

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

Die Rolle des Antidiabetikums Metformin im Degenerationsprozess von Aortenklappen

Dissertation

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

vorgelegt von

Friederike Irmgard Schöttler
(2026)

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

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Peter Kienbaum

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Bernd Niemann

Für Gerlind, Hinnerk und Gerrit.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Weber, A., Pfaff, M., **Schöttler, F.**, Schmidt, V., Lichtenberg, A., Akhyari, P. (2021)
Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitial Cells.
Biomedicines 26;9(5):474; DOI: 10.3390/biomedicines9050474

Tagungsbeiträge mit veröffentlichten Abstracts:

Weber, A., **Schöttler, F.**, Schmidt, V., Lichtenberg, A., Akhyari, P. (2021)
Metformin Protects against the Degeneration of Aortic Valves.
The Thoracic and Cardiovascular Surgeon 69, 1; DOI: 10.1055/s-0041-1725671

Weber, A., **Schöttler, F.***, Schmidt, V., Lichtenberg, A., Akhyari, P. (2020)
Metformin Exerts Protective Effects against the Degeneration of Aortic Valves.
The Thoracic and Cardiovascular Surgeon 68, 1; DOI: 10.1055/s-0040-1705356
*Präsentiert bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Wiesbaden 03/2020

Zusammenfassung

Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (*calcific aortic valve disease*, CAVD) stellt eine zunehmende Belastung für die westlichen Gesundheitssysteme dar und es fehlen bis heute medikamentöse Therapieoptionen. Dem oralen Antidiabetikum Metformin konnten in der Vergangenheit protektive Effekte auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen nachgewiesen werden und zuletzt wurde ein durch Metformin vermittelter anti-degenerativer Effekt auf valvuläre Interstitialzellen (VICs) unter anorganischer phosphatinduzierter Kalzifizierung beschrieben. Der AMP-aktivierte Proteinkinase-Signalweg wurde dabei als regulatorische Schlüsselstelle herausgestellt. Bislang ist jedoch nicht geklärt, ob Metformin auf VICs auch unter organischer phosphatvermittelter Degeneration protektiv wirkt. Zudem ist Metformins Wirkung auf ganze Aortenklappentaschen (AK) bisher unzureichend untersucht, was jedoch für eine potenzielle klinische Anwendbarkeit von Relevanz ist.

In dieser Promotionsarbeit wurde daher untersucht, welche Effekte Metformin unter organischer phosphatinduzierter Degeneration auf VICs und AK vermittelt. Hierzu wurden ovine VICs sowie AK in einem 3D-Aortenklappenspannmodell kultiviert und verschiedenen Behandlungen ausgesetzt. Es folgten Degenerationsanalysen, Analysen zur Protein- und Genexpression und zellulären Differenzierung sowie histologische Untersuchungen zur Evaluation der extrazellulären Matrix (EZM). Zur Untersuchung des AMPK-Signalwegs wurden außerdem der AMPK-Induktor 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR) und der AMPK-Inhibitor Dorsomorphin eingesetzt.

Nach Etablierung der organischen phosphatinduzierten pro-degenerativen (pd) Bedingungen in der Zell- und Gewebekultur konnte gezeigt werden, dass Metformin sowohl in VICs als auch in AK anti-degenerativ wirkt. Durch Metformin wurde die myofibroblastische und osteoblastische Differenzierung moduliert und die EZM geschützt. Sowohl in VICs als auch in AK induzierte Metformin die AMPK-Phosphorylierung und der durch die AMPK-Phosphorylierung vermittelte anti-degenerative Effekt von Metformin auf VICs konnte durch den AMPK-Induktor AICAR konzentrationsabhängig bestätigt werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Metformin sowohl auf zellulärer Ebene als auch im Gewebeverbund unter organischen phosphatvermittelten pd-Bedingungen protektiv wirkt. Dabei scheint der AMPK-Signalweg eine zentrale Rolle einzunehmen. Diese Erkenntnisse bilden das Gerüst für die Erforschung weiterer AMPK-abhängiger und -unabhängiger Mechanismen zur Validierung des anti-degenerativen Effektes von Metformin und einer möglichen klinischen Übertragbarkeit.

Summary

Although calcific aortic valve disease (CAVD) presents an increasing burden on Western health care systems, to date, no pharmacological treatment options are available. The oral antidiabetic drug metformin has demonstrated protective effects on cardiovascular disease in the past, and a recent study showed metformin-mediated anti-degenerative effects in valvular interstitial cells (VICs) under inorganic phosphate-induced calcification. In this context, the AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway was identified as a key player. However, it remains uncertain whether metformin exerts similar protective ramifications under organic-phosphate induced degeneration. Furthermore, the impact of metformin on entire aortic valve (AV) leaflets has not yet been fully elucidated, although this is highly relevant for potential clinical translation.

This doctoral thesis aims to investigate the effects that metformin exhibits on VICs and entire AV leaflets under organic-phosphate induced degeneration. Therefore, ovine VICs were cultured under various conditions, while AV leaflets were cultured in a three-dimensional aortic valve tissue model and treated under various conditions. Analyses for degeneration, protein and gene expression, as well as cellular differentiation were conducted. Further, histological assessments of the extracellular matrix (ECM) were performed. For exploration of the role of the AMPK signaling pathway, the AMPK activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) and the AMPK inhibitor dorsomorphin were used.

After establishing organic phosphate-induced pro-degenerative (pd) conditions for both cell and tissue culture models, metformin treatment was discovered to mediate anti-degenerative effects in both VICs and AV leaflets. Metformin also modulated myofibroblastic and osteoblastic differentiation, as well as protected the integrity and architecture of the ECM. In both VICs and AV leaflets, metformin induced AMPK phosphorylation, and the AMPK phosphorylation mediated anti-degenerative effect of metformin in VICs was confirmed in a dose-dependent manner by the AMPK inductor AICAR.

In summary, these results propose that metformin facilitates protective effects at both the cellular and the tissue levels under organic phosphate-induced pd conditions. In this process, the AMPK signaling pathway arises to play a crucial role. The insights gained in this study provide the framework for further studies and for the investigation of additional AMPK-dependent and -independent mechanisms to validate the anti-degenerative effects of metformin and support a potential clinical translation of these results.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
ACTA-2	<i>Alpha smooth muscle actin</i> -Gen, α-Glattmuskel-Aktin-Gen
ADP	Adenosindiphosphat
AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid
AK	Aortenklappentaschen
ALP	Alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATG	Autophagie-bezogener Gene
ATP	Adenosintriphosphat
aVIC	Aktivierte, myofibroblastische valvuläre Interstitialzelle
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt</i>
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
BrdU	<i>5-bromo-2'deoxyuridine</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAVD	<i>Calcific aortic valve disease</i> , kalzifizierende Aortenklappenerkrankung
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CoA	Coenzym A
COL1A1	Kollagen Typ 1
COL3A1	Kollagen Typ 3
COL5A1	Kollagen Typ 5
CPT1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
Cu ¹⁺	Kupfer(I)-Ion
Cu ²⁺	Kupfer(II)-Ion
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dorso	Dorsomorphin (<i>Compound C</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCGR	Glukagon Rezeptor
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleid acid</i>)
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat

NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
obVIC	Osteoblastische valvuläre Interstitialzelle
OCAL	Osteocalcin
OCT-1	Organischer Kationentransporter 1
OPN	Osteopontin
p-AMPK	Phosphorylierte Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung
pd	Pro-degenerativ
PFK-2	Phosphofruktokinase-2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pk	Pro-kalzifizierend
pmol	Pikomol
p-mTOR	Phosphoryliertes <i>mechanistic target of rapamycin</i>
PNPP	p-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz (<i>p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt</i>)
PS	Penicillin-Streptomycin
qPCR	<i>Semi-quantitative-real time polymerase chain reaction</i> , semi-quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPL-29A	60S ribosomales Protein L29
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler, <i>standard error of mean</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	<i>Transformierender Wachstumsfaktor-β (Transforming growth factor-β)</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSC2	<i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i>
ULK-1	Unc-51-ähnliche Autophagie-aktivierende Kinase-1
V	Volt
VEC	Valvuläre Endothelzelle
VIC	Valvuläre Interstitialzelle
VICs	Valvuläre Interstitialzellen
VIM	Vimentin
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
α-SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i> , α -Glattmuskel-Aktin
β-GP	Beta-Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat

Angelehnt an die Nomenklatur der *Human Genome Organisation* wurden für die Expression von ovinen Genen Abkürzungen in Großbuchstaben und kursiv verwendet, beispielsweise *VIM* [1]. Die dazugehörigen Proteinennamen wurden ebenfalls in Großbuchstaben, aber nicht kursiv geschrieben, beispielsweise *VIM* [2].

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD).....	1
1.1.1 Klinische Relevanz	1
1.1.2 Pathophysiologie	1
1.1.3 Zelluläre Mechanismen der Degeneration.....	2
1.1.4 Modellierung degenerativer Bedingungen.....	3
1.2 Das orale Antidiabetikum Metformin.....	4
1.2.1 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)	5
1.3 Ziele der Arbeit	7
2 Material	8
3 Methodik	9
3.1 Zell- und Gewebekultur.....	9
3.1.1 Zell- und Gewebegewinnung.....	10
3.1.2 Isolation und Kultivierung von VICs.....	11
3.1.3 Aussaat von VICs	11
3.1.4 Aortenklappenspannmodell	12
3.1.5 Kulturbedingungen	13
3.1.6 Kulturente und Gewinnung von Kulturüberständen.....	13
3.1.7 Alizarinrot-Färbung	14
3.1.8 Alkalische Phosphatase (ALP)-Färbung.....	15
3.2 Assay Analysen	15
3.2.1 Kalziumquantifizierung	15
3.2.2 Alkalische Phosphatase (ALP)-Nachweis in Kulturüberständen	15
3.2.3 Laktatdehydrogenase (LDH)-Nachweis.....	16
3.2.4 Zelluläre Proliferation.....	16
3.3 Proteinbiochemische Methoden	17
3.3.1 Proteinernte	17
3.3.2 Proteinisolation	17
3.3.3 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchoninsäure-Assay	18

3.3.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	18
3.3.5	Western Blot-Analyse	19
3.3.6	Antikörperinkubation und Immunodetektion	20
3.4	Genexpressionsanalysen	21
3.4.1	Ribonukleinsäure (RNA)-Ernte	21
3.4.2	RNA-Quantifizierung	22
3.4.3	Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese	23
3.4.4	Realtime-qPCR	23
3.5	Histologie	24
3.5.1	Kryoschnitte	24
3.5.2	Histologische Alizarinrot-Färbung	25
3.5.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	25
3.5.4	Histologische ALP-Färbung	26
3.5.5	Movat Pentachrom-Färbung	26
3.5.7	Von Kossa-Färbung	28
3.5.8	4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)-Färbung	28
3.6	Auswertungen mittels ImageJ	29
3.6.1	Auswertung von makroskopischen Degenerationskriterien der AK	29
3.6.2	Auswertung histologischer Färbungen	29
3.7	Statistische Auswertung	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Etablierung der Kulturbedingungen zur Induktion von Degeneration und Kalzifizierung	31
4.1.1	Kulturbedingungen in VICs	31
4.1.2	Kulturbedingungen in AK	33
4.1.3	Histologische Färbungen der AK	35
4.2	Das orale Antidiabetikum Metformin	35
4.2.1	Etablierung der Metformin-Konzentration	36
4.3	Degenerationsanalysen	36
4.3.1	Degeneration in VICs	36
4.3.2	Degeneration in AK nach 28 Tagen	37
4.3.3	Degeneration in AK nach 56 Tagen	39
4.4	Myofibroblastische Differenzierung	41
4.4.1	Zytotoxizität	41
4.4.2	Proteinanalysen	43
4.4.3	Genexpression	44
4.4.4	Proliferation	45

