenerationsmarker nicht signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen diabetischen Bedingungen unter U0126-Behandlung.



#### Abb. 42: mRNA-Expression und Aktivität von Differenzierungs- und Degenerationsmarkern unter U0126-Behandlung

Die relative mRNA-Expression und Aktivität verschiedener Differenzierungs- und Degenerationsmarker unter U0126-Behandlung wurde unter NG-, HG- und HI-Bedingungen in ovinen VIC untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Abkürzungen: *acta2* = Glattmuskelaktin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; LDH = Laktatdehydrogenase; NG = Normoglykämie; *opn* = Osteopontin.

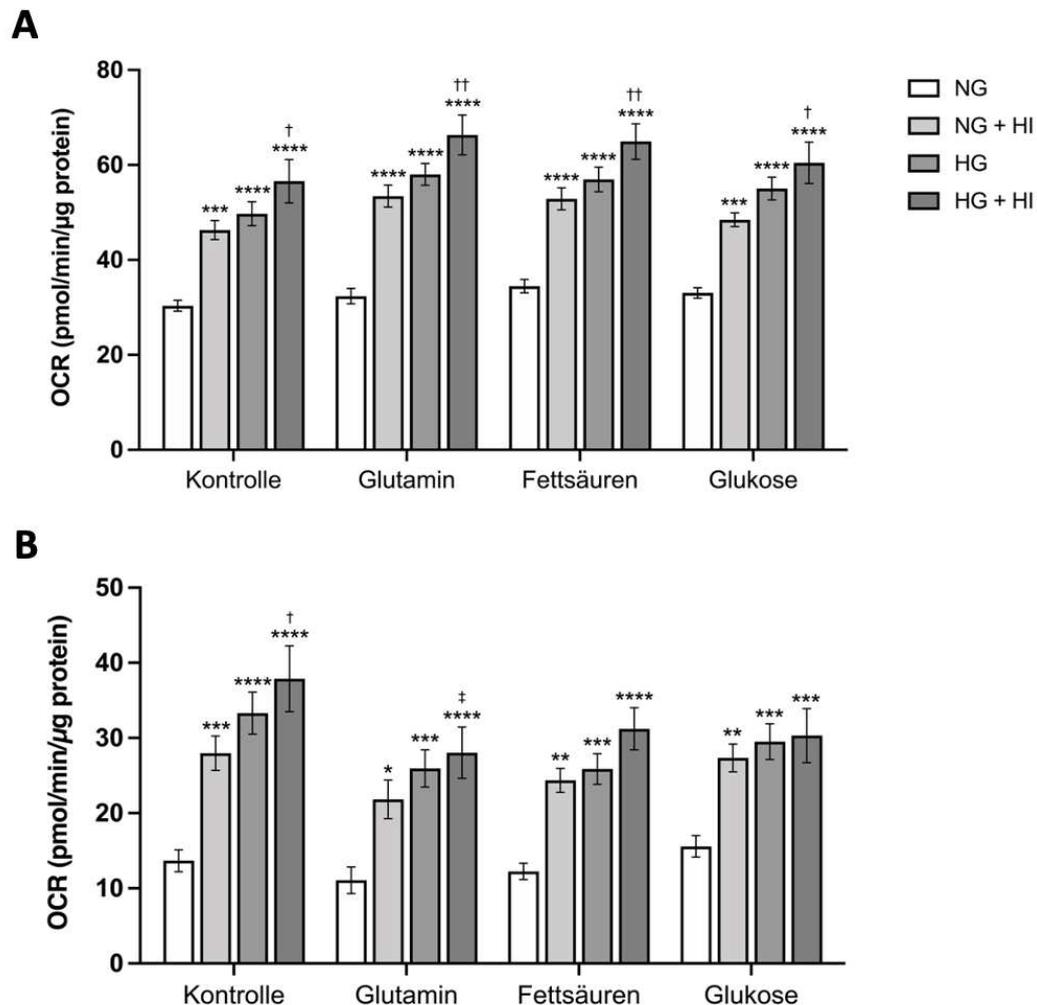
## 3.5 Einfluss der Nährstoffquelle auf den zellulären Metabolismus von VIC

Der Einfluss verschiedener Nährstoffquellen wie Gln, FS und Glc auf den zellulären Metabolismus von VIC wurde mithilfe eines *Seahorse XFe96* Analysiergerätes näher untersucht. Unterschiede zwischen den verschiedenen diabetischen Kultivierungsbedingungen NG, HG und HI wurden dabei ebenfalls eruiert.

### 3.5.1 Mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle

Die mitochondriale Atmung wurde anhand der Parameter basale Zellatmung und ATP-Produktion (Abb. 43) sowie maximale Zellatmung und respiratorische Reserve (Abb. 44) analysiert. Wie in Abb. 43 A ersichtlich, führten die Bedingungen HG und bzw. oder HI unabhängig von der Nährstoffquelle zu einer Aktivierung der basalen Zellatmung im Vergleich zu NG-Behandlung der gleichen Gruppe (Kontrolle:  $p = 0,0003$  für NG+HI;  $p < 0,0001$  für HG/HG+HI; Gln:  $p < 0,0001$  für NG+HI/HG/HG+HI; FS:  $p < 0,0001$  für NG+HI/HG/HG+HI; Glc:  $p = 0,0005$  für NG+HI;  $p < 0,0001$  für HG/HG+HI). Die Behandlung HG+HI führte darüber hinaus zu einer weiteren Steigerung der basalen Zellatmung verglichen mit der Behandlung NG+HI innerhalb der Nährstoffquellen (Kontrolle:  $p = 0,0499$ ; Gln:  $p = 0,0039$ ; FS:  $p = 0,0072$ ; Glc:  $p = 0,0120$ ).

In der ATP-Produktion (Abb. 43 B) zeigte sich eine solche Aktivierung in analoger Weise (Kontrolle:  $p = 0,0005$  für NG gegen NG+HI;  $p < 0,0001$  für NG gegen HG/HG+HI; Gln:  $p = 0,0115$  für NG gegen NG+HI;  $p = 0,0001$  für NG gegen HG;  $p < 0,0001$  für NG gegen HG+HI; FS:  $p = 0,0027$  für NG gegen NG+HI;  $p = 0,0005$  für NG gegen HG;  $p < 0,0001$  für NG gegen HG+HI; Glc:  $p = 0,0063$  für NG gegen NG+HI;  $p = 0,0006$  für NG gegen HG;  $p = 0,0005$  für NG gegen HG+HI). Auch die ATP-Produktion wurde durch die Behandlung HG+HI verglichen mit der Behandlung NG+HI signifikant gesteigert, wobei dieser Unterschied nur in der Kontrolle signifikant war ( $p = 0,0362$ ). Eine Einschränkung der Nährstoffzufuhr führte zu einer Abnahme der ATP-Produktion, welche jedoch nur für Gln im Vergleich zur Kontrolle unter HG+HI-Bedingungen signifikant war ( $p = 0,0399$ ).



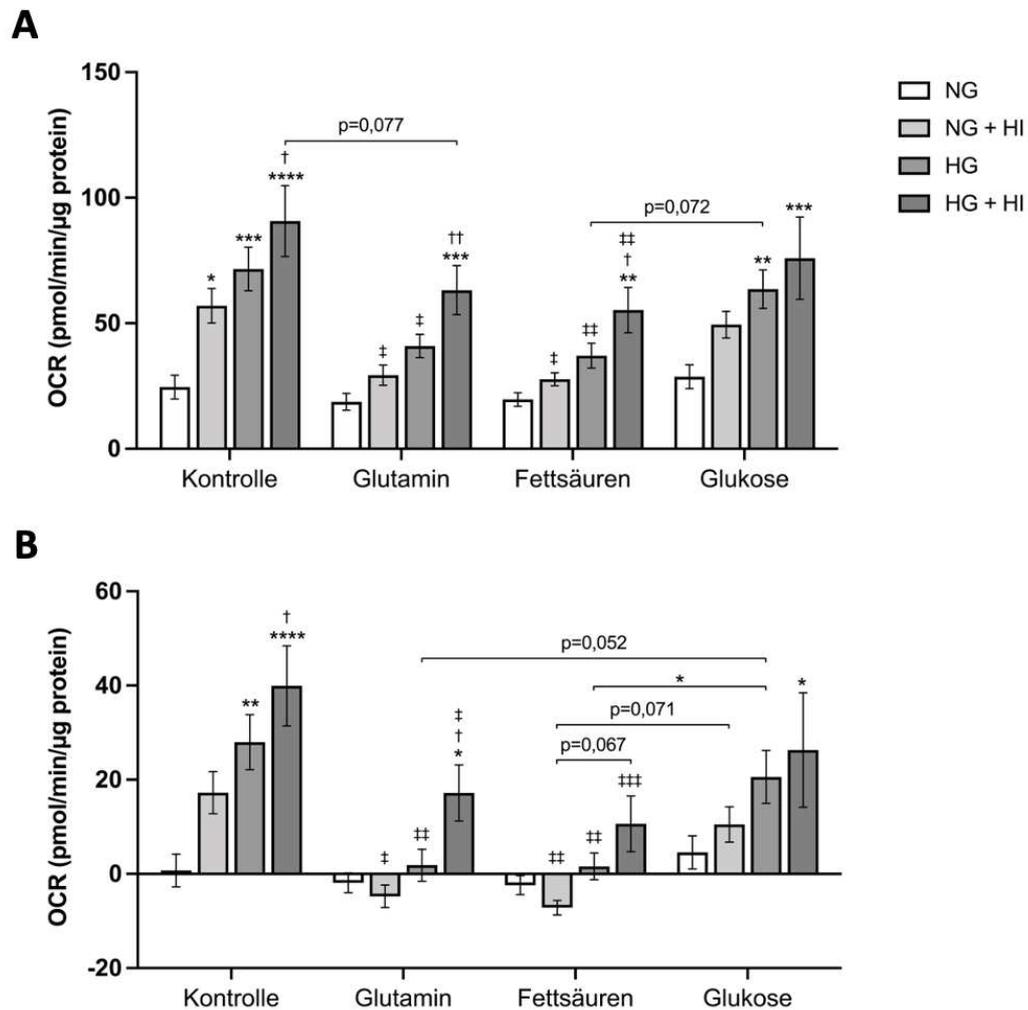
**Abb. 43: Basale Zellatmung und ATP-Produktion in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle**

Ovine VIC wurden unter NG-, HG- und HI-Bedingungen kultiviert und die basale Zellatmung (A) sowie die ATP-Produktion (B) wurden in Abhängigkeit von den Nährstoffquellen Glutamin, Fettsäuren und Glukose mithilfe eines *Seahorse* XFe96 Analysiergerätes bestimmt. Unabhängig von der Nährstoffquelle führte jede Bedingung verglichen mit der jeweiligen NG-Behandlung zu einer Aktivierung des Metabolismus. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der NG-Behandlung der gleichen Gruppe; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$  verglichen mit der NG+HI-Behandlung der gleichen Gruppe; ‡  $p < 0,05$  verglichen mit der gleichen Behandlung in der Kontrollgruppe. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; OCR = Sauerstoffverbrauchsrate, engl.: *oxygen consumption rate*.

Die maximale Zellatmung (Abb. 44 A) stieg in allen Gruppen ebenfalls progressiv durch die Behandlungsbedingungen an (Kontrolle:  $p = 0,0185$  für NG gegen NG+HI;  $p = 0,0001$  für NG gegen HG;  $p < 0,0001$  für NG gegen HG+HI; Gln:  $p = 0,0002$  für NG gegen HG+HI; FS:  $p = 0,004$  für NG gegen HG+HI; Glc:  $p = 0,0079$  für NG gegen HG;  $p = 0,0002$  für NG gegen HG+HI). Die Behandlung HG+HI führte darüber hinaus zu einer weiteren Steigerung der maximalen Zellatmung verglichen mit der Behandlung NG+HI (Kontrolle:  $p = 0,013$ ; Gln:  $p = 0,0083$ ; FS:  $p = 0,0488$ ). Unter Restriktion der Nährstoffzufuhr auf Gln oder FS wurde die maximale Zellatmung in allen Behandlungsbedingungen (außer NG) verglichen mit der jeweiligen Behandlung unter Kontrollbedingungen signifikant

eingeschränkt (Gln:  $p = 0,0493$  für NG+HI;  $p = 0,0235$  für HG; FS:  $p = 0,0298$  für NG+HI;  $p = 0,0073$  für HG;  $p = 0,0081$  für HG+HI).

Die respiratorische Reservekapazität (Abb. 44 B) war ebenso unter HG+HI-Behandlung signifikant erhöht verglichen mit der NG-Behandlung der gleichen Gruppe (Kontrolle:  $p < 0,0001$ ; Gln:  $p = 0,0480$ ; Glc:  $p = 0,0249$ ). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für den Vergleich zwischen den Behandlungen HG+HI und NG+HI innerhalb derselben Gruppe (Kontrolle:  $p = 0,0144$ ; Gln:  $p = 0,0129$ ; FS:  $p = 0,0673$ ). Beim Vergleich der Behandlungen HG gegen NG innerhalb derselben Gruppe zeigte sich nur in der Kontrolle eine signifikante Steigerung der respiratorischen Reservekapazität ( $p = 0,0016$ ). Unter Restriktion der Nährstoffzufuhr auf Gln oder FS wurde die respiratorische Reservekapazität in allen Behandlungsbedingungen (außer NG) verglichen mit der jeweiligen Behandlung unter Kontrollbedingungen signifikant eingeschränkt (Gln:  $p = 0,0117$  für NG+HI;  $p = 0,0018$  für HG;  $p = 0,0149$  für HG+HI; FS:  $p = 0,0033$  für NG+HI;  $p = 0,0016$  für HG;  $p = 0,0006$  für HG+HI). Im Trend zeigte sich ebenso eine Verminderung der respiratorischen Reservekapazität für den Vergleich zwischen einer Restriktion auf Gln oder FS gegenüber einer Restriktion auf Glc (Gln:  $p = 0,0519$  für HG; FS:  $p = 0,0467$  für HG).



