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

Auswirkungen diabetischer und dynamischer Bedingungen auf die Degeneration der Aortenklappe

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Joana Boulgaropoulos

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari Zweitgutachterin: Prof. Dr. Margriet Ouwens In Liebe meinen Eltern Christina und Victor Boulgaropoulos gewidmet.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Selig JI, Boulgaropoulos J, Niazy N, Ouwens DM, Preuss K, Horn P, Westenfeld R, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2021) Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling. Int J Mol Sci. 2021 22 (13), 6976.

Selig JI, Boulgaropoulos J, Niazy N, Ouwens DM, Preuss K, Horn P, Westenfeld R, Lichtenberg A, Akhyari P, Barth M (2024) Diabetes-induzierte Aortenklappendegeneration in statischer Kultur und im Bioreaktor – Wechselwirkungen zwischen der Kultvierungsumgebung und Diabetes mellitus. Z Herz- Thorax- Gefäßchir (38), 60-68 2024.

Zusammenfassung

Die degenerative Aortenklappenerkrankung führt durch strukturelle Veränderungen des Klappengewebes zu einem irreversiblen Funktionsverlust und Stenose der Aortenklappe. Symptome treten oft erst in späten Stadien auf, in denen die Mortalität bereits deutlich erhöht ist und die einzige Möglichkeit der Heilung im Ersatz der Aortenklappe besteht. Der Diabetes mellitus Typ 2 spielt als assoziierter Risikofaktor für die Entstehung und Progression der degenerativen Aortenklappenerkrankung eine bedeutende Rolle, insbesondere da zukünftig mit steigenden Zahlen der enorm hohen weltweiten Prävalenz gerechnet wird. Die molekularen Zusammenhänge beider Erkrankungen sind weitgehend unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie auf die Aortenklappe zu untersuchen, wobei ein statisches *In-vitro*-Modell und ein dynamisches *Ex-vivo*-Modell als dreidimensionale Kulturmodelle herangezogen wurden. Anschließend erfolgten Untersuchungen in Hinblick auf Degeneration, Fibrose und Insulinsensitivität.

Im computergesteuerten Bioreaktor wirkten annähernd physiologische Umgebungsparameter wie pulsatiler Fluss, Druck, Temperatur und pH-Wert konstant auf ganze Aortenklappenkonduits ein. Daraus resultierte im Vergleich zu statisch kultivierten Proben eine deutlich gesteigerte Fibrose, die mit einer Verdickung der Lamina Spongiosa und einer vermehrten Proteoglykan-Einlagerung einherging. Die extrazelluläre Matrix statisch kultivierter Proben charakterisierte sich hingegen durch die Prominenz von Kollagen. Daneben hatte das Modell Einfluss auf die Expression bekannter Degenerationsmarker wie *Acta2, Tgf-\beta und Spp1* und modulierte die Reaktion des Gewebes auf Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, wodurch ein Zusammenspiel physikalischer Parameter und diabetischer Bedingungen deutlich wurde.

Bisherige Erkenntnisse belegen eine Sensitivität valvulärer Interstitialzellen auf Insulin sowie den Erwerb einer Insulinresistenz durch diabetische Einflüsse. Diese Eigenschaften wurden im Rahmen dieser Arbeit auch in ganzen Aortenklappen beobachtet, wobei der Effekt mit zunehmender Komplexität des Modells abnahm.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse dieser Arbeit ein komplexes Zusammenspiel diabetischer und physikalischer Kulturbedingungen auf molekulare Degenerationsprozesse. Dies öffnet Anreize auf weitere Forschung und das Thema Präventionsarbeit sowie Früherkennung des Diabetes mellitus Typ 2 im klinischen Zusammenhang.

Summary

Degenerative aortic valve disease leads to an irreversible loss of function of the aortic valve and stenosis of the outflow tract due to structural changes in the valve tissue. Typical symptoms often manifest lately, when mortality is already significantly increased. The only curative therapy then is aortic valve replacement. Type 2 diabetes mellitus plays a significant role as an associated risk factor in development and progression of degenerative aortic valve disease. The increasing prevalence of type 2 diabetes mellitus emphasizes its growing importance as a risk factor and worldwide burden. Molecular interactions between both diseases are largely unknown and therefore subject of current research. The aim of this study was to investigate the effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the aortic valve. Therefore, two different three-dimensional culture models, a static *in vitro* model and a complex dynamic *ex vivo* model in a bioreactor were used. Histological and molecular biological examinations were connected to investigate degeneration, fibrosis and insulin sensitivity of aortic valve tissue.

The bioreactor as a computer-controlled system allowed aortic valve culture under nearly physiological conditions, such as pulsatile flow, pressure, temperature, and constant pH. This dynamic environment resulted in a significantly increased fibrosis compared to statically cultured samples, accompanied by thickening of the lamina spongiosa due to enhanced proteoglycan deposition. The extracellular matrix of statically cultured valves, on the other hand, was characterized by the prominence of collagen. Additionally, the model influenced the expression of key degeneration markers such as *Acta2*, *Tgf-β*, and *Spp1* and modulated the tissue's response to hyperglycemia and hyperinsulinemia, highlighting the interplay between physical parameters and diabetic conditions.

Previous findings indicate the sensitivity of valvular interstitial cells to insulin and the development of insulin resistance through exposure to diabetic conditions. These characteristics were observed in whole aortic valves as well, with an increasing complexity of the experimental model leading to a diminishing and potentially protective effect.

In summary, the results of this study demonstrate a complex interplay between diabetic and physical culture conditions on molecular degeneration processes. This provides incentives for further research and highlights the relevance of prevention and early detection of Type 2 diabetes mellitus in a clinical context.

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Acta2	α-Glattmuskelaktin, alpha smooth muscle actin
AI	Akutinsulin
AK	Aortenklappe
AKS	Aortenklappenstenose
AKT	
ANOVA	analysis of variance
aVIC	aktivierte valvuläre Interstitialzellen
BGN	Biglykan
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAVD	Degenerative Aortenklappenerkrankung
DCN	Decorin
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FOXO1	foxhead box protein O1
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
НЕ	
HG	Hyperglykämie
HI	
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IR	Insulinrezeptor
LN ₂	Flüssiger Stickstoff, liquid nitrogen

МАРК	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	
NG	Normoglykämie
obVIC	osteoblastische valvuläre Interstitialzellen
OPN	Osteopontin
ОТ	Objektträger
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, phosphate-buffered saline
PG	
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	semiquantitative real-time Polymerasekettenreaktion
RNA	
Rp113a	
Rpl29	Ribosomales Protein L29
rpm	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RT	
SDS-PAGE Natrium	dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, sodium dodecyl
sulfate polyacrylamide	gel electrophoresis
SEM	Standardfehler, standard error oft he mean
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TGF-β	transforming growth factor eta
<i>Tubb</i>	Tubulin-ß
ü. N	über Nacht
VIC	Valvuläre Interstitialzellen
αSMA	α-Glattmuskelaktin, <i>alpha smooth muscle actin</i>

Inhaltsverzeichnis

Z	usam	nmenfas	ssung	I
S	umm	ary		II
A	bkür	zungsv	erzeichnis	III
Ir	halts	sverzeic	chnis	V
A	bbild	dungsve	erzeichnis	VIII
Т	abell	enverze	eichnis	IX
1	E	linleitur	ng	1
	1.1	Das	s Herz und seine Aortenklappe	1
		1.1.1	Die Funktion des Herzens und seiner Herzklappen	1
		1.1.2	Der Aufbau der Aortenklappe	1
	1.2	Die	degenerative Aortenklappenerkrankung	2
		1.2.1 Aortei	Epidemiologie und Ätiologie der degenerativen nklappenerkrankung	2
		1.2.2	Symptome und Folgen der DAVD	3
		1.2.3	Pathogenese der DAVD	4
	1.3	Dia	betes mellitus Typ 2	5
		1.3.1	Definition, Pathophysiologie und epidemiologische Situation	5
		1.3.2	Die Insulinsignalkaskade	6
	1.4	Ein	fluss von DM auf die Degeneration der AK	7
	1.5	Kul	ltivierung von AK-Gewebe	8
	1.6	Zie	lsetzung	10
2	Ν	/laterial		11
	2.1	Ger	äte, Zubehör und Softwaresysteme	11
	2.2	Ma	terialien und Chemikalien	13
	2.3	Kit	s	15
	2.4	Her	stellung von Lösungen	15
	2.5	Her	stellung von Färbelösungen	16
3	Ν	/lethode	en	19
	3.1	Gev	winnung und Kultivierung von Gewebe	19
		3.1.1	Bezug oviner Herzen	19
		3.1.2	Behandlung unter diabetischen Bedingungen	19
		3.1.3	Präparation oviner AK-Taschen für In-vitro-Kulturen	20
		3.1.4	In-vitro-Kultivierung oviner AK-Taschen	20
			3.1.4.1 Etablierung einer Methode zur Aufrechterhaltung kom Glukose- und Insulinkonzentrationen im <i>In-vitro</i> -Modell	stanter 21

			3.1.4.2 Behandlung oviner AK-Taschen unter diabetischen Bedingungen im <i>In-vitro</i> -Modell	22
		3.1.5	Aufbau des Bioreaktors als computergesteuertes Ex-vivo-Kulturmo	dell22
		3.1.6	Präparation oviner AK-Konduits für Ex-vivo-Kulturen im Bioreakt	or24
		3.1.7	Ex-vivo-Kultivierung oviner AK-Konduits im Bioreaktor	25
			3.1.7.1 Vorbereitung des Bioreaktors und Start eines Kulturlaufes	326
			3.1.7.2 Beenden des Laufs und Ernte der AK-Taschen	28
		3.1.8 Aktivi	Etablierung einer geeigneten Akutinsulin-Stimulationsdauer zur erung des Insulinsignalwegs	29
		3.1.9	Ernte und Aufteilung der In-vitro- und Ex-vivo-Proben	30
	3.2	Bes	timmung der Glukosekonzentration im Kulturmedium	31
	3.3	Bes	timmung des Insulingehalts im Kulturmedium mittels Insulin-ELISA	A32
	3.4	Bes	timmung der Gewebedichte mittels Lichtdurchlässigkeitsmessung	32
	3.5	Hist	tologische Analysen	33
		3.5.1	Herstellung von Gefrierschnitten	33
		3.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
		3.5.3	Movat-Pentachrom Färbung	34
		3.5.4	Mikroskopische Fotoaufnahmen und Bildbearbeitung	35
		3.5.5	Auswertung	35
	3.6	Prot	teinanalysen	36
		3.6.1	Herstellung von Proteinlysaten aus AK-Taschen	36
		3.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
		3.6.3 Natriu	Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche mdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
		3.6.4	Der Western-Blot	37
		3.6.5	Detektion spezifischer Proteine	38
	3.7	mR	NA-Analysen	39
		3.7.1	Isolation von Gesamt-RNA	39
		3.7.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	40
		3.7.3	Umschreibung von mRNA in cDNA	40
		3.7.4	Analysen mittels qPCR	41
		3.7.5	Auswertung der qPCR	42
	3.8	Stat	istische Auswertung	42
4	E	rgebnis	se	43
	4.1 Insu	Etal Ilinkonz	blierung der Kultivierungsmodelle: Stabilität der Glukose- und zentration über die Dauer der Behandlung	43
	4.2	Deg	generative Prozesse im AK-Gewebe	45

4.2.1 Expression von Differenzierungsmarkern45
4.2.2 Fibrotische Veränderungen des AK-Gewebes
4.2.3 Der EZM-Umbau
4.3 Auswirkungen chronisch erhöhter Glukose- und Insulinkonzentrationen auf die metabolische Antwort von AK
4.3.1 Stimulation der Insulinantwort
4.3.2 Der PI3K-AKT-Signalweg
4.3.3 MAPK-Signalweg
Diskussion
5.1 Einfluss diabetischer und dynamischer Kulturbedingungen auf Degenerationsprozesse der AK
5.1.1 Die Expression von Degenerationsmarkern in ovinen AK
5.1.2 Einfluss diabetischer und dynamischer Kulturbedingungen auf die Fibrose und den EZM-Umbau oviner AK64
5.1.2.1 Fibrose und EZM-Umbau oviner AK: Veränderungen der Kollagenorganisation65
5.1.2.2 Fibrose und EZM-Umbau oviner AK: Gewebehypertrophie und PG-Verteilung
5.2 Einfluss diabetischer und dynamischer Kulturbedingungen auf den Insulinsignalweg
5.2.1 Insulinsensitivität oviner AK im PI3K-Signalweg67
5.2.2 Einfluss auf den MAPK-Signalweg69
5.3 Die Kulturmodelle und ihre Limitationen
5.4 Schlussfolgerung und Ausblick72
Literaturverzeichnis
anksagung

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1: Der histologische Aufbau der Aortenklappe	2
Abb.	2: Insulinsignalkaskade	7
Abb.	3: Aufspannen oviner AK-Taschen für In-vitro-Kulturen	20
Abb.	4: Aufbau des Vorversuchs "Etablierung einer Methode zur Aufrechterhaltung	
	konstanter Glukose- und Insulinkonzentrationen im In-vitro-Modell"	21
Abb.	5: Aufbau des Versuches zur In-vitro-Behandlung oviner AK-Taschen unter	
	diabetischen Bedingungen	22
Abb.	6: Aufbau des Bioreaktors	24
Abb.	7: Präparation eines AK-Konduits für Ex-vivo-Versuche im Bioreaktor	25
Abb.	8: Aufbau des Versuches zur Ex-vivo-Behandlung oviner AK-Konduits im	
	Bioreaktor	26
Abb.	9: Einnähen eines AK-Konduits in die Herzklappenkammer des Bioreaktors?	27
Abb.	10: Ernte eines AK-Konduits nach Ende der Ex-vivo-Kultur im Bioreaktor	28
Abb.	11: Versuchsaufbau zur Etablierung einer AI-Stimulationsdauer zur Aktivierung	
	des Insulinsignalwegs	29
Abb.	12: Foto von drei AK-Taschen nach der Ernte auf dem Leuchtpad	30
Abb.	13: Aufteilung der AK-Taschen für verschiedene Analysen	31
Abb.	14: Ernte von AK-Taschen für Western-Blot-Analysen	31
Abb.	15: Glukose- und Insulinkonzentration im In-vitro-Modell mit und ohne	
	regelmäßige Mediumwechsel	44
Abb.	16: Stabilität der Glukosekonzentration im statischen- und dynamischen Modell	45
Abb.	17: Expression der Differenzierungsmarker Acta2, Tgf-β und Spp1	47
Abb.	18: Dichte des AK-Gewebes	49
Abb.	19: HE-Färbung und Verhältnis von Lamina Spongiosa zur Gesamtfläche	50
Abb.	20: Movat-Pentachrom Färbung	52
Abb.	21: EZM-Remodeling Marker	54
Abb.	22: Etablierung einer geeigneten AI-Stimulationsdauer	55
Abb.	23: Western-Blot Ergebnisse der AKT-Aktivierung	56
Abb.	24: Western-Blot Ergebnisse der FOXO1-Aktivierung	57
Abb.	25: Western-Blot Ergebnisse der GSK-3α/β Aktivierung	59
Abb.	26: Western-Blot Ergebnisse der ERK1 und ERK2-Aktivierung	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialliste Geräte, Zubehör und Softwaresysteme	11
Tabelle 2: Materialliste Bioreaktor	12
Tabelle 3: Materialliste Materialien und Chemikalien	13
Tabelle 4: Materialliste Kits	15
Tabelle 5: Herstellung von Medium	15
Tabelle 6: Herstellung von Western-Blot-Gelen	16
Tabelle 7: Herstellung von Pufferlösungen	16
Tabelle 8: Herstellung von Lösungen für die HE-Färbung	16
Tabelle 9: Herstellung von Lösungen für die Movat-Pentachrom Färbung	17
Tabelle 10: Diabetischen Bedingungen des Kulturmediums	19
Tabelle 11: Kulturparameter des Bioreaktors	27
Tabelle 12: Färbeschritte der HE-Färbung	34
Tabelle 13: Färbeschritte der Movat-Pentachrom Färbung	35
Tabelle 14: Primärantikörper für Western-Blot-Analysen	39
Tabelle 15: Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen	39
Tabelle 16: Primersequenzen	41

1 Einleitung

1.1 Das Herz und seine Aortenklappe

1.1.1 Die Funktion des Herzens und seiner Herzklappen

Das menschliche Herz ist als muskuläres Hohlorgan dafür verantwortlich, den Körper mit Blut zu versorgen. Um den durch seine Pumpfunktion generierten Blutfluss aufrecht zu erhalten, ist das Herz auf seine vier Herzklappen angewiesen. Diese befinden sich zwischen linken und rechten Herzvorhöfen und Herzkammern (Ventrikel), sowie zwischen Herzkammern und Aorta bzw. Lungenarterie. Abhängig von den vorherrschenden Druckverhältnissen öffnen und schließen sie rein passiv (1). Sie ermöglichen eine ungehinderte Passage des Blutes bei Öffnung und sorgen beim Schließen für einen dichten Verschluss, wodurch ein unidirektionaler Blutfluss entsteht.

1.1.2 Der Aufbau der Aortenklappe

Die Aortenklappe (AK) zählt als Taschenklappen zu den vier Herzklappen und befindet sich zwischen dem linken Ventrikel und der aufsteigenden Aorta im Bereich der Aortenwurzel. Sie wird aus drei hauchdünnen, halbmondförmigen Taschen gebildet (trikuspid), welche an der aortalen Gefäßwand aufgehängt sind und sich ins Gefäßlumen wölben (2).

Das hauchdünne Gewebe einer AK-Tasche ist gefäßfrei und besteht aus hoch organisierter extrazellulärer Matrix (EZM), die drei Schichten bildet (Abb. 1). Die Lamina Fibrosa liegt aortenseitig. Sie ist gekennzeichnet durch ein dichtes Netzwerk zirkulär angeordneter kollagener Fasern (Typ I und III Kollagen), die während der Herzaktion enormen Kräften Stand halten. Die Lamina Spongiosa liegt mittig und ist reich an Glykosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG) (3). Zu den am häufigsten vertretenen PG in der AK gehören u. a. Biglykan (BGN) und Decorin (DCN) (4). Durch ihre hohe Kapazität Wasser zu binden, funktionieren sie insbesondere als Polster- und Verschiebeschicht für die angrenzende Lamina Fibrosa und Lamina Ventricularis, die sich während der Herzaktion durch Biegungen und Kompression relativ zueinander verschieben. Die Lamina Ventricularis liegt ventrikelseitig und ist mit zahlreichen elastischen Fasern durchsetzt. Sie verleihen der AK die nötige Elastizität und wirken durch ihre radiale Ausrichtung einer Überdehnung des Gewebes während der Systole entgegen (5, 6). Darüber hinaus sind valvuläre Interstitialzellen (VIC) als Hauptzelltyp in allen drei Schichten der AK zu finden, die die physiologische Struktur und Funktion der AK durch Signalvermittlung und Sekretion von EZM-Bestandteilen aufrecht erhalten (3). Umhüllt wird die AK von valvulären Endothelzellen, deren Integrität für die intakte Funktion und Homöostase der AK verantwortlich ist. Dysfunktionen der Endothelzellen führen zum Verlust derer regulierender und schützender Fähigkeiten und begünstigen nachweislich die Entstehung und Progression von Klappenpathologien (7).



Abb. 1: Der histologische Aufbau der Aortenklappe

A: Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme einer AK-Tasche in der Movat-Pentachrom Färbung mit ihrer typischen Dreischichtung. B: Schematische Darstellung der drei Schichten einer AK-Tasche. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unterscheidet sich in den entsprechenden Schichten. Erstellt mit (8), angelehnt an (2).