4.5	Osteoblastische Differenzierung.....	47
4.5.1	ALP	47
4.5.2	Genexpression osteoblastischer Marker	50
4.6	Die extrazelluläre Matrix (EZM)	51
4.6.1	EZM in VICs	51
4.6.2	EZM in AK	52
4.7	Der AMPK-Signalweg	55
4.7.1	AMPK-Phosphorylierung in VICs.....	55
4.7.2	AMPK-Phosphorylierung in AK.....	56
4.7.3	Aktivierung und Hemmung des AMPK-Signalwegs.....	57
4.7.4	AMPK-Aktivierung in VICs wirkt anti-degenerativ.....	58
4.7.5	Dorsomorphin antagonisiert dosisabhängig die anti-degenerative Wirkung von Metformin.....	60
4.8	Der mTOR-Signalweg.....	61
5	Diskussion	62
5.1	Aspekte der Kulturmodelle und Kulturbedingungen	62
5.2	Metformin hemmt die Degeneration von VICs und AK	63
5.3	Metformin schützt die EZM	65
5.4	Der AMPK-Signalweg	66
5.5	Limitationen und Ausblick	66
5.6	Schlussfolgerung	67
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	68

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der zellulären Mechanismen von CAVD	3
Abb. 2: Wirkmechanismus Metformin	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des AMPK-Signalwegs	6
Abb. 4: Präparation der Aortenklappentaschen aus ovinen Herzen	10
Abb. 5: Spannen des Aortenklappenspannmodells	12
Abb. 6: Etablierung der pro-degenerativen (pd) und pro-kalzifizierenden (pk) Kulturbedingungen in VIC-Kulturen.....	32
Abb. 7: Etablierung der Kulturbedingungen pro-degenerativ (pd) und pro-kalzifizierend (pk) in AK-Kulturen.....	34
Abb. 8: Histologische Darstellung der Kulturbedingungen in AK nach 28 Tagen Kulturdauer	35
Abb. 9: Etablierung der Metformin-Konzentration	36
Abb. 10: Metformin hemmt die Degeneration in VICs.....	37
Abb. 11: Metformin reduziert die Kalzifizierung von AK nach 28 Tagen Kultivierungsdauer	38
Abb. 12: Alizarinrot-Färbung von AK nach 28 Tagen Kulturdauer	39
Abb. 13: Metformin reduziert die Kalzifizierung von AK nach 56 Tagen Kultivierungsdauer	40
Abb. 14: Alizarinrot-Färbung von behandelten AK nach 56 Tagen Kulturdauer	41
Abb. 15: Metformin reduziert den Laktatdehydrogenase-Gehalt in VIC-Kulturen	42
Abb. 16: Metformin reduziert den Laktatdehydrogenase-Gehalt in AK-Kulturen	42
Abb. 17: Die Proteinexpression myofibroblastischer Marker in VIC-Kulturen	43
Abb. 18: Die Proteinexpression myofibroblastischer Marker in AK-Kulturen	44
Abb. 19: Die Genexpression myofibroblastischer Marker in VIC-Kulturen.....	44
Abb. 20: Die Genexpression myofibroblastischer Marker in AK-Kulturen.....	45
Abb. 21: Metformin reduziert die zelluläre Proliferation in VIC-Kulturen nach 48 und 72 Stunden.....	46
Abb. 22: Quantifizierung der Zellkerne pro AK-Fläche.....	46
Abb. 23: Metformin-Behandlung reduziert die ALP-Aktivität in VIC-Kulturen.....	48
Abb. 24: Metformin-Behandlung reduziert die ALP-Aktivität in AK-Kulturen.....	49
Abb. 25: mRNA-Expression osteoblastischer Differenzierungsmarker in VICs	50
Abb. 26: mRNA-Expression osteoblastischer Differenzierungsmarker in AK	51
Abb. 27: mRNA-Expression extrazellulärer Matrix (EZM) Marker in VICs	52
Abb. 28: mRNA-Expression extrazellulärer Matrix (EZM) Marker in AK	53
Abb. 29: Movat Pentachrom-Färbung der für 28 und 56 Tage kultivierten AK	54

Abb. 30: Kurzzeit AMPK-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen und Metformin-Behandlung in VICs	55
Abb. 31: AMPK-Phosphorylierung unter pd-Bedingungen und Metformin-Behandlung in VICs	56
Abb. 32: AMPK-Phosphorylierung unter pd-Bedingungen und Metformin-Behandlung in AK	57
Abb. 33: Kurzzeit AMPK-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen und verschiedenen Behandlung in VICs	58
Abb. 34: Der AMPK-Induktor AICAR hemmt die Degeneration von VICs konzentrationsabhängig	59
Abb. 35: Dorsomorphin antagonisiert dosisabhängig die anti-degenerative Wirkung von Metformin	60
Abb. 36: Kurzzeit mTOR-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen und Metformin-Behandlung in VICs	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial	8
Tabelle 2: Geräte	9
Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Kulturbedingungen	13
Tabelle 4: Medikamentöse Behandlungen	13
Tabelle 5: Ansatz 2 % Alizarinrot-Lösung	14
Tabelle 6: Zusammensetzung Lyse-Puffer	17
Tabelle 7: SDS-PAGE Ladepuffer	19
Tabelle 8: SDS-Page Laufpuffer	19
Tabelle 9: Zusammensetzung Polyacrylamid-Gele gemäß Zielprotein	19
Tabelle 10: Herstellung Polyacrylamid-Gele	19
Tabelle 11: Western Blot Transferpuffer	20
Tabelle 12: Primärantikörper	21
Tabelle 13: Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (TBST)	21
Tabelle 14: Sekundärantikörper	21
Tabelle 15: RLT-Puffer	22
Tabelle 16: Reaktionsansatz qPCR	24
Tabelle 17: Temperatur- und Zeitprofil der qPCR	24
Tabelle 18: Primer Sequenzen für die qPCR	24
Tabelle 19: Ansatz Eosin-Lösung	26
Tabelle 20: Lösungen für die Movat Pentachrom-Färbung	27
Tabelle 21: Lösungen für die Von Kossa-Färbung	28

1 Einleitung

1.1 Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD)

1.1.1 Klinische Relevanz

Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (*calcific aortic valve disease*, CAVD) ist die global am weitesten verbreitete Herzklappenerkrankung und kann Grund für eine Aortenklappenstenose sein [3, 4]. Die Prävalenz sowie Inzidenz der Erkrankung steigen signifikant mit dem Alter und führen aufgrund der demographischen Entwicklung zu einer zunehmenden Belastung für die westlichen Gesundheitssysteme [5, 6]. Charakterisiert ist die Erkrankung durch eine frühe asymptomatische Phase, gefolgt von ernstesten Symptomen wie beispielsweise Synkopen, Angina, sowie letztlich der Entwicklung von Herzinsuffizienz [7]. Bislang beschränken sich die verfügbaren Behandlungsoptionen auf chirurgische und interventionelle Verfahren wie den operativen Aortenklappenersatz sowie Transkatheter-Ersatzverfahren [8]. Diese Behandlungsverfahren sind invasiv und potenziell mit Komplikationen verbunden. Aggraviert wird dies durch die Notwendigkeit einer therapeutischen Antikoagulation bei mechanischem Klappenersatz und möglicherweise einer drohenden Re-Operation oder Re-Intervention bei biologischem Klappenersatz durch deren begrenzte Haltbarkeit [8]. Außerdem haben neuste Untersuchungen gezeigt, dass betroffene Personen regelhaft bereits vor dem Klappenersatz unter schwerwiegenden Symptomen leiden und ein Umbau des Herzmuskels begünstigt wird [9, 10]. Daher scheinen pharmakologische Ansätze zur Prävention und Prophylaxe sowie zur Behandlung der Erkrankung unumgänglich zu sein. Zu diesem Zeitpunkt fehlt es in unseren Leitlinien allerdings an adäquaten pharmakologischen Optionen für die Prävention sowie Progressionseindämmung von CAVD [8].

1.1.2 Pathophysiologie

Pathogenetisch basiert CAVD auf einem aktiven, langsam fortschreitenden multifaktoriellen Prozess, der die Homöostase der extrazellulären Matrix (EZM) beeinflusst und zahlreiche zelluläre Prozesse initiiert [7, 11]. Diese zellulären Prozesse führen unter anderem zu der Entstehung einer chronischen Entzündungsreaktion sowie der Ablagerung von Lipoproteinen, welche zunächst eine fibrotische Verdickung der Aortenklappe auslösen und anschließend eine globale Verkalkung sowie schwere Degeneration hervorrufen, die mit einer eingeschränkten Beweglichkeit der Klappentaschen einhergeht [7, 12, 13]. Das Auftreten und der Progress von CAVD

stehen mit häufigen kardiovaskulären Risikofaktoren in Verbindung, darunter Alter, Nikotinabusus, Bluthochdruck, das metabolische Syndrom sowie genetische Faktoren und angeborene bikuspidale Aortenklappen [12].

1.1.3 Zelluläre Mechanismen der Degeneration

Aortenklappen setzen sich aus halbmondförmigen Klappentaschen mit drei Schichten zusammen: der *Lamina fibrosa*, *Lamina spongiosa* und *Lamina ventricularis* [12, 14]. Zelluläre Bestandteile sind valvuläre Endothelzellen (VECs), die in einer singulären Schicht auf der Außenfläche von Aortenklappen sowohl an aortaler als auch ventrikulärer Seite aufliegen, sowie valvuläre interstitielle Zellen (VICs), die auf allen drei Schichten vorhanden sind [11]. Eine schematische Darstellung der zellulären Mechanismen von CAVD ist in Abb. 1 dargelegt. Mechanische Kräfte können bei CAVD zu einer Endothelschädigung führen, welche die Einwanderung von Lipoproteinen und Immunzellen zur Folge hat [15]. Durch Makrophagen und andere Immunzellen können proinflammatorische Zytokine sekretiert werden, zu denen unter anderem der *Transforming growth factor* (TGF)- β 1 gehört [15]. Die VICs werden als die wesentlichen Akteure bei der Progression von CAVD angesehen und durch die langanhaltende Entzündungsreaktion aktiviert [16]. Es wird davon ausgegangen, dass ruhende VICs zur Fibrokalzifizierung übergehen, indem sie zu aktivierten, myofibroblastischen (aVICs) und osteoblastischen Phänotypen (obVICs) differenzieren [17]. Beide Phänotypen weisen spezifische Charakteristika auf. Die myofibroblastische Differenzierung zu aVICs wird durch proinflammatorische Stimuli ausgelöst und kann charakterisiert sein durch eine Hochregulierung der *Alpha smooth muscle actin* (α -SMA) Expression sowie simultaner *Vimentin* (VIM) Herunterregulierung [16, 18]. Die osteoblastische Differenzierung ist dagegen durch eine frühe Steigerung der alkalischen Phosphatase (ALP) charakterisiert [16, 19]. Zudem kommt es zu einer Hochregulierung des *Runt-related transcription factor* 2 (RUNX2) und es werden vermehrt osteogene Proteine synthetisiert, zu denen das *Bone morphogenetic protein* 2 (BMP-2), sowie Osteopontin (OPN) und Osteocalcin (OCAL) gehören [16, 19]. Inwieweit beide Differenzierungsarten zum Progress der CAVD beitragen, ist Gegenstand aktueller Forschung, wobei davon ausgegangen wird, dass sich beide Differenzierungsarten bis zu einem gewissen Grad überschneiden [16]. Dabei führen proinflammatorische Stimuli zu einer vermehrten Differenzierung der VICs und folglich werden vermehrt Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) synthetisiert und sekretiert. Dazu gehören Kollagene Typ 1 (COL1A1), Typ 3 (COL3A1) und Typ 5 (COL5A1), sowie Matrix Metalloproteinasen (MMPs), die für den Abbau der EZM verantwortlich und in CAVD erhöht sind [7]. Letztlich verdickt die Aortenklappe und es entsteht Fibrose, wobei die Ablagerung von Kalzium die späte Verkalkung

signalisiert [16]. Dieser Prozess ist irreversibel und bis heute steht nur der Aortenklappenersatz als mögliche Therapie zur Verfügung [12].