**Abb. 44: Maximale Zellatmung und respiratorische Reserve in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle**

Ovine VIC wurden unter NG-, HG- und HI-Bedingungen kultiviert und die maximale Zellatmung (A) sowie die respiratorische Reserve (B) wurden in Abhängigkeit von den Nährstoffquellen Glutamin, Fettsäuren und Glukose mithilfe eines *Seahorse* XFe96 Analysiergerätes bestimmt. Die Einschränkung der Nährstoffzufuhr auf Glutamin oder Fettsäuren führt zu einer Reduktion beider Parameter. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der NG-Behandlung der gleichen Gruppe; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$  verglichen mit der NG+HI-Behandlung der gleichen Gruppe; ‡  $p < 0,05$ ; ‡‡  $p < 0,01$ ; ‡‡‡  $p < 0,001$  verglichen mit der gleichen Behandlung in der Kontrollgruppe. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; OCR = Sauerstoffverbrauchsrate, engl.: *oxygen consumption rate*.

### 3.5.2 Glykolytische Aktivität in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle

Die glykolytische Aktivität wurde anhand der Parameter basale PER und basale Glykolyse (Abb. 45) sowie induzierte Glykolyse und kompensatorische Glykolyse (Abb. 46) analysiert. Die basale PER (Abb. 45 A) wurde unabhängig von einer Einschränkung der Nährstoffquellen in den vier Behandlungsbedingungen ermittelt, wobei HG oder HI zu einem Anstieg der basalen PER im Vergleich zu NG führten. Dies war durch die Kombination der beiden Behandlungsbedingungen verstärkt

ausgeprägt ( $p < 0,0001$  für NG gegen NG+HI/HG/HG+HI;  $p < 0,0001$  für NG+HI gegen HG+HI;  $p = 0,0403$  für HG gegen HG+HI).

In der basalen Glykolyse (Abb. 45 B) zeigte sich eine Aktivierung in analoger Weise zu der mitochondrialen Atmung in Form einer Erhöhung der glykoPER in Abhängigkeit der Behandlung bezogen auf die jeweilige NG-Behandlung (Kontrolle:  $p = 0,0097$  für NG+HI;  $p = 0,0004$  für HG;  $p < 0,0001$  für HG+HI; Gln:  $p = 0,0285$  für NG+HI;  $p = 0,0028$  für HG;  $p < 0,0001$  für HG+HI; FS:  $p = 0,0056$  für HG;  $p = 0,0018$  für HG+HI; Glc:  $p = 0,0069$  für NG+HI;  $p = 0,0002$  für HG;  $p < 0,0001$  für HG+HI). Unterschiede durch eine Restriktion auf verschiedene Nährstoffquellen traten nicht auf.

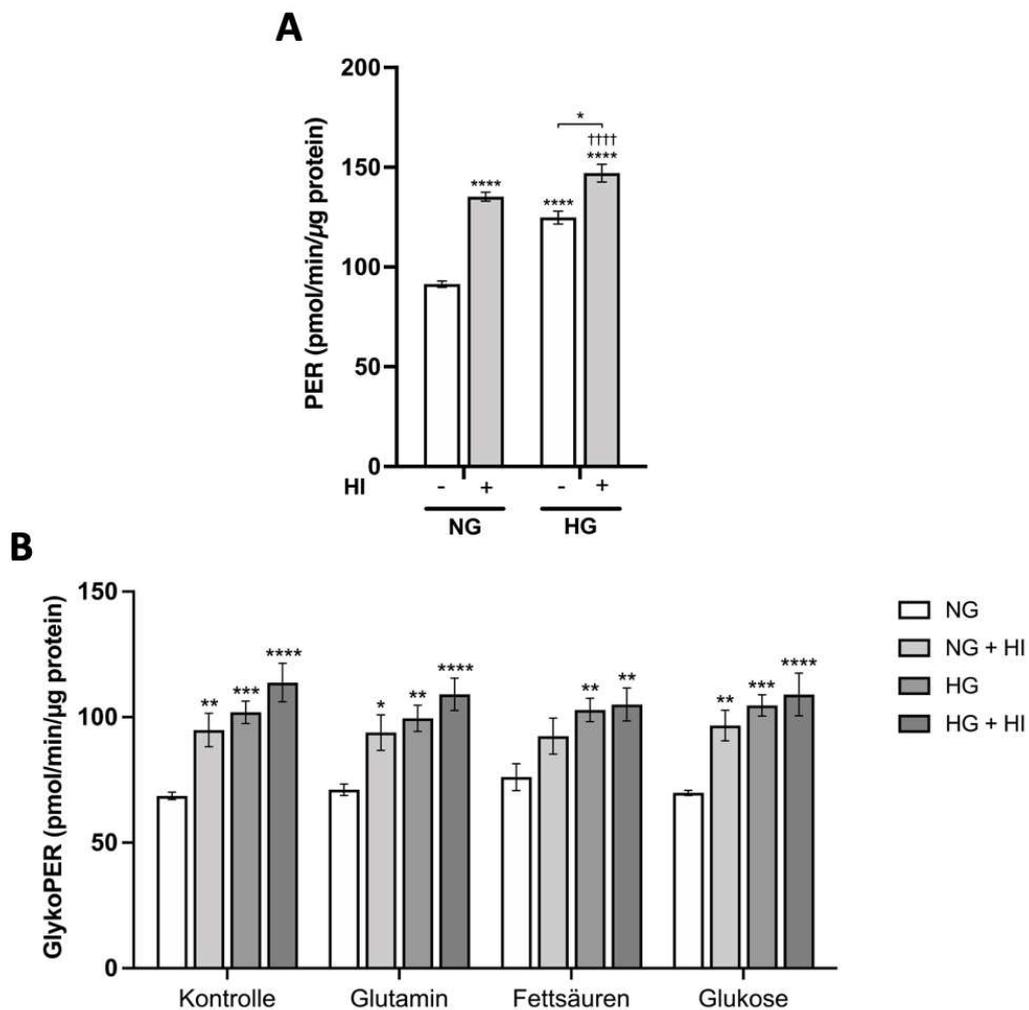


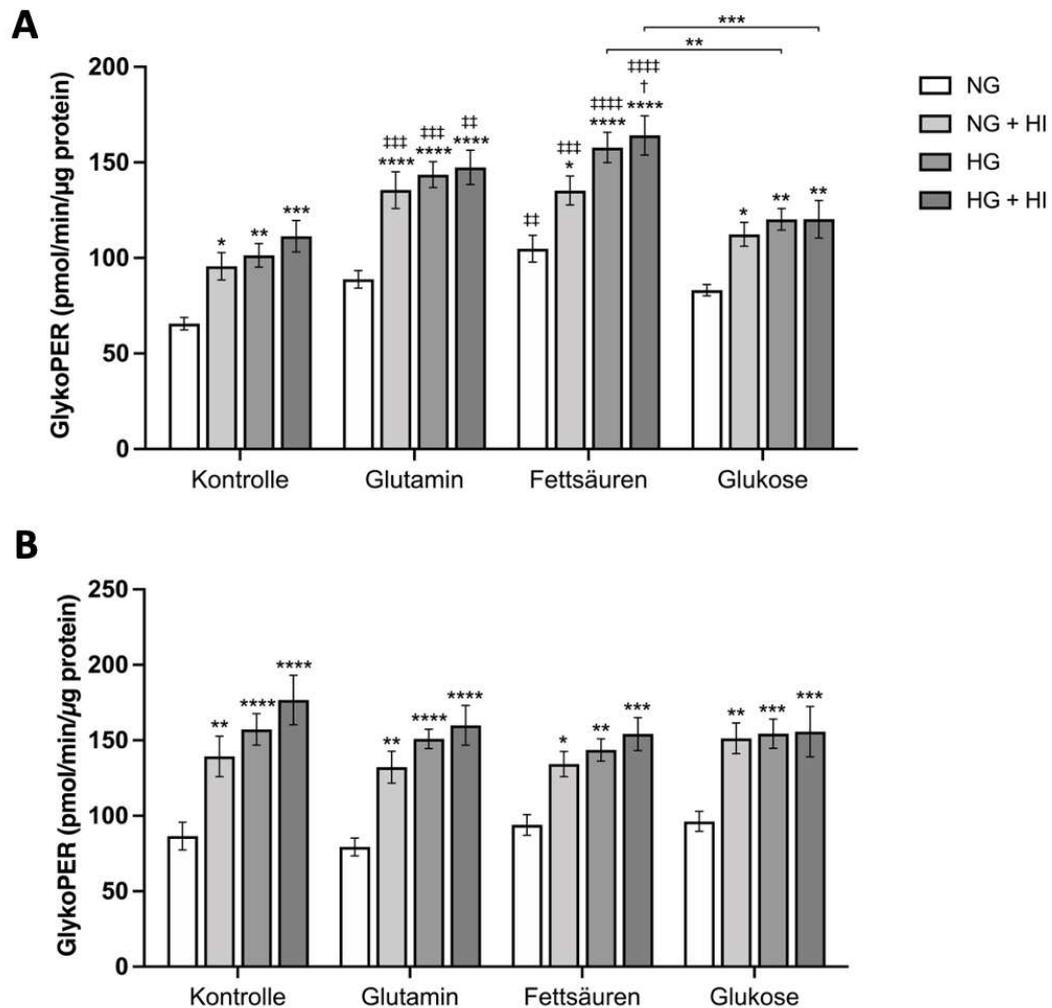
Abb. 45: Basale PER und basale Glykolyse in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle

**Abb. 45: Basale PER und basale Glykolyse in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle**

Ovine VIC wurden unter NG-, HG- und HI-Bedingungen kultiviert und die basale PER (A) sowie die basale Glykolyse (B) wurden mithilfe eines *Seahorse* XFe96 Analysiergerätes bestimmt. Jede Bedingung führte verglichen mit der jeweiligen NG-Behandlung zu einer Aktivierung der Glykolyse. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der NG-Behandlung der gleichen Gruppe bzw. wie eingezeichnet; †††  $p < 0,0001$  verglichen mit der NG+HI-Behandlung. Abkürzungen: GlykoPER = glykolytische PER, engl.: *glycolytic proton exchange rate*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie; PER = Protonenaustauschrate, engl.: *proton exchange rate*.

Die induzierte Glykolyse (Abb. 46 A) wies in allen Gruppen ebenfalls eine Aktivierung in Form einer Erhöhung der glykoPER in Abhängigkeit der Behandlung bezogen auf die jeweilige NG-Behandlung auf (Kontrolle:  $p = 0,0301$  für NG+HI;  $p = 0,0055$  für HG;  $p = 0,0003$  für HG+HI; Gln:  $p < 0,0001$  für NG+HI/HG/HG+HI; FS:  $p = 0,0182$  für NG+HI;  $p < 0,0001$  für HG/HG+HI; Glc:  $p = 0,0352$  für NG+HI;  $p = 0,0029$  für HG;  $p = 0,0046$  für HG+HI). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für den Vergleich zwischen den Behandlungen HG+HI und NG+HI innerhalb derselben Gruppe bei Restriktion auf FS ( $p = 0,0275$ ). Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich darüber hinaus bei Restriktion auf Gln oder FS ein signifikanter Anstieg der induzierten Glykolyse in nahezu allen Behandlungsgruppen (Gln:  $p = 0,0006$  für NG+HI;  $p = 0,0003$  für HG;  $p = 0,0050$  für HG+HI; FS:  $p = 0,0017$  für NG;  $p = 0,0007$  für NG+HI;  $p < 0,0001$  für HG/HG+HI). Eine Restriktion der Nährstoffzufuhr auf Glc führte zu keinen Unterschieden im Vergleich zur Kontrolle. Hingegen zeigte sich bei einer Restriktion auf FS gegenüber einer Restriktion auf Glc eine signifikante Steigerung der induzierten Glykolyse unter HG- ( $p = 0,0017$ ) sowie HG+HI-Behandlung ( $p = 0,0002$ ).

Für die kompensatorische Glykolyse (Abb. 46 B) zeigte sich in allen Gruppen ebenfalls eine Aktivierung in Form einer Erhöhung der glykoPER in Abhängigkeit der Behandlung bezogen auf die jeweilige NG-Behandlung (Kontrolle:  $p = 0,0032$  für NG+HI;  $p < 0,0001$  für HG/HG+HI; Gln:  $p = 0,0021$  für NG+HI;  $p < 0,0001$  für HG/HG+HI; FS:  $p = 0,0337$  für NG+HI;  $p = 0,0047$  für HG;  $p = 0,0002$  für HG+HI; Glc:  $p = 0,0016$  für NG+HI;  $p = 0,0007$  für HG;  $p = 0,0009$  für HG+HI). Unterschiede durch eine Restriktion auf verschiedene Nährstoffquellen traten nicht auf.



**Abb. 46: Induzierte Glykolyse und kompensatorische Glykolyse in Abhängigkeit von der Nährstoffquelle**

Ovine VIC wurden unter NG-, HG- und HI-Bedingungen kultiviert und die induzierte Glykolyse (A) sowie die kompensatorische Glykolyse (B) wurden in Abhängigkeit von den Nährstoffquellen Glutamin, Fettsäuren und Glukose mithilfe eines *Seahorse* XFe96 Analysiergerätes bestimmt. Die Einschränkung der Nährstoffzufuhr auf Glutamin oder Fettsäuren führt zu einer Aktivierung der Glykolyse. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  verglichen mit der NG-Behandlung der gleichen Gruppe bzw. wie eingezeichnet; †  $p < 0,05$  verglichen mit der NG+HI-Behandlung der gleichen Gruppe; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ; ####  $p < 0,0001$  verglichen mit der gleichen Behandlung in der Kontrollgruppe. Abkürzungen: GlykoPER = glykolytische Protonenaustauschrate, engl.: *glycolytic proton exchange rate*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; NG = Normoglykämie.