1.2 Die degenerative Aortenklappenerkrankung

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie der degenerativen Aortenklappenerkrankung

Die Aortenklappenstenose (AKS) gilt als die häufigste Herzklappenerkrankung in den westlichen Ländern. Ätiologisch lassen sich mehrere Formen unterscheiden. Die häufigste ist die degenerative Form der Aortenklappenerkrankung (DAVD, *degenerative aortic valve disease*), die im Laufe der Jahre enorm an klinischer Relevanz gewonnen hat (9, 10). Dabei hat die Inzidenz der Erkrankung in den vergangenen Jahren deutlich

zugenommen. Signifikante AKS zeigen sich bei 2-3 % der über 65-Jährigen und über 8 % der über 85-Jährigen. Hervorzuheben ist jedoch, dass knapp 50 % der über 85-Jährigen mit fibrotisch veränderten AK leben, was die Relevanz dieser Erkrankung unterstreicht (11). Es wird angenommen, dass die Zahl der Erkrankten auch in Zukunft immer weiter steigt (10).

Die Entstehung und Progression der DAVD wird durch zahlreiche Risikofaktoren begünstigt. Dazu zählen u. a. klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, mangelnde körperliche Bewegung, hochkalorische Ernährung, Adipositas, arterielle Hypertonie sowie ein gestörter Lipoprotein- und Kohlenhydratstoffwechsel, welche alle stark mit dem metabolischen Syndrom assoziiert sind. Daneben gehören männliches Geschlecht, genetische Prädisposition sowie die Anatomie der Klappe ebenfalls zu den Risikofaktoren der DAVD (12).

1.2.2 Symptome und Folgen der DAVD

Die Öffnungsfläche einer gesunden, humanen, trikuspiden AK beträgt im Mittel etwa 3-4 cm². Bei der DAVD kommt es zunächst zur Verdickung und Versteifung der AK-Taschen und zur Einlagerung von Kalk. Dadurch verliert die Klappe mit Fortschreiten der Erkrankung zunehmend ihre Funktion und die Öffnungsfläche verringert sich. Dieser Degenerationsprozess schreitet sehr langsam fort und bleibt aufgrund seiner sehr langen symptomfreien Periode meist über Jahrzehnte unbemerkt. Erst ab einer Öffnungsfläche von <1 cm² spricht man von einer symptomatischen AKS, die damit bereits als hochgradig eingestuft wird (13).

Die Verengung der Klappenöffnungsfläche hat zur Folge, dass das Herz durch abnehmende Pumpleistung zunehmend insuffizient wird. Symptome treten zunächst verstärkt bei Belastung und in sehr schweren Stadien sogar in Ruhe auf. Typisch dabei sind Dyspnoe, Engegefühl in der Brust (Angina pectoris) und Schwindel bis hin zur Synkope (14). In der symptomfreien Phase der AKS ist die Mortalität der Patienten nahezu einem Gesunden gleichzusetzen (14). Ist die AKS bereits symptomatisch, nimmt die Prognose unbehandelter Patienten rapide ab und die 2-Jahres-Mortalität steigt auf beachtliche 50 % (15).

Da es keine kausale Therapie zur Behandlung der DAVD gibt, ist der chirurgische oder perkutane Ersatz der AK für betroffene Patienten die einzige Möglichkeit der Heilung (16).

1.2.3 Pathogenese der DAVD

Anders als man früher dachte, handelt es sich bei der DAVD um eine aktive, langsam progrediente Erkrankung, bei der es zu einer fibrotischen Verdickung des Klappengewebes sowie zur Einlagerung von Kalk kommt. Dadurch verliert die AK zunehmend ihre Funktion und stenosiert, wodurch der Blutfluss behindert und die Herzfunktion beeinträchtigt wird (11).

Die Entstehung der DAVD ist durch eine Umstrukturierung der EZM charakterisiert, die zum Verlust ihrer mechanischen und signalübertragenden Eigenschaften führt (17). Sie verläuft in typischen Phasen, die denen der Atherosklerose stark ähneln (18).

Durch mechanischen Stress entstehen Schäden im Endothel, was zum Verlust seiner Integrität führt. Dadurch können Entzündungszellen und Lipide erleichtert in das Gewebe der AK eindringen und eine Entzündungsreaktion initiieren (15). Eine wichtige Rolle spielen dabei VIC, die in diesem Prozess zu aktivierten VIC (aVIC) sowie zu osteoblastischen VIC (obVIC) differenzieren (19). aVIC reagieren mit Reparaturmechanismen auf Gewebeschäden, indem sie die Zellproliferation, Migration und die Sekretion von EZM-Bestandteilen sowie die Expression von Proteasen anregen. obVIC fördern durch die Sekretion knochenbildender Proteine wie Osteopontin (OPN) und alkalische Phosphatase die Bildung und Einlagerung von Kalk. Sie sind somit wesentlich an der Degeneration und Kalzifizierung beteiligt und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung der DAVD (20).

Die Fibrose des AK-Gewebes ist gekennzeichnet durch eine Desorganisation der kollagenen Fasern, die das Resultat erhöhten Kollagenabbaus durch Proteasen wie Matrix-Metalloproteasen (MMP) und erhöhter Fasersynthese sind (21). Die Akkumulation von PG, Lipiden, Mineralien und eine erhöhte Zellproliferation beeinflussen zudem zur Verdickung des AK-Gewebes . Daneben kommt es aufgrund der erhöhten Proteaseaktivität zum Untergang und zur Desorganisation elastischer Fasern, was zur Versteifung der AK-Tasche beiträgt (4).

Diese Prozesse begünstigen wiederum Gewebereaktionen, die zur weiteren Progression der Erkrankung führen.

1.3 Diabetes mellitus Typ 2

1.3.1 Definition, Pathophysiologie und epidemiologische Situation

Beim Diabetes mellitus (DM) handelt es sich um einen Überbegriff an Stoffwechselstörungen, deren gemeinsames Merkmal chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie, HG) sind. Definitionsgemäß liegt ein DM vor, wenn beispielsweise die Nüchternblutglukose einen Wert von 126 mg/dl überschreitet. Dabei werden je nach Ursache mehrere Typen unterschieden, wobei der DM Typ 2 (DM2) mit über 90 % die häufigste Form darstellt (22).

Das Hormon Insulin spielt beim DM die Hauptrolle. Es wird in den β-Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet und bei erhöhten Blutzuckerspiegeln, insbesondere nach Aufnahme kohlenhydrathaltiger Nahrungsmittel in den Blutkreislauf ausgeschüttet. Seine metabolische Hauptfunktion besteht in der Senkung des Blutzuckerspiegels, indem es die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen veranlasst (23).

Pathophysiologisch entsteht die hyperglykäme Stoffwechsellage beim DM2 durch eine periphere Insulinresistenz und in weiterer Folge eine gestörte Insulinsekretion. Hauptursachen für die Entstehung des DM2 sind Faktoren, die mit dem metabolischen Syndrom assoziiert sind. Dazu zählen insbesondere Fettleibigkeit, mangelnde körperliche Bewegung und hochkalorische Ernährung. Dieser Zustand begünstigt die Entstehung verschiedener Entzündungsmechanismen im Körper, die letztendlich die periphere Sensitivität der Zellen auf Insulin herabsetzen (24). In frühen Stadien der DM2-Entstehung werden solche beginnenden Zustände der Insulinresistenz mit einer gesteigerten Insulinsekretion der ß-Zellen kompensiert, die wiederum chronisch erhöhte Insulinspiegel im Blut (Hyperinsulinämie, HI) bedingen. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zur Verschlechterung der Insulinsensitivität, chronischen Entzündungszuständen und HG, die zunehmend zur Apoptose der ß-Zellen und somit zu einer Abnahme der Insulinsekretion und damit Manifestation des DM2 führen (24, 25).

Mit einer Prävalenz von 6,28 % zählt der DM2 weltweit zu den häufigsten Erkrankungen. Prognosen deuten darauf hin, dass die Prävalenz in den kommenden Jahren trotz fortschreitender Erkenntnisse und sich verbessernder medizinischer Prävention und Versorgung in diesem Bereich weiter steil steigen wird (26). Besorgniserregend sind diese Zahlen vor allem im Hinblick auf Komplikationen und Spätfolgen, die mit DM2 assoziiert sind. Die Sterblichkeitsrate von Erwachsenen durch Herzerkrankungen und Schlaganfälle ist bei DM2-Patienten auf das Zwei- bis Vierfache erhöht (24).

1.3.2 Die Insulinsignalkaskade

Trifft Insulin auf seine Zielzellen, werden eine Reihe intrazellulärer Prozesse in Gang gesetzt, die durch zahlreiche Proteine gesteuert werden. Diese Signalkaskade wird durch die Bindung von Insulin an seinen Insulinrezeptor (IR) initiiert, der mit seiner Tyrosin-Kinase-Aktivität die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine veranlasst (Abb. 2). Dabei werden zwei Hauptvermittler unterschieden, die ihre Signale in zwei unterschiedlichen Wegen weitergeben: die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK). Über die PI3K kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase B (AKT), die eine zentrale Schaltstelle in ihrem Signalweg darstellt. Sie ist in der Lage eine Vielzahl nachgeschalteter Proteine über weitere Phosphorylierungsschritte zu aktivieren oder zu hemmen, die Einfluss auf Zellteilung, Zellwachstum, Zellüberleben, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel haben. Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf den wachstumsbezogenen Transkriptionsfaktor foxhead box protein (FOXO1), das mitogene Prozesse beeinflusst und der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3), die an metabolischen Prozessen beteiligt ist. Des Weiteren kommt es über die MAPK u. a. zur Aktivierung von extracellular signal-regulated kinase (ERK), welche ebenfalls mitogene Zellprozesse steuert (27).



Abb. 2: Insulinsignalkaskade

Die Insulinsignalkaskade wird durch die Bindung von Insulin an seinen Insulinrezeptor initiiert. Es folgt eine Phosphorylierungskaskade nachgeschalteter Proteine, die an mitogenen und metabolischen Prozessen beteiligt sind. Abkürzungen: IR: Insulinrezeptor; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; AKT: Proteinkinase B; FOXO1: *foxhead box protein O1;* GSK-3: Glykogensynthase-Kinase 3; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*. Erstellt mit (8), angelehnt an (27).

1.4 Einfluss von DM auf die Degeneration der AK

Die Entstehung und Progression der DAVD ist auf zahlreiche Risikofaktoren zurückzuführen. DM ist dabei erwiesenermaßen stark mit der Entwicklung der DAVD assoziiert und führt zudem zur schnelleren und stärkeren Progression der Erkrankung (28). In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von DM in Populationen mit hochgradiger AKS deutlich höher ist als in der Allgemeinbevölkerung. Umgekehrt ist die Inzidenz bei DM2-Patienten für die Entwicklung einer AKS höher als bei Patienten ohne DM2 (29).

Die genauen Mechanismen der DAVD-Entstehung sind komplex und können viele der mit DM2 einhergehenden Stoffwechselstörungen zur Ursache haben. Die Studienlage dahingehend hat zwar erste Erkenntnisse aufgezeigt, jedoch bedarf es umfangreicher weiterer Forschung, um die Auswirkungen des DM2 auf die DAVD-Entstehung aufzudecken.

Bekannt ist, dass die DAVD mit einer fibrotischen Verdickung der AK einhergeht, was unter anderem mit der Zunahme von PG zusammenhängt (4). Die erhöhte Genexpression von *Bgn* wurde in humanen degenerierten AK im Vergleich zu nicht degenerierten AK bereits nachgewiesen, wobei nach Unterteilung in Klappen von DM2- und Nicht-DM2-Patienten eine erhöhte *Bgn*-Expression in AK von DM2-Patienten gemessen wurde (30).

Charakteristisch für DM2 sind hyperglykäme Stoffwechselzustände, die isoliert von anderen Risikofaktoren betrachtet einen Beitrag zur Entwicklung der DAVD leisten. In gelatinebasierten dreidimensionalen (3D) Modellen mit humanen valvulären Endothelzellen und VIC wurde gezeigt, dass HG die Expression zahlreicher Moleküle fördert, die an inflammatorischen und degenerativen Prozessen beteiligt sind und somit eine Rolle in der Pathogenese der DAVD spielen (31). Es wurde außerdem beobachtet, dass humane VIC unter HG einen Umbau der EZM induzieren und vermehrt der Wachstumsfaktor *transforming growth factor* β (TGF- β) und osteogenen Moleküle exprimiert werden, was die Ablagerung von Kalzium begünstigt (32).

Zudem wurde in einer *In-vitro*-Studie mit ovinen VIC gezeigt, dass die ebenfalls für DM2 typische anfängliche HI einen Einfluss auf die Degeneration der AK haben könnte. Die Studie zeigt, dass VIC sensibel auf Insulinstimuli reagieren und unter diabetischen Bedingungen mit chronisch erhöhter Insulin- und Glukoseeinwirkung die Sensitivität der Insulinantwort beeinträchtigt wird. Außerdem wurde unter chronischer HI eine gesteigerte Proliferation der VIC beobachtet, was ebenso hinweisend auf beginnende Degenerationsprozesse ist (33).

Die bisherige Studienlage gibt erste Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen DM2 und Mechanismen der DAVD-Entstehung. Bekannt ist jedoch, dass die DAVD eine Erkrankung ist, die sowohl mit Veränderungen valvulärer Zellen als auch der umgebenden EZM einhergeht und die AK somit in ihrer komplexen Gesamtheit betrifft. Die Untersuchung ganzer, nativer AK unter dem Einfluss isolierter diabetischer Bedingungen blieb in der Forschung bisher jedoch gänzlich unberücksichtigt.

1.5 Kultivierung von AK-Gewebe

Mithilfe von 3D-Kulturmodellen ist es möglich, Zellen und ihr umgebendes Gewebe unter Beibehaltung ihrer natürlichen Architektur und Interaktion zu untersuchen (34). Solche Untersuchungen von AK im Rahmen der DAVD-Forschung sind von enormer Bedeutung, da sie pathologische Veränderungen des gesamten AK-Gewebes betreffen. Neben Veränderungen auf zellulärer Ebene ist die EZM dabei ebenso wesentlich an Degenerationsprozessen beteiligt und beeinflusst darüber hinaus die Funktion valvulärer Zellen (35).

In der AK-Forschung existieren bereits einige 3D-Modelle, die untereinander, abhängig von der zugrundeliegenden Fragestellung, große Unterschiede aufweisen. Darunter wurde beispielsweise ein statisches *In-vitro*-Modell etabliert, das der Kultivierung ganzer AK-Taschen durch Befestigung auf Silikonringen dient. Dabei handelt es sich um eine einfach reproduzierbare und kostengünstige Methode, mit der das komplexe AK-Gewebe unter Einfluss verschiedener Substanzen untersucht werden kann (36). Darüber hinaus existieren Modelle, die mechanische Einflüsse, denen die AK *in vivo* unter physiologischen Bedingungen ausgesetzt ist, berücksichtigen. Während der Herzaktion wirken mechanische Kräfte wie Scherstress, Dehnung und Druck auf die einzelnen AK-Taschen ein. Sie haben direkte und indirekte Auswirkungen auf die Biologie und Physiologie der Klappe und können bei Abweichungen degenerative Prozesse fördern (37). Komplexere *Ex-vivo*-Bioreaktormodelle fokussieren sich vor diesem Hintergrund auf die Kultivierung von AK-Taschen unter Einfluss verschiedener Kräfte (38-40).

In vivo öffnet und schließt die AK durchschnittlich über 100.000 mal pro Tag und ist dabei einem permanenten Zusammenspiel unterschiedlicher physikalischer Einflüsse ausgesetzt (37). Um dynamische Bedingungen unter Beibehaltung der physiologischen Klappenanatomie nachzuahmen, wurde ein komplexes, computergesteuertes *Ex-vivo*-Bioreaktormodell entwickelt. Damit ist es gelungen, ganze native AK-Konduits unter kontrollierten, physiologischen Bedingungen zu kultivieren und daraus resultierende Degenerationsprozesse zu untersuchen (41).

1.6 Zielsetzung

Die genauen Zusammenhänge und Mechanismen der DAVD-Entstehung und -Progression unter Einfluss von DM2 sind bisher wenig erforscht. Zudem existieren bisher noch keine Daten, die die Reaktion ganzer, nativer AK auf isolierte, diabetische Bedingungen untersuchten. Auch hämodynamische Bedingungen, die *in vivo* unter physiologischen Bedingungen auf die AK einwirken, blieben in bisherigen Studien unberücksichtigt.

Diese Arbeit hatte das Ziel AK unter isolierten diabetischen Bedingungen wie HG und HI zu untersuchen. Dafür wurden zwei unterschiedliche 3D-Modelle genutzt, um AK *in vitro* unter statischen und *ex vivo* unter dynamischen Bedingungen zu kultivieren. Die Beantwortung folgender Fragen war Ziel dieser Arbeit:

- 1. Welche Auswirkungen haben diabetische Bedingungen auf die Degeneration ganzer AK und die Sensitivität von AK-Taschen auf Insulin?
- 2. Welche Rolle spielt die Kultivierung von AK unter statischen *versus* dynamischen Bedingungen in Bezug auf degenerative Prozesse?
- 3. Beeinflussen die hämodynamischen Bedingungen des Kulturmodells die Reaktion des AK-Gewebes auf diabetische Bedingungen?