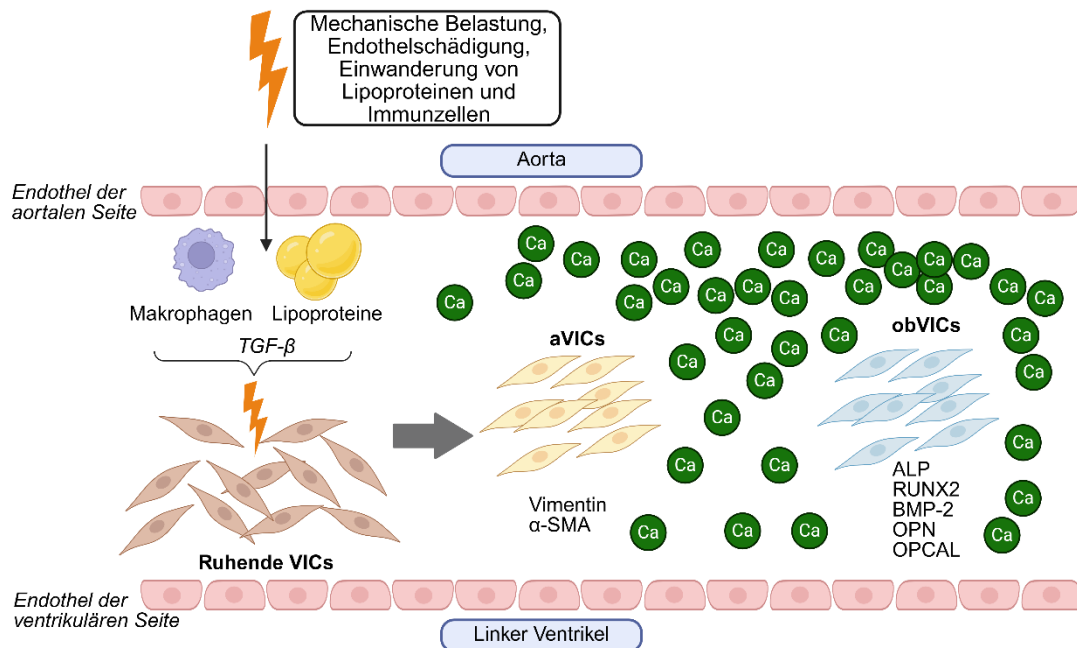


Abb. 1: Schematische Darstellung der zellulären Mechanismen von CAVD

Durch mechanische Belastung und Endothelschädigung kommt es zur Einwanderung von Lipoproteinen und Immunzellen in das Interstitium der Aortenklappe. Als Folge dieser Einwanderung und durch pro-inflammatorische Stimuli (beispielsweise TGF- β -vermittelt) differenzieren die vorher ruhenden VICs zu aktivierten, myofibroblastischen VICs (aVICs) und osteoblastischen VICs (obVICs). Es kommt zur Kalzium (Ca)-Einlagerung und die Aortenklappe kalzifiziert. Abb. erstellt mit *Biorender.com* und angelehnt an [11, 15-17]. Abkürzungen: ALP = Alkalische Phosphatase, aVICs = Aktivierte, myofibroblastische valvuläre Interstitialzellen, α -SMA = *Alpha smooth muscle actin*, BMP-2 = *Bone morphogenetic protein 2*, Ca = Kalzium, obVICs = Osteoblastische valvuläre Interstitialzellen, OCAL = Osteocalcin, OPN = Osteopontin, RUNX2 = *Runt-related transcription factor 2*, TGF- β = Transformierender Wachstumsfaktor- β , VICs = Valvuläre Interstitialzellen.

1.1.4 Modellierung degenerativer Bedingungen

Zur Erforschung von CAVD können verschiedene *in vitro* Modelle genutzt werden, in denen Degeneration induziert werden kann. Dazu zählen zum einen zwei-dimensionale (2D) VIC-Kulturen, welche in unserer Arbeitsgruppe etabliert sind [20, 21]. Zum anderen wurde vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe ein reproduzierbares drei-dimensionales (3D) Aortenklappentaschen (AK) Gewebekulturmodell entwickelt [21, 22]. In diesem 3D-Modell werden ganze AK auf Gummiringe gespannt, sodass sie unter passiver Spannung kultiviert werden können [21]. Goto *et al.* wiesen auf die Bedeutung der Kulturbedingungen für die Kalzifizierungsfähigkeit menschlicher Aortenklappen-VICs hin und postulierten eine Standardisierung dieser Bedingungen [23]. Zwei der

Kulturbedingungen sollen im Folgenden näher beleuchtet werden, und zwar das pro-degenerative Kulturmedium (pd) und das pro-kalzifizierende Kulturmedium (pk). Das pd-Kulturmedium besteht dabei aus beta-Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat (β -GP) als Quelle für organisches Phosphat zur Induktion einer alkalischen Phosphatase (ALP)-bedingten Degeneration sowie osteogenen Verschiebung und Kalziumchlorid (CaCl_2) als Kalziumlieferant [21-25]. Das pk-Kulturmedium besteht wiederum aus Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4) als anorganischem Phosphatlieferanten und löst damit eine ALP-unabhängige Kalzifizierung aus [21, 23, 26, 27]. Beide Kulturbedingungen können in 2D- sowie 3D-Kulturen eingesetzt werden [21].

1.2 Das orale Antidiabetikum Metformin

Metformin ist ein Derivat der Biguanide und das am häufigsten verschriebene orale Antidiabetikum zur Erstlinientherapie bei Diabetes mellitus Typ 2 [28]. Der Wirkmechanismus ist in Abb. 2 (modifiziert nach [29]) dargestellt. In Hepatozyten gelangt Metformin durch aktiven Transport über den organischen Kationentransporter 1 (OCT-1) in die Zelle [30, 31]. Dort hemmt es direkt den Komplex 1 der Atmungskette in den Mitochondrien und erhöht folglich das Adenosinmonophosphat (AMP)/Adenosintriphosphat (ATP) sowie Adenosindiphosphat (ADP)/ATP-Verhältnis, vermindert so die ATP-Produktion und aktiviert die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) [32]. Erhöhte AMP/ATP- und ADP/ATP-Verhältnisse führen außerdem zur Hemmung ATP-verbrauchender anaboler Prozesse, wie exemplarisch der Glukoneogenese, da zyklisches AMP (cAMP) verringert wird [33]. Neben den hypoglykämischen Eigenschaften hat Metformin nachgewiesene positive Effekte auf zahlreiche Erkrankungen, wie beispielsweise Atherosklerose [34], entzündungsbedingte Herz-Kreislauf-Erkrankungen [35], Herzinfarkte [36], chronische Herzinsuffizienz [37], Gefäßverkalkung [38] und Krebs [39]. Metformin hat sich dabei in der Vergangenheit als wirksames *Off-Label*-Therapeutikum erwiesen und wurde mit der Protektion von kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht [40, 41]. Speziell im Zusammenhang mit CAVD legen neuere Studien nahe, dass Metformin die VIC-Verkalkung in durch anorganisches Phosphat induzierten 2D-Zellkulturmodellen hemmt, indem es den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B-Signalweg AMPK-abhängig aktiviert [42] und Autophagie induziert [43]. Dennoch ist noch nicht viel bekannt über die Fähigkeit von Metformin, ganze AK vor Degeneration zu schützen.

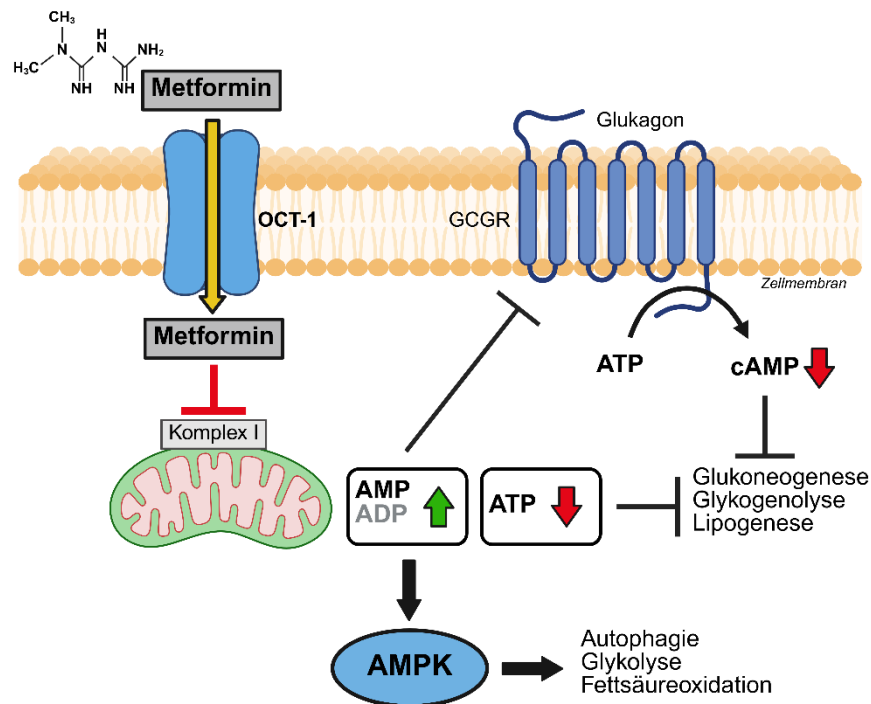


Abb. 2: Wirkmechanismus Metformin

Schematische Darstellung des Wirkmechanismus des oralen Antidiabetikums Metformin (modifiziert nach [29]). Abb. erstellt mit Biorender.com. Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, AMPK = Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase, ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = Zyklisches Adenosinmonophosphat, GCGR = Glukagon Rezeptor.

1.2.1 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) existiert in den meisten Spezies als obligates Heterotrimer, das aus der katalytischen Untereinheit α und zwei regulatorischen Untereinheiten β und γ besteht [44]. Das Enzym AMPK steuert zahlreiche Stoffwechselwege [45]. Kurz zusammengefasst initiiert die Aktivierung von AMPK katabole Stoffwechselprozesse, wie Autophagie, Glykolyse und Fettsäureoxidation [44]. Die Autophagie und das Zellwachstum werden dabei durch AMPK über eine Hemmung des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) Komplexes 1 (mTORC1) reguliert [44, 46, 47]. mTORC1 wiederum ist verantwortlich für eine negative Regulation mehrerer Anlaufstellen der autophagischen Prozesse, inklusive der Unc-51-ähnlichen Autophagie-aktivierenden Kinase-1 (ULK-1), Autophagie-bezogener Gene (ATG) und transkriptioneller Faktoren [48]. Zudem wird über mTORC1 sowie die Phosphorylierung von *Tuberous Sclerosis Complex 2* (TSC2) und Raptor auch die Proteinsynthese gehemmt [49]. mTOR besteht neben Komplex 1 aus dem Komplex 2 (mTORC2), der als primärer Regulator des Zellüberlebens über die Aktivierung der Proteinkinase B und konsekutiver Inhibition von Transkriptionsfaktoren angesehen wird [48]. Die Fettsäureoxydation wird durch eine AMPK-bedingte Hemmung der Acetyl-Coenzym A-

Carboxylase (ACC) gefördert, die die Konzentration von Malonyl-CoA, einem Inhibitor der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1), reduziert und damit den Transport von Fettsäuren in das Mitochondrium erleichtert [49, 50]. Die Glykolyse wird über eine Aktivierung der Phosphofruktokinase-2 (PFK-2) gefördert und in manchen Zellen, wie beispielsweise Muskelzellen, wird durch AMPK auch eine Translokation von Glukosetransportern (z.B. GLUT-4) zur Zellmembran initiiert [50]. Zellulärer Stress kann zu AMPK-Aktivierung führen, indem beispielsweise durch einen Mangel an Nährstoffen ein physiologischer Anstieg an AMP/ADP entsteht, aber auch pharmakologische Stoffe können AMPK aktivieren. Neben Metformin wird auch 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR) als AMPK-Agonist angesehen, der AMP nachahmt und an die AMPK γ -Untereinheit bindet [44]. Im Gegenzug gilt Dorsomorphin (in der Literatur auch Compound-C (Comp-C) genannt) als AMPK-Inhibitor, welcher reversibel und kompetitiv zu ATP an die katalytische α -Untereinheit bindet und deren Kinaseaktivität und somit die Phosphorylierung von Substraten verhindert [51, 52]. Dabei gilt zu beachten, dass Dorsomorphin kein selektiver AMPK-Inhibitor ist und beispielsweise auch den BMP-Signalweg hemmen kann [53]. Eine schematische und vereinfachte Darstellung des AMPK-Signalwegs und der pharmakologischen Modulatoren ist in Abb. 3 dargestellt.