## 4 Diskussion

### 4.1 Evaluierung des Versuchsaufbaus

Der Versuchsaufbau ist ein etabliertes Modell, welches bereits im Rahmen einer naturwissenschaftlichen Dissertation im eigenen Institut entwickelt wurde [22]. Es wurde in Untersuchungen während der Etablierung bereits nachgewiesen, dass es unter der Kultivierung zu einem Verbrauch an Glc kommt [22]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun, dass auch Insulin unter Kultivierung verbraucht wird. Damit ist ein MW alle zwei Tage zur Aufrechterhaltung sowohl der Glc- als auch der Insulinkonzentration und damit der Versuchsbedingungen indiziert. Des Weiteren sinkt mit zunehmender Kultivierungsdauer die Insulinkonzentration verstärkt. Diese Dynamik der Insulinabnahme über den Zeitraum der Kultivierung deutet darauf hin, dass Insulin in Abhängigkeit von der Zellzahl abgebaut wird. Die Hypothese wird untermauert, wenn man bedenkt, dass Insulin in die Zelle internalisiert wird und im Anschluss durch Enzyme degradiert wird [78, 79], sodass mit steigender Zellzahl eine vermehrte Internalisierung und somit eine verminderte Verfügbarkeit von Insulin im Medium resultieren könnte. Darüber hinaus legt die fehlende Detektion von Insulin in den Kontrollgruppen nahe, dass FCS als 10 %iger Mediumzusatz keine relevanten Mengen Insulin enthält.

### 4.2 Kreuzreaktion von Insulinrezeptor und IGF-1-Rezeptor

Der InsR und der IGF-1R ähneln sich sehr in ihrer Struktur. Beide Rezeptoren gehören der Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren an und sind in ihrer Struktur grundsätzlich gleich aufgebaut [80]. Erhöhte Insulinkonzentrationen beispielsweise im Rahmen einer peripheren Insulinresistenz können jedoch aufgrund dieser Rezeptorhomologie zu einer Kreuzaktivierung des IGF-1R führen [81], wodurch die gleiche Signalkaskade wie bei Insulin aktiviert wird [72]. In VIC ist bereits nachgewiesen, dass der IGF-1R exprimiert wird, wobei die Behandlungsbedingungen HG und HI die Rezeptorexpression nicht beeinflussen [22]. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Insulinkonzentration im menschlichen Körper bei 0,2 - 0,9 nM [72] und im Schaf bei etwa 1,5 nM [71]. Im angewandten Versuchsaufbau wurde jedoch mit deutlich überphysiologischen Konzentrationen von Insulin gearbeitet, sodass in der vorliegenden Arbeit die Fragestellung untersucht wurde, inwiefern es zu einer Kreuzaktivierung des IGF-1R im Rahmen des AI-Stimulus kommt. Während dabei eine AI-Stimulation von 100 nM unter allen Behandlungsbedingungen einen signifikanten Anstieg in der Phosphorylierung verursacht, führt eine Stimulation mit 10 nM AI nach chronischer Behandlung mit HI (unter NG und HG) nicht mehr zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung. Die Ergebnisse legen nahe, dass ein AI-Stimulus mit 100 nM zu einer Kreuzaktivierung des IGF-1R führt, während dies unter 10 nM Stimulation nicht mehr so stark zu beobachten ist. Dies deckt sich weitestgehend mit den bisherigen Ergebnissen in der Literatur, wobei nach heutigem Stand davon ausgegangen wird, dass Insulin mit einer 10- bis 100-fach höheren Affinität an den InsR bindet als an den IGF-1R [72, 77, 81]. Verschiedene Untersuchungen in

bovinen Aortenendothelzellen [77], 3T3- [81, 82] und CHO-Zellen [82] zeigen zudem, dass die Affinität von Insulin am InsR zwischen 0,1 nM und 0,5 nM liegt. Die Aktivierung des IGF-1R durch Insulin unterliegt je nach Zelltyp weit größeren Schwankungen und reicht von 5 nM bis zu > 100 nM [77, 81-83], wobei auch eine zunehmende Aktivierung des IGF-1R mit steigender Insulinkonzentration beschrieben ist [77]. Um eine möglichst isolierte Wirkung Insulins auf den InsR zu untersuchen und Nebeneffekte zu minimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Stimulationskonzentration von 10 nM AI als Standard durchgeführt.

Neben der Aktivierung des IGF-1R durch Insulin wird in der Literatur auch der umgekehrte Weg im Sinne einer Aktivierung des InsR durch IGF-1 beschrieben [72]. Die Expression von IGF-1 ist ebenfalls für VIC bereits beschrieben, wobei auch hier die Behandlungsbedingungen HG und HI keinen Einfluss auf die Expression haben [22].

## 4.3 Wirkung von Insulin auf die Insulinsignalkaskade in VIC

### 4.3.1 PI3K-Signalweg

AKT stellt einen Knotenpunkt im PI3K-Signalweg der Insulinsignalkaskade dar und unterliegt somit starken Regulationen [34]. Während eine AI-Stimulation von VIC mit 10 nM unter NG- und HG-Behandlung zu einer erhöhten Phosphorylierung von AKT führt, wird dieser Effekt durch eine chronische HI-Behandlung reduziert. GSK-3 $\alpha/\beta$  ist als nachgeschaltetes Protein von AKT ebenso von zentraler Bedeutung im PI3K-Signalweg und vermittelt Effekte im Rahmen der Proliferation und Glykogensynthese [38, 84]. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit findet eine Regulation von GSK-3 $\alpha/\beta$  in abgeschwächter Form analog zu AKT statt. Dieses Ergebnis bestätigt die von Selig et al. bereits unter einer AI-Stimulation von 100 nM beschriebene Beobachtung, dass VIC insulinempfindlich sind und unter HI-Behandlung eine Insulinresistenz entwickeln [43]. Weiterhin deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die Ergebnisse von Selig et al. [43] darauf hin, dass neben bereits bekannten Parametern wie vermehrtem Scherstress [85], osteogenem Medium [86] und Leptin [87] Insulin den PI3K-Signalweg in VIC im Sinne einer vermehrten Phosphorylierung aktiviert. Während in Klappengewebe diese Effekte für GSK-3 $\alpha/\beta$  bisher nur *in vitro* als bestätigt gelten, zeigen sich für die Phosphorylierung von AKT auch im dreidimensionalen (3D) – Modell unter statischen und dynamischen Bedingungen die gleichen Effekte [88].

FOXO1 spielt in der Genexpression im Rahmen der Insulinsignalkaskade ebenso eine wichtige Rolle [84]. Bisher ist der FOXO-Signalweg in VIC in Zusammenhang mit Diabetes allerdings wenig erforscht. Die aktuelle Literatur beschreibt in Bezug auf die Insulinsignalkaskade eine Insulin-vermittelte Phosphorylierung von FOXO1 durch AKT [89]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ein AI-Stimulus in VIC unter NG-Behandlung signifikant die Phosphorylierung von FOXO1 erhöht,

während dies unter allen anderen Behandlungen nicht der Fall ist. Auch hier scheint FOXO1 demnach als nachgeschaltetes Signalprotein von AKT in ähnlicher Weise reguliert zu sein, wobei der Effekt wesentlich schwächer ausgeprägt ist als für AKT. Dabei ist jedoch zu beachten, dass in den vorliegenden Versuchen zur Etablierung einer Inhibition der FOXO1-Phosphorylierung durch AS1842856 eine derartige Regulation von FOXO1 unter Kontrollbedingungen nicht zu beobachten ist, sodass kritisch hinterfragt werden muss, inwiefern diese Einflüsse in weiterer Folge eine Relevanz im Rahmen einer antiapoptotischen und lipogenetischen Wirkung auf die Zellen zeigen. Zudem ist im 3D-Modell keine Veränderung der Phosphorylierung von FOXO1 in ovinen AK unter AI-Stimulation sichtbar [88]. Man könnte somit vermuten, dass die Hauptwirkungen von Insulin in ovinen VIC respektive in der AK nicht primär über FOXO1-vermittelt werden, wie es z. B. in dermalen Fibroblasten gezeigt wurde. Hier findet eine Induktion der Phosphorylierung von AKT durch AMP, nicht aber von FOXO1 statt [90]. Möglich ist auch, dass nicht FOXO1 die entscheidenden Wirkungen vermittelt, sondern eine andere Unterform aus der Familie der FOXO-Proteine wie beispielsweise FOXO3 oder FOXO4, für welche auch eine Regulation der Zellzykluskontrolle und Apoptose im Rahmen von DM beschrieben ist [91].

MTOR nimmt als nachgeschaltetes Signalprotein von AKT eine zentrale Rolle im Zellwachstum und -überleben ein und reguliert metabolische Prozesse wie die Glc-Aufnahme [35, 38]. Während unter Kontrollbedingungen der AI-Stimulus eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von MTOR auslöst, ist diese jedoch unter Behandlung mit Insulin signifikant verringert. Da dieser Effekt insbesondere unter HI- und weniger unter HG-Behandlung ausgeprägt ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Exposition der Zellen mit Insulin einen größeren Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz nimmt als jene mit Glc. MTOR scheint damit ebenso wie GSK-3 $\alpha/\beta$  ein zentrales Signalprotein der Insulin-vermittelten Effekte in VIC im PI3K-Signalweg zu sein. Es ist bereits publiziert, dass MTOR im Rahmen eines T2D überaktiviert wird. Dabei geht man davon aus, dass diese Überaktivierung eine Insulinresistenz beispielsweise über Lipidakkumulation vermittelt [36]. Die vorliegenden Untersuchungen erlauben keine Aussage über Effekte auf Organ- oder Organismusebene, aber auf zellulärer Ebene scheint Insulin ebenso zu einer Überaktivierung von MTOR zu führen. Inwiefern die beobachtete Insulinresistenz durch MTOR-vermittelt wird, ist anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend zu sagen und bedarf zukünftiger Forschung.

### 4.3.2 AMPK $\alpha$

Eine AMPK $\alpha$ -Aktivierung wirkt auf zellulärer Ebene durch eine Hemmung von MTOR protektiv auf die Insulinsensitivität und stellt ein viel beforschtes und vielversprechendes Ziel in der Therapie von T2D und seinen metabolischen Begleiterkrankungen dar [41, 92]. Über die Bedeutung der AMPK $\alpha$  in VIC ist derzeit noch wenig bekannt. Man weiß, dass TGF- $\beta$ 1 die Phosphorylierung von AMPK $\alpha$  inhibiert [93]. Parallele Wirkweisen von Insulin und TGF- $\beta$ 1 [94] hätten ein ähnliches Ergebnis unter HI-Behandlung vermuten lassen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch keine Regulation der

AMPK $\alpha$  unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die AMPK $\alpha$  in VIC nicht wesentlich durch Insulin oder Glc beeinflusst wird und dass die nachgewiesene Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Insulin ebenfalls keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung der AMPK $\alpha$  hat.

### 4.3.3 MAPK-Signalweg

Während es im PI3K-Signalweg insbesondere für AKT, aber auch für GSK-3 $\alpha/\beta$  und MTOR durch die diabetischen Bedingungen zu deutlichen Veränderungen kommt, welche insbesondere auf eine HI- und weniger auf eine HG-Behandlung zurückzuführen sind, zeigen sich im MAPK-Signalweg für ERK 42/44 weniger Unterschiede im Phosphorylierungsgrad bei AI-Stimulation. In allen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist unter Kontrollbedingungen visuell eine erhöhte Phosphorylierung von ERK 42/44 durch AI-Stimulation sichtbar, wobei dieser Effekt oft nicht signifikant ist. Wenn man bedenkt, dass es insbesondere für HG dabei jedoch zu hohen Standardabweichungen kommt, könnte auch dies die fehlende Signifikanz erklären. Bisher ist eine Aktivierung des MAPK-Signalweges durch Insulin in ovinen VIC nicht beschrieben. Jedoch findet eine Aktivierung von ERK 42/44 in VIC im Sinne einer vermehrten Phosphorylierung durch Mediatoren wie Leptin [87] sowie Kalzifikationsbedingungen [86, 95] statt. In bovinen Aortenendothelzellen ist eine Aktivierung von ERK 42/44 durch Insulin bereits beschrieben [77]. Im ovinen 3D-Kultivierungsmodell einer AK zeigt ERK 42/44 hingegen keine signifikante Regulation im Rahmen diabetischer Bedingungen [88]. In Zusammenschau der Ergebnisse bleibt spekulativ, ob Insulin über den MAPK-Signalweg der Insulinsignalkaskade in VIC einen relevanten Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK 42/44 nimmt. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass ein AI-Stimulus analog zum PI3K-Signalweg nur unter Kontrollbedingungen eine Phosphorylierung von ERK 42/44 induziert. Eine Behandlung mit diabetischen Bedingungen scheint demgegenüber potenzielle Effekte zu nivellieren. Die Veränderungen in der Gesamtsynthese von ERK 42 unter HG+HI-Bedingungen sind unter Berücksichtigung weiterer Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Abb. 11, Abb. 35) am ehesten als Messungenauigkeit bei hohem Standardfehler einzuordnen.