2 Material

2.1 Geräte, Zubehör und Softwaresysteme

Beschreibung	Hersteller	Artikel/Software
Autoklav	SysTec GmbH, Bergheim	VX-95
Bildbearbeitungsprogramm	Rasband, National Institutes of Health, USA	Fiji/ImageJ
Blutzuckermessgerät	Nova Biomedical GmbH, Waltham	StatStrip Xpress®2
Elektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham	Novex Mini-Cell
Gewebehomogenisator	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	gentleMACS Dissociator, M-Tubes
Imager	GE Healthcare, Chicago	ImageQuant TL, Version 8.1
Kryostat	Leica Biosystems, Wetzlar	Leica CM1950
Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar	DM2000, DFC425 LAS Software v3.8 LAS X Software
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan Group AG, Männerdorf	<i>Infinite</i> M1000 PRO Tecan.AT.XFluor Software Software Magellan v7.2
Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham	StepOnePlus
Spannungsgeräte	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	PowerPac 200
Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	NanoDrop 1000
Statistikprogramm	GraphPad Software, Inc., San Diego,	GraphPad Prism Version 9
Thermozykler	Biometra GmbH, Göttingen	T3000

Tabelle 1: Materialliste Geräte, Zubehör und Softwaresysteme

western-Blot-Kammer Blo-Rad Laboratories, Inc., Hercules Mini Trans-Blot Cell	Western-Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	Mini Trans-Blot Cell
---	---------------------	--------------------------------------	----------------------

Beschreibung	Hersteller	Artikel/Software
Bioreaktor PC/Software	Engineo GmbH, Kelkheim	
Deckel GL45 mit Dichtring	DURAN Group GmbH, Wertheim	
Herzklappenkammer	Freundliche Leihgabe von Prof. A. Lichtenberg	
Konnektoren (1/2 x 3/8, mit/ohne Öffnung)	CORMED Medizintechnik GmbH & Co KG, Rüthen	
O-Dichtring 15,5 x 3 mm	Arcus GmbH, Seevetal	
O ₂ -Sonde	Hamilton Company, Nevada	VisiFerm DO Arc 120
Oxygenierungskammer	Freundliche Leihgabe von Prof. A. Lichtenberg	
pH-Sonde	Hamilton Company, Nevada	Easyferm Plus VP 120
PTFE-Luftfilter	Sartorius TM AG, Göttingen	Midisart TM 2000 PTFE
Rollerpumpe	Stöckert Instrumente GmbH, München	
Schläuche (0,5/4/12 mm)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	
Schläuche (9,5/12,7 mm)	Reichelt Chemietechnik GmbH & Co, Heidelberg	
Schlauchschellen (versch. Größen)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	ROTILABO®
Stecksystem (Adapter)	Applied Critical Fluids GmbH, Mannheim	MPX 320-39
Temperatursonde	Engineo GmbH, Kelkheim	
Verschlussdeckel mit Fräsung	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	

Tabelle 2: Materialliste Bioreaktor

2.2 Materialien und Chemikalien

Material/Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Alcianblau	Sigma-Aldrich, St. Louis	A5268-25G
Ammoniumhydroxid 30 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	CP17.1
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis	248614
Amphotericin B	Gilead Sciences, Inc., Foster City	
Antikörper	Siehe Kapitel 3.6.5	
Brilliant Crocein R	Waldeck	1B-109
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis	B0126
BSA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	8076
$cOmplete^{TM}$	Sigma-Aldrich, St. Louis	11836153001
Diethiothreitol	Thermo Fisher Scientific, Waltham	R0862
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 1 g/l Glc.	Thermo Fisher Scientific, Waltham	21885-025
DMEM, 4,5 g/l Glc.	Thermo Fisher Scientific, Waltham	31966-021
Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis	861006
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	6755.2
Ethanol (versch. %)	Zentralapotheke UKD	
Formaldehydlösung 37 %	Roth	4979.1
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis	F7524
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	3783.2
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	23390.03
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis	H3136
HCl 32-37 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	2601.1

IGEPAL [®] CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis	I3021
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis	15523
Isopentan	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	3927.2
Isopropanol	VWR International, Radnor	20839366
Jod	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	7935.2
Kaliumjodid	Roth	8491.1
Methanol	VWR International, Radnor	20847.320
Milchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis	70166
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	9265.2
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt	1065040250
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis	72049-260G
Nicht essenzielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St. Louis	M7145
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	1620115
Nukleasefreies Wasser	Promega GmbH, Walldorf	P119
PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham	26619
PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham	14190-094
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham	15140-122
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis	P4006-250G
PhosSTOP TM	Sigma-Aldrich, St. Louis	4906837001
Pikrinsäure	VWR Chemicals	84512.260
Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	A515.1
Safran du Gatinais	Waldeck	5A-394
Säurefuchsin	Roth	T128.1
Natriumdodecylsulfat, sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	CN30.4
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad	1610801
TRI-Reagenz [®]	Sigma-Aldrich, St. Louis	T9424
TRIS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	4855.5

Tritrisol HCl (1N)	Sigma-Aldrich, St. Louis	1.09970.0001
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis	P1379
Xylol	VWR	28975.325

2.3 Kits

Tabelle 4: Materialliste Kits

Kit	Hersteller	Artikelnummer
DC-Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules	5000116
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega GmbH, Walldorf	A6002
Insulin-ELISA	RayBiotech, Inc., Peachtree Corners	ELR-Insulin
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QUIAGEN N. V., Venlo	205313
Roti-Histokit II	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	T160.1
Western BrightTM Quantum	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	541015

2.4 Herstellung von Lösungen

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium:	DMEM mit 1 g/l (NG) oder 4,5 g/l (HG) Glucose
	10 % Fötales Kälberserum
	2 % Penicillin-Streptomycin
	1 % Amphothericin B (5 μg/ml)
	1 % nicht essenzielle Aminosäuren
Hungermedium:	DMEM mit 1 g/l (NG) oder 4,5 g/l (HG) Glucose
	2 % Penicillin-Streptomycin
	1 % Amphothericin B (5 μg/ml)
	1 % nicht essenzielle Aminosäuren

Gel	Zusammensetzung	Gel	Zusammensetzung
Trenngel 10 %:	48,45 % dH ₂ O	Sammelgel 4 %:	63,6 % dH ₂ O
	25 % Rotiphorese® Gel 40		10 % Rotiphorese® Gel 40
	25 % Trenngelpuffer		25,2 % Sammelgelpuffer
	1 % SDS		1 % SDS
	0,5 % Ammoniumpersulfat		0,5 % Ammoniumpersulfat
	0,05 % TEMED		0,1 % TEMED

Tabelle 6: Herstellung von Western-Blot-Gelen

Tabelle 7	: Herstellung	von Pufferlösungen
I abene /	, mor sconding	, on I anonosangen

Puffer	Zusammensetzung	Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer:	1,5 M TRIS	Sammelgelpuffer:	0,5 M TRIS
	pH-Wert 8,8		pH-Wert 6,8
Laufpuffer:	25 nM TRIS	Transferpuffer:	25 nM TRIS
	190 nM Glycin		190 nM Glycin
	0,1 % SDS		20 % Methanol
Ladepuffer:	375 mM TRIS	RIPA-Puffer:	150 nM Natriumchlorid
	60 % Glycerin		50 nM TRIS
	12,6 % SDS		1 % IGEPAL®
	600 nM Diethiothreitol		0,5 % Natriumdesoxycholat
	0,09 % Bromphenolblau		0,1 % SDS
<u>TBST:</u>	20 nM TRIS	Lysepuffer:	RIPA-Puffer
	150 nM Natriumchlorid		14,3 % $cOmplete^{TM}$

2.5 Herstellung von Färbelösungen

Tabelle 8	: Herstellung	von Lösungen	für die	HE-Färbung
-----------	---------------	--------------	---------	------------

Lösung	Inhaltsstoffe
Eosin B – Lösung:	1 g Eosin
	100 ml dH2O

100 ml EtOH 100%

$200~\mu l$ Essigsäure 100 %

	9
Lösung	Inhaltsstoffe
Alkalischer Alkohol:	360 ml Ethanol
	40 ml Ammoniumhydroxid 30 %
Bouin's Lösung:	300 ml Pikrinsäure
	100 ml Formaldehyd 37 – 40 %
	20 ml Essigsäure 100 %
Natriumthiosulfat 5 %:	
	200 ml dH2O
Alcianblau 1 %:	2 g Alcianblau
	200 ml dH2O
Alkoholisches Hämatoxylin 2%:	10 g Hämatoxylin
	500 ml EtOH 96 %
Eisenchlorid:	12,5 g Eisen-Chlorid-Hexahydrat
	500 ml dH2O
	5 ml HCl 37 – 40 %
Jod-Lösung:	10 g Jod
	20 g Kaliumjodid
	500 ml dH2O
W7. '	(0, 1) $U'' = (1, 2) 0/$
weigerts Eisenhamatoxylin:	00 mi Hamatoxylin 2 %
	40 mi Eisenchlorid
	20 mi jod-Losung
Brilliant Crocein R Stock:	4 g Brilliant Crocein R

Tabelle 9: Herstellung von Lösungen für die Movat-Pentachrom Färbung

	398 ml dH2O
Säurefuchsin Stock	0.5 g Säurefuchsin
Saureruensm Stock.	497,5 ml dH2O
	2,5 ml Essigsäure 100 %
Crocein Säurefuchsin:	80 ml Brilliant Crocein R Stock
	20 ml Säurefuchsin Stock
Phosphorwolframäure 5 %:	25 g Phosphorwolframsäure
	500 ml dH2O
Essigsäure 1 %:	5 ml Essigsäure 100 %
	495 ml dH2O
Alkoholischer Safran:	12 g Safran du Gatinais
	200 ml EtOH 100 %

3 Methoden

3.1 Gewinnung und Kultivierung von Gewebe

3.1.1 Bezug oviner Herzen

In dieser Arbeit wurde ausschließlich ovines AK-Gewebe untersucht. Dafür wurden frische Herzen sechs bis acht Monate alter Schafe von einem lokalen Schlachthof (Laame GmbH & Co. KG, 42329 Wuppertal) bezogen. Die Herzen wurden unmittelbar nach Ankunft in der Forschungseinrichtung auf Eis gekühlt und unter sterilen Bedingungen präpariert und bearbeitet (42).

3.1.2 Behandlung unter diabetischen Bedingungen

Zur Kultivierung der AK kamen zwei unterschiedliche 3D-Modelle zum Einsatz. Dabei diente ein *In-vitro*-Modell der Kultivierung einzelner AK-Taschen unter statischen Bedingungen. Der Bioreaktor, ein computergesteuertes *Ex-vivo*-Modell, diente der Kultivierung der AK unter Beibehaltung der physiologischen Klappenanatomie als AK-Konduit unter dynamischen Bedingungen.

Diabetische Bedingungen definierten sich anhand des Glukosegehaltes des eingesetzten Kultivierungsmediums sowie durch die Zugabe von Insulin (siehe Tabelle 10). Medium mit einem Glukosegehalt von 100 mg/dl wurde zur Behandlung unter Normoglykämie (NG) verwendet. Medium mit einem Glukosegehalt von 450 mg/dl diente der Behandlung unter HG. Der Zusatz von 100 nM Insulin zum entsprechenden Medium diente einer Behandlung unter HI (42).

Behandlung	Glukosekonzentration	Insulinkonzentration
NG	– 100 mg/dl	-
NG+HI		100 nM
HG	- 450 mg/dl	-
HG+HI		100 nM

Tabelle 10: Diabetischen Bedingungen des Kulturmediums

3.1.3 Präparation oviner AK-Taschen für In-vitro-Kulturen

AK-Gewebe wurde *in vitro* in Form von einzelnen AK-Taschen kultiviert. Dafür wurden AK-Taschen unter sterilen Bedingungen aus Schafsherzen präpariert.

Zur Präparation der AK-Taschen wurde das Herz von seinem Herzbeutel befreit und die Herzspitze abgetrennt, wodurch ein apikaler Blick in die Ventrikel ermöglicht wurde. Der linke Ventrikel wurde vorsichtig bis knapp unter die AK eröffnet. Von hier aus wurde die AK und die darüber liegende Aorta unter Sicht exakt zwischen zwei Kommissuren eröffnet, sodass alle drei AK-Taschen unverletzt blieben. Anschließend wurden alle drei AK-Taschen entlang ihrer Aufhängungen herausgeschnitten.

3.1.4 In-vitro-Kultivierung oviner AK-Taschen

Um ein Einrollen der AK-Taschen zu verhindern und somit eine gleichmäßige Kontaktfläche zwischen den AK-Taschen und dem Kultivierungsmedium zu gewährleisten, wurden AK-Taschen für *In-vitro*-Kulturen mit drei Nadelspitzen auf einem Silikonring aufgespannt (siehe Abb. 3) (36). Zur Entfernung blutiger Rückstände wurden die AK-Taschen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend in die entsprechende Zellkulturplatte überführt. Die Kultivierung einer aufgespannten AK-Taschen erfolgte unabhängig von anderen AK-Taschen mit 10 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ (42).



Abb. 3: Aufspannen oviner AK-Taschen für *In-vitro*-Kulturen

A: Drei einzelne AK-Taschen unmittelbar nach der Präparation aus dem Schafsherz. B: Drei AK-Taschen auf Silikonringe aufgespannt zur *In-vitro*-Kultivierung.

3.1.4.1 Etablierung einer Methode zur Aufrechterhaltung konstanter Glukoseund Insulinkonzentrationen im *In-vitro*-Modell

Diabetische Bedingungen wurden durch den Glukose- und Insulingehalt des Mediums definiert (siehe Kapitel 3.1.2). Um ein konstantes Einwirken auf die AK zu gewehrleisten, mussten Glukose- und Insulinkonzentration über die Gesamtdauer der Behandlung auf ihrem entsprechenden Niveau aufrechterhalten werden. In einem Vorversuch wurde ermittelt, wie sich Glukose- und Insulinkonzentrationen über einen Behandlungszeitraum von sieben Tagen verhalten und welche Frequenz an Mediumwechsel (MW) notwendig ist, um das entsprechende Niveau aufrecht zu erhalten.

Dafür wurden AK-Taschen aus sechs Schafherzen präpariert und auf Silikonringen aufgespannt. Die AK-Taschen wurden nach Präparation (Tag -1) für 24 Stunden unter NG vorbehandelt und am Folgetag (Tag 0) unter NG oder NG+HI in Kultur gebracht. Über die Gesamtdauer der Behandlung erfolgten in beiden Bedingungen keine MW. Eine Behandlung unter NG+HI mit MW alle zwei Tage (Tag 2, 4, 6) stellte eine dritte Bedingung dar. Aus jedem Schaf war eine AK-Tasche pro Bedingung vertreten (n = 6). Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4 dargestellt.

Zur Beurteilung des Glukoseverbrauches erfolgten tägliche Messungen der Glukosekonzentration aus dem Medium. Der Insulingehalt im Medium wurde an Tag 0, 2, 4, 6 und 7 mittels Insulin-ELISA analysiert.



Abb. 4: Aufbau des Vorversuchs "Etablierung einer Methode zur Aufrechterhaltung konstanter Glukose- und Insulinkonzentrationen im *In-vitro*-Modell"

AK-Taschen wurden an Tag -1 präpariert, aufgespannt und unter NG vorbehandelt. Von Tag 0 bis Tag 7 erfolgte eine Behandlung unter NG, NG+HI oder NG+HI mit MW alle zwei Tage. Nach der Behandlung wurden Glukose- und Insulinkonzentrationen analysiert. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; NG: Normoglykämie; HI: Hyperinsulinämie; MW: Mediumwechsel

3.1.4.2 Behandlung oviner AK-Taschen unter diabetischen Bedingungen im *In-vitro*-Modell

Um diabetische Bedingungen auf AK-Gewebe einwirken zu lassen, wurden AK-Taschen in ein *In-vitro*-Modell überführt. Dafür wurden AK-Taschen am Tag der Isolation (Tag -1) für 24 Stunden unter NG oder HG vorbehandelt. Am Folgetag (Tag 0) wurde die Behandlung NG-vorbehandelter AK-Taschen mit NG (n = 6) oder NG+HI (n = 6), bzw. HG-vorbehandelter AK-Taschen mit HG (n = 6) oder HG+HI (n = 6) begonnen. Alle AK-Taschen eines Schafes wurden ident behandelt. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt. Das Medium wurde alle zwei Tage (Tag 2, 4 und 6) gewechselt und die Glukosekonzentration des Mediums täglich gemessen. Die Behandlung wurde an Tag 7 beendet und die AK-Taschen von den Silikonringen gelöst und geerntet (42). Eine Übersicht des Versuchsaufbaus ist in Abb. 5 dargestellt. Die Ernte und Aufteilung der Proben entsprechend den Analysen sind in Kapitel 3.1.9 beschrieben.



Abb. 5: Aufbau des Versuches zur *In-vitro*-Behandlung oviner AK-Taschen unter diabetischen Bedingungen

AK-Taschen wurden an Tag -1 präpariert, aufgespannt und unter NG oder HG vorbehandelt. Von Tag 0 bis Tag 7 erfolgte eine Behandlung unter NG, NG+HI, HG oder HG+HI, wobei das Medium alle zwei Tage erneurt wurde. An Tag 7 wurden die AK-Taschen geerntet und analysiert. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie

3.1.5 Aufbau des Bioreaktors als computergesteuertes *Ex-vivo*-Kulturmodell

Der Bioreaktor besteht aus mehreren Komponenten, deren Zusammenwirken eine automatisierte computergesteuerte Kultivierung ganzer oviner AK-Konduits ermöglichen. Dabei handelt es sich um die Bioreaktoreinheit, die Steuerungssoftware und zwei Kammersysteme. Eine detaillierte Beschreibung des Systems sowie die Etablierung zur Kultivierung oviner AK-Konduits wurde 2019 durch Frau Dr. Feichtner im Rahmen ihrer Dissertation ausgearbeitet, diese lässt sich auf diese Arbeit anwenden (43).

Die Steuerungssoftware dient der computergesteuerten Bedienung und Steuerung der Bioreaktoreinheit. Für beide Kammersysteme der Bioreaktoreinheit existiert eine eigene Steuerungssoftware, um eine unabhängige Betreibung zu ermöglichen.

Die Herzstücke des Bioreaktors stellen die beiden rechts und links an der Bioreaktoreinheit befindlichen Kammersysteme als Ort der Kultivierung dar.

Ein Kammersystem besteht aus verschiedenen Glaskammern (Oxygenierungskammer, Herzklappenkammer), Silikonschläuchen und Messsonden (pH, O₂, Temperatur). Die einzelnen Komponenten werden direkt oder über verschiedene Konnektoren miteinander verbunden. Dichtringe, Schraubschellen und Kabelbinder dienen der sicheren Befestigung der Einzelkomponenten untereinander sowie der Abdichtung des Kammersystems.

Die Oxygenierungskammer ist Ort der Zu- und Abfuhr von Druckluft sowie der Messung des pH-Wertes. Knapp darunter befindet sich die Herzklappenkammer, in der das AK-Konduit eingenäht und kultiviert wird. Hier findet die Temperaturmessung statt. Von der Oxygenierungskammer führt ein langes, von einer Heizmanschette umhülltes Schlauchsystem über einen absteigenden Schenkel zu einer Rollerpumpe und über einen aufsteigenden Schenkel zurück zur Herzklappenkammer. Die Rollerpumpe generiert über seine Pumpfunktion einen pulsatilen und unidirektionalen Fluss, der die in der Herzklappenkammer befindliche AK öffnen und schließen lässt. Durch das Schlauchsystem nahe der Oxygenierungskammer ist eine Sonde zur Sauerstoffmessung angebracht. Der Bioreaktor sowie der schematische Aufbau eines Kammersystems sind in Abb. 6 dargestellt.


Abb. 6: Aufbau des Bioreaktors

A: Dargestellt ist der Bioreaktor als seine Bioreaktoreinheit mit angeschlossenem Kammersystem auf seiner rechten Seite. B: Zeigt den schematischen Aufbau eines Kammersystems. Die Pfeile geben die durch die Rollerpumpe generierte Flussrichtung an. Die verschiedenen Sonden messen Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur innerhalb des Systems und regulieren über eine Steuerungssoftware die Anpassung der Istwerte an die Sollwerte. (42)

3.1.6 Präparation oviner AK-Konduits für Ex-vivo-Kulturen im Bioreaktor

AK-Gewebe wurde *ex vivo* unter Beibehaltung der physiologischen Klappenanatomie in Form eines ganzen AK-Konduits behandelt. Dafür wurden AK-Konduits unter sterilen Bedingungen aus 21 Schafherzen präpariert.

Zur Präparation eines AK-Konduits wurde zunächst der Herzbeutel entfernt und die Herzspitze abgetrennt, wodurch linker und rechter Ventrikel apikal eröffnet wurden. Die Lungenarterie wurde über den rechten Ventrikel sondiert und anschließend die rechte Herzhälfte zunächst eröffnet und dann entfernt. Die linke Herzhälfte wurde unter Schonung der aortalen Ausstrombahn an der Seitenwand eröffnet und das Myokard auf Höhe der Mitralklappe entfernt. Der Myokardring um die AK sowie das aortale Segel der Mitralklappe wurden bis knapp unter die AK gekürzt und die Aortenwurzel freigelegt. Die Aorta ascendens wurde auf ca. 1-2 cm herabgekürzt, um das Einnähen des AK-Konduits in das Schlauchsystem des Bioreaktors zu ermöglichen. Das AK-Konduit wurde von überschüssigem Fett und Bindegewebe befreit und die Koronararterien auf 3-4 mm zurückgekürzt. Das AK-Konduit wurde nach abgeschlossener Präparation in 25 ml PBS gewaschen, um Blut und Geweberückstände zu entfernen. Die Präparationsschritte sind in Abb. 7 dargestellt.