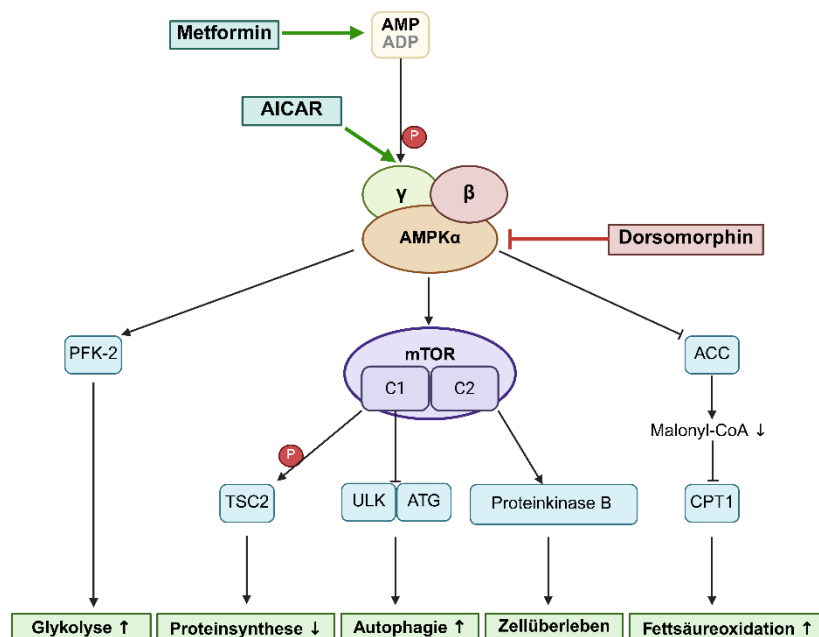


Abb. 3: Schematische Darstellung des AMPK-Signalwegs

Dargestellt ist der vereinfachte AMPK-Signalweg mit den Ansatzpunkten der pharmakologischen Therapien: AMPK-Induktion durch Metformin und 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR), AMPK-Inhibition durch Dorsomorphin. Rote „P“ indizieren Phosphorylierung. Pfeile zeigen eine Induktion, während eine Inhibition durch einen abgebrochenen Strich dargestellt ist. Abb. erstellt mit *Biorender.com*, angelehnt an [44]. Abkürzungen: ACC = Acetyl-Coenzym A-Carboxylase, ATG = Autophagie-bezogener Gene, C = Komplex, CoA = Coenzym A, CPT1 = Carnitin-Palmitoyltransferase 1, PFK-2 = Phosphofruktokinase-2, TSC2 = Tuberous Sclerosis Complex 2, ULK-1 = Unc-51-ähnliche Autophagie-aktivierende Kinase-1.

1.3 Ziele der Arbeit

Die Erkrankung CAVD betrifft viele Menschen weltweit und wird durch die immer älter werdende Bevölkerung zu einer zunehmenden Belastung für die westlichen Gesundheitssysteme. Bislang fehlen medikamentöse Therapieoptionen für CAVD in unseren Leitlinien [8]. Eine potenzielle Therapieoption könnte das orale Antidiabetikum Metformin sein, da hier protektive Effekte gegenüber CAVD gezeigt wurden [42, 43]. Um eine künftige Übertragung in die klinische Praxis zu ermöglichen, müssen diese Ergebnisse jedoch weiter validiert werden.

Die Ziele dieser Arbeit setzen sich daher wie folgt zusammen:

- 1) Zunächst sollte die Applikation des 3D-Aortenklappenspannmodells erweitert werden, indem die Kulturbedingungen pd und pk sowohl in VIC-Kulturen als auch im Aortenklappenspannmodell *in vitro* etabliert werden.
- 2) Das orale Antidiabetikum Metformin sollte in Bezug auf potenzielle protektive Effekte gegenüber organischer phosphatinduzierter Degeneration (pd-Bedingungen) *in vitro* untersucht werden.
- 3) Hierbei sollten sowohl die myofibroblastische, die osteoblastische Differenzierung, als auch potenzielle Effekte auf die EZM untersucht werden.
- 4) Der AMPK-Signalweg sollte unter pd-Bedingungen in Bezug auf die Metformin-vermittelten Effekte beleuchtet werden.

2 Material

Das für die experimentelle Arbeit dieser Dissertation verwendete tierische Material stammt aus Schafsherzen von gesunden 6-9-Monate alten Schafen (*Ovis aries*) vom lokal ansässigen Schlachthof (Laame GmbH & Co. KG, Wuppertal), die als Nebenprodukt bei der industriellen Schlachtung gewonnen wurden. Die für die Versuche genutzten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 1 und die genutzten Geräte in Tabelle 2 dargelegt. Die darüberhinausgehend verwendeten Versuchsmaterialien, Chemikalien und Kits werden im folgenden Methodenteil bei jeweils erster Nennung im Detail deklariert.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Spezifikationen	Hersteller	Kat-Nr.
Deckgläser	24x50 mm	Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland	K12450
Destroy Aufsätze	Destroy-SR-15	Biozym Scientific GmbH., Hessisch Oldenburg, Deutschland	710398
Einbetttschälchen	<i>Histology tissue molds</i> 7x7x5 mm,	Medite Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland	48-6302-00
Eindeckmedium	CV Ultra	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland	140070937891
Eindeckmedium	Roti Histokitt II	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	T160.1
Fettstift	Dako-Pen	Dako, Glostrup, Dänemark	S2002
Filterpapier Histologie	Filtration histologischer Färbelösungen	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	531 024
Filterpapier Western Blot	<i>Whatmanpaper</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	CL75.1
Gummiringe	Silikonschlauch ½"x3/32 60 cm	Free Life Medical GmbH	FLU0080090
Nadelspitzen	BD Vacutainer Safety-Lok 21Gx3/4"x12" (Ø=0,8mm)	Becton, Dickison and Company,	367286
Nitrozellulosemembran	0,45 µm Dicke	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA	1620115
Objektträger	SuperFrost® Plus Objektträger 25x75x1,0 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland	03-0060
Zellschaber		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.1832

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Spezifikationen	Hersteller
Autoklav	Autoklav VX-95	Systec, Wettenberg, Deutschland
Digitalkamera	PowerShot SX20 IS	Canon Inc., Tokyo, Japan
Fluoreszenzmikroskop	DM2000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Imager System	Amersham Imager 600	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Inversmikroskop	DM IL LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kryostat	Cryostat CM 1950	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge	Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Leuchtpad	KAISER slimlite LED	Kaiser Fototechnik, Buchen, Deutschland
Mikroplattenleser	Infinite 1000 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop Kamera (für Inversmikroskop und Fluoreszenzmikroskop)	DFC425 C Software: <i>Leica Application Suite Version 3.8</i> ; Leica Microsystems GmbH	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mini Trans-Blot® System	Kat.-Nr. 170-3935	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell System	Kat.-Nr. 165-8001	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
StepOnePlus Real-Time PCR System	Software: <i>StepOne Software Version 2.3</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Thermocycler	Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultraschallbad	SONOREX RK 156	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortexmischer	IKA MS1 Minishaker	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zellkulturbank	HERAsafe KS	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Labofuge 300	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

3 Methodik

3.1 Zell- und Gewebekultur

Für diese Arbeit wurden Primärzellen und Primärgewebe aus ovinen Aortenklappen isoliert und bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Die Arbeiten wurden unter der Zellkulturbank durchgeführt und es wurde auf eine saubere und sterile Arbeitsweise geachtet. Alle nicht vom Hersteller bereits sterilisierten Materialien wurden autoklaviert oder gründlich mit Alkohol desinfiziert.

3.1.1 Zell- und Gewebegewinnung

Die Schafsherzen wurden unmittelbar nach der Schlachtung auf Eis transportiert und in unsere Weiterverarbeitung übergeben. Die Aortenklappe wurde durch möglichst sterile Präparation freigelegt. Der Ablauf ist in Abb. 4 dargestellt [21]. Nach Vorbereitung der Materialien für die Präparation wurde zunächst mit einer groben Schere die Herzspitze (*Apex cordis*) abgetrennt. Im Folgenden wurde der linke Ventrikel von dorsal, gegenüber der *Auricula*, aufgeschnitten, sodass die Mitralklappe dargestellt wurde. Die Aorta wurde dann auf Höhe einer Kommissur zwischen den AK eingeschnitten, ohne die einzelnen Klappentaschen zu verletzen. Die drei AK wurden dann mit Hilfe einer Pinzette und einem scharfen Skalpell gemäß ihrer anatomischen Konstitution am Klappenannulus abgesetzt. Anschließend wurden die einzelnen Taschen gründlich mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Kat.-Nr. 14190-094), die mit 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S; Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Kat.-Nr. 15140-122) und 1 % Amphotericin-B (Amp-B; Gilead Sciences, Foster City, CA, USA, Kat.-Nr. 62044908) versetzt war, gereinigt.

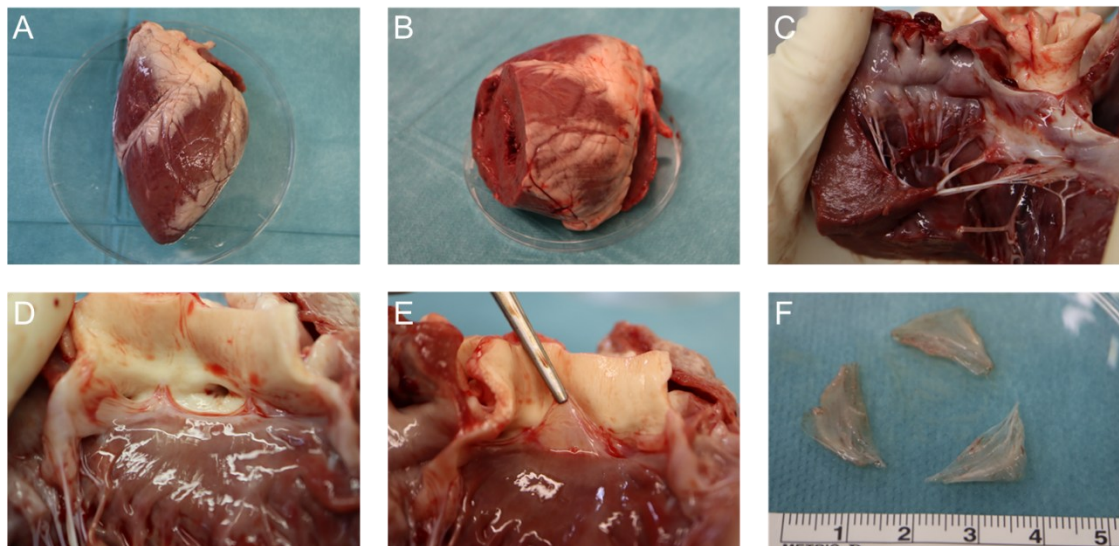


Abb. 4: Präparation der Aortenklappentaschen aus ovinen Herzen

A Ansicht des ovinen Herzens von ventral. **B** Ovines Herz nach Abtrennung des *apex cordis*. **C** Darstellung der Mitralklappe nach Eröffnung des linken Ventrikels. **D** Blick auf die Aortenklappe mit den drei *valvulae semilunaris*. **E** Darstellung einer Aortenklappentasche. **F** Die drei Aortenklappentaschen direkt nach Explantation. Modifiziert nach [21].

3.1.2 Isolation und Kultivierung von VICs

Für die Kultivierung eines biologischen Replikats wurden jeweils alle drei AK in 3 ml Zellkulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose und GlutaMAX™ Zusatz; Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Kat.-Nr. 31966-021), 10 % fötalem Kälberserum (FCS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.-Nr. F7524), 1 % P/S, 1 % Amp-B und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.-Nr. M7145) überführt und mit einer feinen Schere in etwa 1 mm² große Fragmente zerkleinert. Nach Zerkleinerung wurden die Taschenfragmente in eine 25 cm²-Zellkulturflasche, die vorher mit 1%iger Gelatine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.-Nr. G9391; in 1 % PBS, autoklaviert und sterilfiltriert) beschichtet wurde, transferiert, durch Schwenken gleichmäßig verteilt, und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Nach einer Woche wurden die aus den Taschenfragmenten herausgewachsenen VICs nach Entfernung der Gewebefragmente passagiert. Dafür wurden die Zellen nach gründlichem Waschen mit PBS durch 3-minütige Inkubation mit 0,25%iger Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (Trypsin-EDTA; Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Kat.-Nr. 25200-56) von der Kulturflasche gelöst, mit 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS versetzt und bei 1500 x g für 5 Minuten zentrifugiert (Heraeus Labofuge 300). Der entstandene Überstand wurde entsorgt, das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS resuspendiert und im Anschluss in eine bereits mit 1%iger Gelatine beschichtete 75 cm²-Zellkulturflasche überführt. Das Kulturmedium wurde im Folgenden alle 2-3 Tage gewechselt und die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90 % im Verhältnis von 1:3 in neue beschichtete Zellkulturflaschen passagiert. Für die Langzeitlagerung wurden die VICs in Passage 3 nach gründlichem Waschen mit PBS durch Zugabe 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung in Suspension überführt und anschließend bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, sodass ein Zellpellet entstand. Es folgte die Resuspension des Zellpellets in 10 ml FCS, zugesetzt mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.-Nr. D8418), und Überführung je eines ml in ein Kryoröhrchen. Anschließend wurden die VICs in Flüssigstickstoff kryokonserviert und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Aussaat von VICs

Es wurden primäre VICs der Passagen vier bis sechs für die Experimente verwendet. Zur Aussaat der VICs wurden diese zunächst gründlich mit PBS gewaschen und mit Hilfe der 0,25 %-Trypsin-EDTA-Lösung aus der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden die VICs mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht

GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön) gezählt. Für die Durchführung der Experimente wurden jeweils 2 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS mit entweder 100 000 Zellen/Well in 6-Well-Platten oder 50 000 Zellen/Well in 48-Well-Platten ausgesät. Hierfür wurde die im vorherigen Schritt kalkulierte Zellzahl in dem entsprechenden Volumen Zellkulturmedium mit 10 % FCS gelöst und in die bereits vorher gelantine-beschichteten Wells gefüllt. Die Behandlung der VICs mit verschiedenen Bedingungen wurde bei 90%iger Konfluenz der Zellen begonnen.