## 4.4 Wirkung von Insulin und Glukose auf die Genexpression in VIC

Die Veränderung der Zusammensetzung der EZM in der Entwicklung einer CAVD ist ein viel beforschtes Thema, die Grundlagen dieser Veränderungen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von Proteoglykanen in VIC unter diabetischen Bedingungen, insbesondere durch eine HI-Behandlung. Dies steht jedoch Ergebnissen in VIC entgegen, in welchen diabetische Bedingungen keine Veränderung der

Genexpression von *dcn* und *bgn* induzieren [22]. Diese Unterschiede könnten in unterschiedlichen Zellpopulationen der Projekte begründet sein, was auf eine hohe Plastizität der VIC hindeutet. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund wahrscheinlich, dass VIC ihr osteogenes Potenzial in Abhängigkeit von der Zellpassage und dem Individuum ausbilden [96]. Im 3D-Modell sind widersprüchliche Ergebnisse zur Proteoglykanexpression in ovinen Klappen publiziert [88], eine vermehrte Genexpression von *bgn* und *dcn* in der AKS, bzw. fibrotischen und kalzifizierten Stadien der AK ist jedoch unbestritten [10, 15, 43, 97, 98]. Dies verdeutlicht die Bedeutung von 3D-Gewebekulturen im Vergleich zu zweidimensionalen Kulturen, da biomechanische Einflüsse unmittelbar Auswirkungen auf Matrixmoleküle haben können [99].

Analog zu den Proteoglykanen wird die Genexpression von *has2* und *mmp2* als weitere Proteine der EZM durch HI angeregt. Gegenüber VIC weisen kardiale Fibroblasten keine Induktion der Genexpression von *has2* durch eine Behandlung mit HG auf [100] und in VIC ist auch schon eine verminderte *has2*-Expression durch diabetische Bedingungen beschrieben [22]. *Has2* kodiert für ein Protein, welches als eines von vielen die Hyaluronansynthese induziert, ein erhöhter Hyaluronanspiegel wirkt sich dann wiederum protektiv im Sinne einer reduzierten Kalziumeinlagerung aus [101]. Hier könnte man also vermuten, dass diabetische Bedingungen einer Klappenkalzifizierung entgegenwirken. Demgegenüber gibt es jedoch Untersuchungen, welche eine Überexpression von *has2* in sklerotisierten und kalzifizierten Klappen zeigen [23], sodass möglicherweise *has2* im Rahmen diabetischer Bedingungen in VIC hochreguliert werden könnte, um eine potenzielle Fibrosierung und Verkalkung der AK zu verlangsamen. Sicher scheint in diesem Zusammenhang nur, dass *has2* und die Hyaluronanhomöostase eine relevante Rolle in der Entwicklung einer CAVD einnehmen [23].

Für die Kollagen-abbauenden *mmps* gilt die Annahme, dass diese im Rahmen einer CAVD vermehrt exprimiert werden [102]. Während dabei jedoch insbesondere *mmp9* und weniger *mmp2* vermehrt exprimiert wird [20, 103, 104], ist die *mmp2*-Expression in der vorliegenden Arbeit durch diabetische Behandlungen hochreguliert. Einzelne Untersuchungen berichten jedoch auch über eine vermehrte Expression von *mmp2* in kalzifizierten AK [10]. Darüber hinaus ist in kardialen Fibroblasten eine vermehrte Expression von *mmp2* durch eine Behandlung mit Glc bekannt [105], sodass *mmp2* möglicherweise ebenso ein wichtiger Parameter sein könnte. Für *mmp9* konnte in den vorliegenden Ergebnissen keine Genexpression nachgewiesen werden. Die Genexpression von *coll1a1* wie auch von *eln* ist in den vorliegenden Ergebnissen unverändert im Rahmen einer diabetischen Behandlung. Dies deckt sich mit Untersuchungen am 3D-Modell oviner AK, in welchen diabetische Bedingungen ebenso zu keinen signifikanten Veränderungen in der *coll1a1*-Expression führen [88]. Im Rahmen einer AKS ist die *coll1a1*-Expression erhöht [97], jedoch ist für kardiale Fibroblasten kein Einfluss von HG auf die *coll1a1*-Expression beschrieben [100, 105]. Demnach scheint es, dass diabetische Bedingungen in VIC eine untergeordnete Rolle im Rahmen einer Aktivierung der *coll1a1*-Expression einnehmen.

Der Differenzierungsmarker *acta2* ist in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant durch diabetische Bedingungen reguliert, bei genauerer Betrachtung lässt sich jedoch eine tendenziell verminderte

Expression unter HI-Behandlung vermuten, wie sie bereits von Selig et al. als signifikant beschrieben wurde [43]. Der Degenerationsmarker *opn* scheint demgegenüber, anders als für VIC bisher beschrieben [15, 43], ausschließlich durch HG-Behandlung signifikant vermehrt exprimiert zu sein. Auch wenn eine vermehrte Expression von *opn* im Rahmen einer osteoblastischen Differenzierung von VIC und daraus resultierender Kalzifikation der Klappe angenommen wird [20, 106], scheinen diabetische Bedingungen in VIC einen untergeordneten Einfluss auf diese Differenzierung zu nehmen. Erstaunlich erscheint, dass für *alpl* keinerlei Expression nachweisbar ist. Zahlreiche Publikationen haben die *alpl*-Expression in humanen VIC unabhängig von Insulin bereits nachweisen können, wobei die Expression in der Literatur nach 24 h und 48 h gemessen wurde [86, 107]. Jedoch ist eine Abhängigkeit sowohl zum AKT- als auch zum MAPK-Signalweg postuliert und dadurch belegt worden, dass eine Inhibition einer der beiden Signalwege die *alpl*-Expression signifikant reduziert [86, 87, 107]. Es stellt sich ebenso die Frage, inwiefern die Spezies hier einen Unterschied macht, da die vorliegenden Untersuchungen an ovinen VIC durchgeführt wurden. Darüber hinaus zeigt die *alpl*-Expression in VIC eine Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation sowie der Wahl des Kultivierungsuntergrundes [108, 109], sodass durchaus die Bestimmung der Expression nach 6 Tagen Kultivierung und die Wahl von Gelatine als Untergrund der Kavitäten in der vorliegenden Arbeit Einfluss auf die Genexpression von *alpl* gehabt haben könnten. In der LDH-Expression als Marker für den Zelltod gibt es keine signifikanten Unterschiede, was einen toxischen Einfluss der Behandlung auf die Zellen unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist stets zu bedenken, dass diese im Rahmen der Versuche mit den Inhibitoren Rapamycin und U0126 erhoben wurden. Somit bezieht sich die Interpretation auf Vehikelkontrollen. Auf eine separate Untersuchung der EZM sowie Degenerations- und Differenzierungsmarker wurde in Anbetracht der bereits vorhandenen Ergebnisse aus dem eigenen Institut verzichtet [22, 43].

## 4.5 Wirksamkeit der Inhibitoren auf Proteinebene

In der Anwendung der Inhibitoren muss berücksichtigt werden, dass diese über den gesamten Behandlungszeitraum von fünf Tagen Bestandteil des Mediums waren und stetig mit dem MW alle zwei Tage aufgefrischt wurden. Andere Publikationen geben als Inkubationszeit für die Inhibitoren in der Regel eine Stunde, selten mehr als 24 Stunden an [60, 63, 66, 95, 110-117].

### 4.5.1 AS1842856

AS1842856 ist als potenter und selektiver Inhibitor von FOXO1 bekannt [60]. Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben in VIC hingegen eher unspezifische Effekte. Dabei ist eine Inhibition des Zellwachstums bis hin zu einem Absterben der Zellen insbesondere bei hohen Konzentrationen Kern

der Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit. Unter der Annahme, dass FOXO1 in phosphorylierter Form an Proliferation und Anti-Apoptose beteiligt ist [38], ergeben diese Beobachtungen durchaus ein schlüssiges Bild. Auf der anderen Seite induziert AS1842856 in der vorliegenden Arbeit keine nachweisbare Reduktion von pFOXO1 in den Western-Blot-Analysen. Die fehlende Nachweisbarkeit einer inhibierenden Wirkung von AS1842856 auf die Phosphorylierung von FOXO1 scheint vor dem Hintergrund der bereits nachgewiesenen inhibierenden Wirkung in kardialen Fibroblasten [118] verwunderlich. Jedoch ist nicht nur für kardiale Fibroblasten, sondern auch für murine Mesangiumzellen beschrieben, dass AS1842856 eine Hemmung der Phosphorylierung von FOXO1 nur nach adäquater Stimulation dieser beispielsweise durch Lysosphosphatidylcholin [118] oder Homocystein [112] induziert. Sofern die Ergebnisse auf VIC übertragbar wären, scheint es so zu sein, dass AS1842856 nur unter spezifischen Stimuli eine Wirksamkeit ausprägt.

#### 4.5.2 Rapamycin

Rapamycin ist ein spezifischer Inhibitor von MTOR [65], die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dies auch für VIC. Die mikroskopischen Aufnahmen sowie die Analyse der Proteinkonzentrationen indizieren, dass Rapamycin zu einer Inhibition des Zellwachstums oviner VIC führt. Dieser Effekt einer verminderten Proliferation durch Rapamycin ist für primäre und kardiale Fibroblasten bereits beschrieben [61, 115]. In den Western-Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit inhibiert Rapamycin in allen getesteten Konzentrationen die Phosphorylierung von MTOR, wobei die Gesamtsynthese unverändert bleibt. Für murine mitrale VIC ist die inhibierende Wirkung Rapamycins auf die Phosphorylierung von MTOR unter Kontrollbedingungen bereits bekannt [111], sodass die Wirksamkeit von Rapamycin in ovinen aortalen VIC nun als bestätigt angesehen werden kann. Als effektive Konzentration wird oft 100 nM Rapamycin verwendet [61, 67, 111, 119]. Alternativ werden die Konzentrationen 10 nM [65, 117] oder 25 nM [120, 121] ebenfalls des Öfteren als effektiv beschrieben. In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse sind alle diese Konzentrationen in VIC als wirksam und nicht toxisch zu betrachten.

Unter Hinzunahme der weiteren Behandlungsbedingungen bestätigt sich die Wirksamkeit Rapamycins im Sinne einer Inhibition der Phosphorylierung von MTOR in allen Behandlungsbedingungen. Möglicherweise scheint dabei sogar die Gesamtsynthese im Sinne einer verminderten tMTOR-Synthese unter Inhibitorbehandlung beeinflusst zu werden. Ein solcher Effekt ist für 3T3- und HepG2-Zellen ebenfalls bereits beschrieben [65].

In zahlreichen Veröffentlichungen wird anstatt der Phosphorylierung von MTOR die Phosphorylierung von P70S6K als Korrelat einer Wirkung von Rapamycin ermittelt [61, 67, 117, 119, 120]. Diese zeigt als nachgeschaltete Kinase von MTOR in der Insulinsignalkaskade ebenfalls eine Wirkung des Inhibitors an [35, 39]. In humanen Leukozyten hat Rapamycin bereits eine Insulin-stimulierte

Aktivierung der Phosphorylierung von P70S6K erfolgreich inhibiert [67]. In VIC [111] sowie primären und kardialen Fibroblasten [61, 115] ist ebenfalls eine Inhibition der Phosphorylierung von P70S6K durch Rapamycin schon beschrieben. Diese ist beispielsweise in kardialen Fibroblasten sogar stärker ausgeprägt, als die Inhibition von pMTOR selbst [115, 122]. Vor diesem Hintergrund ist das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, in welchem pP70S6K nicht durch Rapamycin reguliert ist, widersprüchlich zur Fachliteratur einzuordnen. Schaefer et al. [123] haben jedoch bereits 2007 publiziert, dass die IGF-1-vermittelte Aktivierung von P70S6K in renalen Fibroblasten nur partiell durch eine Rapamycin-Behandlung inhibiert werden kann [123]. Dabei ist trotz der Unterschiede in den Zelllinien die Analogie von Insulin und IGF-1 zu beachten (siehe 4.2). Demgegenüber inhibiert Rapamycin in mitralen VIC die Periostin-vermittelte Phosphorylierung von MTOR und P70S6K effektiv [111]. In Analogie zu renalen Fibroblasten könnte auch in ovinen VIC die Aktivierung von P70S6K im Sinne einer Phosphorylierung durch Insulinstimulation nur zum Teil durch MTOR-vermittelt werden [123], sodass eine Inhibition von MTOR alleine zur Regulation der P70S6K nicht ausreichen könnte. Eine Wirksamkeit von Rapamycin in VIC *in vitro* scheint in Anbetracht der Western-Blot-Ergebnisse von MTOR sowie der Genexpressionsanalysen jedoch gegeben.

### 4.5.3 PD98059

PD98059 ist ein spezifischer Inhibitor von ERK 42/44 im MAPK-Signalweg [124]. In den untersuchten VIC führt PD98059 in allen getesteten Konzentrationen weder auf morphologischer noch auf proteinbiochemischer Ebene zu signifikanten Veränderungen. Vor dem Hintergrund, dass PD98059 bereits in humanen aortalen VIC als erfolgreicher Inhibitor publiziert ist [110], erscheint dieses Ergebnis widersprüchlich. Zudem ist für weitere Zelllinien wie Glattmuskelzellen [113], humane Endothelzellen der Umbilikalvene [117] und humane Fibroblasten [57] ebenfalls eine erfolgreiche Inhibition der Phosphorylierung von ERK 42/44 durch PD98059 beschrieben. Eine Inhibition insulininduzierter ERK-Phosphorylierung ist bisher nur in immortalisierten humanen Pankreasgang-Zellen veröffentlicht [121]. Wenn man bedenkt, dass die Inhibition von pERK 42/44 in den untersuchten Arbeiten ausschließlich nach einer adäquaten Stimulation der Zellen beispielsweise durch Taurin [110] oder VEGF [117] ausgeprägt ist, sind die vorliegenden Ergebnisse in VIC möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Phosphorylierung von ERK 42/44 nur unter Kontrollbedingungen dargestellt ist und AI hier keinen ausreichenden Stimulus darstellt. Dies deckt sich mit Beobachtungen in anderen Arbeiten [57, 114]. Zahlreiche Untersuchungen vergleichen darüber hinaus die Effektstärken von PD98059 und U0126. In diesen Untersuchungen ergibt sich das Bild einer Hemmung der Phosphorylierung von ERK 42/44 durch beide Inhibitoren, jedoch ist die Effektstärke unabhängig von der Zelllinie bei U0126 stets größer [58, 59, 120, 125, 126].