Abb. 7: Präparation eines AK-Konduits für Ex-vivo-Versuche im Bioreaktor

Zu sehen sind die einzelnen Schritte zur Präparation eines AK-Konduits aus einem Schafherz. A: Ganzes Schafherz B: Herz nach Abtrennung der Herzspitze. C: Blick von apikal in die Ventrikel. Die rechte Herzhälfte wurde eröffnet. Die Wand des rechten Ventrikels wird mit der Pinzette hochgehalten. D: Blick von apikal in den linken Ventrikel nach Entfernung der rechten Herzhälfte. E: Blink von apikal in den eröffneten linken Ventrikel. F: Präpariertes AK-Konduit nach Entfernung der linken Herzhälfte und Kürzung des umgebenden Myokardrings, des Mitralsegels, der Aorta und der Koronararterien. Abkürzungen: AK: Aortenklappe

3.1.7 Ex-vivo-Kultivierung oviner AK-Konduits im Bioreaktor

Um kontaminierte Proben vor Beginn der Kultivierung zu identifizieren, wurden die AK-Konduits nach ihrer Präparation (Tag -1) für 24 Stunden mit 25 ml NG- oder HG-Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ vorbehandelt. Kontaminierte Proben, deren Überstände sich trüb oder ausgeflockt zeigten, wurden am Folgetag (Tag 0) verworfen. Proben, deren Überstände makroskopisch sauber und frei von Kontamination waren, wurden für eine Behandlung im Bioreaktor ausgewählt. Ein ausgewähltes AK-Konduit wurde an Tag 0 in

die Herzklappenkammer des Bioreaktor eingenäht und ein Versuchslauf gestartet. Die Behandlung NG-vorbehandelter Proben erfolgte unter NG (n = 5) oder NG+HI (n = 6). HG-vorbehandelte Proben wurden unter HG (n = 5) oder HG+HI (n = 5) behandelt. Die Kultivierung wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt. An Tag 7 wurde der Lauf beendet und die AK-Taschen geerntet (42). Die einzelnen Schritte zur Durchführung eines Bioreaktorlaufes werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben. Eine Übersicht des Versuchsaufbaus ist in Abb. 8 dargestellt. Die Ernte und Aufteilung der Proben entsprechend der Analysen sind in den Kapiteln 3.1.7.2 und 3.1.9 beschrieben.



Abb. 8: Aufbau des Versuches zur Ex-vivo-Behandlung oviner AK-Konduits im Bioreaktor

AK-Taschen wurden an Tag -1 präpariert und unter NG oder HG vorbehandelt. Von Tag 0 bis Tag 7 erfolgte eine Behandlung unter NG, NG+HI, HG oder HG+HI. An Tag 7 wurde die Behandlung beendet und die AK-Taschen geerntet und analysiert. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie

3.1.7.1 Vorbereitung des Bioreaktors und Start eines Kulturlaufes

Vor Inbetriebnahme des Bioreaktors wurde das Kammer- und Schlauchsystem auf Intaktheit überprüft und gereinigt. Der Pumpenschlauch wurde für jeden Versuchslauf erneuert, um eine zu starke Abnutzung durch die Drehbewegung der Rollerpumpe zu vermeiden. Die pH-Sonde wurde vor jedem Lauf entsprechend der Herstellerangaben kalibriert. Für die Kalibrierung wurden Pufferlösungen mit pH = 7 und pH = 9,4 benutzt. Das Kammersystem wurde für jeden Lauf unmittelbar vor Start autoklaviert. Das autoklavierte Schlauch- und Kammersystem wurde unter sterilen Bedingungen zusammengebaut und ein ausgewähltes AK-Konduit in der Herzklappenkammer des Bioreaktors befestigt. Die Befestigung erfolgte durch sechs bis acht Einzelknopfnähte zwischen Myokardring und unterem Silikonschlauch sowie zwischen Aorta und oberem Silikonschlauch mit nicht resorbierbarem, chirurgischem Nahtmaterial der Stärke 3-0 (siehe Abb. 9).



Abb. 9: Einnähen eines AK-Konduits in die Herzklappenkammer des Bioreaktors

Für *Ex-vivo*-Kulturen im Bioreaktor wurden AK-Konduits präpariert und anschließend mit jeweils sechs bis acht Einzelknopfnähten in die innere Herzklappenkammer zwischen zwei Silikonschläuche eingenäht. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; (42).

Anschließend erfolgte die Befüllung des Schlauch- und Kammersystems mit 500 ml Kulturmedium über die zentrale Öffnung der Oxygenierungskammer. Durch die Befestigung der pH-Sonde an der zentralen oberen Öffnung der Oxygenierungskammer wurde das System vollständig verschlossen und abgedichtet. Das Schlauchsystem wurde danach an die Bioreaktoreinheit montiert. Anschließend erfolgte der Anschluss sämtlicher Sonden, sowie der Zu- und Abluft an die Bioreaktoreinheit und die Abdeckung der Oxygenierungskammer mit einer protektiven Abdeckhaube.

Über die Steuerungssoftware wurden einheitliche Kulturbedingungen als Sollwerte festgelegt (siehe Tabelle 11) und der Lauf schließlich gestartet.

Parameter	Sollwert
Pumpfrequenz	30/min
pH-Wert	7,35
Druck	107 mbar
Temperatur	37 °C

Tabelle 11: Kulturparameter des Bioreaktors

Während der gesamten Kulturzeit wurden die Sollwerte kontinuierlich von der Steuerungssoftware überwacht und bei Abweichungen der Istwerte über Regulationsmechanismen wieder den Sollwerten angeglichen. Entsprechende Messergebnisse und Regulationsvorgänge wurden über eine Messwerthistorie sowie eine graphische Darstellung dieser überwacht und nachvollzogen. Die festgelegten Kulturparameter konnten auf diese Weise auf ihrem entsprechenden Niveau aufrecht und konstant gehalten und Ausreißer erkannt und von der Studie ausgeschlossen werden.

3.1.7.2 Beenden des Laufs und Ernte der AK-Taschen

Mit Abschluss der siebentägigen Kultur eines AK-Konduits wurde das System über die Bioreaktorsoftware heruntergefahren und der Lauf beendet.

Nach Abkopplung aller Anschlüsse wurde das Kulturmedium über ein Ventil im Schlauchsystem abgelassen und eine kleine Menge zur Messung der Glukosekonzentration aufgefangen. Anschließend wurde das AK-Konduit aus der Herzklappenkammer gelöst und unter Beibehaltung steriler Bedingungen vorsichtig zwischen rechter und linker Semilunarklappe eröffnet, ohne die AK-Taschen zu verletzen (Abb. 10A). Die AK-Taschen wurden anschließend mit einer feinen Schere herausgeschnitten (Abb. 10B). Die weitere Ernte der Proben ist in Kapitel 3.1.9 beschrieben.



Abb. 10: Ernte eines AK-Konduits nach Ende der Ex-vivo-Kultur im Bioreaktor

A: Eröffnetes AK-Konduit mit Blick von aortal in die drei Klappentaschen. B: Drei AK-Taschen nach Herausschneiden aus dem AK-Konduit auf einem Leuchtpad. Abkürzungen: AK: Aortenklappe. Maßstab 1 cm.

3.1.8 Etablierung einer geeigneten Akutinsulin-Stimulationsdauer zur Aktivierung des Insulinsignalwegs

In späteren Analysen wurden die Auswirkungen diabetischer Bedingungen auf die Sensitivität von AK-Gewebe auf Insulin untersucht. Dazu wurde der Insulinsignalweg durch einen Stimulus mit Akutinsulin (AI) aktiviert und die Phosphorylierung der Zielproteine mittels Western-Blot Analysen quantifiziert.

In einem Vorversuch wurde ermittelt, welche Stimulationsdauer nötig ist, um den Insulinsignalweg in AK zu aktivieren. Dafür wurden AK-Taschen aus vier Schafen präpariert und aufgespannt. Die AK-Taschen wurden am Tag der Isolation (Tag-1) für 24 Stunden unter NG vorbehandelt. Am Folgetag (Tag 0) wurden die AK-Taschen für vier Stunden in serumfreiem NG-Medium (Hungermedium) weiterkultiviert. Die AK-Taschen wurden danach halbiert. Eine Hälfte erhielt einen Stimulus mit 100 nM AI in PBS (+AI). Die andere Hälfte wurde ohne Insulin in PBS (-AI) stimuliert. Die Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von 10, 30 oder 60 Minuten. Die Proben wurden unmittelbar nach der Stimulation in flüssigem Stickstoff (LN₂) schockgefroren und bei -80 °C Die Insulinantwort wurde durch Quantifizierung gelagert. der AKT-Phosphorylierung mittels Western-Blot-Analyse gemessen. Abb. 11 zeigt eine Übersicht des Versuchsaufbaus.



Abb. 11: Versuchsaufbau zur Etablierung einer AI-Stimulationsdauer zur Aktivierung des Insulinsignalwegs

Ovine AK-Taschen wurden 24 Stunden unter NG vorbehandelt. An Tag 0 erfolgte eine Behandlung in serumfreiem NG-Hungermedium für vier Stunden. Danach erfolgte eine Stimulation mit +AI (100 nM Insulin in PBS) oder -AI (PBS) für 10, 30 oder 60 Minuten. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; NG: Normoglykämie; AI: Akutinsulin; PBS: phosphatgepufferte Salzlösung

3.1.9 Ernte und Aufteilung der In-vitro- und Ex-vivo-Proben

Nach Ende der *In-vitro-* und *Ex-vivo-*Kulturen wurden die AK-Taschen aus beiden Modellen nach dem gleichen Schema geerntet. Die zusammengehörigen drei AK-Taschen eines Schafes wurden zunächst plan auf eine Petrischale aufgelegt. Für spätere Messungen der Lichtdurchlässigkeit wurden die AK-Taschen unter einheitlichen Bedingungen auf einem Leuchtpad fotografiert (Abb. 12) (Kameraeinstellungen manuell: ISO 125; Blende 5,6; Belichtungszeit 1/100)





Zu sehen sind drei AK-Taschen eines Schafes. Nach Ende der *In-vitro-* oder *Ex-vivo*-Kultivierung wurden die drei AK-Taschen geerntet und auf einem Leuchtpad aufgelegt. Abkürzungen: AK: Aortenklappe. Maßstab: 1 cm

Anschließend wurden die AK-Taschen für spätere Analysen halbiert und nach demselben Schema aufgeteilt (siehe Abb. 13). Die AK-Taschenhälfte für Analysen mittels semiquantitativer *real-time* Polymerasekettenreaktion (qPCR) sowie zwei Reservehälften wurden sofort in LN₂ schockgefroren. Eine Hälfte wurde für histologische Analysen eingebettet. Dafür wurde die AK-Taschenhälfte in einer Kryoeinbettform (Cryomolds) positioniert, mit Kryoeinbettmedium (CryoCompound) bedeckt und mithilfe von Isopentan und LN₂ zu einem Kryoblock ausgehärtet. Es wurde darauf geachtet, die AK-Taschenhälfte plan zu positionieren und die Lage der inneren Schnittkante zu markieren, um den Kryoblock für die Herstellung histologischer Schnitte später einheitlich ausrichten zu können (42).

Für Untersuchungen des Insulinsignalweges mittels Western-Blot-Analysen, wurden zwei AK-Taschenhälften für vier Stunden in Hungermedium bei 37 °C, 5 % CO₂ nachbehandelt. NG oder NG+HI behandelte Proben wurden in NG-Hungermedium kultiviert. HG oder HG+HI behandelte Proben wurden in HG-Hungermedium kultiviert.

Im Anschluss wurde eine Hälfte mit 100 nM Insulin in PBS (+AI) und die andere Hälfte ohne Insulin in PBS (-AI) stimuliert. Die Stimulationsdauer betrug 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben in LN_2 schockgefroren. Eine Übersicht für die Ernte der Western-Blot Proben ist in Abb. 14 dargestellt (42).

Alle Proben wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.



Abb. 13: Aufteilung der AK-Taschen für verschiedene Analysen

Zu sehen ist eine schematische Darstellung von drei AK-Taschen. Die Proben wurden entlang der strichlierten Linie halbiert. Die Hälften wurden entsprechend ihrer vorgesehenen Analyse geerntet. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; qPCR: semiquantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion



Abb. 14: Ernte von AK-Taschen für Western-Blot-Analysen

Schematische Darstellung einer halbierten AK-Tasche. Die Hälften wurden in serumfreiem Hungermedium über einen Zeitraum von vier Stunden nachkultiviert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Stimulation der AK-Taschenhälften in 2 ml PBS mit 100 nM Insulin (+ AI) oder ohne Insulin (- AI). Abkürzungen: AK: Aortenklappe; NG: Normoglykämie, HG: Hyperglykämie, AI: Akutinsulin; PBS: phosphatgepufferte Salzlösung

3.2 Bestimmung der Glukosekonzentration im Kulturmedium

Der Glukoseverbrauch *in vitro* und *ex vivo* kultivierter Proben unter den unterschiedlichen Behandlungen wurde über eine Messung der Glukosekonzentration im

Kulturmedium bestimmt. Die Messzeitpunkte sind in den entsprechenden Kapiteln zu den Versuchen beschrieben.

Die Messung der Glukosekonzentration erfolgte für jede Probe in Doppelbestimmung. Dafür wurden jeweils zwei 50 μ l-Tropfen des entsprechenden Kulturmediums entnommen und auf einen Parafilm pipettiert. Die Messung der Glukosekonzentration erfolgte mittels eines Blutglukosemessgerätes aus dem jeweiligen Tropfen. Die Werte wurden anschließend gemittelt.

3.3 Bestimmung des Insulingehalts im Kulturmedium mittels Insulin-ELISA

Aus dem in 3.1.4.1 beschriebenen Versuch wurde Kulturmedium zur Messung des Insulingehalts herangezogen. Für die Bestimmung des Insulingehalt mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde ein Ratten-Insulin-ELISA-Kit verwendet und entsprechend Herstellerangaben vorgegangen.

Der Insulin-ELISA basiert auf der Sandwich-Methode. Insulin bindet dabei an einen immobilisierten Antikörper auf dem Boden einer 96-Well Platte. Durch die Zugabe eines weiteren insulinspezifischen, biotinylierten Zweitantikörpers entsteht ein Antikörper-Insulin-Antikörper-Sandwich. Ein Peroxidase-Streptavidin-Konjugat kann anschließend hochspezifisch an Biotin binden. Die Peroxidase katalysiert danach die Reduktion eines zugegebenen Substrates, wodurch ein Farbumschlag entsteht. Die Farbintensität korreliert mit der Insulinkonzentration der Probe. Die Farbintensitäten wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3.4 Bestimmung der Gewebedichte mittels Lichtdurchlässigkeitsmessung

Um den Einfluss diabetischer Bedingungen auf die Gewebedichte zu untersuchen, wurden Lichtdurchlässigkeitsmessungen an AK-Taschen durchgeführt. Dafür wurden AK-Taschen an Tag 7 ihrer Behandlung unter einheitlichen Bedingungen auf einem Leuchtpad fotografiert (siehe 3.1.9).

Für die Quantifizierung der Lichtdurchlässigkeit wurde das Bildbearbeitungsprogramm *Fiji/ImageJ* verwendet. Es wurden jeweils drei AK-Taschen eines Schafes gleichzeitig

analysiert. Dafür wurde die Fläche jeder AK-Tasche ausgemessen und jeweils der mittlere Grauwert (*mean grey value*) bestimmt. Als Referenzwert wurde der mittlere Grauwert einer zwischen zwei AK-Taschen gelegenen Hintergrundfläche gemessen. Der mittlere Grauwert einer AK-Tasche wurde ins Verhältnis zum mittleren Grauwert des Hintergrundes gesetzt. Anschließend wurde ein Mittelwert über alle drei Werte der AK-Taschen gebildet und mit 100 multipliziert (42).

Der hervorgehende Endwert gibt den mittleren Grauwert als relatives Verhältnis zum Referenzhintergrund in % an. Volle Lichtdurchlässigkeit erhält dadurch den Wert 100 (minimale Dichte), volle Lichtundurchlässigkeit den Wert 0 (maximale Dichte).

3.5 Histologische Analysen

3.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Für histologische Analysen wurden Gefrierschnitte von AK-Taschen angefertigt, die zuvor in einem Einbettmedium als Kryoblock fixiert wurden (Kapitel 3.1.9). Die Schnitte wurden bei – 20 °C in einem Kryostaten erstellt.

Dafür wurde der Kryoblock am Objektkopf des Kryostaten fixiert. Der Kryoblock wurde orientierend an seiner Markierung so positioniert, dass die Schnittfläche parallel zur inneren Schnittkante der AK-Taschenhälfte ausgerichtet war. Anschließend wurden Schnitte in einer Dicke von 5 µm hergestellt und auf Objektträger (OT) aufgenommen (42). Die Präparate wurden bis zu ihrer Färbung bei -20 °C gelagert.

3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) zählt als Übersichtsfärbung zu den gängigsten histologischen Färbungen. Dabei werden saure Strukturen blau (zB. Desoxyribonukleinsäure, DNA) und basische Strukturen rot (zB. Zellproteine, Kollagene) angefärbt. Es entsteht ein Überblick über die verschiedenen feingeweblichen Strukturen des Präparates. Die einzelnen Färbeschritte und -zeiten sind chronologisch in Tabelle 12 aufgelistet. Die Herstellung der Eosin-B-Lösung ist in Tabelle 8 beschrieben. Die OT wurden nach der Färbung luftgetrocknet und mit RotiHisto Kit eingedeckt.

Färbeschritte			
1.	Hämatoxylin (1 Min)	7.	Eosin B - Lösung (15 Min)
2.	dH ₂ O (1 Min)	8.	70 % EtOH (1 Min)
3.	5% Essigsäure (1 Min)	9.	96 % EtOH (2 x 1 Min)
4.	dH ₂ O (1 Min)	10.	100 % EtOH (2 x 1 Min)
5.	Fließendes Leitungswasser (2 Min)	11.	Xylol (2 x 1 Min)
6.	70 % EtOH (1 Min)		

Tabelle 12: Färbeschritte der HE-Färbung

3.5.3 Movat-Pentachrom Färbung

Die Movat-Pentachrom Färbung stellt als Übersichtsfärbung die verschiedenen Komponenten des Bindegewebes dar. Die Strukturen färben sich dabei schwarz (Kerne und elastische Fasern), blau (Hintergrund und Muskulatur), rot (Muskulatur), gelb (Kollagen und retikuläres Bindegewebe), grün (Glykosaminoglykane) oder intensiv rot (Fibrin und Fibrinoid).

Die OT wurden zunächst luftgetrocknet und anschließend gefärbt. Die Färbeschritte und -zeiten sind chronologisch in Tabelle 13 aufgelistet Die Herstellung der einzelnen Färbelösungen ist in Tabelle 9 beschrieben. Die OT wurden nach der Färbung luftgetrocknet und mit RotiHisto Kit eingedeckt.

Färbeschritte			
1.	dH ₂ O (5 Min)	13.	Fließendes Leitungswasser (1 Min)
2.	4 % Formalin (10 Min)	14.	dH ₂ O (2 x 2 Min, 1 x 1 Min)
3.	dH ₂ O (5 Min)	15.	Brilliant-Crocein-Säurefuchsin working solution (1 Min)
4.	50 °C Bouin's Lösung (10 Min)	16.	dH ₂ O (2 x 2 Min, 1 x 1 Min)
5.	Fließendes Leitungswasser (10 Min)	17.	5 % Phosphorwolframsäure (5 Min)
6.	5 % Natriumthiosulfat (5 Min)	18.	1 % Essigsäure (5 Min)
7.	dH ₂ O (2 x 2 Min, 1 x 1 Min)	19.	dH ₂ O (2 x 2 Min, 1 x 1 Min)
8.	1 % Alcianblau (20 Min)	20.	96 % EtOH (1 Min)
9.	Fließendes Leitungswasser (3:30 Min)	21	100 % EtOH (2 x 1 Min)
10.	60 °C alkalischer Alkohol (10 Min)	22.	Alkoholischer Safran (8 Min)
11.	Fließendes Leitungswasser (3:30 Min)	23.	100 % EtOH (2 x 1 Min)
12.	Weigert's working solution (9 Min)	24.	Xylol (3 x 5 Min)

3.5.4 Mikroskopische Fotoaufnahmen und Bildbearbeitung

Die weiteren histologischen Analysen wurden in digitaler Form an mikroskopischen Fotoaufnahmen der Präparate durchgeführt. Dafür wurden die gefärbten Präparate in einem Durchlichtmikroskop über eine Software betrachtet fotografiert. Die Einzelbilder wurden danach mit der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* über das *Plugin "Stitching"* zu einem Gesamtbild zusammengefügt (42).