3.1.4 Aortenklappenspannmodell

Die gereinigten AK wurden für das 3D-Aortenklappenspannmodell mit Hilfe von Nadelspitzen auf Gummiringe gespannt (Abb. 5) [21]. Die aufgespannten AK wurden in 6- oder 12-Well-Platten überführt und zunächst für 48 Stunden zur Akklimation in Zellkulturmedium mit 10 % FCS inkubiert. Daraufgehend wurden die AK für einen Zeitraum von 28 – 58 Tagen kultiviert und dabei verschiedenen Behandlungen ausgesetzt.

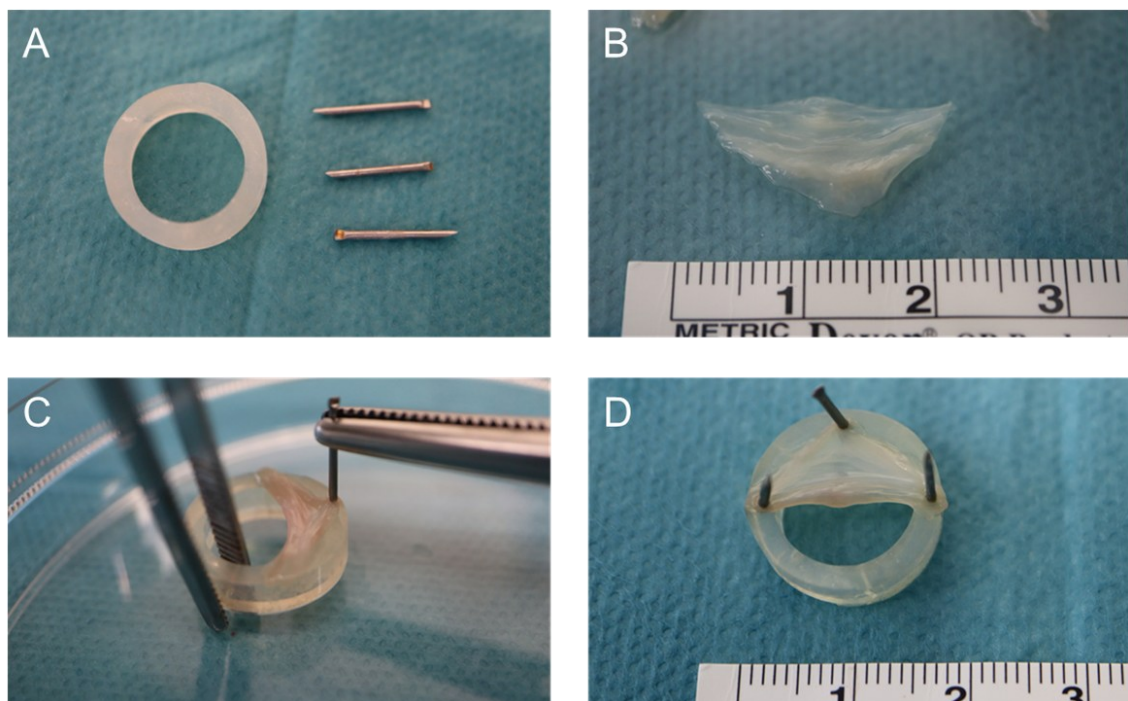


Abb. 5: Spannen des Aortenklappenspannmodells

A Für das Spannen einer Aortenklappentasche benötigte Materialien. **B** Gereinigte Aortenklappentasche unmittelbar vor dem Spannvorgang. **C** Aufspannen der Aortenklappentasche mit einer Nadel auf einen Gummiring. **D** Fertig aufgespannte Aortenklappentasche. Modifiziert nach [21].

3.1.5 Kulturbedingungen

Dem Zellkulturmedium wurden verschiedene Zusätze hinzugefügt, um bestimmte Behandlungsbedingungen zu schaffen. Als Kontrollmedium wurde das Zellkulturmedium (DMEM mit 4,5 g/l Glukose zuzüglich GlutaMAX™ Zusatz, 1 % P/S, 1 % Amp-B, 1 % NEAA) mit 10 % FCS verwendet. Die VICs und AK wurden unter verschiedenen Kulturbedingungen (Tabelle 3) mit verschiedenen medikamentösen Behandlungen (Tabelle 4) kultiviert. Zur Anregung der Degeneration wurden pro-degenerative (pd) Kulturbedingungen mit β -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat (β -GP; 10 mM, Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. 50020) und 1,5 mM Kalziumchlorid (CaCl_2 ; Carl Roth, Karlsruhe, DE, Kat.-Nr. CN93.1) geschaffen. β -GP gilt dabei als Quelle für organisches Phosphat, welches zur Bildung von Kalziumphosphatkristallen beiträgt [16]. Für die pro-kalzifizierende (pk) Kulturbedingung wurden dem Zellkulturmedium 5 % FCS sowie 2 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4 ; Carl Roth, Kat.-Nr. 4984.1) zugesetzt, sodass eine anorganische Phosphatquelle zur Initiation von Kalzifizierungsprozessen hinzugefügt wurde (pk-Bedingung modifiziert nach Goto *et al.* [23]).

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Kulturbedingungen

	Zellkulturmedium mit 10 % FCS	Pro-degenerativ (pd)	Pro-kalzifizierend (pk)
DMEM (4,5g/l Glukose) + GlutaMAX™ Zusatz	500 ml	500 ml	500 ml
FCS	10 %	10 %	5 %
P/S	1 %	1 %	1 %
Amp-B	1 %	1 %	1 %
NEAA	1 %	1 %	1 %
Weitere Zusätze		10 mM β -GP 1,5 mM CaCl_2	2 mM NaH_2PO_4

Tabelle 4: Medikamentöse Behandlungen

Stoff	Wirkung	Arbeitskonzentration	Hersteller	Referenz
1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride (Metformin)	AMPK-Induktor	10 mM	Sigma-Aldrich	D150959-5g
Dorsomorphin dihydrochloride (Compound-C (Comp-C))	AMPK-Inhibitor	10 μM	Adooq Bioscience	A13720-10mg
5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR)	AMPK-Induktor	1 mM	Adooq Bioscience	A10028-50mg

3.1.6 Kulturente und Gewinnung von Kulturüberständen

In der 2D-Zellkultur wurden die kultivierten VICs je nach angestrebter Analyse zwischen Tag 7 und Tag 9 geerntet. Zur Evaluation der Zelldichte sowie der Morphologie der VICs wurden diese regelmäßig mit einem Inversmikroskop (DM IL LED) begutachtet und mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera (DFC425 C) sowie der dazugehörigen Software (*Leica Application Suite Version 3.8*; Leica Microsystems GmbH) fotografisch dokumentiert.

An Kulturtag 2, 5 und 7 wurden je 1 ml Zellkulturüberstand entnommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Das Medium wurde alle 2 – 3 Tage gewechselt. In der 3D-Gewebekultur wurden die AK je nach angestrebter Analyse an Tag 28 oder Tag 56 geerntet. Alle 7 Tage wurde je 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Wechsel des Kulturmediums erfolgten alle 7 Tage. Bei Ernte des 3D-Aortenklappenspannmodells wurden die AK zunächst mehrfach in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Klappentaschen auf dem Leuchtpad inklusive Maßstab mit einer Digitalkamera (PowerShot SX20 IS) fotografiert und zur Weiterverarbeitung entweder histologisch eingebettet oder bis zur weiteren Analyse zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert.

3.1.7 Alizarinrot-Färbung

Zur Degenerationsanalyse wurden mit der Alizarinrot S-Zellfärbung (im Folgenden zur Vereinfachung Alizarinrot-Färbung genannt) Kalziumablagerungen in den VIC-Kulturen nachgewiesen und durch Farbstoffextraktion quantifiziert. Mechanistisch bildet Alizarinrot dabei Chelatkomplexe mit Kalziumphosphat [54], das durch degenerative Prozesse akkumuliert. Zur Färbung in VIC-Kulturen wurde zunächst je nach morphologischem Degenerationsgrad an Tag 7 – 9 das Zellmedium abgesaugt und die Zellen gründlich mit PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung mit 4 % Formaldehyd-Lösung (Carl Roth, Kat.-Nr. P087.3; 1 ml bei 6-Well-Platten, 300 µl bei 48-Well-Platten) für 10 Minuten. Nach Fixierung wurden die VICs erneut mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 2 % Alizarinrot S Lösung (Tabelle 5; Carl Roth, Kat.-Nr. 0348.2; 1 ml bei 6-Well-Platten, 200 µl bei 48-Well-Platten) gefärbt. Nach gründlichem Waschen mit PBS und circa 1- bis 2-stündiger Trockenzeit der Platten wurden die Zellen in den 6-Well-Platten mikroskopisch mit einer 5x Vergrößerung fotografiert. Die 48-Well-Platten wurden makroskopisch auf dem Leuchtpad mit der Digitalkamera dokumentiert. Zur Quantifizierung der Kalziumablagerungen wurde der Farbstoff in den 48-Well-Platten unter dem Abzug mit 200 µl Cetylpyridiumchlorid-Monohydrat-Lösung (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA, Kat.-Nr. 8.40008.0025) unter fortwährendem Schütteln für 3 Stunden gelöst. Durch Absorptionsmessung mit einem Mikroplattenleser bei 540 nm wurden die Kalziumablagerungen quantifiziert.

Tabelle 5: Ansatz 2 % Alizarinrot-Lösung

Alizarinrot-Lösung	2 % Alizarin Rot S in dH ₂ O lösen (pH auf 4,1-4,3 einstellen)
---------------------------	--

3.1.8 Alkalische Phosphatase (ALP)-Färbung

Zur Analyse der ALP-Aktivität in kultivierten VICs wurden behandelte VICs nach dreimaligem Waschen mit PBS für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ mit der *1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution* (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 34042) inkubiert. Die Kombination aus Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT; *nitro-blue tetrazolium chloride*) und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP; *5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*) erzeugt bei Reaktion mit ALP einen unlöslichen schwarz-lilafarbenen Niederschlag [55]. Auf die Inkubation folgte die Dokumentation unter dem Inversmikroskop (DM IL LED). Anschließend wurden die Zellen mit 4%iger Formaldehyd-Lösung (Carl Roth, Kat.-Nr. P087.3) fixiert. Es erfolgte die photometrische Analyse mit ImageJ Version 1.50i (National Institute of Health, USA) [56], bei der der Mittelwert der angefärbten Areale von bis zu drei Bildern pro Experiment berechnet und in Relation zur jeweils dargestellten Gesamtfläche gesetzt wurde.