#### 4.5.4 U0126

U0126 kommt als direkter Inhibitor der Phosphorylierung von ERK 42/44 zum Einsatz [127]. Im Gegensatz zur fehlenden Nachweisbarkeit einer Wirkung von PD98059, fällt in den vorliegenden Ergebnissen bereits morphologisch eine reduzierte Proliferation unter der Behandlung mit U0126 auf. Während sich die meisten Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit von U0126 auf die Expression verschiedenster Marker im Rahmen von Kalzifikation und Apoptose konzentrieren, beschreibt eine Untersuchung an neuronalen Vorläuferzellen ebenso eine Inhibition der Proliferation durch U0126 [59]. Die in den Western-Blot-Analysen nachgewiesene Inhibition der Phosphorylierung ist ebenfalls konsistent mit der Literatur. Nicht nur in den VIC ähnlichen Zelllinien wie Glattmuskelzellen [58] und Fibroblasten [94, 128], sondern bereits in aortalen VIC selbst ist eine effektive Inhibition der Phosphorylierung von ERK 42/44 durch U0126 beschrieben [129]. Die in Folgeversuchen gewählte Konzentration von 10  $\mu$ M U0126 gilt in verschiedensten Zelllinien in der aktuellen Fachliteratur als etabliert und wirksam [58, 59, 94, 120, 125, 128, 130, 131] und weist auch in der durchgeführten Etablierung in VIC keine signifikanten antiproliferativen Effekte bei einer starken Inhibition von pERK 42/44 auf.

In der Evaluation der Wirkung von U0126 in den weiteren Behandlungsgruppen HG und HI sowie in deren Kombination fällt eine Inhibition der Phosphorylierung von ERK 42/44 insbesondere unter NG- und HG-Behandlung auf. Es scheint demnach so zu sein, dass die Behandlungsbedingungen Einfluss auf die Stärke der Inhibition durch U0126 nehmen, sodass unter Behandlung mit HG+HI kein signifikanter Effekt mehr zu beobachten ist. In der Interpretation ist jedoch zu beachten, dass Vergleiche zwischen den HG- und NG-Bedingungen aufgrund der Versuchsanordnung nicht zulässig sind, sodass durchaus ein signifikanter Unterschied von der HG+HI-Behandlung mit Rapamycin gegenüber der NG-Kontrolle bestehen könnte. Demgegenüber zeigt sich in der Gesamtsynthese von ERK 42/44 eine Anregung durch den Inhibitor in allen Behandlungsbedingungen, sodass die Ergebnisse in einer anderen üblichen Darstellungsweise der Form „pProtein/tProtein“ möglicherweise einen deutlicheren Inhibitor-Effekt suggerieren würden.

Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass U0126 nicht nur die Phosphorylierung von ERK 42/44, sondern auch jene von P70S6K in verschiedensten Zelllinien inhibiert [120, 132-134]. Demgegenüber stehen jedoch Untersuchungen in primären Fibroblasten, in welchen U0126 keine Regulation auf den gesamten PI3K-Signalweg nimmt [128], sodass sich die Fachmeinungen zu diesem Thema spalten. Um den Einfluss von U0126 auf den PI3K-Signalweg in VIC näher zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von P70S6K untersucht. Der Phosphorylierungsgrad von P70S6K blieb dabei von einer U0126-Behandlung im Wesentlichen unbeeinflusst. Lediglich unter HG-Behandlung kam es bei AI-Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu führte U0126 in allen Behandlungsbedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtsynthese von P70S6K. Inwiefern diese Regulation eine Auswirkung auf den Signalweg hat, ist schwer zu beurteilen,

insbesondere weil Effekte auf Proteinebene, wie bereits oben dargestellt, im Regelfall in der Form „pProtein/tProtein“ dargestellt werden, sodass eine gesonderte Beurteilung der Gesamtsynthese im Regelfall gar nicht erfolgt.

Die vorliegenden Ergebnisse indizieren, dass P70S6K kein geeigneter Parameter in VIC ist, um die proteinbasierten Effekte der Inhibitoren näher zu charakterisieren. Sowohl Rapamycin als auch U0126 führen zu keinen reproduzierbaren Veränderungen im Phosphorylierungsgrad von P70S6K. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann somit keine Aussage darüber getroffen werden, ob U0126 Einfluss auf den PI3K-Signalweg nimmt.

## 4.6 Expressionsanalysen unter MTOR-Inhibition

Über den Einfluss von Insulin und Glc auf den Zusammenhang zwischen Fibrosierung und Kalzifikation im Rahmen einer AKS und vermehrter Expression von Matrixmolekülen sowie Degenerations- und Differenzierungsmarkern ist derzeit noch wenig bekannt. Inwiefern Rapamycin im *in vitro* Modell Einfluss auf Veränderungen im Rahmen diabetischer Bedingungen in ovinen VIC nimmt, wurde in Genexpressionsanalysen näher beleuchtet. Rapamycin reduziert in der vorliegenden Arbeit unter diabetischen Bedingungen – insbesondere unter HI – die Expression von Molekülen der EZM, wobei vor allem *dcn*, *bgn*, *mmp2* und *has2* reguliert sind. Somit scheint Rapamycin zunächst einmal in VIC ähnliche Effekte hervorzurufen, wie sie beispielsweise für Fibroblasten und Glattmuskelzellen bereits beschrieben sind, wobei die bisherigen Untersuchungen insbesondere Effekte für *coll1a1* [122, 123, 135, 136], *mmp2* [137] sowie *bgn* und *dcn* [138] beschreiben. In immortalisierten humanen Pankreasgang-Zellen ist sogar eine Insulin-induzierte Inhibition der *mmp2*-Expression bereits beschrieben [121], wie sie scheinbar auch in VIC abläuft. Die *coll1a1*-Expression wird in den vorliegenden Ergebnissen unter allen Bedingungen einschließlich der Vehikelkontrolle durch Rapamycin signifikant inhibiert, sodass Rapamycin auf *coll1a1* möglicherweise unabhängig von einem aktivierenden Stimulus regulierend im Sinne einer Inhibition der Genexpression wirkt. Vergleicht man ausschließlich die Gruppen unter Rapamycin-Behandlung miteinander, fällt kein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen mehr auf. Rapamycin inhibiert demnach die in 4.4 beschriebenen Effekte, welche durch eine Behandlung mit diabetischen Bedingungen hervorgerufen werden. *Has2* weist demgegenüber auch unter Rapamycin-Behandlung noch signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression auf. Insbesondere HI scheint auf die mRNA-Expression von *has2* einen so großen Einfluss zu haben, dass dieser Effekt nicht durch Rapamycin inhibierbar scheint.

Der Differenzierungsmarker *acta2* wird durch Rapamycin gegenteilig zu den Molekülen der EZM vermehrt exprimiert. Hier liegt die Vermutung nahe, dass Rapamycin die Umwandlung ruhender VIC in aktivierte VIC induziert. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass Rapamycin verhindert, dass aktivierte VIC weiter zu osteoblastischen VIC differenzieren, wobei die *opn*-Expression in der vorliegenden Arbeit ausschließlich unter HG-Behandlung einen Hinweis hierauf im Sinne einer

verminderten *opn*-Expression unter Rapamycin-Behandlung liefert. Andererseits weisen humane aortale VIC unter anderem eine verminderte *alpl*-Expression unter Rapamycin-Behandlung auf, sodass eine antiosteogene Wirkung Rapamycins untermauert wird [139, 140]. Demgegenüber weisen Glattmuskelzellen und embryonale Fibroblasten keine Regulation der *opn*-Expression auf [141, 142], wobei in Ersteren selbst eine vorgeschaltete Inhibition des gesamten PI3K-Signalweges zu keiner veränderten Expression führte [142]. Außerdem sind die vorliegenden Ergebnisse zur *opn*-Expression bei hoher Standardabweichung unter HG-Behandlung kritisch zu betrachten. Scheinbar ist der PI3K-Signalweg in VIC nicht primär für die vermehrte Expression von *opn* in kalzifizierten AK [106] verantwortlich. Unter Betrachtung der Rapamycin-Gruppen untereinander fällt weiterhin eine Regulation der *acta2*-Expression durch HI-Behandlung auf, sodass Rapamycin unter HI-Bedingungen potenziell einen geringeren Einfluss auf phänotypische Veränderungen von VIC nimmt. Für *alpl* hätte man bei nachweisbarer Expression möglicherweise eine Inhibition der *alpl*-Expression erwarten können, wie sie für humane VIC bereits beschrieben ist [140].

Der Einfluss der Rapamycin-Behandlung auf die Vitalität der Zellen wurde mithilfe des LDH-Assays untersucht. LDH ist als Zelltodmarker im Zytoplasma aller Zellen vorhanden und wird im Rahmen zellulärer Schadensprozesse wie Apoptose und Nekrose in den Überstand freigesetzt [143]. Die LDH-Aktivität nimmt in der vorliegenden Arbeit durch eine Kombination der Behandlungen Rapamycin und HG bzw. HG+HI signifikant zu. Bedenkt man, dass sowohl verminderte LDH-Synthese [144], aber auf der anderen Seite auch vermehrter Zelltod durch Rapamycin in Fibroblasten bereits beschrieben sind [61], scheinen VIC in ihrer Vitalität gemessen an der LDH-Synthese durch Rapamycin unter Kontrollbedingungen nicht eingeschränkt zu sein. Erst eine Kombination von Rapamycin mit HG oder HG+HI führt im Sinne einer Potenzierung schädlicher Einflüsse zu einer signifikanten Zunahme der LDH-Synthese respektive einer Abnahme der Vitalität. Ohne Rapamycin führen diabetische Bedingungen scheinbar nicht zu einer reduzierten Vitalität. *In vitro* Untersuchungen in arteriellen SMC zeigen darüber hinaus eine reduzierte Proliferation durch Rapamycin-Behandlung [145] und führen in murinen 3T3-Fibroblasten zu einer Protein-Degradation [146]. Rapamycin scheint also schädliche Effekte auf verschiedene Zelltypen auszuüben. Dabei ist jedoch zu beachten, dass trotz geringer Datenlage zum Einfluss Rapamycins auf die LDH-Freisetzung für Mesangiumzellen keine vermehrte LDH-Freisetzung durch eine Rapamycin-Behandlung gezeigt wird [147]. Außerdem zeigen andere Vitalitätsmessungen wie der MTT-Assay in Neuroblastom-Zellen ebenfalls keinen negativen Einfluss [148]. Fraglich bleibt, inwiefern diese Erkenntnisse jedoch weiteren Einfluss auf die Homöostase und Funktion der Zellen nehmen. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass auch eine Vielzahl weiterer Umstände die Vitalität der Zellen beeinflussen kann. Dazu gehören insbesondere Temperaturschwankungen oder verlängerte Trockenphasen während des Medium-Wechsels aufgrund der Anordnung in den Kultivierungsplatten. Ein solcher Einfluss sollte jedoch bei einer Replikationszahl von sieben zunehmend an Bedeutung verlieren.

Zusammenfassend scheint Rapamycin die Genexpression relevanter Marker der AKS auf ein konstantes Level zu senken, sodass sich zumindest auf genetischer Ebene die induzierten Effekte durch eine diabetische Behandlung vollständig zu nivellieren scheinen. Ausgenommen hiervon sind *has2* und *acta2*. HI scheint in diesem Rahmen einen so großen Einfluss zu haben, dass dieser nicht durch Rapamycin inhibierbar ist. Auch in diesem Rahmen kann weiterhin die Hypothese vertreten werden, dass eine HI-Behandlung mehr Einfluss auf die Zellen zu nehmen scheint als eine HG-Behandlung.

## 4.7 Expressionsanalysen unter ERK 42/44-Inhibition

Inwiefern U0126 im Rahmen diabetischer Bedingungen Einfluss auf Veränderungen der Genexpression verschiedener Matrixmoleküle sowie Degenerations- und Differenzierungsmarker in ovinen VIC nimmt, wurde analog zu Rapamycin in Genexpressionanalysen näher beleuchtet. Tendenziell zeichnet sich in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der Expression von Molekülen der EZM ab, wobei insbesondere *dcn*, *bgn*, *mmp2* und *has2* reguliert sind. Dies ist – soweit bekannt – konsistent mit der aktuellen Fachliteratur. Dort wird bereits eine reduzierte *dcn*-Expression in mesenchymalen Stammzellen [149] sowie eine reduzierte *mmp2*-Expression in kardialen Fibroblasten [150, 151] durch U0126 beschrieben. Ebenso führt U0126 in dermalen Fibroblasten zu einer signifikanten Reduktion der PDGF-induzierten Expression von *has2* mit daraus resultierender verminderter Hyaluronansynthese, wobei der Vergleich zur Kontrollbedingung keinen signifikanten Unterschied zeigt [152]. Analog dazu ist in der vorliegenden Arbeit eine reduzierte Expression von Molekülen der EZM durch U0126 vereinzelt unter diabetischen Bedingungen zu beobachten, während U0126 unter Kontrollbedingungen die Genexpression oben genannter Moleküle nicht verändert. Damit scheinen potenzielle Einflüsse diabetischer Bedingungen auf genetischer Ebene zum Teil durch U0126 inhibierbar. Analog zu Rapamycin könnte dies ein vielversprechendes Ergebnis sein, da insbesondere die beiden Proteoglykane *bgn* und *dcn* bekanntermaßen in frühen Stadien in der CAVD vermehrt exprimiert sind [97, 153], wobei insbesondere für *bgn* sowohl in fibrotischen als auch in kalzifizierten Stadien eine erhöhte Expression nachgewiesen wurde [15]. Demgegenüber wird in der vorliegenden Arbeit die *eln*-Expression unter allen Behandlungsbedingungen durch U0126 signifikant vermehrt exprimiert. Analog hierzu inhibiert U0126 in pulmonalen Fibroblasten die durch EGF-induzierte Herunterregulation von *eln* [154], sodass VIC unter diabetischen Bedingungen ähnlich auf eine U0126-Behandlung zu reagieren scheinen. Andererseits wird die *eln*-Expression in den vorliegenden Ergebnissen bereits unter Kontrollbedingungen durch U0126 hochreguliert, sodass der verwendete Inhibitor potenziell unabhängig von einer diabetischen Behandlung protektive Effekte im Sinne vermehrter Elastizität der Klappe ausüben könnte. Es lässt sich somit vermuten, dass ERK 42/44 eine wichtige Rolle in der Bildung elastischer Fasern in VIC einnimmt. In der vorliegenden Arbeit wird *colla1* als Molekül der EZM nicht durch eine Behandlung mit U0126 beeinflusst. Hier scheinen sich VIC potenziell von kardialen Myofibroblasten zu unterscheiden, für welche bereits eine Inhibition der VEGF-induzierten

Kollagen Typ 1-Expression beschrieben ist [155]. Wie bereits vermutet, scheint ERK 42/44 keinen relevanten Einfluss auf die Genexpression von *coll1a1* unter diabetischen Bedingungen zu nehmen. Dies könnte daran liegen, dass die in der vorliegenden Arbeit gewählten diabetischen Bedingungen als Stimuli für eine Veränderung der Kollagenexpression alleine nicht ausreichend sind.