3.5.5 Auswertung

HE-gefärbte Präparate wurden herangezogen, um den Einfluss diabetischer Bedingungen auf die Flächenveränderung der Lamina Spongiosa zu untersuchen. Dafür wurde die Gesamtfläche eines Präparates sowie die Fläche der Lamina Spongiosa mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms *ImageJ* ausgemessen. Anschließend wurde ein Verhältnis zwischen Lamina Spongiosa zur Gesamtfläche gebildet.

3.6 Proteinanalysen

3.6.1 Herstellung von Proteinlysaten aus AK-Taschen

Zur Herstellung von Proteinlysaten für Analysen mittels Western-Blot-Verfahren wurden gefrorene AK-Taschen mit einem in LN₂ vorgekühltem Mörser mechanisch zerkleinert und mit 100-250 µl Lysepuffer versetzt. Das Homogenisat wurde für 15 Minuten in einem eisgekühlten Ultraschallbad zur Proteinextraktion vorbehandelt. Überschüssige Zell- und Gewebefragmente wurden bei 4 °C und 13000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert (42).

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der Proteinlysate wurde mithilfe eines DC-*Assays*, angelehnt an die Lowry-Methode, bestimmt (44). Dafür wurden 10 μ l einer Probe in eine Vertiefung einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und 25 μ l alkalische Kupfer-Tartart-Lösung (DC-*Assay Reagent A*) hinzugefügt, wodurch es zu einer Reaktion zwischen Proteinen und Kupfer kam. Anschließend wurden 200 μ l Folin-Reagenz (DC-*Assay Reagent B*) hinzugefügt und das Gemisch 15 Minuten inkubiert. Durch die Reduktion des Folin-Reagenzes entstand eine charakteristische Blaufärbung, die mit der Proteinkonzentration der Probe korrelierte und photometrisch gemessen werden konnte. Die Messungen erfolgten für jede Probe in Doppelbestimmung.

Die Proteinkonzentrationen berechneten sich mit Hilfe einer Standardreihe. Dafür wurde für jede Analyse eine Standardproteinreihe im Bereich zwischen 0 μ g/ μ l und 1 μ g/ μ l Bovines Serumalbumin (BSA) mitgeführt, welche in Lysepuffer verdünnt wurde.

Die photometrische Messung erfolgte durch ein Mikrotiterplatten-Messgerät bei einer Wellenlänge von 750 nm.

3.6.3 Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ist eine Methode zur Auftrennung von geladenen Makromolekülen (in diesem Fall Proteinen) nach ihrem Molekulargewicht (45). Die aufgetrennten Proteine können anschließend mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert, detektiert und quantifiziert werden.

Zunächst wurde ein Polyacrylamidgel als Matrix zur Proteinauftrennung hergestellt. Dafür wurde 10% iges Trenngel zu drei Vierteln in eine Gelkassette gefüllt und mit 500 µl Isopropanol bedeckt, um die Oberkante zu glätten. Nach 30 Minuten wurde das Isopropanol abgekippt und die Gelkassette mit 4% igem Sammelgel aufgefüllt, in das ein Gelkamm eingeführt wurde. Das Gel war nach weiteren 30 Minuten vollständig polymerisiert.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden zwei Gelkassetten in eine Elektrophoresekammer eingespannt und Laufpuffer eingefüllt. Die Proteinlysate wurden zunächst in dem Verhältnis 1:6 mit 6x Laemmli-Puffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C aufgekocht. Dadurch wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und mit negativen Ladungen besetzt. Anschließend wurde der Gelkamm entfernt und die Geltaschen mit jeweils $10 \ \mu g - 15 \ \mu g$ Protein beladen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wanderten die Proteine im Polyacrylamidgel in Richtung der Anode. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 60 Volt durchgeführt, um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 130 Volt im Trenngel. Ein Molekulargewichtsmarker (*PageRuler*) wurde in jedem Gel mitgeführt (42).

3.6.4 Der Western-Blot

Durch das Western-Blot-Verfahren können Proteine, die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran transferiert und anschließend immunologisch detektiert werden.

Zur Durchführung von Western-Blots wurde ein Tank-Blot-System verwendet. Dafür wurde eine aus Nitrozellulose bestehende Trägermembran auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten und in dH₂O aktiviert. Die Membran wurde anschließend anodenseitig auf dem Gel positioniert und in einem Bad mit Transferpuffer luftblasenfrei zwischen zwei Filterpapieren und Schwämmen zu einem Blotsandwich aufgebaut. Das Blotsandwich wurde in eine Blotkassette gespannt und in einen Tank-Blotter eingebracht, welcher mit eisgekühltem Transferpuffer befüllt war. Der Proteintransfer wurde bei max. 100 V, 500 mA und 50 W für 90 Minuten durchgeführt.

Die Nitrozellulosemembranen wurden anschließend, abhängig vom zu detektierenden Zielprotein, für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 5% BSA in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBST) oder 5% Milch/TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren (42).

3.6.5 Detektion spezifischer Proteine

Die Nitrozellulosemembranen wurden nach abgeschlossenem Proteintransfer für eine Stunde bei RT in 5 % BSA oder 5 % Milch blockiert, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Zur immunologischen Detektion spezifischer Proteine wurden die Membranen mit Primärantikörpern inkubiert, die gegen ein auf der Membran immobilisiertes Zielantigen gerichtet waren. Überschüssige Antikörper wurden danach durch dreimaliges Waschen in TBST entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran mit *horseradish-peroxidase*-gekoppelten Sekundärantikörpern, die gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet waren. Überschüssige Sekundärantikörper wurden ebenfalls durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Die Verdünnung der Antikörper sowie die entsprechenden Inkubationszeiten sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführt.

Die Membran wurde anschließend mit Chemilumineszenzsubstrat im Verhältnis 1:1 bedeckt. HRP katalysiert daraufhin eine Chemilumineszenzreaktion, dessen Lumineszenzsignal mithilfe des *Imagers* detektiert werden konnte. Die Signalintensität der Proteinbanden wurde anschließend mit der Software *ImageQuant* um das Hintergrundsignal korrigiert und quantifiziert.

Das Zielsignal wurde anschließend auf das Signal des auf derselben Membran befindlichen *housekeeper*-Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert (42).

Protein	Spezies	Hersteller; KatNr.	Verdünnung	Inkubation
AKT	Kaninchen	Cell Signaling Technology; 4691	1:1000 in 5 % BSA/TBST	ü. N. bei 4 °C
рАКТ	Kaninchen	Cell Signaling Technology; 4060	1:1000 in 5 % BSA/TBST	ü. N. bei 4 °C
ERK1/2	Maus	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA; sc-514302	1:500 in 5 % Milch/TBST	ü. N. bei 4 °C
pERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling Technology; 4370	1:2000 in 5 % BSA/TBST	ü. N. bei 4 °C
FOXO1	Kaninchen	Cell Signaling Technology; 2880	1:500 in 5 % BSA/TBST	ü. N. bei 4 °C
pFOXO1	Kaninchen	Cell Signaling Technology; 9461	1:500 in 5 % BSA/TBST	ü. N. bei 4 °C
GSK-3α/β	Kaninchen	Cell Signaling Technology; 5676	1:1000 in 5% BSA/TBST	ü. N. bei 4 °C
pGSK-3α/β	Kaninchen	Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA; LS-C7154	1:500 in 5 % BSA/TBST	ü. N. bei 4 °C
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling Technology; 2118	1:2000 in 5 % BSA/TBST	60 Min bei RT

Tabelle 14: Primärantikörper für Western-Blot-Analysen

Tabelle 15: Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

Protein	Spezies	Hersteller; KatNr.	Verdünnung	Inkubation
Anti- Kaninchen	Ziege	Jackson ImmunoResearch; 111-035-003	1:10.000 in 5 % BSA/TBST	45 Min. bei RT
Anti-Maus	Ziege	Jackson ImmunoResearch; 111-035-044	1:10.000 in 5 % BSA/TBST	45 Min. bei RT

3.7 mRNA-Analysen

3.7.1 Isolation von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus ovinen AK-Taschen wurde die Phenol-Chloroform-Methode angewandt (46). Dafür wurden halbe gefrorene AK-Taschen zunächst mit jeweils 1 ml TRI-Reagenz und 70 µg Glykogen und das Gewebe in einem automatisierten versetzt Gewebehomogenisator mechanisch zerkleinert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei RT wurde dem Homogenisat 200 µl Chloroform zugesetzt und das Gemisch für weitere 10 Minuten inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation von 15 Minuten bei RT und 13000 rpm. Die wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde anschließend mit 500 µl Propan-2-ol versetzt und die RNA über Nacht (ü. N.) bei 4 °C präzipitiert.

Nach Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm für 30 Minuten wurde das Propan-2-ol vorsichtig abgesaugt. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 75% igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden 30 µl RNAse-freies Wasser hinzugefügt und die RNA für 10 Minuten bei RT gelöst. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert (42).

3.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration und die Qualität der RNA-Proben wurden photometrisch bestimmt. Dafür wurde 1 µl einer RNA-Probe auf ein Spectophotometer aufgetragen und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Die RNA-Konzentration wurde im Anschluss mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Die Qualität der Proben wurde durch das E260/E280- und das E260/E230-Reinheitsverhältnis ermittelt.

3.7.3 Umschreibung von mRNA in cDNA

Für weitere Analysen mittels qPCR wurde *messenger*-RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür kam das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* zur Anwendung. Es wurde je 1 μ g mRNA nach Protokoll des Herstellers mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA durch Zugabe von 180 μ l RNAse freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 5 ng/ μ l verdünnt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert (42).

3.7.4 Analysen mittels qPCR

Die mRNA-Expression spezifischer Zielgene wurde mittels qPCR mit interkalierenden Farbstoffen analysiert. Diese wurde unter Verwendung des *GoTaq qPCR Master Mix Kits* durchgeführt.

Die qPCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Die Amplifikation der Zielsequenzen kann dabei durch eine Fluoreszenzmessung in Echtzeit beobachtet und quantifiziert werden. Dafür lagern sich Fluoreszenzfarbstoffe an doppelsträngige DNA-Sequenzen an. Mit zunehmender Zyklenzahl steigt das Fluoreszenzsignal proportional zur Anzahl der Amplifikate an. Die Spezifität der Amplifikate wurde anschließend durch eine Schmelzkurvenanalyse bestimmt.

Der *GoTaq qPCR Master Mix* wurde zunächst mit 2 % Referenzfarbstoff CXR versetzt. Für die qPCR wurden 2 µl cDNA (5 ng/µl) mit 10 µl *GoTaq qPCR Master Mix*, 7,4 µl RNAse-freies H₂O und je 0,3 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol/µl) in eine Vertiefung einer 96-well PCR-Platte pipettiert (Primer siehe Tabelle 16). Die Messung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung. In jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle mit dH₂O mitgeführt. Die qPCR wurde mit *StepOnePlus Real-Time PCR System* durchgeführt (42).

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (3'-5')	
Acta2	GATAGAGCACGGCATCATCA	GAAGGGTTGGATGCTCTTCA	
Bgn	TCTGCTCCGCTACTCCAAGT	TTGTTGTCCAAGTGCAGCTC	
Col1a1	AAGACATCCCACCAGTCACC	TAAGTTCGTCGCAGATCACG	
Dcn	CCAAAGTGCGAAAGTCTGTG	TTCAATGCCTGAGCTCTTCA	
Mmp2	TGACAAGGACGGCAAGTATG	GTAAGATGTGCCCTGGAAGC	
Rpl13a	GATCCCACCACCCTATGACA	CTTCAGACGCACAACCTTGA	
Rpl29	CCAAGTCCAAGAACCACACC	TATCGTTGTGATCGGGGTTT	
Spp1	GATGGCCGAGGTGATAGTGT	TCGTCTTCTTAGGTGCGTCA	
Tgf-β	GAGCCAGAGGCGGACTACTA	TCGGACGTGTTGAAGAACAT	
Tubb	CCTACAACTGGACCGCATCT	AAAGGACCTGAGCGAACAGA	

Tabelle 16: Primersequenzen

3.7.5 Auswertung der qPCR

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit der Gerätesoftware *StepOnePlus* Version 2.3. Jede Probe wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dabei wurden Proben, deren Schmelzkurven sich phasenverschoben zur Schmelzkurve der eigentlichen Zielsequenz zeigten oder deren Duplikate sich in mehr als einem C_T-Wert unterschieden, wiederholt gemessen oder von der Auswertung ausgeschlossen.

Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression wurde die $\Delta\Delta$ CT-Methode angewandt (47). Als Referenzgene dienten ribosomales Protein L29 (*Rpl29*), ribosomales Protein L13a (*Rpl13a*) und Tubulin-ß (*Tubb*). Der Referenz-C_T-Wert wurde aus dem Mittelwert der C_T -Werte berechnet. Als Kontrolle wurde der Δ C_T-Wert einer NG-Probe des entsprechenden Modells herangezogen (42).

3.8 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen der Forschungsergebnisse sowie dessen graphische Darstellung wurde mit dem Statistikprogramm *GraphPad Prism* durchgeführt.

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Signifikanzen ergaben sich bei einem p-Wert ≤ 0.05 zwischen den Vergleichsdaten.

Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem *Mann-Whitney U Test* analysiert. Der *Kruskal-Wallis Test* mit dem *Post-Hoc Test* von *Dunn* wurde für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen angewandt. Die Datenanalyse von zwei beeinflussenden, voneinander unabhängigen Variablen wurde mithilfe des *two-way analysis of variance (ANOVA)* und dem *Sidak's multiple comparison Post-Hoc Test* durchgeführt (42).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Kultivierungsmodelle: Stabilität der Glukoseund Insulinkonzentration über die Dauer der Behandlung

Um diabetische Bedingungen isoliert auf ihre Auswirkungen auf die AK-Degeneration zu untersuchen, ist deren Stabilität in Bezug auf die jeweilige Konzentration im entsprechenden Versuchsmodell essenziell. Dafür wurde in einem Vorversuch in drei unterschiedlichen Gruppen (NG, NG+HI und NG+HI mit MW) untersucht, ob regelmäßige Wechsel des Kulturmediums im statischen Modell notwendig sind, um Glukose- und Insulinkonzentrationen auf ihrem entsprechenden Niveau aufrecht zu erhalten (Abb. 15).

In allen drei Gruppen kam es an Tag 2 (NG: $65,2 \pm 1,6 \text{ mg/dl}$; NG+HI: $62,1 \pm 2,5 \text{ mg/dl}$; NG+HI mit MW: $46,6 \pm 1,8 \text{ mg/dl}$) zu einer signifikanten Erniedrigung der Glukosekonzentration im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 (NG: $83 \pm 0 \text{ mg/dl}$; NG+HI: $84 \pm 0 \text{ mg/dl}$; NG+HI mit MW: $84 \pm 0 \text{ mg/dl}$). In den Gruppen NG und NG+HI verringerte sich die Glukosekonzentration täglich und sank ab Tag 6 auf unter 5 mg/dl. In Der Gruppe NG+HI mit MW blieb die Glukosekonzentration auf einem Niveau zwischen $42,4 \pm 3,3 \text{ mg/dl}$ und $88,5 \pm 0 \text{ mg/dl}$ annähernd stabil und unterschied sich an Tag 7 signifikant von den Gruppen ohne MW (NG: $1,8 \pm 1,8 \text{ mg/dl}$; NG+HI: $0 \pm 0 \text{ mg/dl}$; NG+HI mit MW: $62,9 \pm 2,3 \text{ mg/dl}$).

Die Insulinkonzentration verringerte sich in den Gruppen NG+HI und NG+HI mit MW an Tag 2 (NG+HI: 7976,9 \pm 371,7 IU; NG+HI mit MW: 8456,5 \pm 1615,4 IU) signifikant verglichen zu Tag 0 (NG+HI: 16505,1 \pm 2933,1 IU; NG+HI mit MW: 16505,1 \pm 2933,1 IU). Die Insulinkonzentration der Gruppe NG+HI blieb zwischen Tag 2 und Tag 7 auf einem annähernd stabilen Niveau. Die Insulinkonzentration der Gruppe NG+HI mit MW war im Vergleich zu den Gruppen ohne MW zu allen Messzeitpunkten höher und unterschied sich an Tag 7 signifikant (NG+HI: 5232,1 \pm 801,3 IU; NG+HI mit MW: 9042,9 \pm 885,9 IU). In der Gruppe NG lag die Insulinkonzentration an allen Messzeitpunkten unter der Nachweisgrenze.



Abb. 15: Glukose- und Insulinkonzentration im *In-vitro*-Modell mit und ohne regelmäßige Mediumwechsel

A: Glukosekonzentration nach täglichen Messungen aus dem Überstand von *in vitro* kultivierten AK-Taschen im Vorversuch mit und ohne regelmäßige Mediumwechsel. **B:** Insulinkonzentration nach regelmäßigen Messungen aus dem Überstand von *in vitro* kultivierten AK-Taschen im Vorversuch mit und ohne regelmäßige Mediumwechsel. Die Mediumwechsel wurden an Tag 2, 4 und 6 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6). ****: p < 0,0001 Tag 2 vs. Tag 0 derselben Gruppe; ††††: p < 0,0001 Gruppen mit vs. ohne MW; †: p < 0,05 Gruppen mit vs. ohne MW. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; NG: Normoglykämie; HI: Hyperinsulinämie; MW: Mediumwechsel. (42)

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des oben beschriebenen Vorversuchs wurden in allen weiteren Versuchen des statischen Kulturmodells über den Zeitraum der Behandlung regelmäßige MW alle zwei Tage durchgeführt und die Glukosekonzentration zur Überwachung der Konzentrationsstabilität täglich kontrolliert (Abb. 16A). Dabei kam es zu geringfügigen Schwankungen der Glukosekonzentration innerhalb der entsprechenden Behandlungsgruppen, welche sich jedoch über den Zeitraum der Behandlung annähernd stabil um den Ausgangswert an Tag 0 (NG: 94 \pm 0 mg/dl; NG+HI: 88 \pm 0 mg/dl; HG: 343 \pm 0 mg/dl; HG+HI: 354 \pm 0 mg/dl) bewegten.

Im dynamischen Kulturmodell wurde die Behandlung ohne MW durchgeführt. Zur Kontrolle der Stabilität der Glukosekonzentration über die Behandlungsdauer wurde die Glukosekonzentration an Tag 0 und Tag 7 gemessen (Abb. 16B). Dabei kam es in allen Gruppen an Tag 7 zu einer geringfügigen Erniedrigung der Glukosekonzentration im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 (NG: d0: $88,5 \pm 0$ mg/dl vs. d7: $75,4 \pm 1,2$ mg/dl; NG+HI: d0: $88,5 \pm 0$ mg/dl vs. d7: $65,8 \pm 3,6$ mg/dl; HG: d0: $339,3 \pm 0$ mg/dl vs. d7: $326,1 \pm 8$ mg/dl; HG+HI: d0: $339,3 \pm 0$ mg/dl vs. d7: $324,6 \pm 3,9$ mg/dl).