3.2 Assay Analysen

3.2.1 Kalziumquantifizierung

Zur Quantifizierung der Kalziumakkumulation in VIC-Kulturen wurde ein *Calcium Assay Kit* (Abnova Corporation, Taieph, Taiwan, Kat.-Nr. KA1644) nach Herstellerangaben verwendet. Der Nachweis der Kalziumakkumulation beruht darauf, dass der zugegebene Phenolsulfonphthalein-Farbstoff mit freiem Ca²⁺ einen stabilen blauen Farbkomplex bildet, der spektralphotometrisch gemessen werden kann und direkt proportional zur Kalziumkonzentration ist. Zur Vorbereitung wurden die VICs gründlich mit PBS gespült und in Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,0) für 15 Minuten in einem eisgekühlten Ultraschallbad lysiert. Es folgte die Zentrifugation der Lysate für 20 Minuten bei 18 000 x g und 4 °C mit anschließender Abnahme der entstandenen Überstände. Nach 3-minütiger Inkubation mit der Arbeitslösung bei Raumtemperatur wurde die Wellenlänge bei 612 nm mit dem Mikroplattenleser in Doppelbestimmung gemessen. Durch die mitgelieferten Standards wurde die Kalziumkonzentration berechnet und in Relation zur gemessenen Proteinkonzentration (Bestimmung der Proteinkonzentration siehe 3.3.3) gesetzt.

3.2.2 Alkalische Phosphatase (ALP)-Nachweis in Kulturüberständen

Der kolorimetrische Nachweis der ALP in Kulturüberständen der VICs und AK fungiert als Marker für Mineralisierungsprozesse und wurde mit Hilfe des *Thermo Scientific™*

Pierce PNPP Substrates (Thermo Fisher Scientific Inc., Kat.-Nr. 34047) nachgewiesen. Er beruht darauf, dass die ALP eine Dephosphorylierung katalysiert, bei der sich das zugegebene Substrat *p*-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz (PNPP; *p*-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt) gelb färbt. Die Intensität der Gelbfärbung ist dabei proportional zur umgesetzten Menge PNPP. Je 100 µl Kulturüberstand wurden in einer 96-Well-Platte in Doppelbestimmung mit 100 µl PNPP-Reagenzlösung (10 mg pNPP in 10 ml 1 M Dietholamine-Lösung) versetzt. Nach 45-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur ohne Lichteinfluss wurde die Reaktion mit 50 µl NaOH-Stopplösung (2 M NaOH (2 N)) pro Well abgestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im Mikroplattenleser gemessen. Für jede Probe in Doppelbestimmung wurde eine *Background*-Kontrolle mitgeführt und mit der gemessenen Probe zum Erhalt des absoluten Absorptionswertes verrechnet.

3.2.3 Laktatdehydrogenase (LDH)-Nachweis

Der Nachweis der Laktatdehydrogenase (LDH) in VIC- und AK-Kulturüberständen dient als Zytotoxizitätsmarker, da LDH ein bei Zellschaden freigesetztes, zytosolisches Enzym ist [57]. Zum Nachweis von LDH wurde der LDH Assay (*Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit*; Thermo Fisher Scientific Inc., Kat.-Nr. PI88953) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden hierbei jeweils 50 µl Kulturüberstand in Doppelbestimmungen in eine 96-Well-Platte gefüllt und mit dem Reaktionsreagenz für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Über eine verknüpfte enzymatische Reaktion entsteht dabei über den Katalysationschritt von Laktat zu Pyruvat letztlich Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid (NADH). NADH reduziert wiederum ein Tetrazolium Salz (INT) zu einem roten Formazan Produkt, das direkt proportional zur LDH-Menge im Zell- oder Gewebekulturüberstand ist, die wiederum direkt proportional zur Anzahl der geschädigten Zellen ist [57]. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Farbreaktion gestoppt und bei 490 nm und 680 nm in einem Mikroplattenleser gemessen.

3.2.4 Zelluläre Proliferation

Der Einfluss der unterschiedlichen Behandlung auf die Proliferation von VICs in der Zellkultur wurde mit Hilfe des *BrdU Cell Proliferation Assay Kit* (Cell Signaling Technology®, Cambridge, UK, Kat.-Nr. 6813) evaluiert. Dafür wurden VICs in einer Dichte von etwa 2500 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät und nach 48 Stunden Zeit zum Anwachsen für 24, 48 und 72 Stunden unter verschiedenen Behandlungen inkubiert. Der BrdU-Assay detektiert während der Zellproliferation in die zelluläre DNA inseriertes BrdU (*5-bromo-2'deoxyuridine*) mittels eines anti-BrdU-Antikörpers. Ein *anti-*

mouse IgG, *HRP-linked* Antikörper wird dann mit Hilfe eines Farbstoffs zur Visualisierung des gebundenen Antikörpers verwendet. Der BrdU-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Lösungen wurden dementsprechend vorbereitet. Über 20 Stunden wurden die VICs dann mit der BrdU-Lösung inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, bevor sie anschließend mit 100 µl Fixierungs-/Denaturierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert wurden. Es folgte die Inkubation mit dem Detektions-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur sowie das folgende gründliche Waschen mit der Wasch-Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl HRP-konjugiertem Sekundär-Antikörper für 30 Minuten inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat für 30 Minuten sowie zum Abschluss die Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung. Zur Quantifizierung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Mikroplattenleser gemessen.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinernte

Für die Gewinnung von Proteinproben aus VICs wurde der Zellrasen an Kulturtag 7 zunächst mehrfach gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von 100 µl Lyse-Puffer lysiert (Tabelle 6), mit einem Zellschaber abgetragen und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße umgefüllt. Für die Gewinnung von Proteinproben aus den AK des Aortenklappenspannmodells wurden diese an Tag 28 geerntet, zunächst mehrfach gründlich mit PBS gewaschen und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Zum Homogenisieren des Klappengewebes wurden die schockgefrorenen Taschen in gefrorenen Mörsern zerklopft und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt. Das pulverisierte AK-Gewebe wurde daraufhin mit 100 µl Lyse-Puffer (Tabelle 6) versetzt und gründlich gemischt, bis sich ein homogenes, trübes Gemisch gebildet hatte.

Tabelle 6: Zusammensetzung Lyse-Puffer

Lyse-Puffer (5ml)	Hersteller	Kat.-Nr.
500 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail (PhosSTOP)	Hoffmann-La Roche AG	04906837001
714 µl Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete)	Hoffmann-La Roche AG	04693124001
3786 µl 1x RIPA-Puffer	Sigma	R0278-50ml

3.3.2 Proteinisolation

Die Proteinisolation aus Zell- oder Gewebe-Lysaten wurde identisch durchgeführt. Zunächst wurden die Lysate im eisgekühlten Ultraschallbad mit einer Frequenz von

70 Hertz weiter aufgeschlossen und danach bei 4 °C mit 13 000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Der sich vom Zell- oder Gewebepellet abgesetzte proteinhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und, wenn nicht umgehend für die Analysen verwendet, bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung konserviert.

3.3.3 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchoninsäure-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Lysaten wurde der kommerzielle Bicinchoninsäure-Assay (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*; Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. 23225) nach Angaben des Herstellers verwendet, welcher auf der Reduktion von Kupfer(II)-Ion (Cu^{2+}) zu Kupfer(I)-Ion (Cu^{1+}) beruht [58]. Die entstandenen Cu^{1+} -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, dessen Intensität proportional zur vorliegenden Proteinmenge ist. Für Standards wurde bovines Serumalbumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen verwendet und die Reaktionslösung aus BCA und Kupfer-II-Sulfat wurde in einem Verhältnis von 50:1 hergestellt. Es wurden 96-Well-Platten genutzt und die Proben in einer 1:5 Verdünnung verwendet. Die Proben und Standards wurden dann in Doppelbestimmungen mit jeweils 200 µl Reaktionslösung versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 562 nm im Mikroplattenleser. Anhand der Standards wurde dann eine Standardkurve erstellt und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mit Hilfe der entsprechenden Geradengleichung kalkuliert.

3.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der in den Lysaten erhaltenen Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht wurde die Methode Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt [59, 60]. Dabei wurden die Proben gemäß ihrer im BCA-Assay ermittelten Proteinkonzentration mit Ladepuffer (Tabelle 7) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

Die präparierten Proben wurden anschließend in die Taschen der vorbereiteten 1,5 mm dicken Polyacrylamid-Gele (Tabelle 9, Tabelle 10) gefüllt, die vorher in der Gelkassette in dem Mini-PROTEAN® Tetra Cell System eingespannt und mit Laufpuffer (Tabelle 8) befüllt wurden. Je nach Zielprotein wurden spezifische Prozentsätze Acrylamid verwendet (Tabelle 9). Zudem wurde ein Proteingrößenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific Inc., Kat.-Nr.: 26619) mitgeführt. Die SDS-PAGE wurde initial mit 60 V für 15 Minuten zur Konzentrierung der Proteine an der Sammel- und Trenngelgrenze und dann 120 V für 60 Minuten zur Auftrennung gemäß der Proteinmasse durchgeführt.

Tabelle 7: SDS-PAGE Ladepuffer

Komponente	Konzentration	Menge für 10 ml	Hersteller	Kat.-Nr.
Tris/HCl 1 M pH 6,8	62,5 mM	3,75 ml	Sigma-Aldrich	T1503
Glycerin	10 %	6 ml	Carl Roth	3783.2
SDS	70 mM	1,26 g SDS	Sigma-Aldrich	L 4509
Dithiothreitol	100 mM	0,9258 g	Thermo Fisher Scientific	D-9779
Bromphenolblau	0,01 %	0,009 g	Sigma-Aldrich	B0126
dH ₂ O		ad bis 10 ml		

Tabelle 8: SDS-Page Laufpuffer

Komponente	Hersteller	Kat.-Nr.	Konzentration
Tris-Base	Sigma-Aldrich	T1503	25 mM
Glycin	SERVA	23390.03	200 mM
SDS	Sigma-Aldrich	L 4509	0,1 %
dH ₂ O	ad 1 l, pH auf 8,3 einstellen		

Tabelle 9: Zusammensetzung Polyacrylamid-Gele gemäß Zielprotein

Zielprotein	Prozent Acrylamid	
	Trenngel (%)	Sammelgel (%)
Vimentin (VIM)	10	4
α -Glattmuskel-Aktin (α SMA)	10	4
Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α (AMPK)	8/10	4
Phosphorylierte Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α (p-AMPK)	8/10	4
<i>Mechanistic target of rapamycin</i> (mTOR)	8	4
Phosphoryliertes mTOR (p-mTOR)	8	4

Tabelle 10: Herstellung Polyacrylamid-Gele

	Hersteller	Kat.-Nr.	Sammelgel			Trenngel
			4 %	8 %	10 %	
Prozent Acrylamid			4 %	8 %	10 %	
dH ₂ O (ml)			6,3	10,6	9,6	
0,5 M Tris-Base in dH ₂ O (pH 6,8) (ml)	Sigma-Aldrich	T1503	2,5			
1,5 M Tris-Base in dH ₂ O (pH 8,8) (ml)				5	5	
40 % Acrylamid-/Bisacrylamid (ml)	Carl Roth	A515.1	1,0	4	5	
10 % SDS in dH ₂ O (μ l)	Sigma-Aldrich	L 4509	100	200	200	
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (μ l)	Bio-RAD	161-0801	20	40	40	
10 % Ammoniumperoxodisulfat in dH ₂ O (μ l)	Sigma-Aldrich	A3678	100	200	200	

3.3.5 Western Blot-Analyse

Zur semi-quantitativen Proteinanalyse wurde im nächsten Schritt die Western Blot-Methode im *Tank-Blot*-Verfahren durchgeführt [61, 62]. Dafür wurden die Proteinbanden auf eine 0,45 μ m dicke Nitrozellulosemembran mit dem Mini Trans-Blot® System im Nassverfahren transferiert. Das vorbereitete Polyacrylamid-Gel wurde mit je zwei in gekühltem Transferpuffer (Tabelle 11) getränkten Schwämmen und Filterpapieren (*Whatmanpaper*) geschichtet und mit der Membranseite zur Anode in die mit Transferpuffer befüllte Blotkammer eingebracht. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran bei 100 V und 4 °C für 80 Minuten. Nach Abschluss des Proteintransfers wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit

5%iger BSA-Lösung (Carl Roth, Kat.-Nr. 8076.3) für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.