Der Differenzierungsmarker *acta2* ist in der vorliegenden Arbeit analog zu einer Rapamycin-Behandlung durch eine U0126-Behandlung signifikant vermehrt exprimiert. In porcinen aortalen VIC ist die Induktion der *acta2*-Expression durch U0126 bereits mehrfach beschrieben [129, 156]. Dies lässt vermuten, dass U0126 ebenso wie Rapamycin die Aktivierung ruhender VIC in aktivierte VIC induziert, wobei der Effekt unabhängig von einer diabetischen Behandlung der Zellen bereits unter Kontrollbedingungen in Erscheinung tritt. Bedenkt man jedoch, dass U0126 die Kalzifikation in porcinen VIC reduziert [95, 129], bedarf es weiterer Untersuchungen zum Pathomechanismus bzw. dem Einfluss der *acta2*-Expression im Rahmen diabetischer Bedingungen auf die Entwicklung einer AKS und die Rolle von Inhibitoren wie U0126. Die *opn*-Expression ist unter HG-Bedingungen signifikant durch eine U0126-Behandlung vermindert, während sich ein solches Ergebnis in keiner der anderen untersuchten Gruppen nachweisen lässt. Somit scheint U0126 in VIC antiosteogene Effekte hervorzurufen, wie sie bereits für pulmonalarterielle und aortale Glattmuskelzellen [142, 157], aber auch für porcine VIC [95] beschrieben sind. Demgegenüber prägen murine fibroblasten-ähnliche Präosteoblasten auf verschiedene Behandlungskonzentrationen von U0126 keine Unterschiede in der *opn*-Expression aus [158], sodass auch in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse bei hoher Standardabweichung unter HG-Behandlung und keinen signifikanten Effekten in den übrigen Gruppen kritisch zu betrachten sind.

Vergleicht man ausschließlich die Gruppen unter U0126-Behandlung miteinander, fällt ausnahmslos kein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen auf. Dies gilt für Moleküle der EZM, wie auch für den Differenzierungsmarker *acta2* und den Degenerationsmarker *opn*. U0126 inhibiert demnach die in 4.4 beschriebenen Effekte, welche durch eine Behandlung mit diabetischen Bedingungen hervorgerufen werden.

Der Einfluss der U0126-Behandlung auf die Vitalität der Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe eines LDH-Assays untersucht. Dabei kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen, sodass die Vermutung naheliegt, dass eine Behandlung mit U0126 die Vitalität in ovinen VIC nicht beeinträchtigt. Dies deckt sich mit Untersuchungen aus murinen H9c2-Zellen, in welchen U0126 alleine keinen Effekt auf die LDH-Expression ausübt [159]. Spezifische Behandlungsbedingungen wie die Inkubation mit NG folgend auf HG unter U0126-Behandlung zeigt in der gleichen Zelllinie sogar einen protektiven Effekt im Sinne einer verminderten LDH-Freisetzung [160]. Ein solcher Effekt ist in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zu beobachten. Analog zu humanen aortalen Glattmuskelzellen, in welchen U0126 keinen Einfluss auf die Zellvitalität nimmt [157], scheint U0126 auch in VIC unter allen diabetischen Behandlungsbedingungen keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen auszuüben.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass in VIC die *dcn-*, *bgn-*, *mmp2-*, *has2-* wie auch die *eln*-Expression unter anderem ERK 42/44-vermittelt sind. Zusätzlich scheint die *acta2*-Expression unter anderem ERK 42/44-vermittelt zu sein. Demgegenüber scheint ERK 42/44 in der *coll1a1*-Expression eine untergeordnete Rolle zu spielen. Inwiefern die beobachteten Effekte auf die Genexpression auch auf Proteinebene nachweisbar sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sollte in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden. Darüber hinaus scheint U0126 die Genexpression relevanter Marker der AKS auf ein konstantes Level zu senken, sodass sich zumindest auf genetischer Ebene die induzierten Effekte durch eine diabetische Behandlung vollständig zu nivellieren scheinen. Die Inhibitorbehandlung könnte zu einer Unabhängigkeit von den Behandlungsbedingungen führen, was Sinn ergibt, wenn man von dem Gedanken ausgeht, dass die Genexpression unter anderem von der Aktivierung der Insulinsignalkaskade abhängt. Dagegen scheint es jedoch auch ohne Inhibitor zu keiner wesentlichen Änderung der Genexpression zu kommen, sodass fraglich erscheint, inwiefern die detektierten Unterschiede in der Aktivierung des Signalweges in der Genexpression der untersuchten Moleküle in Rahmen einer CAVD relevant sind. Nichtsdestotrotz erwirken beide Inhibitoren unabhängig von weiteren Behandlungsbedingungen zum Teil signifikante Effekte, die sich protektiv auf die Entwicklung einer CAVD auswirken könnten. Somit könnte die Aktivierung des Insulinsignalweges einen relevanten Anteil zu der Entwicklung einer CAVD beitragen.

## 4.8 Analyse des Metabolismus

Bisher ist weitgehend unbekannt, welche metabolischen Charakteristika VIC unter diabetischen Behandlungsbedingungen ausprägen. Man weiß, dass insbesondere die Bedingungen HI und HG in VIC zu einer Aktivierung des Metabolismus im Sinne einer erhöhten OCR und PER führen [43]. Darüber hinaus ist in weiteren Zelllinien wie humanen Muskelzellen [161] oder pulmonalarteriellen Fibroblasten [162] eine Aktivierung der Glykolyse unter HG beschrieben. In den vorliegenden Ergebnissen führt die Kultivierung von VIC mit HI oder HG nach einem Zeitraum von fünf Tagen im *Seahorse*-Assay ebenfalls zu einem relativen Anstieg der OCR sowie der PER im Vergleich zur Kultivierung unter NG-Bedingungen. Anders als von Selig et al. [43] beschrieben, ist die Aktivierung unter einer Kombinationsbehandlung von HG und HI in den vorliegenden Ergebnissen jedoch am stärksten ausgeprägt. Diese Unterschiede könnten auf den unterschiedlichen Zellpool, aus welchem die Zellen stammen, zurückzuführen sein. Es scheint demnach, anders als bisher angenommen, so zu sein, dass alle diabetischen Behandlungsbedingungen, insbesondere HG+HI, die metabolische Aktivität in VIC aktivieren.

### 4.8.1 Einfluss von Glukose und Insulin auf die mitochondriale Atmung

In der basalen Zellatmung, welche die Ausgangswerte der OCR abzüglich der nicht-mitochondrialen Atmung beschreibt, zeigt sich in der vorliegenden Arbeit ein progressiver Anstieg durch die diabetischen Bedingungen. Demgegenüber gibt es keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Nährstoffquellen. In den Ausgangswerten der OCR ist noch kein Inhibitor dem Medium zugegeben, sodass potenzielle Unterschiede ausschließlich aus einer veränderten nicht-mitochondrialen Atmung herrühren. Somit scheint kein Unterschied in der nicht-mitochondrialen Atmung unter Restriktion auf die verschiedenen Nährstoffquellen zu bestehen. Unter HG+HI-Bedingungen kommt es hingegen zu einer Abnahme der ATP-Produktion unter Restriktion der Zellen auf Gln. Darüber hinaus sind die maximale Zellatmung sowie die respiratorische Reservekapazität, welche Parameter für die Anpassungsfähigkeit der Zellen auf veränderte Bedingungen darstellen, unter Restriktion auf Gln oder FS signifikant eingeschränkt. Scheinbar ist die mitochondriale Atmung in VIC damit insbesondere von einer Energiezufuhr durch Glc abhängig. Dieser Effekt ist jedoch nur unter den diabetischen Behandlungsbedingungen ausgeprägt. Dies kann so interpretiert werden, dass die diabetischen Bedingungen in VIC eine Abhängigkeit von Glc auslösen, während unter NG-Bedingungen eine Abhängigkeit von Glc nicht in dem Maße ausgeprägt ist. Hier scheint ein Unterschied zur Energieversorgung im Rest des Herzens zu bestehen, welcher zu etwa 70 % durch FS-Oxidation gedeckt wird [30, 54].

### 4.8.2 Einfluss von Glukose und Insulin auf die glykolytische Aktivität

In der basalen Glykolyse zeigen sich in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede unter Restriktion der VIC auf verschiedene Nährstoffquellen. Dies scheint nicht weiter verwunderlich mit dem Wissen, dass analog zur basalen Zellatmung nur die nicht-mitochondriale Atmung einen Unterschied zwischen den Gruppen induzieren könnte. Wie bereits oben beschrieben (siehe 4.8.1), scheint es diesbezüglich jedoch unter Restriktion auf verschiedene Nährstoffquellen keine signifikanten Unterschiede zu geben. Eine Restriktion der Zellen auf Gln oder FS führt hingegen zu einer erhöhten induzierten Glykolyse im Vergleich zur Kontrolle, aber auch verglichen mit einer Restriktion auf Glc. Hier scheint sich ebenso zu bestätigen, dass Glc die Hauptenergiequelle für VIC darstellt. Während die aerobe Glykolyse durch die Inhibition mit UK5099 blockiert ist [50], scheint die anaerobe Glykolyse vermehrt stattzufinden und als Energiequelle für die VIC zu dienen. Eine Restriktion auf Glc führt jedoch weder in den Parametern der mitochondrialen Atmung noch in jenen der glykolytischen Aktivität zu signifikanten Unterschieden. Vermutlich kann unter diesen Bedingungen die aerobe Glykolyse über die mitochondriale Atmung sowie die anaerobe Glykolyse weiter ablaufen. Die Analyse der kompensatorischen Glykolyse, welche nach der Blockade der mitochondrialen Atmung durch Rotenon und Antimycin A erhoben wird, zeigt ebenso keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den einzelnen Gruppen. Vermutlich ist hier

eine Sättigung erreicht, sodass die Zellen nicht mehr Moleküle in der Glykolyse umsetzen können, als dies bereits unter Kontrollbedingungen der Fall ist. Der weiterhin vorhandene Unterschied zwischen den diabetischen Behandlungsbedingungen könnte darauf hindeuten, dass eine Inkubation unter diesen Bedingungen über fünf Tage zu einer vermehrten Expression metabolischer Enzyme und damit zu einem erhöhten Potenzial, Glykolyse durchzuführen, führt. Analog dazu ist für verschiedene Zelllinien bereits eine Aktivierung der Glykolyse durch Inkubation der Zellen mit HG beschrieben [43, 161, 162], wobei HI und insbesondere deren Kombination (HG+HI) diesen Effekt ebenso zu verursachen scheinen.

## 4.9 Limitationen der Arbeit

In der Entwicklung einer CAVD im humanen Organismus gibt es eine Vielzahl an Stimuli sowie komplexe Interaktionen zwischen diesen, welche in dem Rahmen eine entscheidende Rolle spielen. T2D stellt in diesem komplexen System einen Risikofaktor dar [45]. In den vorliegenden Untersuchungen werden ausschließlich Stimuli im Rahmen von diabetischen Bedingungen untersucht, wobei Interaktionen zu weiteren Risikofaktoren keine Beachtung finden. Darüber hinaus finden alle Untersuchungen an einem artifiziellen zweidimensionalen Zellkulturmodell statt, welches Interaktionen zu anderen Zelltypen, wie den valvulären Endothelzellen, aber auch die Rolle der EZM ausklammert. Als Behandlungsbedingungen wurden HG und HI festgelegt, da diese in der Entwicklung eines T2D eine wichtige Rollen einnehmen [26, 46]. Jedoch wirken diese nicht allein auf die Zellen, sondern es kommt zudem zu inflammatorischen Reaktionen sowie metabolischen Veränderungen im Rahmen eines DM [26], welche in der vorliegenden Arbeit nicht in den Versuchsbedingungen berücksichtigt wurden. Darüber hinaus spielt auch die Adipositas, welche mit einem veränderten Fettstoffwechsel einhergeht, im Rahmen eines T2D eine entscheidende Rolle. Daraus resultierende hormonelle Unterschiede und differierende FS-Gehalte im Blut finden in der vorliegenden Arbeit ebenso keine Beachtung. Zuletzt ist zu beachten, dass die Untersuchungen an ovinen Zellen durchgeführt werden. Hintergrund der Forschung bildet die CAVD im humanen Organismus. Unterschiede zwischen den beiden Spezies sind demnach bei einer Übertragung zu beachten. Insgesamt bieten zweidimensionale Zellkulturmodelle jedoch eine gute Möglichkeit, initial Veränderungen auf zellulärer Basis zu untersuchen und zu beschreiben. Dennoch ist es nötig, detektierte Veränderungen in 3D-Modellen bis hin zu Kultursystemen wie z. B. einem Bioreaktor weiter zu charakterisieren und zu validieren, wobei es zur Charakterisierung der Einflüsse von Glc und Insulin in verschiedenen 3D-Modellen bereits Forschungsansätze gibt [88].