Abb. 16: Stabilität der Glukosekonzentration im statischen- und dynamischen Modell A: Tägliche Glukosemessungen im statischen *In-vitro*-Kulturmodell an Tag 0-7. B: Glukosemessung im dynamischen *Ex-vivo*-Modell an Tag 0 und Tag 7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6). Abkürzungen: NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie. (42)

4.2 Degenerative Prozesse im AK-Gewebe

4.2.1 Expression von Differenzierungsmarkern

VIC reagieren auf Schäden des AK-Gewebes, indem sie aus einem ruhenden in einen aktiven Zustand übergehen. aVIC sind u. a. durch die Expression von α -Glattmuskelaktin (α SMA/*Acta2*) gekennzeichnet und sezernieren Zytokine wie TGF- β und Proteine wie OPN (20). Um dies zu quantifizieren, wurden Messungen der mRNA-Expression von

Acta2, Tgf-ß und Spp1 durchgeführt (Abb. 17). Dabei zeigte sich die Acta2-Expression unter statischen Bedingungen durch den Einfluss von HI und HG signifikant erniedrigt. Im dynamischen Modell unterlag die Acta2-Expression Schwankungen, wobei die diabetische Behandlung keinen wesentlichen Einfluss zeigte. Im direkten Modellvergleich kam es in den Kontrollgruppen zu einer signifikant verringerten Acta2-Expression unter dem Einfluss dynamischer Bedingungen (statisch NG: 1 ± 0.13 ; dynamisch NG: 0.37 ± 0.07). Die Expression von *Tgf-* β war lediglich im dynamischen Modell behandlungsabhängig und zeigte durch die Kombination von HG und HI eine signifikante Erniedrigung. Im Modellverglich kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Tgf- β -Expression im Vergleich zum statischen Modell (statisch NG: 1 ± 0,1; dynamisch NG: $2,2 \pm 0,5$). Der Degenerationsmarker *Spp1*, der das Protein OPN codiert, unterlag in beiden Modellen größeren Schwankungen. Unter dynamischen Bedingungen hatte HG unter den HI behandelten Proben einen signifikanten Einfluss und führte zu einer erniedrigten Spp1-mRNA-Expression. Im direkten Modellvergleich konnten unter den dynamisch behandelten Proben trendweise niedrigere mRNA-Expressionen gezeigt werden (statisch NG: 1 ± 0.3 ; dynamisch NG: 0.4 ± 0.2) (42).





Relative mRNA-Expression von A: *Acta2*, B: *Tgf-* β und C: *Spp1*. Abgebildet sind die Messungen unter statischen (linke Spalte) und dynamischen Bedingungen (mittlere Spalte) sowie dem Vergleich der Kontrollgruppen NG beider Modelle (rechte Spalte). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n = 5-6); *: p < 0,05; **: p < 0,005. Abkürzungen: NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie; *Acta2: alpha smooth muscle actin 2; Tgf-* β : *transforming growth factor* β ; *Spp1*: Osteopontin 1. (42)

4.2.2 Fibrotische Veränderungen des AK-Gewebes

Die fibrotische Verdickung der AK zählt zu den charakteristischen Merkmalen in der Pathogenese der DAVD. Um Rückschlüsse auf Veränderungen der Gewebedichte und damit auf fibrotische Prozesse zu ziehen, wurden AK-Taschen auf einem Leuchtpad fotografiert (Abb. 18A) und die Lichtdurchlässigkeit anhand des mittleren Grauwerts quantifiziert. Weder im statischen In-vitro-Modell noch im dynamischen Ex-vivo-Bioreaktor-Modell kam es durch den Einfluss von HI oder HG zu signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen (statisch: NG: 83,3 ± 1,2 %; NG+HI: $83,1 \pm 0,7$ %; HG: $82,3 \pm 0,6$ %; HG+HI: $83,8 \pm 0,5$ %; dynamisch: NG: 77,9 ± 2 %; NG+HI: 79,1 ± 1 %; HG: 79,7 ± 1 %; HG+HI: 77,5 ± 0,7 %; Abb. 18B). Im direkten Modellvergleich führten dynamische Bedingungen in allen Behandlungsgruppen zu einer stärkeren Verdichtung. Insbesondere in den Gruppen NG, NG+HI und HG+HI wurden signifikant höhere Gewebedichten in den dynamischen Gruppen nachgewiesen (Abb. 18C) (42).

Ergänzend wurden histologische Untersuchungen vorgenommen, um Veränderungen in den einzelnen Schichten der AK-Taschen zu visualisieren (Abb. 19A). Mithilfe der HE-Färbung als Übersichtsfärbung konnte die typische Dreischichtung der AK-Taschen in allen Proben deutlich dargestellt werden. Bei näherer Betrachtung der einzelnen Schichten fiel auf, dass sich die Behandlungsgruppen in Bezug auf ihre Kompaktheit sowie der Fläche der Lamina Spongiosa unterschieden. Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurden die Flächenverhältnisse zwischen der Lamina Spongiosa und der Gesamtfläche jeder AK berechnet. Dabei hatte unter statischen Bedingungen weder HG noch HI einen signifikanten Einfluss auf das Flächenverhältnis (NG: 0,37 ± 0,04; NG+HI: 0.34 ± 0.02 ; HG: 0.35 ± 0.05 ; HG+HI: 0.38 ± 0.02 ; Abb. 19B links). Unter dynamischen Bedingungen wurde ein Trend in Richtung Zunahme der Spongiosa-Fläche unter Einfluss von HG und HI beobachtet (NG: 0.45 ± 0.07 ; NG+HI: 0.54 ± 0.02 ; HG: 0.5 ± 0.03 ; HG+HI: 0.64 ± 0.03 ; Abb. 19B). Im direkten Vergleich wurde zudem deutlich, dass dynamische Bedingungen im Bioreaktor-Modell zu signifikant erhöhten Flächenverhältnissen durch den Einfluss diabetischer Bedingungen führten (Abb. 19C) (42).



Abb. 18: Dichte des AK-Gewebes

A: Die einzelnen AK-Taschen wurden nach Ende der Behandlung auf einem Leuchtpad fotografiert. B: Lichtdurchlässigkeitsmessung zur Quantifizierung der Dichte aufgeteilt nach den Modellen. C: Lichtdurchlässigkeitsmessung im Modellvergleich. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6). *: p < 0,1; **: p < 0,01; ***: p < 0,001. Maßstab: 1 cm. Abkürzungen: NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie. (42)





A: Mikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter AK-Taschen mit ihrem typischen dreischichtigen Aufbau (von oben nach unten): Lamina Fibrosa, Lamina Spongiosa, Lamina Ventricularis. **B**: Berechnung des Flächenverhältnisses der Lamina Spongiosa zur Gesamtfläche einer AK-Tasche. **C**: Direkter Modellvergleich zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6). *: p < 0,05; **: p < 0,01; ****: p < 0,001. Abkürzungen: AK: Aortenklappe; HE: Hämatoxylin-Eosin; NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie. (42)

4.2.3 Der EZM-Umbau

Die DAVD ist durch eine Umstrukturierung der EZM gekennzeichnet und geht mit typischen Veränderungen ihrer Zusammensetzung einher. Zur Darstellung der verschiedenen EZM-Komponenten wurden AK-Taschen mit der Movat-Pentachrom Färbung gefärbt (Abb. 20). Die AK-Taschen zeigten sich reich an kollagenen Fasern (gelb), wobei statisch kultivierte Proben eine intensivere Gelbfärbung aufwiesen als dynamisch kultivierte Proben. Zudem wurde eine diffuse Verteilung von PG (blau-grün) beobachtet, die sich jedoch in der Lamina Spongiosa deutlich konzentriert zeigte. Dabei kam es insbesondere in der dynamischen Gruppe zu einer deutlichen Farbintensivierung, die durch HG verstärkt schien (42). Außerdem wiesen die AK-Taschen der dynamischen verglichen zur statischen Gruppe vermehrt elastische Fasern (schwarz) in der Lamina Ventricularis auf.

Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression von EZM-Komponenten quantifiziert (Abb. 21). Die Expression von Collal blieb im statischen Modell in Bezug auf die Behandlung nahezu unverändert. Im dynamischen Modell zeigte sich die Expression durch HG und HG+HI erhöht, wobei es zu größeren Schwankungen kam und sich keine statistische Signifikanz berechnen ließ. Im direkten Vergleich kam es zu einer signifikanten Verminderung der Collal-Expression im dynamischen Modell (statisch NG: $1 \pm 0,1$; dynamisch NG: $0,6 \pm 0,04$). Die Expression der *Mmp2* war in den NG- und HG-Gruppen in beiden Modellen in entsprechender Kombination mit HI niedriger als ohne HI. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich der Modelle, in dem dynamisch behandelte NG-Proben eine deutlich höhere Mmp2-Expression aufwiesen als die statische Vergleichsgruppe (statisch NG: $1 \pm 0,1$; dynamisch NG: $4,4 \pm 1,2$) (42). Darüber hinaus kam es im statischen Kulturmodell zu einer vermehrten Expression von Bgn unter dem Einfluss von HG+HI, während sich unter dynamischen Bedingungen keine Unterschiede durch HG oder HI beobachten ließen. Dennoch führte die dynamische Kultur unter den NG-Proben zu einer signifikant erhöhten Bgn-Expression im Vergleich zur statischen Gruppe (statisch NG: $1 \pm 0,1$; dynamisch NG: $2,6 \pm 0,6$). Die Expression von Dcn wurde unter statischen Bedingungen durch HI reduziert. Im dynamischen Modell zeigte sich die Dcn-Expression unter NG+HI im Gegenzug signifikant höher als unter HG+HI. Im Modellvergleich zeigte sich eine unter dynamischen Bedingungen im Trend höhere Expression (42).





Mikroskopische Aufnahmen von AK-Taschen in der Movat-Pentachrom Färbung. Gezeigt sind ein übersichtliches Gesamtbild und vergrößerten Ausschnitte zur besseren Beurteilbarkeit der Komponenten. Farbkomponenten: Schwarz: Elastische Fasern; gelb: Kollagen; blau-grün: Proteoglykane. Abkürzungen: NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie. (42)



Abb. 21: EZM-Remodeling Marker

Relative mRNA-Expression von A: *Colla1*, B: *Mmp2*, C: *Bgn*, D: *Dcn*. Abgebildet sind die Messungen unter statischen (linke Spalte) und dynamischen Bedingungen (mittlere Spalte) sowie dem Vergleich der Kontrollgruppen NG beider Modelle (rechte Spalte). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6); *: p < 0,05; **: p < 0,005. Abkürzungen: NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie; *Colla1*: *collagen type 1 alpha 1*; *Mmp2* Matrix-Metalloprotease 2; *Bgn*: Biglykan, *Dcn*: Decorin. (42)

4.3 Auswirkungen chronisch erhöhter Glukose- und Insulinkonzentrationen auf die metabolische Antwort von AK

4.3.1 Stimulation der Insulinantwort

Bindet Insulin an den IR seiner Zielzellen, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die u. a. zur Phosphorylierung beteiligter Signalproteine führt. Die Stärke der Phosphorylierung ist dabei abhängig von der Sensitivität der Zielzellen auf Insulin. Um Rückschlüsse auf die Insulinsensitivität oviner AK-Taschen zu ziehen, wurden die Proben nach Ende ihrer Behandlung zur Aktivierung der Signalkaskade mit AI stimuliert und die Phosphorylierung der Zielproteine mittels Western-Blot-Analysen quantifiziert.

Zur Untersuchung einer adäquaten Dauer des AI-Stimulus wurden AK-Taschen in einem Vorversuch zunächst unterschiedlich lange mit AI stimuliert und die dadurch ausgelöste AKT-Phosphorylierung mittels Western-Blot Analysen quantifiziert (Abb. 22). Die Stimulation der AK-Taschen mit AI (+AI) über 10 und 30 Minuten führte zu einer signifikant höheren AKT-Phosphorylierung gegenüber den nicht mit AI (-AI) stimulierten AK-Taschen. Eine längere Stimulationsdauer über 60 Minuten führte zu keinem Unterschied hinsichtlich der Phosphorylierung von AKT. Darüber hinaus hatte die Einwirkung von AI über 30 und 60 Minuten einen signifikanten Einfluss auf das Gesamt-AKT, welches hingegen unter der 10-minütigen Stimulation unverändert blieb (42).





Western Blot Analyse der AKT-Aktivierung mit (+AI) und ohne (-AI) Akutinsulin-Stimulus. Die Dauer der Stimulation betrug 10 (links), 30 (Mitte) oder 60 (rechts) Minuten. A: Dargestellt ist der phosphorylierte Anteil von AKT (pAKT) sowie B: das Gesamt-AKT (tAKT) jeweils im Verhältnis zum *housekeeper*-Protein GAPDH. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 4). *: p < 0,05. Abkürzungen: AKT: Proteinkinase B; AI: Akutinsulin; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. (42)

4.3.2 Der PI3K-AKT-Signalweg

Innerhalb des PI3K-Signalweges kommt es nach der Bindung von Insulin an den IR zur Aktivierung und Phosphorylierung beteiligter Proteine wie AKT und den nachgeschalteten Proteinen FOXO1 und GSK-3. Um die Stärke der Aktivierung zu quantifizieren, wurden Western-Blot Analysen der Proben nach Behandlung und anschließender zehnminütiger Stimulation mit bzw. ohne AI durchgeführt. Die Stimulation mit AI (+AI) führte verglichen zu den Proben ohne AI-Stimulus (-AI) im statischen sowie im dynamischen Modell innerhalb derselben Behandlungsgruppe in allen Fällen zu einer höheren AKT-Phosphorylierung (Abb. 23B). Dies äußerte sich insbesondere in den Kontrollgruppen (NG) beider Modelle sowie unter statischen Bedingungen ebenfalls durch den Einfluss von HG signifikant. Der Einfluss von HI führte zwar in allen Gruppen ebenfalls zu einer höheren, jedoch deutlich schwächeren Insulinantwort. Darüber hinaus zeigte sich, dass der Einfluss von HI vergleichen zur entsprechenden Gruppe ohne HI zu einer verminderten Phosphorylierung nach AI-Stimulus führte. Im statischen Modell ließ sich diese Beobachtung sowohl nach NG als auch nach HG-Behandlung signifikant nachweisen, wohingegen es im dynamischen Modell nur nach HG-Behandlung zu einer signifikanten Verminderung der **AKT-Aktivierung** durch HI kam. Im Gegensatz dazu hatte weder das Kultivierungsmodell noch die Behandlung selbst einen nachweislichen Einfluss auf die Gesamt-AKT-Expression (Abb. 23C) (42).





Western-Blot Analysen der AKT-Aktivierung nach Behandlung unter NG, HG und HI im statischen (linke Spalte) und dynamischen (rechte Spalte) Kulturmodell und Stimulation mit (graue Balken) oder ohne (weiße Balken) Akutinsulin. A: Repräsentative Bilder der Western-Blots, B: Graphische Darstellung der Auswertung der phosphorylierten Anteile von AKT (pAKT), C: Graphische Darstellung der Auswertung der Gesamt-AKT (tAKT) jeweils im Verhältnis zum *housekeeper*-Protein GAPDH quantifizieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6). *: p < 0,05; ****: p < 0,0001; ††: p < 0,005; †††: p < 0,0005 †††; p < 0,0001. Abkürzungen: AI: Akutinsulin; NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie;

HI: Hyperinsulinämie; AKT: Proteinkinase B; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. (42)

Die Western-Blot Analysen des in der Signalkaskade nachgeschalteten Proteins FOXO1 zeigten durch die Stimulation mit AI (+AI) keine erhöhte Phosphorylierung verglichen zu den -AI Proben derselben Gruppe (Abb. 24B). Zudem ergaben sich weder im statischen noch im dynamischen Modell Unterschiede zwischen den mit NG und NG+HI behandelten AK-Taschen. Es zeigte sich lediglich im statischen Kulturmodell unter HG eine signifikante Minderung der Phosphorylierung bei HG+HI. Diese Beobachtung ergab sich sowohl in den Proben ohne als auch mit AI-Stimulus. Die Menge des Gesamt-FOXO1 (tFOXO1) blieb in allen Gruppen unverändert (Abb. 24C) (42).





Western-Blot Analysen der FOXO1-Aktivierung nach Behandlung unter NG, HG und HI im statischen (linke Spalte) und dynamischen (rechte Spalte) Kulturmodell und Stimulation mit (graue Balken) oder ohne (weiße Balken) Akutinsulin. A: Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western-Blots. B: Western-Blots mit ihren zugehörigen Graphen der Auswertungen, welche den phosphorylierten Anteil von FOXO1 (pFOXO1) sowie C: Gesamt-FOXO1 (tFOXO1) jeweils im Verhältnis zum *housekeeper*-Protein GAPDH

quantifizieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6). ***: p < 0,0005; ****: p < 0,0001. Abkürzungen: AI: Akutinsulin; NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie; FOXO1: *foxhead box protein O1;* GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. (42)

Für Analysen der GSK-3 erfolgte die Unterteilung und separate Betrachtung der zwei Isoformen GSK-3α und GSK-3β. Im statischen Modell kam es unter NG weder unter chronischer HI noch durch die AI-Stimulation zu Änderungen der GSK-3a-Phosphorylierung. Unter HG reduzierte sich die GSK-3a Phosphorylierung durch den Einfluss von HI wiederum signifikant (Abb. 25B). GSK-3ß reagierte dagegen in den Gruppen NG, NG+HI und HG mit einer erhöhten Phosphorylierung auf AI. Dieser Effekt verschwand in HG+HI Gruppe, wobei die Menge des pGSK-3ß verglichen zur HG-Gruppe nach +AI signifikant reduziert wurde (Abb. 25D). Die Expression der Gesamt-GSK-3 α und -GSK-3 β zeigte sich dabei jeweils stabil (Abb. 25C/E). Unter dynamischen Bedingungen kam es in den Gruppen NG und NG+HI zu einer signifikant gesteigerten Aktivierung der GSK-3α als auch GSK-3β durch die Stimulation mit +AI (Abb. 25B/D). Die Gesamt-GSK-3α blieb durch die AI-Stimulation unbeeinflusst, reagierte allerdings unter der Behandlung mit NG+HI mit einer gesteigerten Expression verglichen zur NG-Gruppe (Abb. 25C). Ähnliches ließ sich auch bei der Gesamt-GSK-3β beobachten, wobei es neben der erhöhten GSK-3β-Expression durch die Behandlung mit NG+HI zu einer zusätzlichen Steigerung der Expression nach AI-Stimulation kam (Abb. 25E). In den Gruppen HG und HG+HI kam es sowohl in der Expression der GSK-3a als auch GSK-3β zu größeren Schwankungen, wobei weder HI noch der AI-Stimulus einen Einfluss auf die Gesamt-GSK-3 oder die GSK-3-Aktivierung hatte (42).