Tabelle 11: Western Blot Transferpuffer

Komponente	Hersteller	Kat.-Nr.	Konzentration
Tris-Base	Sigma-Aldrich	T1503	25 mM
Glycin	SERVA	23390.03	200 mM
Methanol	VWR	20847.320	20 %
dH ₂ O	ad 1 l, auf 4 °C kühlen		

3.3.6 Antikörperinkubation und Immunodetektion

Auf die Blockierung der Membran folgte die Antikörperinkubation zur spezifischen Detektion von Zielantikörpern. Dafür wurde die blockierte Membran über Nacht mit den verdünnten Primärantikörpern (Tabelle 12) bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst drei Mal für 5 Minuten mit Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween-20 (TBST, Tabelle 13) gewaschen und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 14) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde auf die Nitrozellulosemembran zur Detektion der spezifischen Zielproteinbanden 500 µl Substratlösung (WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum, Biozym Scientific, Oldendorf, DE, Kat.-Nr. 541015) aufgetragen. Es folgte die Belichtung mit einem Imager System (Amersham Imager 600). Zur Ladekontrolle und Proteingehalt-Normierung wurde darauffolgend nach erneutem Waschen auf derselben Membran als Referenzprotein entweder Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) oder β -Actin (Tabelle 12) über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag wie beschrieben nach Inkubation des Sekundärantikörpers detektiert. Die Intensität der Proteinbanden wurde mit Hilfe der Software ImageJ [56] ausgewertet, wobei zunächst eine Hintergrundkorrektur vorgenommen wurde. Zur Normalisierung der ermittelten Proteinexpression auf die eingesetzte Proteinmenge wurde die Expression des Referenzproteins als Ladekontrolle herangezogen.

Tabelle 12: Primärantikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Referenz	Verdünnung (in 5 % BSA/TBST)
Vimentin (VIM)	Meerschweinchen	ProGen	6P53	1:1000
α -Glattmuskel-Aktin (α SMA)	Maus	Sigma Aldrich	A5228	1:1000
Glyceraldehyd-3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Kaninchen	Cell Signaling	2118	1:2000
Adenosinmonophosphat- aktivierte Proteinkinase α (AMPK)	Kaninchen	Cell Signaling	2603	1:1000
Phosphorylierte Adenosinmonophosphat- aktivierte Proteinkinase α (p-AMPK)	Kaninchen	Cell Signaling	2535	1:1000
<i>Mechanistic target of rapamycin</i> (mTOR)	Kaninchen	Cell Signaling	2983	1:1000
Phosphoryliertes mTOR (p-mTOR)	Kaninchen	Cell Signaling	2971	1:1000
β -Actin	Kaninchen	Cell Signaling	4967L	1:2000

Tabelle 13: Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (TBST)

Komponente	Hersteller	Kat.-Nr.	Konzentration
Tris-Base	Sigma-Aldrich	T1503	10 mM
NaCl	Roth	9265.2	150 mM
Tween-20 (Polyoxyethylen(20)- sorbitan-monolaurat)	Sigma-Aldrich	P1379	0,1 %
dH ₂ O	ad 1 l, pH 7,6 einstellen		

Tabelle 14: Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Kat.-Nr.	Verdünnung in TBST
Anti-Kaninchen (HRP gekoppelt)	Ziege	Dianova	111-035-003	1:10 000
Anti-Maus (HRP gekoppelt)	Ziege	Dianova	115-035-044	1:10 000
Anti-Meerschweinchen (HRP gekoppelt)	Ziege	Dianova	106-035-003	1:10 000

3.4 Genexpressionsanalysen

3.4.1 Ribonukleinsäure (RNA)-Ernte

Für die RNA-Ernte aus VIC-Kulturen wurden die VICs am Kulturtage 7 geerntet, indem zunächst die Wells abgesaugt und dann mehrfach mit PBS gewaschen wurden. Pro Well wurden 350 μ l RLT-Puffer (Tabelle 15) zur Lyse hinzugefügt und das Zelllysate mit einem Zellschaber abgetragen. Die Zellsuspension wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, DE, Kat.-Nr. 74106) aufgereinigt. Bei diesem Prozess wurde nach Homogenisierung des Zelllysates mit dem *QIAshredder* (Qiagen, DE, Kat.-Nr. 79656) die RNA über eine säulenbasierte Methode an eine Membran aus Siliciumdioxid gebunden und durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte sowie einem Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau aufgereinigt. Die Prozedur wurde gemäß der

Herstellerangaben wie folgt durchgeführt: Die mit RLT-Puffer versetzte Zellsuspension wurde auf die *QIAshredder* Säulen gefüllt und anschließend für eine Minute bei 21 °C und 10 000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5804R). Zu dem Durchfluss wurden dann 350 µl 70%iger Ethanol (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. SZBF236EV) gegeben, auf- und abpipettiert und schließlich in das *RNeasy* Säulen-System gegeben, und die RNA nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die aufgereinigte RNA wurde im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C konserviert.

Für die Ernte von RNA aus AK wurde das Gewebe zunächst mechanisch homogenisiert. Es wurde mit RNase freien bzw. mit RNASE Away® (Roth, Kat.-Nr. A998.3) gesäuberten Materialien gearbeitet. Dafür wurden die in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefrorenen Taschen mit einem vorher in 1 M NaOH gereinigtem und danach tiefgefrorenen Mörser zerkleinert und sofort mit 350 µl TRIzol (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. T9424) versetzt. Um das Gewebe weiter zu homogenisieren, wurde jede Probe mit einer Pellet Pestle und Destroy Aufsätzen (Destroy-SR-15) für 1 bis 2 Minuten bearbeitet. Zur Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen wurden dann weitere 650 µl TRIzol hinzugefügt und das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zur Phasentrennung 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. 037K3734) zugesetzt und das verschlossene Reaktionsgefäß für 15 Sekunden stark geschüttelt. Nach 2 bis 3-minütiger Inkubationszeit begannen sich die wässrige und organische Phase zu trennen. Durch Zentrifugation mit 14 000 rpm bei 4 °C für 25 Minuten entstanden drei Phasen: Die wässrige Phase, Interphase und die organische Phase. Die Aufreinigung der RNA wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt und der finale Durchfluss bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 15: RLT-Puffer

Komponente	Hersteller	Kat.-Nr.	Konzentration
RLT-Puffer	Qiagen	1015762	
Dithiothreitol (DDT)	Invitrogen	R0862	1 %

3.4.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit einem Mikroplattenleser und der dazugehörigen Software *Tecan i-Control* bestimmt. Dafür wurden 2 µl des RNA-Eluats auf die *NanoQuant Plate™* (Tecan) pipettiert und eine photometrische Absorptionskoeffizientenbestimmung bei 230 nm, 260 nm und 280 nm durchgeführt.

3.4.3 Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese

Für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) wurden auf Eis pro Probe jeweils 500 ng der isolierten RNA mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Zur Entfernung genomischer DNA (gDNA) und zur reversen Transkription wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Kat.-Nr. 205313) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Entfernung der gDNA wurden dabei zu jeder Probe 2 µl *gDNA Wipeout Buffer* aus dem Kit hinzugefügt und der Ansatz bei 42 °C im Thermocycler für zwei Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden zur cDNA-Synthese auf Eis zu jeder Probe 4 µl RT-Buffer und 1 µl Primer Mix aus dem Kit hinzugefügt. Als letztes erfolgte die Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase und die Inkubation im Thermocycler für zunächst 30 Minuten bei 42 °C sowie anschließend für 3 Minuten bei 95 °C. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss mit 80 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 5 ng cDNA pro µl und ein Gesamtvolumen von 100 µl vorlag.

3.4.4 Realtime-qPCR

Mit der semi-quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (*semi-quantitative-real time polymerase chain reaction*, qPCR) wurde die mRNA-Expression analysiert. Für die Reaktion wurde der *GoTaq® qPCR Master Mix* mit Referenzfarbstoff (CXR Reference Dye; Promega, Mannheim, DE, Kat.-Nr. A6002) nach Herstellerangaben verwendet. Die in Tabelle 18 dargestellten Primer wurden auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/l verdünnt. Der Reaktionsansatz für die qPCR ist in Tabelle 16 dargestellt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen und die Messungen wurden mit dem *StepOnePlus Real-Time PCR System* nach dem Temperatur- und Zeitprofil in Tabelle 17 durchgeführt. Als spezifische endogene Kontrolle wurde das 60S ribosomale Protein L29 (RPL-29A) gewählt. Für die Auswertung der mRNA-Expressionsergebnisse wurde die integrierte Software *StepOne Software Version 2.3* (Applied Biosystems) genutzt. Bei Ansätzen, die in der Schmelzkurve mehrere Scheitelpunkte zeigten oder in der Doppelbestimmung eine Abweichung von mehr als einem C_T -Wert hatten, wurden diese entweder wiederholt oder ausgeschlossen. Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde für die relative Quantifizierung der mRNA-Expression genutzt [63].

Tabelle 16: Reaktionsansatz qPCR

Komponente	Volumen pro Well
cDNA (5ng/µl)	2 µl
GoTaq® qPCR Master Mix	10 µl
RNase-freies Wasser	7,4 µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,3 µl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,3 µl
Total	20 µl

Tabelle 17: Temperatur- und Zeitprofil der qPCR

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sekunden)	Zyklen
Inkubation	50	120	1
Enzymaktivierung	95	120	1
Denaturierung	95	15	40
Primerhybridisierung und -elongation	60	30	
Schmelzkurve	Nach Standardprotokoll des Gerätes		

Tabelle 18: Primer Sequenzen für die qPCR

Zielgen	Vorwärtsprimer (5' – 3')	Rückwärtsprimer (5' – 3')
ACTA-2 (<i>Alpha smooth muscle actin</i>)	TAGAACACGGCATCATCACC	TGAGAAGGGTTGGATGCTCT
BMP-2 (<i>Bone morphogenetic protein 2</i>)	CTTAGACGGTCTGCGGTCTC	GGAAGCAGCAACGCTAGAAG
COL1A1 (Kollagen Typ 1)	AAGACATCCCACCAGTCACC	TAAGTTCGTCGCAGATCACG
COL3A1 (Kollagen Typ 3)	GACATAGAGGCTTTGATGGACGA	CACTTCCTCGAGCTCCATCG
COL5A1 (Kollagen Typ 5)	CGAGAACCCGGATGAGAACC	GGCCTCCGATCCCTTCATAGA
MMP2 (Matrix-Metalloproteinase-2)	TGACAAGGACGGCAAGTATG	GTAAGATGTGCCCTGGAAGC
MMP9 (Matrix-Metalloproteinase-9)	TAGCACGCACGACATCTTTC	GCCCACATAGTCCACCTGAT
OCAL (Osteocalcin)	GAAGAGACTCAGGCGCTACC	GCTCATCACAGTCAGGGTTG
OPN (Osteopontin)	GATGGCCGAGGTGATAGTGT	TCGTCTTCTTAGGTGCGTCA
RPL-29A (60S ribosomales Protein L29)	CCAAGTCCAAGAACCACACC	TATCGTTGTGATCGGGGTTT
RUNX2 (<i>Runt-related transcription factor 2</i>)	CTCTGGCCTTCCACTCTCAG	ATGAAATGCTTGGAAGTGC
TGF-β (<i>Transforming growth factor-β</i>)	GAGCCAGAGGCGGACTACTA	TCGGACGTGTTGAAGAACAT
VIM (Vimentin)	GACCTGGAGCGTAAAGTGGA	CTCTTGAATCTGGGCCTGAA

3.5 Histologie

3.5.1 Kryoschnitte

Zur histologischen Aufarbeitung der Präparate aus der dem Aortenklappenspannmodell wurden die AK in KP-CryoCompound (Immunologic, VWR, Kat.-Nr. VWRK1620-C) in Einbetttschälchen eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die eingebetteten Präparate wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben am Kryostaten mit einer Schnittdicke von 8 µm geschnitten und auf Objektträger aufgetragen. Im Anschluss wurden die Objektträger bis zur nachfolgenden Färbung bei -20 °C gelagert.

3.5.2 Histologische Alizarinrot-Färbung

Zur Darstellung von Kalziumablagerungen als Anhalt für degenerative Veränderungen wurden die Präparate mittels Alizarinrot-Färbung gefärbt [54]. Zunächst wurden die Objektträger auf Raumtemperatur gebracht und für 10 Minuten in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend folgte der Färbeschritt für 2 Minuten in 2%iger Alizarinrot-Lösung (Lösungsansatz siehe 3.1.7, Tabelle 5). Nach kurzem Eintauchen in dH₂O wurden die Schnitte durch 20-maliges schnelles Eintauchen in Aceton (VWR) dehydriert. Es folgte ein weiterer Dehydrierungsschritt mit 20-maligem Eintauchen in 1:1 Aceton/Xylol und 10-maligem Eintauchen in Xylol (VWR) zur Säuberung der Präparate. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mit Eindeckmedium (Roti Histokitt II) und Deckgläsern eingedeckt.