## 4.10 Schlussfolgerung

Insgesamt ist noch wenig über Inhibitor-Wirkungen in VIC bekannt und insbesondere der Einfluss diabetischer Behandlungsbedingungen in Zusammenhang mit den Inhibitorwirkungen ist hier erstmalig beschrieben. Unter den diabetischen Behandlungsbedingungen scheint insbesondere HI verglichen mit HG einen großen Effekt auf die Biosynthese einiger Signalproteine wie AKT, GSK, MTOR und ERK zu haben. Dies untermauert die von Selig et al. beschriebene Hypothese, dass VIC eine Insulinsensitivität aufweisen [43]. Diese scheint jedoch unter Inhibition des PI3K-Signalweges mit Rapamycin oder des MAPK-Signalweges mit U0126 nachrangig zu werden, sodass es im Rahmen der Inhibitorbehandlung potenziell zu einer Unterdrückung der mitogenen und metabolischen Aktivität der Insulinsignalkaskade kommt. Ebenso führt Rapamycin wie auch U0126 in der Analyse der Genexpression zu einer Angleichung der beobachteten Unterschiede durch eine diabetische Behandlung.

Die Analyse des Metabolismus zeigt, dass diabetische Bedingungen in VIC die Stoffwechselaktivität anregen. Außerdem scheint Glc die Hauptenergiequelle für VIC zu sein. In diesem Rahmen wird die von Selig et al. [43] bereits beschriebene Hypothese verstärkt, dass HG über die vermehrte Energiezufuhr durch einen erhöhten Glc-Spiegel den Metabolismus in VIC anregt. Diese Erkenntnis kann jedoch nicht in einen primären Zusammenhang zu einer vermehrten Fibrosierung oder Verkalkung der AK gesetzt werden, da derartige Zusammenhänge bisher weitgehend unbekannt sind.

Über welche Mechanismen T2D und prädiabetische Stadien Einfluss auf die Entwicklung einer CAVD nehmen, bleibt weiterhin zu erforschen. Die Insulinsignalkaskade scheint dabei jedoch eine relevante Rolle einzunehmen, welche weiterhin ein weites und interessantes Forschungsfeld darstellt. Die vorliegende Arbeit zeigt an einem *in vitro* Modell, dass diabetische Behandlungsbedingungen in VIC über den PI3K- und den MAPK-Signalweg profibrotische und prokalzifizierende Mechanismen induzieren, welche über eine Inhibition mit Rapamycin und U0126 ausgeglichen werden. Somit könnten sich die Inhibitoren Rapamycin und U0126 potenziell protektiv auf die Effekte auswirken, welche diabetische Bedingungen im Rahmen der Entwicklung einer CAVD erwirken.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Weinhaus, A.J. and K.P. Roberts, *Anatomy of the Human Heart*, in *Handbook of Cardiac, Anatomy, Physiology, and Devices*, P.A. Iaizzo, Editor. 2005, Humana Press: Totowa. p. 51-79.
2. Schrader, J., A. Gödecke, and M. Kelm, *Das Herz*, in *Physiologie*, A. Kurtz, H.-C. Pape, and S. Silbernagel, Editors. 2014, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 170-212.
3. Schmitz, F., *Herz und Herzbeutel*, in *Duale Reihe Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2014, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 578-626.
4. Misfeld, M. and H.H. Sievers, *Heart valve macro- and microstructure*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007. **362**(1484): p. 1421-36.
5. Goody, P.R., et al., *Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. **40**(4): p. 885-900.
6. Lerman, D.A., S. Prasad, and N. Alotti, *Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches*. *Eur Cardiol*, 2015. **10**(2): p. 108-112.
7. Iung, B., et al., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. *Eur Heart J*, 2003. **24**(13): p. 1231-43.
8. Thaden, J.J., V.T. Nkomo, and M. Enriquez-Sarano, *The global burden of aortic stenosis*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2014. **56**(6): p. 565-71.
9. Osnabrugge, R.L., et al., *Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(11): p. 1002-12.
10. Lindman, B.R., et al., *Calcific aortic stenosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16006.
11. Iung, B. and A. Vahanian, *Degenerative calcific aortic stenosis: a natural history*. *Heart*, 2012. **98 Suppl 4**: p. iv7-13.
12. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease*. *Cardiovascular Health Study*. *J Am Coll Cardiol*, 1997. **29**(3): p. 630-4.
13. Yutzey, K.E., et al., *Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(11): p. 2387-93.
14. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. *Circulation*, 1994. **90**(2): p. 844-53.
15. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. *Diab Vasc Dis Res*, 2019. **16**(3): p. 254-269.
16. SMARTSEVIR. *Erstellung von Abbildungen*. 2022/01/08]; Available from: <https://smart.servier.com>.
17. Otto, C.M., *Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(13): p. 1395-8.

18. Obermayer-Pietsch, B. and V. Schwetz, [*Biochemical markers of bone metabolism and their importance*]. *Z Rheumatol*, 2016. **75**(5): p. 451-8.
19. Rutkovskiy, A., et al., *Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification*. *J Am Heart Assoc*, 2017. **6**(9).
20. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(5): p. 1407-18.
21. Rajamannan, N.M., et al., *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update*. *Circulation*, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
22. Selig, J.I., *Die Rolle der extrazellulären Matrix in der degenerativen Aortenklappenerkrankung unter dem Einfluss von Diabetes*, in *Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie*. 2019, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf. p. 171.
23. Krishnamurthy, V.K., et al., *Dysregulation of hyaluronan homeostasis during aortic valve disease*. *Matrix Biol*, 2017. **62**: p. 40-57.
24. Song, R., et al., *Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(11): p. 2711-20.
25. Mann, W.A., K.-H. Usadel, and P. Wahl, *Diabetologie*, in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2018, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 691-718.
26. American Diabetes, A., 2. *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018*. *Diabetes Care*, 2018. **41**(Suppl 1): p. S13-S27.
27. Huang, Y., et al., *Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis*. *BMJ*, 2016. **355**: p. i5953.
28. Cho, N.H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018. **138**: p. 271-281.
29. Menke, A., et al., *Prevalence of and Trends in Diabetes Among Adults in the United States, 1988-2012*. *JAMA*, 2015. **314**(10): p. 1021-9.
30. Gray, S. and J.K. Kim, *New insights into insulin resistance in the diabetic heart*. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. **22**(10): p. 394-403.
31. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(1).
32. Belfiore, A., et al., *Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease*. *Endocr Rev*, 2009. **30**(6): p. 586-623.
33. Godsland, I.F., *Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer*. *Clin Sci*, 2009. **118**(5): p. 315-32.
34. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(2): p. 85-96.
35. Fruman, D.A., et al., *The PI3K Pathway in Human Disease*. *Cell*, 2017. **170**(4): p. 605-635.

36. Liu, G.Y. and D.M. Sabatini, *mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(4): p. 183-203.
37. Hardie, D.G. and M.L. Ashford, *AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels*. Physiology (Bethesda), 2014. **29**(2): p. 99-107.
38. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
39. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
40. Arad, M., C.E. Seidman, and J.G. Seidman, *AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. 474-88.
41. Chopra, I., et al., *Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle*. Diabetologia, 2012. **55**(3): p. 783-94.
42. Frojdo, S., H. Vidal, and L. Pirola, *Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(2): p. 83-92.
43. Selig, J.I., et al., *Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells - A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(9): p. 2526-2537.
44. Larsson, S.C., et al., *Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases*. Int J Cardiol, 2018. **262**: p. 66-70.
45. Yan, A.T., et al., *Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study*. J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(12): p. 1523-1532.
46. Kitada, M., et al., *Molecular mechanisms of diabetic vascular complications*. J Diabetes Investig, 2010. **1**(3): p. 77-89.
47. Le Quang, K., et al., *Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(10): p. 2283-91.
48. Heinonen, S.E., et al., *Increased atherosclerotic lesion calcification in a novel mouse model combining insulin resistance, hyperglycemia, and hypercholesterolemia*. Circ Res, 2007. **101**(10): p. 1058-67.
49. Ljungberg, J., 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).
50. Agilent Technologies, I. *Agilent Seahorse XF Mito Fuel Flex Test Kit*. 2019 2020/03/25]; 2:[Available from: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Mito\\_Fuel\\_Flex\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide%20old.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Mito_Fuel_Flex_Test_Kit_User_Guide%20old.pdf).
51. Rassow, J., *Energiestoffwechsel*, in *Duale Reihe Biochemie*, J. Rassow, et al., Editors. 2016, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 17-336.
52. Agilent Technologies, I. *Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit*. 2019 2020/03/25]; 2:[Available from:

- [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Cell\\_Mito\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf).
53. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchon, *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. **26**(6): p. 711-23.
  54. Veloso, C.D., et al., *A Mitochondrial Approach to Cardiovascular Risk and Disease*. Curr Pharm Des, 2019. **25**(29): p. 3175-3194.
  55. Baum, H., *Zählkammer*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2013, Springer-Verlag GmbH: Berlin. p. 1437.
  56. Galley, J.C., et al., *Antagonism of Forkhead Box Subclass O Transcription Factors Elicits Loss of Soluble Guanylyl Cyclase Expression*. Mol Pharmacol, 2019. **95**(6): p. 629-637.
  57. Imai, K., et al., *Biological Effects of Shikonin in Human Gingival Fibroblasts via ERK 1/2 Signaling Pathway*. Molecules, 2019. **24**(19).
  58. Kubin, T., et al., *The MEK1 inhibitors UO126 and PD98059 block PDGF-AB induced phosphorylation of threonine 292 in porcine smooth muscle cells*. Cytokine, 2017. **95**: p. 51-54.
  59. Learish, R.D., M.D. Bruss, and M. Haak-Frendscho, *Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks proliferation of neural progenitor cells*. Brain Res Dev Brain Res, 2000. **122**(1): p. 97-109.
  60. Nagashima, T., et al., *Discovery of novel forkhead box O1 inhibitors for treating type 2 diabetes: improvement of fasting glycemia in diabetic db/db mice*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(5): p. 961-70.
  61. Ranieri, C., et al., *In vitro efficacy of ARQ 092, an allosteric AKT inhibitor, on primary fibroblast cells derived from patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS)*. Neurogenetics, 2018. **19**(2): p. 77-91.
  62. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 159-68.
  63. Savai, R., et al., *Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1289-300.
  64. Senawong, T., et al., *Germline mutations of MEK in cardio-facio-cutaneous syndrome are sensitive to MEK and RAF inhibition: implications for therapeutic options*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(3): p. 419-30.
  65. Yang, P., et al., *Paradoxical effect of rapamycin on inflammatory stress-induced insulin resistance in vitro and in vivo*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14959.
  66. Zhang, L., et al., *Reversal of Pathological Features of Graves' Orbitopathy by Activation of Forkhead Transcription Factors, FOXOs*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(1): p. 114-22.
  67. Zhang, Z., et al., *Insulin-Dependent Regulation of mTORC2-Akt-FoxO Suppresses TLR4 Signaling in Human Leukocytes: Relevance to Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2016. **65**(8): p. 2224-34.
  68. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.

69. Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967. **28**(5): p. 815-20.
70. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
71. Wallace, A.L. and J.M. Bassett, *Effect of sheep growth hormone on plasma insulin concentration in sheep*. *Metabolism*, 1966. **15**(2): p. 95-7.
72. Wilcox, G., *Insulin and insulin resistance*. *Clin Biochem Rev*, 2005. **26**(2): p. 19-39.
73. Thermo Fisher Scientific, I. *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit*. 2019 2020/03/25]; B.O:[Available from: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018500\\_CyQUANT-LDH-Cytotoxicity-Assay-Kit\\_PI.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018500_CyQUANT-LDH-Cytotoxicity-Assay-Kit_PI.pdf).
74. Romero, N., et al., *Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology (White Paper)*. Agilent Technologies, Inc., 2018(5991-9303EN).
75. Romero, N., et al., *Improving Quantification of Cellular Glycolytic Rate Using Agilent Seahorse XF Technology (White Paper)*. Agilent Technologies, Inc., 2017(5991-7894EN).
76. Ouwens, D.M., *Master module: Insulin Resistance and Diabetes Mellitus, Seahorse analysis*. 2020, Deutsches Diabetes Zentrum, Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
77. Li, G., et al., *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): p. 4690-6.
78. Fries, J., *LONG®R3IGF-I: An Insulin Alternative Exclusively for Cell Culture Applications*. *BioFiles*, 2009. **4.5**: p. 14.
79. Harada, S., R.M. Smith, and L. Jarett, *Mechanisms of nuclear translocation of insulin*. *Cell Biochem Biophys*, 1999. **31**(3): p. 307-19.
80. White, M.F. and C.R. Kahn, *The insulin signaling system*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(1): p. 1-4.
81. Pandini, G., et al., *Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39684-95.
82. Benyoucef, S., et al., *Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and FnI domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation*. *Biochem J*, 2007. **403**(3): p. 603-13.
83. Denley, A., et al., *Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR*. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(10): p. 2502-12.
84. Haeusler, R.A., T.E. McGraw, and D. Accili, *Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(1): p. 31-44.
85. Lam, N.T., I. Tandon, and K. Balachandran, *The role of fibroblast growth factor 1 and 2 on the pathological behavior of valve interstitial cells in a three-dimensional mechanically-conditioned model*. *J Biol Eng*, 2019. **13**: p. 45.