Western-Blot Analysen der GSK-uk3-Aktivierung nach Behandlung unter NG, HG und HI im statischen (linke Spalte) und dynamischen (rechte Spalte) Kulturmodell und Stimulation mit (graue Balken) oder ohne (weiße Balken) Akutinsulin. A: Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western-Blots. **B**, **D**: Zugehörige Graphen der Auswertungen, welche den phosphorylierten Anteil von GSK-3 α/β (pGSK-3 α/β) im
Verhältnis zum *housekeeper*-Protein GAPDH quantifizieren. **C**, **E**: Zugehörige Graphen der Auswertungen, welche das Gesamt-GSK- $3\alpha/\beta$ (tGSK- $3\alpha/\beta$) im Verhältnis zum *housekeeper*-Protein GAPDH quantifizieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6). *: p < 0,05; ***: p < 0,0005; ****: p < 0,0001; †: p < 0,05; ††: p < 0,005; †††: p < 0,0005 ††††: p < 0,0001. Abkürzungen: AI: Akutinsulin; NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie, GSK-3: Glykogensynthase-Kinase 3; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. (42)

4.3.3 MAPK-Signalweg

Der MAPK-Signalweg ist neben dem PI3K-Signalweg ein weiterer Signalweg, der nach Bindung von Insulin an den IR aktiviert wird. Eine wesentliche Rolle spielt dabei das Protein ERK. Zur Quantifizierung der ERK-Aktivierung wurden Western-Blot-Analysen der Proben nach Abschluss ihrer entsprechenden Behandlung durchgeführt. Dabei wurden die zwei Isoformen ERK1 und ERK2 separat voneinander untersucht. Unter statischen Bedingungen hatte weder die Behandlung noch die Stimulation mit AI einen Einfluss auf die ERK1-Aktivierung (Abb. 26B) während es in der NG+HI Gruppe zu einer signifikanten Reduktion der Gesamt-ERK1-Expression im Vergleich zur NG-Gruppe kam (Abb. 26C). ERK2 reagierte wiederum unabhängig vom AI-Stimulus mit einer gesteigerten Aktivierung im Rahmen der NG+HI Behandlung verglichen zur NG-Gruppe (Abb. 26D) und ähnlich wie ERK1 mit einer verminderten Gesamt-ERK2-Expression unter NG+HI verglichen zu NG (Abb. 26E). Im dynamischen Modell zeigten sich weder Veränderungen in der Gesamt-ERK1/2-Expression (Abb. 26C/E) noch in der ERK1/2-Aktivierung durch die Behandlung oder den AI-Stimulus (Abb. 26B/D). Unter HG kam es jedoch zu größeren Schwankungen (42).



Western-Blot Analysen der ERK1/2-Aktivierung nach Behandlung unter NG, HG und HI im statischen (linke Spalte) und dynamischen (rechte Spalte) Kulturmodell und Stimulation mit (graue Balken) oder ohne (weiße Balken) Akutinsulin. A: Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western-Blots. B, D: Zugehörigen Graphen der Auswertungen, welche den phosphorylierten Anteil von ERK1/2

(pERK1/2) im Verhältnis zum *housekeeper*-Protein GAPDH quantifizieren. **C, E:** Zugehörigen Graphen der Auswertungen von Gesamt-ERK1/2 (tERK1/2) im Verhältnis zum *housekeeper*-Protein GAPDH quantifizieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6). *: p < 0,05; **: p < 0,005. Abkürzungen: AI: Akutinsulin; NG: Normoglykämie; HG: Hyperglykämie; HI: Hyperinsulinämie; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. (42)

5 Diskussion

5.1 Einfluss diabetischer und dynamischer Kulturbedingungen auf Degenerationsprozesse der AK

5.1.1 Die Expression von Degenerationsmarkern in ovinen AK

Im Rahmen der Pathogenese der DAVD reagieren VIC mit komplexen Reparaturmechanismen auf Gewebeschäden. Dabei kommt es zu einer Differenzierung in aktivierte und osteoblastische Zelltypen und zur Sekretion von Zytokinen und Zur Quantifizierung aVIC EZM-Komponenten (20).von wird in der üblicherweise Differenzierungsmarker Herzklappenforschung der α SMA/*Acta2* herangezogen (48).

Bisherige Studien zeigen, dass das Einwirken von Dehnung und Druck auf die AK die Acta2-Expression beeinflussen (49). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine verminderte Acta2-Expression als Zeichen einer geringeren VIC-Aktivierung in dynamisch behandelten AK des Bioreaktors im direkten Modellvergleich (42). Konkret konnte eine Studie zeigen, dass Dehnung zu einer erhöhten Expression von Acta2 und Druck alleine sowie die Kombination von Dehnung und Druck zu einer verminderten Acta2-Expression führt (49). Mit der Annahme, dass AK im Bioreaktor durch den pulsatilen Fluss sowohl Dehnung als auch Druck und die AK des In-vitro-Modells in aufgespanntem Zustand hauptsächlich Dehnung ausgesetzt sind, sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit den bisherigen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen in Einklang zu bringen. Daneben kam es im statischen Modell durch den Einfluss diabetischer Bedingungen zu einer verminderten VIC-Aktivierung, während sich AK im Bioreaktor von diabetischen Bedingungen unbeeinflusst zeigten (42, 50). In Zusammenschau der Ergebnisse könnte man einen protektiven Einfluss der annähernd physiologischen, dynamischen Umgebungsbedingungen des Bioreaktors auf die Anfälligkeit der AK auf diabetische Bedingungen vermuten. Weitere Arbeitsgruppen untersuchten die Acta2-Expression von VIC anhand eines klassischen zweidimensionalen (2D) Modells und eines synthetischen 3D-Modells, bei denen keine gesteuerten äußeren mechanischen oder dynamischen Parameter auf die Zellen einwirkten und haben ebenfalls keine Einflüsse durch HG beobachtet (31, 33).

Daneben differenziert ein weiterer Teil der VIC in AK im Rahmen degenerativer Prozesse zu osteoblastischen Subtypen, wodurch sie die Fähigkeit erlangen, *Spp1* zu exprimieren und das mit Knochensubstanz assoziierte Protein OPN zu bilden. Durch die Behandlung der AK mit diabetischen Bedingungen kam es in dieser Arbeit zu keiner Veränderung der *Spp1*-Expression. Die Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen einer früheren Studie, bei der die *Spp1*-Expression von VIC im 2D-Modell unter diabetischen Bedingungen ebenfalls unbeeinflusst blieb (33). Im Bioreaktor kam es hingegen unter NG zu einer geringeren *Spp1*-Expression als im statischen Modell. In Hinblick auf die gleichzeitig verminderte *Acta2*-Aktivierung dynamisch behandelter Proben lässt sich ein Zusammenhang erkennen und eine reduzierte Differenzierungstendenz von VIC unter dynamischen Umgebungsbedingungen vermuten. Eine entgegengesetzte Beobachtung wurde zuvor in einer Studie gemacht, welche eine erhöhte *Spp1*-Expression unter dynamischen Bedingungen detektierte, jedoch unter Verwendung von HG-Medium (41).

Humane, fibrotische AK konnten in bisherigen Untersuchungen mit einer deutlich erhöhten Tgf- β Expression verglichen zu gesunden humanen AK charakterisiert werden (30). Auf dieser Beobachtung basierend wurde Tgf- β als weiterer Degenerationsmarker untersucht. Tgf- β reagierte insbesondere auf mechanische Umgebungseinflüsse und wurde im Bioreaktor deutlich stärker exprimiert als in statischer Umgebung, was die Ergebnisse einer früheren Studie mit ähnlicher Beobachtung unterstreicht (41). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte eine gesteigerte Tgf- β -Expression in bovinen Aortenendothelzellen in Zusammenhang mit Scherstress (51). In Hinblick auf die im Bioreaktor herrschenden dynamischen Einflüsse ist durch den pulsatilen Fluss von einem auf die AK einwirkenden Scherstress auszugehen und somit eine damit zusammenhängende Steigerung der Tgf- β Expression im Sinne einer degenerativen Reaktion erklärbar.

5.1.2 Einfluss diabetischer und dynamischer Kulturbedingungen auf die Fibrose und den EZM-Umbau oviner AK

Die für die DAVD typische Fibrose der AK-Taschen ist makroskopisch anhand einer Gewebeverdichtung und -verdickung charakterisiert. Fibrotisch veränderte AK können somit bereits mit bloßem Auge von gesunden AK unterschieden werden (4). Durch Messungen der Lichtdurchlässigkeit wurde die Gewebedichte der AK im Rahmen dieser Arbeit quantifiziert, wobei eine dynamische Umgebung unabhängig von HG und HI zu einer deutlichen Verdichtung der AK führte. Ähnliches zeigt eine frühere Studie, die ovine AK-Taschen im Bioreaktor unter dynamischen Kulturbedingungen mit nativen AK verglich (41). Damit wird die Relevanz der Auswirkungen der Umgebungsbedingungen deutlich, wobei mechanischer Stress zu Gewebeveränderungen im Sinne einer Fibrose führt (42, 50).

5.1.2.1 Fibrose und EZM-Umbau oviner AK: Veränderungen der Kollagenorganisation

Der Fibrose des AK-Gewebes liegen zahlreiche Mechanismen zugrunde, die letztendlich zur Umstrukturierung der EZM führen und die Verdickung des Gewebes bedingen (4). Eine wichtige Rolle spielt dabei das Strukturprotein Kollagen, dessen Desorganisation im Rahmen der DAVD durch pathologisch vermehrten Abbau und Neusynthese beschrieben ist (4). Untersuchungen der damit zusammenhängenden *Collal*-Expression zeigten sich von diabetischen Bedingungen unbeeinflusst. Im Modellvergleich kam es hingegen zu einer signifikant verminderten *Collal*-Expression in AK des Bioreaktors. Dem gegenüber reagierten AK in einer anderen Studie genau entgegengesetzt, wobei es im Bioreaktor zu einer höheren *Collal*-Expression kam verglichen mit dem statischen Modell (41). Eine mögliche Ursache für diese entgegengesetzten Beobachtungen könnte das eingesetzte HG-Kulturmedium sein, da basalen Vergleichsgruppen dieser Arbeit unter NG behandelt wurden (42).

Die Expression von *Mmp2* als wichtigster Vertreter der kollagenabbauenden Proteasen zeigte sich ebenfalls unabhängig von den verwendeten diabetischen Bedingungen. Die Behandlung im Bioreaktor führte, verglichen zum statischen Modell, allerdings zu einer deutlichen Steigerung der *Mmp2*-Expression und weist damit auf einen verstärkten Katabolismus der kollagenen EZM hin (52). Die Zusammenschau dieser Beobachtungen liefert Hinweise auf einen initialen Kollagenverlust durch dynamische Einflüsse. Die Erkenntnisse decken sich mit Beobachtungen der histologischen Analyse der Movat-Pentachrom Färbung, in der sich das kollagene Bindegewebe der Bioreaktor-Proben weniger intensiv gelb darstellte als das der statischen Proben.

5.1.2.2 Fibrose und EZM-Umbau oviner AK: Gewebehypertrophie und PG-Verteilung

Ein weiteres Charakteristikum fibrotischer Prozesse im Rahmen der DAVD ist die vermehrte Einlagerung von PG in die EZM der AK (4). Anhand histologischer Analysen mittels Movat-Pentachrom Färbung wurde visualisiert, dass AK unter dynamischen Kulturbedingungen deutlich mehr PG einlagern als AK im statischen Modell (42, 50). Daneben schien HG im dynamischen Modell die PG-Einlagerung zu verstärken. Eine möglicher Zusammenhang könnten die im Bioreaktor herrschenden Druckverhältnisse sein, da andere Forschungsergebnisse eine vermehrte PG-Einlagerung durch steigende Drücke beschreiben (53).

Unter genauerer Betrachtung der einzelnen Gewebeschichten zeigte sich passend zu bisherigen Beobachtungen insbesondere die Lamina Spongiosa reich an PG (3). Weitere Untersuchungen zielten darauf ab, die Hypertrophie der lockeren Lamina Spongiosa in Abhängigkeit der Behandlung zu erkennen. Dabei kam es ebenfalls im Bioreaktor zu einer Zunahme des Flächenverhältnisses Lamina Spongiosa zu Gesamtfläche, wobei diabetische Bedingungen diesen Effekt verstärkten. Die Lamina Spongiosa gilt in der AK als PG-reichste Schicht, die durch ihre stoßdämpfenden Eigenschaften mechanischen Belastungen standhält. Die mechanischen Umgebungseinflüsse des Bioreaktors auf die AK könnten demzufolge eine vermehrte PG-Einlagerung und konsekutiv eine Hypertrophie der Lamina Spongiosa als kompensatorischen Mechanismus und gleichzeitig fibrotische Reaktion verursachen.

Aufbauend auf den o. g. Beobachtungen wurden Analysen der Genexpression der beiden für PG kodierenden Gene *Dcn* und *Bgn* angeschlossen. Im Einklang zu den vorherigen Beobachtungen kam es zu einer Hochregulation der *Bgn*-Expression im dynamischen verglichen zum statischen Modell. Einen möglichen Zusammenhang könnte die Beobachtung mit der in der dynamischen Umgebung gesteigerten *Tgf-β*-Expression haben, wie in der Vergangenheit bereits beschrieben wurde (54). *Bgn* reagierte zudem unter statischen Bedingungen und dem Einfluss von HG+HI mit einer erhöhten Gen-Expression, nicht jedoch unter dynamischen Bedingungen. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine dynamische Umgebung zwar die Hochregulation von *Bgn* bedingt, sich aber protektiv auf den Einfluss von HG und HI auswirkt (42). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in degenerierten AK von DM2-Patienten gemacht, bei denen es verglichen zu gesunden AK zu erhöhten *Bgn*-Expressionen kam. Zudem konnte *in vitro* in VIC ebenfalls eine erhöhte *Bgn*-Expression unter dem Einfluss prodegenerativer Stimuli erreicht werden, was darauf hindeutet, dass degenerative Prozesse mit einer Zunahme von *Bgn* assoziiert sind und diabetische Bedingungen zu einer solchen degenerativen Veränderung in der AK führen (30). *Dcn*, als zweiter wichtiger Vertreter der PG, wies im statischen Modell eine verminderte Expression unter HI auf und zeigte sich unter dynamischen Bedingungen unter Einfluss von HG eher vermindert. Im Modellvergleich ließen sich keine Unterschiede feststellen, womit die Ergebnisse einer ähnlichen Studie bestätigt werden (30).

5.2 Einfluss diabetischer und dynamischer Kulturbedingungen auf den Insulinsignalweg

5.2.1 Insulinsensitivität oviner AK im PI3K-Signalweg

Bindet Insulin an den IR seiner Zielzellen, wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, bei der es u. a. zur Phosphorylierung und folglich Aktivierung nachgeschalteter Signalmoleküle kommt (27, 55). Eine wesentliche Rolle spielt dabei das Schlüsselprotein AKT des PI3K-Signalweges, das in seiner aktiven Form die Phosphorylierung weiterer Signalproteine wie FOXO1 und GSK-3 steuert und damit konsekutiv Einfluss auf intrazelluläre Prozesse nimmt (56). Bereits bekannt ist, dass VIC als Hauptzelltyp oviner AK hochsensitiv mit einer Phosphorylierung von AKT auf AI-Stimuli reagieren und die Sensitivität durch den Einfluss prädiabetischer Stoffwechselzustände wie HG und HI abnimmt (33).

Darauf aufbauend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es nicht nur rein auf Zellebene, sondern darüber hinaus im gesamten Gewebe zu einer Reaktion der AK auf Insulin sowohl unter statischen als auch dynamischen Kulturbedingungen kommt. Anders jedoch als die Reaktion isolierter VIC im 2D-Modell, fallen die Reaktionen in den 3D-Modellen insgesamt schwächer aus (42, 50).

Betrachtet man die Insulinantwort der AK differenziert in den beiden 3D-Modellen, kann eine ähnliche, jedoch insgesamt verminderte Reaktion auf AI im dynamischen Modell unter diabetischen Bedingungen beobachtet werden. Insgesamt zeigt sich damit, dass die Stärke der Insulinantwort mit zunehmender Komplexität des Versuchsmodells (VIC im 2D-Modell < AK im statischen 3D-Modell < AK im dynamischen 3D-Modell) abnimmt. Gleichzeitig bleibt die AK während der Behandlung mit zunehmender Modellkomplexität näher in ihrer physiologischen Struktur erhalten, womit von einem protektiven Einfluss durch den Erhalt der physiologischen AK-Struktur auszugehen ist. Andererseits ist für Fibroblasten beschrieben, dass mechanischer Stress allgemein zu einer Aktivierung des PI3K Signalweges führt (57). Die im dynamischen Modell beobachtete verminderte Insulinantwort kann demnach auch durch eine durch mechanischen Stress verursachte PI3K-Aktivierung erklärbar sein, welche die Reaktion auf AI verdecken könnte.

Bei Betrachtung der einzelnen Behandlungsbedingungen isoliert voneinander, zeigten HI-behandelte AK eine schwächere Reaktion auf AI als die jeweilige Kontrollgruppe, weshalb eine erhöhte Resistenz gegenüber AI anzunehmen ist. Eine ähnliche Reaktion zeigten AK unter HG-Behandlung, wobei hervorzuheben ist, dass eine für Prädiabetes typische Kombination aus HG und HI die Insulinresistenz der AK deutlich verstärkte. Im direkten Modellvergleich fiel die Reaktion auf AI nach HG und/oder HI im dynamischen Modell wiederum deutlich schwächer aus (42). Die Ergebnisse stützen damit die in 5.1.1 erläuterte Hypothese, dass der Erhalt der Klappenstruktur und eine dynamische Umgebung die Anfälligkeit des AK-Gewebes auf diabetische Bedingungen reduziert. Zusammenfassend wird deutlich, dass bereits mit Prädiabetes einhergehende Stoffwechselzustände negative Einflüsse auf die Insulinsensitivität der AK haben und das Zielgewebe damit nachdrücklich belastet werden könnte.

Die der AKT nachgeschalteten Signalproteine GSK- $3\alpha/\beta$ und FOXO1 reagierten beide ähnlich, verglichen zu AKT jedoch nur auf den kombinierten Einfluss von HG und HI mit einer verringerten Antwort auf AI. Im dynamischen Modell ließen sich in beiden Fällen keine Unterschiede durch AI oder die Behandlung HI und HG beobachten (42). GSK-3 und FOXO1 haben insulinvermittelt einen direkten Einfluss auf metabolische Prozesse und den Zellzyklus und spielen damit eine wichtige Rolle in der Pathogenese des DM2 (58, 59). Aufgrund der fehlenden Antwort auf AI ist zu diskutieren, ob in AK grundsätzlich GSK-3 und FOXO1 unabhängige Signalwege zu diabetestypischen Degenerationsreaktionen führen. Wie zuvor aufgeführt, besteht zudem die Erkenntnis, dass die Insulinantwort mit zunehmender Komplexität des Versuchsmodells abnimmt und für die Beeinflussung AKT-nachgeschalteter Signalwege entsprechend stärkere Stimuli oder längere Behandlungszeiträume nötig sein könnten.

5.2.2 Einfluss auf den MAPK-Signalweg

Neben dem PI3K-Signalweg kommt es durch die Aktivierung des IR zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs (60). Wesentlicher bei der Aktivierung des MAPK-Signalweges ist jedoch der Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R), welcher dem IR als Rezeptortyrosinkinase eine starke Ähnlichkeit aufweist (61). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit besitzen Insulin und Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) die Fähigkeit an den jeweils anderen Rezeptor zu binden, wobei die Affinität zum entsprechend eigenen Rezeptor deutlich höher ist. Dieses Phänomen wird als sogenannte Kreuzreaktivität von IR und IGF-1R bezeichnet (62). VIC exprimieren neben IR nachweislich auch IGF-1R, sodass hinsichtlich auf die in dieser Arbeit verwendeten überphysiologischen Insulinkonzentrationen von 100 nM eine solche Kreuzaktivierung von IGF-1R und damit insbesondere die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu befürchten wäre (33). Untermauert wird die Hypothese durch die Erkenntnisse einer Untersuchung, die eine vermehrte Antwort von ERK auf AI mit einer Konzentration 100 nM verglichen zu 10 nM zeigte (63). Da in dieser Arbeit jedoch keine Reaktionen des MAPK-Signalweges durch AI oder den Einfluss diabetischer Bedingungen und des Modells beobachtet werden konnte, ist nicht von einer relevanten Kreuzaktivierung des IGF-1R auszugehen.