86. Zhou, T., et al., *Curcumin inhibits calcification of human aortic valve interstitial cells by interfering NF-kappaB, AKT, and ERK pathways*. *Phytother Res*, 2020. **34**(8): p. 2074-2081.
87. Rosa, M., et al., *Leptin induces osteoblast differentiation of human valvular interstitial cells via the Akt and ERK pathways*. *Acta Diabetol*, 2017. **54**(6): p. 551-560.
88. Selig, J.I., et al., *Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(13).
89. van der Horst, A. and B.M. Burgering, *Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(6): p. 440-50.
90. Moorhead, W.J., 3rd, et al., *Dysregulation of FOXO1 (Forkhead Box O1 Protein) Drives Calcification in Arterial Calcification due to Deficiency of CD73 and Is Present in Peripheral Artery Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. **40**(7): p. 1680-1694.
91. Fatima, K., et al., *The Dual Specificity Role of Transcription Factor FOXO in Type 2-diabetes and Cancer*. *Curr Pharm Des*, 2018. **24**(24): p. 2839-2848.
92. Zhang, B.B., G. Zhou, and C. Li, *AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome*. *Cell Metab*, 2009. **9**(5): p. 407-16.
93. Liu, F., et al., *Metformin ameliorates TGF-beta1-induced osteoblastic differentiation of human aortic valve interstitial cells by inhibiting beta-catenin signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **500**(3): p. 710-716.
94. Budi, E.H., B.P. Muthusamy, and R. Derynck, *The insulin response integrates increased TGF-beta signaling through Akt-induced enhancement of cell surface delivery of TGF-beta receptors*. *Sci Signal*, 2015. **8**(396): p. ra96.
95. Gu, X. and K.S. Masters, *Role of the MAPK/ERK pathway in valvular interstitial cell calcification*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(6): p. H1748-57.
96. Goto, S., et al., *Standardization of Human Calcific Aortic Valve Disease in vitro Modeling Reveals Passage-Dependent Calcification*. *Front Cardiovasc Med*, 2019. **6**: p. 49.
97. Martin-Rojas, T., et al., *iTRAQ proteomic analysis of extracellular matrix remodeling in aortic valve disease*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17290.
98. Stephens, E.H., et al., *Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves*. *Cardiovasc Pathol*, 2011. **20**(6): p. 334-42.
99. Schroer, A.K. and W.D. Merryman, *Mechanobiology of myofibroblast adhesion in fibrotic cardiac disease*. *J Cell Sci*, 2015. **128**(10): p. 1865-75.
100. Gorski, D.J., et al., *Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 1827.
101. Kong, Y., et al., *Hyaluronan negatively regulates vascular calcification involving BMP2 signaling*. *Lab Invest*, 2018. **98**(10): p. 1320-1332.
102. Edep, M.E., et al., *Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis*. *Cardiovasc Pathol*, 2000. **9**(5): p. 281-6.
103. Fondard, O., et al., *Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors*. *Eur Heart J*, 2005. **26**(13): p. 1333-41.

104. Satta, J., et al., *Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **76**(3): p. 681-8; discussion 688.
105. Song, S.E., et al., *IGFBP5 mediates high glucose-induced cardiac fibroblast activation*. *J Mol Endocrinol*, 2013. **50**(3): p. 291-303.
106. Zhiduleva, E.V., et al., *Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification*. *Bull Exp Biol Med*, 2018. **164**(3): p. 371-375.
107. Huang, Y., et al., *The natural compound andrographolide inhibits human aortic valve interstitial cell calcification via the NF-kappa B/Akt/ERK pathway*. *Biomed Pharmacother*, 2020. **125**: p. 109985.
108. Monzack, E.L. and K.S. Masters, *Can valvular interstitial cells become true osteoblasts? A side-by-side comparison*. *J Heart Valve Dis*, 2011. **20**(4): p. 449-63.
109. Rodriguez, K.J. and K.S. Masters, *Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix*. *J Biomed Mater Res A*, 2009. **90**(4): p. 1043-53.
110. Feng, X., et al., *Taurine suppresses osteoblastic differentiation of aortic valve interstitial cells induced by beta-glycerophosphate disodium, dexamethasone and ascorbic acid via the ERK pathway*. *Amino Acids*, 2012. **43**(4): p. 1697-704.
111. Ghatak, S., et al., *Periostin/beta1 integrin interaction regulates p21-activated kinases in valvular interstitial cell survival and in actin cytoskeleton reorganization*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019. **1863**(5): p. 813-829.
112. Majumder, S., et al., *Hydrogen sulphide mitigates homocysteine-induced apoptosis and matrix remodelling in mesangial cells through Akt/FOXO1 signalling cascade*. *Cell Signal*, 2019. **61**: p. 66-77.
113. Servant, M.J., E. Giasson, and S. Meloche, *Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(27): p. 16047-52.
114. Song, R., 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): p. 703-10.
115. Torp, M.K., et al., *Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) and the Proteasome Attenuates IL-1beta Expression in Primary Mouse Cardiac Fibroblasts*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1285.
116. Yip-Schneider, M.T., et al., *Resistance to mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitors correlates with up-regulation of the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway in hepatocellular carcinoma cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **329**(3): p. 1063-70.
117. Yu, Y. and J.D. Sato, *MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor*. *J Cell Physiol*, 1999. **178**(2): p. 235-46.
118. Tseng, H.C., et al., *Lysophosphatidylcholine-induced mitochondrial fission contributes to collagen production in human cardiac fibroblasts*. *J Lipid Res*, 2019. **60**(9): p. 1573-1589.
119. Wiza, C., et al., *Knockdown of PRAS40 inhibits insulin action via proteasome-mediated degradation of IRS1 in primary human skeletal muscle cells*. *Diabetologia*, 2013. **56**(5): p. 1118-28.

120. Fukazawa, H., et al., *Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated extracellular-regulated kinase (ERK) pathway*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(5): p. 303-9.
121. Wang, G., et al., *Insulin promotes invasion and migration of KRAS(G12D) mutant HPNE cells by upregulating MMP-2 gelatinolytic activity via ERK- and PI3K-dependent signalling*. Cell Prolif, 2019. **52**(3): p. e12575.
122. Sun, S., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 induces cardiac fibrosis by mediating mammalian target of rapamycin activity*. J Cell Biochem, 2019. **120**(4): p. 4813-4826.
123. Schaefer, L., et al., *Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin*. Am J Pathol, 2007. **170**(1): p. 301-15.
124. Dudley, D.T., et al., *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7686-9.
125. Dunner, N., et al., *Angiotensin II signaling in human preadipose cells: participation of ERK1,2-dependent modulation of Akt*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e75440.
126. Haworth, R.S., et al., *Stimulation of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 31676-84.
127. Favata, M.F., et al., *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18623-32.
128. Liu, L., X. Jiang, and W. Yu, *Dracohodin Perochlorate Stimulates Fibroblast Proliferation via EGFR Activation and Downstream ERK/CREB and PI3K/Akt/mTOR Pathways In Vitro*. Evid Based Complement Alternat Med, 2019. **2019**: p. 6027186.
129. Hutcheson, J.D., et al., *Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(1): p. 114-20.
130. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
131. Chen, Y., et al., *Homocysteine up-regulates endothelin type A receptor in vascular smooth muscle cells through Sirt1/ERK1/2 signaling pathway*. Microvasc Res, 2017. **114**: p. 34-40.
132. Demidenko, Z.N., M. Shtutman, and M.V. Blagosklonny, *Pharmacologic inhibition of MEK and PI-3K converges on the mTOR/S6 pathway to decelerate cellular senescence*. Cell Cycle, 2009. **8**(12): p. 1896-900.
133. Guenther, M.K., U. Graab, and S. Fulda, *Synthetic lethal interaction between PI3K/Akt/mTOR and Ras/MEK/ERK pathway inhibition in rhabdomyosarcoma*. Cancer Lett, 2013. **337**(2): p. 200-9.
134. Manlin, W., et al., *Molecular Characterization and Expression Analysis of S6K1 in Cashmere Goats (Capra hircus)*. Asian-Australas J Anim Sci, 2013. **26**(8): p. 1057-64.
135. Bernard, M., et al., *Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF*. Autophagy, 2014. **10**(12): p. 2193-207.

136. Guo, T., et al., *Combination treatment with asiaticoside and rapamycin: A new hope for in-stent restenosis*. *Exp Ther Med*, 2013. **6**(2): p. 557-561.
137. Li, F.F., et al., *Rapamycin Treatment Attenuates Angiotensin II -induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation via VSMC Phenotypic Modulation and Down-regulation of ERK1/2 Activity*. *Curr Med Sci*, 2018. **38**(1): p. 93-100.
138. Zhang, X., et al., *The small leucine-rich proteoglycan BGN accumulates in CADASIL and binds to NOTCH3*. *Transl Stroke Res*, 2015. **6**(2): p. 148-55.
139. Deng, X.S., et al., *Rapamycin Decreases the Osteogenic Response in Aortic Valve Interstitial Cells Through the Stat3 Pathway*. *Ann Thorac Surg*, 2016. **102**(4): p. 1229-38.
140. Deng, X.S., et al., *Autophagy negatively regulates pro-osteogenic activity in human aortic valve interstitial cells*. *J Surg Res*, 2017. **218**: p. 285-291.
141. Jin, F., et al., *Deficient TSC1/TSC2-complex suppression of SOX9-osteopontin-AKT signalling cascade constrains tumour growth in tuberous sclerosis complex*. *Hum Mol Genet*, 2017. **26**(2): p. 407-419.
142. Li, P., et al., *Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells*. *J Appl Physiol* (1985), 2004. **97**(4): p. 1550-8; discussion 1549.
143. Kumar, P., A. Nagarajan, and P.D. Uchil, *Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018. **2018**(6).
144. Zha, X., et al., *Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2011. **71**(1): p. 13-8.
145. Lee, K.J., et al., *Rapamycin-eluting stents in the arterial duct: experimental observations in the pig model*. *Circulation*, 2009. **119**(15): p. 2078-85.
146. Furuta, S., et al., *Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase*. *Oncogene*, 2004. **23**(22): p. 3898-904.
147. Lock, H.R., S.H. Sacks, and M.G. Robson, *Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(1): p. F76-81.
148. Chen, S., et al., *Biglycan protects human neuroblastoma cells from nitric oxide-induced death by inhibiting AMPK-mTOR mediated autophagy and intracellular ROS level*. *Biotechnol Lett*, 2020. **42**(4): p. 657-668.
149. Tong, Z., et al., *Dynamic vibration cooperates with connective tissue growth factor to modulate stem cell behaviors*. *Tissue Eng Part A*, 2014. **20**(13-14): p. 1922-34.
150. Jun, J.H., et al., *Effects of propofol on the expression of matrix metalloproteinases in rat cardiac fibroblasts after hypoxia and reoxygenation*. *Br J Anaesth*, 2011. **106**(5): p. 650-8.
151. Rude, M.K., et al., *Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes*. *Hypertension*, 2005. **46**(3): p. 555-61.
152. Li, L., et al., *Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB*. *Biochem J*, 2007. **404**(2): p. 327-36.

153. Chen, J.H. and C.A. Simmons, *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): p. 1510-24.
154. Liu, J., et al., *Heparin-binding EGF-like growth factor regulates elastin and FGF-2 expression in pulmonary fibroblasts*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **285**(5): p. L1106-15.
155. Zhao, T., et al., *Vascular endothelial growth factor-D mediates fibrogenic response in myofibroblasts*. *Mol Cell Biochem*, 2016. **413**(1-2): p. 127-35.
156. Cushing, M.C., et al., *Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells*. *FASEB J*, 2008. **22**(6): p. 1769-77.
157. Zeng, P., et al., *ERK1/2 inhibition reduces vascular calcification by activating miR-126-3p-DKK1/LRP6 pathway*. *Theranostics*, 2021. **11**(3): p. 1129-1146.
158. Jackson, R.A., et al., *Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells*. *J Cell Physiol*, 2006. **209**(3): p. 894-904.
159. Lu, H.S., et al., *Hypoxic preconditioning up-regulates DJ-1 protein expression in rat heart-derived H9c2 cells through the activation of extracellular-regulated kinase 1/2 pathway*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **370**(1-2): p. 231-40.
160. Bi, Y., et al., *Low-after-high glucose down-regulated Cx43 in H9c2 cells by autophagy activation via cross-regulation by the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK1/2 signal pathways*. *Endocrine*, 2017. **56**(2): p. 336-345.
161. Lund, J., et al., *Increased Glycolysis and Higher Lactate Production in Hyperglycemic Myotubes*. *Cells*, 2019. **8**(9).
162. Bhedi, C.D., et al., *Glycolysis regulated transglutaminase 2 activation in cardiopulmonary fibrogenic remodeling*. *FASEB J*, 2020. **34**(1): p. 930-944.

## 6 Danksagung

Ein langer Weg liegt hinter mir. Ein schöner, aber intensiver und zum Teil steiniger Weg, welchen ich ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen nicht geschafft hätte. All jenen Personen gilt an dieser Stelle mein besonderer Dank:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari danke ich für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit in der Klinik für Herzchirurgie und die stetige Begleitung auf meinem Weg.

Frau Prof. Dr. Margriet Ouwens danke ich für die unentwegte Begleitung meiner Arbeit, den gedanklichen Input und zahlreiche lehrreiche und schöne Momente beim *Seahorse*-Assay im Deutschen Diabetes Zentrum.

Ebenso danken möchte ich Dr. Mareike Barth und Dr. Jessica Selig. Zahlreiche Fragen im Labor wurden durch Euch beantwortet und mit Euch diskutiert und ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich.

Auch dem Labor der Klinik für Herzchirurgie gilt mein besonderer Dank. Zahlreiche Stunden im Labor wurden durch inspirative Unterhaltungen, gegenseitige Unterstützung und gemeinsame Mittagessen bereichert.

Zu guter Letzt gilt ein großes Dankeschön meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem Weg zum Dokortitel stets begleitet und unterstützt haben. Ohne Euch hätte ich das sicher nicht geschafft.

*VIELEN DANK!*