5.3 Die Kulturmodelle und ihre Limitationen

3D-Kulturmodelle bieten die Möglichkeit, oftmals aufbauend auf vorausgegangene Untersuchungen in 2D-Modellen, Gewebe unter Beibehaltung seiner anatomischen Strukturen zu untersuchen und die Interaktion von Zellen untereinander sowie mit ihrer umgebenden EZM aufrecht zu erhalten. Unter Einfluss entsprechender Behandlungsparameter wurden AK in zwei verschiedenen Modellen auf unterschiedliche Veränderungen untersucht, wobei sich trotz unterschiedlicher Modellkomplexität eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielen ließ.

Als *Ex-vivo*-Modell stellt der Bioreaktor eine bedeutende Schnittstelle zwischen *In-vitro*und *In-vivo*-Modellen dar und bietet zahlreiche Vorteile gegenüber dem *In-vitro*-Modell. Er ermöglicht die Forschung an Gewebe höher entwickelter Spezies und imitiert durch die Generierung physikalischer und annähernd physiologischer Kulturbedingungen einen lebenden Organismus, die im *In-vitro*-Modell gänzlich unberücksichtigt bleiben. Durch die standardisierte und einheitliche Einstellung der Kulturparameter konnten AK gezielt auf den Einfluss von HG und HI untersucht werden, da diese die einzigen Variablen im Rahmen der durchgeführten Versuche darstellten. Einen weiteren Vorteil bot die Möglichkeit ganze AK-Konduits in das System des Bioreaktors einzubauen und die AK in ihrer ursprünglichen anatomischen Aufhängung unversehrt zu belassen.

Gegenüber den zahlreichen Vorteilen existieren jedoch auch klare Limitationen des *Ex-vivo*-Modells. In Hinblick auf seine Anwendbarkeit ist das Bioreaktormodell herkömmlichen *In-vitro*-Modellen unterlegen, da die Komplexität des Modelles zum einen einer entsprechenden Expertise in Bezug auf die Benutzung bedarf und zum anderen wesentlich kostenintensiver und zeitaufwändiger in seiner Bedienung und Wartung ist. Zudem stellt der Bioreaktor ein künstliches Versuchssystem dar, das den lebenden Organismus zwar vereinfacht unter Berücksichtigung diverser physikalischer Parameter imitiert, die Komplexität und Vielfalt *in vivo* herrschenden Bedingungen aber außer Acht lässt.

Schlussfolgernd konnte durch die Anwendung beider Modelle sowie den direkten Modellvergleich jedoch gezeigt werden, dass dynamische Einflüsse eindeutige Auswirkungen auf die Krankheitsentstehung haben. Dies unterstreicht die Relevanz des Bioreaktors als Schnittstelle zwischen *In-vitro-* und *In-vivo-*Studien und liefert einen Anreiz dynamische Kulturmodelle sowie in weiterer Folge *In-vivo-*Versuche anzuschließen, um mechanische Umgebungsbedingungen und deren modulierende Einflüsse auf die Behandlung zu berücksichtigen.

Eine der Hauptfragstellungen der Arbeit bezog sich auf die Auswirkungen diabetischer Bedingungen auf die AK. Die verwendeten Glukose- und Insulinkonzentrationen lagen im Rahmen der Behandlung mit HG und HI auf deutlich überphysiologischen Niveaus, wobei hierbei auf das Modell einer vorausgegangenen Studie mit VIC zurückgegriffen wurde, um aufbauend vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten (33). Ob ähnliche Auswirkungen auf degenerative Prozesse oder die Insulinsensitivität unter dem Einfluss von HG und HI mit physiologischen prädiabetischen Konzentrationen zu erzielen sind bleibt unklar und erfordert weitere anschließende Untersuchungen. Trotz der relativ kurzen Behandlungszeiträume von sieben Tagen konnten durch die überphysiologischen Glukose- und Insulinkonzentrationen Effekte erzielt werden, womit sich die gewählten Behandlungsparameter gut für erste Erkenntnisse im Rahmen experimenteller Fragestellungen eignen. Zudem kommt es durch das prädiabetische Krankheitsbild neben chronischer HG und HI *in vivo* zu weitaus umfangreicheren Veränderungen des Körpers und seinen Stoffwechsel, welche wiederum potenzierende oder gar protektive Auswirkungen auf Degenerationsprozesse und die Insulinantwort haben könnten, in dieser Arbeit jedoch unberücksichtigt blieben.

Nicht zuletzt ist zu berücksichtigen, dass in dieser Arbeit ausschließlich junge, native AK oviner Herkunft untersucht wurden. Der DM2 sowie der vorausgehende Prädiabetes sind erwiesenermaßen Erkrankungen des höheren Lebensalters und gehen mit weiteren komplexen und pathologischen Stoffwechselzuständen einher (64). Native AK eigneten sich daher gut, um HG und HI unabhängig von andere pathologischen Stoffwechselparametern auf junges, gesundes Gewebe einwirken zu lassen, wobei diabetestypische Begleitpathologien der Lämmer nicht erwartet wurden. Das mögliche Zusammenspiel weiterer Risikofaktoren für die Entstehung der DAVD blieb hierbei außer Acht. Dies sowie entsprechende speziestypische Unterschiede sollten für etwaige Rückschlüsse der Forschungsergebnisse auf den menschlichen Organismus zwingend berücksichtigt werden. Zusammenfassend eignete sich das Modell jedoch hervorragend, um einen weiteren Grundstein an Erkenntnissen zu legen und weitere Untersuchungen darauf aufbauend anzustreben (42, 50).

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

DM2 spielt aufgrund seiner weltweit hohen Prävalenz eine bedeutende Rolle als Risikofaktor für die Entstehung und Progression der DAVD. In dieser Arbeit wurden erstmalig die Auswirkungen der im Frühstadium des DM2 typischen Stoffwechselzustände HG und HI auf ganze, native AK untersucht. Hierfür wurden AK in einem statischen *In-vitro*-Modell und einem dynamischen *Ex*-vivo-Modell behandelt und unterlagen damit dem Einfluss unterschiedlicher Umgebungsbedingungen.

Degenerative und fibrotische Prozesse schritten insbesondere durch das zugrundeliegende Versuchsmodell sehr unterschiedlich fort, wobei dynamische Umgebungsbedingungen zu einer deutlichen Fibrose des Gewebes führten. Zudem zeigten sich Unterschiede in der Zusammensetzung der EZM, welche sowohl histologisch als auch molekularbiologisch nachgewiesen werden konnten. Dabei zeigte sich außerdem ein modulierender Einfluss des Modells auf die Auswirkung diabetischer Bedingungen, wobei modellintern nur geringe Veränderungen durch HG und HI zu beobachten waren.

Die vorbeschriebene Sensibilität von VIC auf Insulin kann sich den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge weiterführend auch auf ganze AK übertragen lassen. Insgesamt zeigte sich ebenfalls eine durch HG und HI erworbene Insulinresistenz, welche jedoch mit Zunahme der Komplexität des Modells abnahm und somit auf einen protektiven Einfluss einer erhaltenen Gewebeintegrität hinwies.

Diese Arbeit stellt erste mögliche Zusammenhänge zwischen DM2 und DAVD dar. Die Pathogenese der DAVD ist jedoch deutlich komplexer als in den verwendeten 3D-Modellen imitierbar und erfordert weitere Forschung mit Berücksichtigung weit umfangreicherer Einflüsse sowie Interaktionen zahlreicher diabetestypischer Stoffwechselzustände. Zudem ist die DM2-Entstehung und die vorausgehende prädiabetische Phase ein oft jahre- bis jahrzehntelanger Prozess, womit die Relevanz weiterführender Langzeitstudien deutlich wird, welche wiederum die Möglichkeit bieten mit physiologischeren Behandlungskonzentrationen zu arbeiten.

Schlussfolgernd auf den klinischen Alltag ist aufgrund des pathogenen Potenzials des Prädiabetes insbesondere ein Fokus auf die Präventionsarbeit und die Früherkennung des DM2 zu legen, um gesundheitliche Konsequenzen wie die Entstehung der DAVD frühzeitig abzuwenden.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Spicer DE, Bridgeman JM, Brown NA, Mohun TJ, Anderson RH. The anatomy and development of the cardiac valves. Cardiol Young. 2014;24(6):1008-22.
- 2. Misfeld M, Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007;362(1484):1421-36.
- 3. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stenslokken KO, et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. J Am Heart Assoc. 2017;6(9).
- 4. Chen JH, Simmons CA. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. Circ Res. 2011;108(12):1510-24.
- 5. Hinton RB, Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. Annu Rev Physiol. 2011;73:29-46.
- 6. Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE. On the biomechanics of heart valve function. J Biomech. 2009;42(12):1804-24.
- Ma X, Zhao D, Yuan P, Li J, Yun Y, Cui Y, et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Calcific Aortic Valve Disease. Acta Cardiol Sin. 2020;36(3):183-94.
- 8. Servier LL. Smart Servier Medical Art 2021 [Available from: smart.servier.com.
- 9. Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2007;28(2):230-68.
- Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, et al. Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. Circulation. 2020;141(21):1670-80.
- Izquierdo-Gomez MM, Hernandez-Betancor I, Garcia-Niebla J, Mari-Lopez B, Laynez-Cerdena I, Lacalzada-Almeida J. Valve Calcification in Aortic Stenosis: Etiology and Diagnostic Imaging Techniques. Biomed Res Int. 2017;2017:5178631.
- 12. Kamath AR, Pai RG. Risk factors for progression of calcific aortic stenosis and potential therapeutic targets. Int J Angiol. 2008;17(2):63-70.
- 13. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2014;63(22):2438-88.
- 14. Carabello BA. Introduction to aortic stenosis. Circ Res. 2013;113(2):179-85.
- 15. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, et al. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020;40(4):885-900.

- 16. Lindman BR, Clavel M-A, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. Nature Reviews Disease Primers. 2016;2(1).
- Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, 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):1333-41.
- Milin AC, Vorobiof G, Aksoy O, Ardehali R. Insights into aortic sclerosis and its relationship with coronary artery disease. J Am Heart Assoc. 2014;3(5):e001111.
- 19. Dayawansa NH, Baratchi S, Peter K. Uncoupling the Vicious Cycle of Mechanical Stress and Inflammation in Calcific Aortic Valve Disease. Front Cardiovasc Med. 2022;9:783543.
- 20. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. Am J Pathol. 2007;171(5):1407-18.
- 21. Hutson HN, Marohl T, Anderson M, Eliceiri K, Campagnola P, Masters KS. Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture. PLoS One. 2016;11(9):e0163858.
- 22. Laakso M. Biomarkers for type 2 diabetes. Mol Metab. 2019;27S:S139-S46.
- 23. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. J Cell Biol. 2018;217(7):2273-89.
- 24. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Mol Sci. 2020;21(17).
- 25. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS. The dynamic plasticity of insulin production in beta-cells. Mol Metab. 2017;6(9):958-73.
- 26. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. J Epidemiol Glob Health. 2020;10(1):107-11.
- 27. Godsland IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. Clin Sci (Lond). 2009;118(5):315-32.
- 28. Larsson SC, Wallin A, Hakansson N, Stackelberg O, Back M, Wolk A. Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases. Int J Cardiol. 2018;262:66-70.
- 29. Banovic M, Athithan L, McCann GP. Aortic stenosis and diabetes mellitus: An ominous combination. Diab Vasc Dis Res. 2019;16(4):310-23.
- 30. Barth M, Selig JI, Klose S, Schomakers A, Kiene LS, Raschke S, 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):254-69.
- 31. Ciortan L, Macarie RD, Cecoltan S, Vadana M, Tucureanu MM, Mihaila AC, et al. Chronic High Glucose Concentration Induces Inflammatory and Remodeling Changes in Valvular Endothelial Cells and Valvular Interstitial Cells in a Gelatin

Methacrylate 3D Model of the Human Aortic Valve. Polymers (Basel). 2020;12(12).

- 32. Vadana M, Cecoltan S, Ciortan L, Macarie RD, Tucureanu MM, Mihaila AC, et al. Molecular mechanisms involved in high glucose-induced valve calcification in a 3D valve model with human valvular cells. J Cell Mol Med. 2020;24(11):6350-61.
- 33. Selig JI, Ouwens DM, Raschke S, Thoresen GH, Fischer JW, Lichtenberg A, 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):2526-37.
- 34. Koledova Z. 3D Cell Culture: An Introduction. Methods Mol Biol. 2017;1612:1-11.
- 35. Rodriguez KJ, Masters KS. Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix. J Biomed Mater Res A. 2009;90(4):1043-53.
- 36. Weber A, Pfaff M, Schottler F, Schmidt V, Lichtenberg A, Akhyari P. Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitials Cells. Biomedicines. 2021;9(5).
- 37. Arjunon S, Rathan S, Jo H, Yoganathan AP. Aortic valve: mechanical environment and mechanobiology. Ann Biomed Eng. 2013;41(7):1331-46.
- 38. Balachandran K, Konduri S, Sucosky P, Jo H, Yoganathan AP. An ex vivo study of the biological properties of porcine aortic valves in response to circumferential cyclic stretch. Ann Biomed Eng. 2006;34(11):1655-65.
- 39. Schipke KJ, To SD, Warnock JN. Design of a cyclic pressure bioreactor for the ex vivo study of aortic heart valves. J Vis Exp. 2011(54).
- 40. Sun L, Rajamannan NM, Sucosky P. Design and validation of a novel bioreactor to subject aortic valve leaflets to side-specific shear stress. Ann Biomed Eng. 2011;39(8):2174-85.
- 41. Niazy N, Barth M, Selig JI, Feichtner S, Shakiba B, Candan A, et al. Degeneration of Aortic Valves in a Bioreactor System with Pulsatile Flow. Biomedicines. 2021;9(5).
- 42. Selig JI, Boulgaropoulos J, Niazy N, Ouwens DM, Preuss K, Horn P, et al. Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling. Int J Mol Sci. 2021;22(13).
- 43. Feichtner S. Etablierung und Charakterisierung eines voll automatisierten computergesteuerten Bioreaktors zur artifiziellen Kalzifizierung von ovinen Aortenklappen unter physiologi- schen Parametern und Flussbedingungen. Heinrich-Heine-Universität. 2019;Dissertation.
- 44. O H LOWRY NJR, A L FARR, R J RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951:193(1):265-75.
- 45. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.

- 46. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-9.
- 47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
- 48. Olsson M, Rosenqvist M, Nilsson J. Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis. Journal of the American College of Cardiology. 1994;24(7):1664-71.
- 49. Thayer P, Balachandran K, Rathan S, Yap CH, Arjunon S, Jo H, et al. The effects of combined cyclic stretch and pressure on the aortic valve interstitial cell phenotype. Ann Biomed Eng. 2011;39(6):1654-67.
- Selig JI, Boulgaropoulos J, Niazy N, Ouwens DM, Preuß K, Horn P, et al. Diabetesinduzierte Aortenklappendegeneration in statischer Kultur und im Bioreaktor. Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie. 2023;38(1):60-8.
- Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. J Clin Invest. 1995;95(3):1363-9.
- 52. Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. Circulation. 2001;104(21):2525-32.
- 53. Lehmann S, Walther T, Kempfert J, Rastan A, Garbade J, Dhein S, et al. Mechanical strain and the aortic valve: influence on fibroblasts, extracellular matrix, and potential stenosis. Ann Thorac Surg. 2009;88(5):1476-83.
- 54. Burch ML, Yang SN, Ballinger ML, Getachew R, Osman N, Little PJ. TGF-beta stimulates biglycan synthesis via p38 and ERK phosphorylation of the linker region of Smad2. Cell Mol Life Sci. 2010;67(12):2077-90.
- Posner BI. Insulin Signalling: The Inside Story. Can J Diabetes. 2017;41(1):108-13.
- 56. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. Cell. 2017;170(4):605-35.
- 57. Gorski DJ, Petz A, Reichert C, Twarock S, Grandoch M, Fischer JW. Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance. Sci Rep. 2019;9(1):1827.
- 58. Ullah A, Ali N, Ahmad S, Rahman SU, Alghamdi S, Bannunah AM, et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) a magic enzyme: it's role in diabetes mellitus and glucose homeostasis, interactions with fluroquionlones. A minireview. Braz J Biol. 2021;83:e250179.
- 59. Link W. Introduction to FOXO Biology. Methods Mol Biol. 2019;1890:1-9.
- 60. Baghaie L, Bunsick DA, Szewczuk MR. Insulin Receptor Signaling in Health and Disease. Biomolecules. 2023;13(5).
- 61. Hakuno F, Takahashi SI. IGF1 receptor signaling pathways. J Mol Endocrinol. 2018;61(1):T69-T86.

- 62. Li G, Barrett EJ, Wang H, Chai W, Liu Z. Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells. Endocrinology. 2005;146(11):4690-6.
- 63. Krug HV. Die Regulation der Insulinsignalkaskade in aortalen valvulären Interstitialzellen unter diabetischer Stoffwechsellage. Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Klinik für Herzchirurgie. 2023.
- 64. Kerner W, Bruckel J, German Diabetes A. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2014;122(7):384-6.

Danksagung

Ein langer und spannender Weg geht hiermit zu Ende und ich blicke dankbar auf eine sehr lehrreiche und prägende Zeit zurück. An dieser Stelle möchte ich meinen großen Dank an folgende maßgeblich mitwirkende Personen aussprechen:

Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg, Direktor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikum Düsseldorf. Danke für die Möglichkeit zur Promotion in Ihrer Klinik.

Herrn Prof. Dr. Payam Akhyari, meinem Doktorvater und damaligem Leiter der Experimentellen Chirurgie. Danke für die Bereitstellung meines besonderen Promotionsprojektes und das Anvertrauen des Bioreaktors als eines der Herzstücke der Forschungseinrichtung.

Frau Prof. Dr. Margriet Ouwens aus dem Deutschen Diabetes Zentrum. Danke für die Betreuung als Zweitgutachterin, den inspirierenden Austausch und die wertvollen Gedankenanstöße.

Frau Dr. Jessica Isabel Selig gilt mein außerordentlicher Dank für die großartige Betreuung meiner Promotion. Danke für die unermüdliche Unterstützung und die enthusiastische, professionelle und zugleich freundschaftliche Zusammenarbeit, die mir in anstrengenden Phasen immer das nötige Maß an Motivation und Sicherheit gegeben haben. Ich würde mich immer wieder für den zurückgelegten Weg mit dir als Mentorin an meiner Seite entscheiden.

Frau Dr. Naima Niazy danke ich für die außerordentlich tolle Einarbeitung in die Bedienung des Bioreaktors und grundlagenwissenschaftliche Methodiken, die das wesentliche Fundament des Projektes gesetzt haben.

Frau Dr. Mareike Barth danke ich ebenfalls für die großartige Unterstützung und zahlreichen Hilfestellungen. Mit viel Geduld warst du als wichtige Ansprechpartnerin ebenfalls unverzichtbar für mich.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Forschungslabors der Experimentellen Chirurgie danke ich für die unvergessliche Zeit. Der rege Austausch bei gemeinsamen Mittagspausen oder nach anstrengenden Labortagen und die unzähligen gemeinsamen Unternehmungen haben die Zeit nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern auch auf persönlicher Ebene ganz besonders gemacht.

Zuletzt danke ich meinen Freunden und ganz besonders meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung, Rücksicht und Motivation auf dem gesamten Weg meiner Promotion.

Jeder einzelne Wegbegleiter ist für sich ein unwahrscheinlich wertvoller und unverzichtbarer Teil meines liebevollen und unterstützenden Umfelds, von dem ich voller Dankbarkeit umgeben sein darf.

DANKE!