3.5.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Als Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gewählt. Hämatoxylin färbt dabei klassischerweise alle sauren Zellbestandteile blau, wodurch die im Zellkern enthaltene DNA eine bläuliche Farbe erhält. Eosin färbt dagegen basische Strukturen pink, wodurch Proteine der EZM sowie die Zellmembran, das Zytoplasma und Kollagene nach der Färbung in einem unterschiedlich intensiven Rot erscheinen [64]. Alle Färbelösungen wurden vor dem Gebrauch gefiltert. Nachdem die Objektträger auf Raumtemperatur gebracht wurden, startete die HE-Färbung mit einer 1-minütigen Färbung in Hämatoxylin (Thermo, Kat.-Nr. 6765009). Die Schnitte wurden zunächst in dH₂O gewaschen und 1 Minute in 4-5%iger Essigsäure (Carl Roth, Kat.-Nr. 6755.2) oxidiert sowie erneut 1 Minute in frischem dH₂O gewaschen. Im Anschluss wurden die Präparate zur Anhebung des pH-Wertes unter fließendes Leitungswasser gehalten. Die Objektträger wurden dann mit 70%igem Ethanol gespült und für 15 Minuten in dem vorher vorbereiteten Eosin (Ansatz siehe Tabelle 19) gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 1 Minute (70 %, 2x 96 %, 2x 100 %, 2 x Xylol) dehydriert. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit Eindeckmedium (Roti Histokitt II) und Deckgläsern eingedeckt.

Tabelle 19: Ansatz Eosin-Lösung

Komponenten	Hersteller	Kat.-Nr.	Menge
Eosin	Sigma-Aldrich	861006	1 g
100 % Ethanol			100 ml
Essigsäure	Carl Roth	6755.2	200 µl
dH ₂ O			100 ml

3.5.4 Histologische ALP-Färbung

Zum kolorimetrischen Nachweis der ALP-Aktivität in AK wurde eine Färbung mit der *1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution* (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 34042) durchgeführt. Die Kombination aus NBT und BCIP erzeugt bei Reaktion mit der ALP einen unlöslichen schwarz-lilafarbenen Niederschlag (siehe 3.1.8) [55]. Für die Färbung wurden die Objektträger auf Raumtemperatur gebracht, in einer Feuchtkammer drapiert, und die einzelnen Präparate wurden mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrandet. Die Präparate wurden anschließend für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ mit der Färbelösung inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das Substrat abgeschüttet und die Objektträger gründlich mit PBS gewaschen. Nach dem Trocknen wurden sie mit Eindeckmedium (CV Ultra) und Deckgläsern eingedeckt.

3.5.5 Movat Pentachrom-Färbung

In der Movat Pentachrom-Färbung werden alle Komponenten des Bindegewebes dargestellt, wodurch die EZM beurteilt werden kann [65]. Für diese Arbeit wurde die modifizierte Methode nach H. K. Russell Jr. angewendet [66], bei der es zu charakteristischer Anfärbung von Zellkernen und elastischen Fasern in schwarz, Kollagen und retikuläres Bindegewebe in Gelb, Glykosaminoglykane in Grün, Fibrin und Fibrinoid in Rot und Muskulatur in Blau kommt. Die Objektträger wurden zunächst über Nacht auf 37 °C erhitzt und dann 5 Minuten in dH₂O, 10 Minuten in 4%iger Formaldehyd-Lösung und wieder 5 Minuten in dH₂O getaucht. Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 20 aufgeführt und wurden zeitgerecht angesetzt. Die Objektträger wurden dann für 10 Minuten in auf 50 °C erhitzte Bouin's-Lösung inkubiert und danach 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Es folgte ein Fixierungsschritt für 5 Minuten in 5%igem Natriumthiosulfat und mehrfaches Spülen mit dH₂O. Anschließend wurden die Objektträger für 20 Minuten in 1%igem Alcianblau gefärbt, unter fließendem Leitungswasser gewaschen und für 10 Minuten in auf 60 °C erhitzten alkalischen Alkohol stabilisiert. Nach erneutem Waschen unter fließendem Leitungswasser folgte die Färbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin für 9 Minuten. Nach mehreren Waschschritten mit dH₂O wurden die Objektträger für 1 Minute in Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Arbeitslösung gefärbt und erneut mehrfach mit dH₂O gespült.

Es folgte die 5-minütige Differenzierung mit 5%iger Phosphorwolframsäure und die 5-minütige Spülung mit 1%iger Essigsäure. Nach mehrfachem Waschen mit dH₂O, dem Dehydrieren mit 96%igem Alkohol (1x für 1 Minute) und 100 %igem Alkohol (2x für 1 Minute) wurden die Präparate für 8 Minuten in alkoholischem Safran gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 1 Minute in 100%igem Ethanol dehydriert und 3-mal für 5 Minuten mit Xylol entfettet. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden sie mit Eindeckmedium (Roti Histokitt II) und Deckgläsern eingedeckt.

Tabelle 20: Lösungen für die Movat Pentachrom-Färbung

Lösung	Komponenten	Hersteller	Kat.-Nr.	Menge
Alkalischer Alkohol (400ml)	96 % Ethanol			360 ml
	30 % Ammoniumhydroxid (NH ₃ +H ₂ O)	Carl Roth	CP17.1	40 ml
Bouin's Lösung (420 ml)	Pikrinsäure (wässrig gesättigt)	VWR	84512.260	300 ml
	37 % Formaldehyd	Carl Roth	4979.1	100 ml
	100 % Essigsäure	Carl Roth	6755.2	20 ml
5 % Natriumthiosulfat (200 ml)	Natriumthiosulfat (<i>Sodium Thiosulfate</i>)	Sigma	72049-250G	10 g
	dH ₂ O			200 ml
1 % Alcianblau (200 ml)	Alcianblau	Sigma-Aldrich	A5268-25G	2 g
	dH ₂ O			200 ml
2 % Alkoholisches Hämatoxylin (500 ml)	Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	H3136	10 g
	96 % Ethanol			500 ml
Eisenchlorid (500 ml)	Eisen-Chlorid-Hexahydrat (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	Sigma-Aldrich	236489-100G	12,4 g
	dH ₂ O			500 ml
	Salzsäure (HCl) 32-37 %	Carl Roth	2601.1	5 ml
Jodlösung (500 ml) <i>24 h lösen lassen</i>	Jod	Carl Roth	7935.1	10 g
	Kaliumjodid (<i>Potassium Iodide</i>)	Carl Roth	8491.1	20 g
	dH ₂ O			500 ml
Weigerts Eisenhämatoxylin (120 ml) <i>Während Färbung angesetzt</i>	2 % Hämatoxylin			60 ml
	Eisenchlorid			40 ml
	Jodlösung			20 ml
Brilliant Crocein R Stock (400 ml)	Brilliant Crocein R (Crocein Scarlet 3B)	Waldeck	1B-109	4 g
	dH ₂ O			398 ml
Säurefuchsin Stock (500 ml) <i>24 h lösen lassen</i>	Säurefuchsin	Carl Roth	T128.1	0,5 g
	dH ₂ O			497,5 ml
	100 % Essigsäure	Carl Roth	6755.2	2,5 ml
Crocein-Säurefuchsin (100ml)	Brilliant Crocein R Stock			80 ml
	Säurefuchsin Stock			20 ml
5 % Phosphorwolframsäure (500 ml)	Phosphorwolframsäure (<i>Phosphotungstic Acid</i>)	Sigma-Aldrich	P4006-250G	25 g
	dH ₂ O			500 ml
1 % Eisessig (500 ml)	100 % Essigsäure	Carl Roth	6755.2	5 ml
	dH ₂ O			495 ml
Alkoholischer Safran (200 ml)	Safran du Gatinais (<i>Spanish Saffron</i>)	Waldeck	5A-394	12 g
	100 % Ethanol			200 ml

3.5.6 Von Kossa-Färbung

Zum Nachweis von Kalzifizierungen im Gewebe wurde die Von Kossa-Färbung angewendet. Hierbei wird das Gewebe mit Silbernitratlösung behandelt, welches zur Reduktion von Kalzium führt und dieses durch Silbernitrit ersetzt. Nach anschließender Reduktion in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung wird das Silber in Form von schwarzbraunen Ablagerungen sichtbar [67]. Die gefrorenen Objektträger wurden zunächst für 8 Minuten bei -20 °C in Aceton gestellt und luftgetrocknet, bevor sie kurz in dH₂O getaucht wurden. Die für die Färbung benötigten Ansätze der Lösungen sind in Tabelle 21 dargestellt. Anschließend wurden die Präparate unter einer Neonröhre bei direkter Lichteinstrahlung für 60 Minuten in 5 % Silbernitratlösung inkubiert. Es folgte die mehrfache Spülung mit dH₂O und eine 2-minütige Reduktion in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung. Daraufhin wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten und mit dH₂O für 3 Minuten gespült. Nach 10-minütiger Färbung mit Kernechtrot wurden die Präparate gewaschen und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (für je 2 Minuten in 50 %, 70 %, 90 %, 100 % Ethanol und 2 x für 5 Minuten in Xylol) entwässert. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit Eindeckmedium (Roti Histokitt II) und Deckgläsern eingedeckt.

Tabelle 21: Lösungen für die Von Kossa-Färbung

Lösung	Komponenten	Hersteller	Kat.-Nr.	Menge
5 % Silbernitritlösung (200 ml)	Silbernitrat	Carl Roth	9370.1	10 g
	dH ₂ O			200 ml
5 % Natriumthiosulfatlösung (200 ml)	Natriumthiosulfat	Sigma	72049-250G	10 g
	dH ₂ O			200 ml
Natriumkarbonat-Formaldehydlösung (200 ml)	Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth	4979.1	50 ml
	Natriumkarbonat	Merck	1.06392.1000	10 g
	dH ₂ O			150 ml
Kernechtrot	Gebrauchsfertige Lösung	Carl Roth	N069.1	

3.5.7 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)-Färbung

Die Färbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) zur Anfärbung der DNA und dadurch Darstellung der Zellkerne [68] erfolgte durch 10-minütige Fixierung der Präparate mit 4 % Formalin, gefolgt von 10-minütiger Inkubation in 0,25 % Triton-X-100 (NeoLab, Kat.-Nr. 1139LT001) in PBS und dreimaliges Waschen mit PBS. Die Präparate wurden daraufhin 10 Minuten lang mit DAPI (Carl Roth, Kat-Nr. 6335) in einem Verhältnis von 1:1000 in 1 % BSA inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und mit destilliertem Wasser gespült, bevor sie mit Eindeckmedium (CV Ultra) und Deckgläsern eingedeckt wurden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem DM2000 Mikroskop, einer DFC425C Kamera und der *LAS Software-*

Version 3.8 (Leica) gefertigt. Die Zellkerne wurden mit ImageJ Version 1.50i (National Institute of Health) quantifiziert und als Menge pro Gesamtfläche des entsprechenden AK-Bereichs in Prozent angegeben. Es wurden zwei Bilder pro Experiment analysiert und der Mittelwert berechnet.

3.6 Auswertungen mittels ImageJ

3.6.1 Auswertung von makroskopischen Degenerationskriterien der AK

Zur Auswertung und Maßgebung der Degeneration der AK unter Einfluss der verschiedenen Behandlungen wurden die bei Ernte der Taschen erstellten Fotos auf dem LeuchtPad mit Hilfe der ImageJ Software Version 1.50i (National Institute of Health) [56] analysiert. Zur Bestimmung degenerativer Veränderung der AK wurden zunächst die AK-Ränder manuell umrandet und anschließend die kalzifizierten Bereiche der Tasche in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche gesetzt. Das Produkt ist der prozentuale Anteil der kalzifizierten Bereiche in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche.

3.6.2 Auswertung histologischer Färbungen

Zur Auswertung der histologischen Schnitte wurden diese zunächst mit dem Mikroskop und einer 10 x Vergrößerung fotografiert und daraufhin zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Die Movat Pentachrom-, HE- und Von Kossa-Färbung wurden lediglich als Übersichtsfärbungen ohne quantifizierende Auswertung durchgeführt. Die Alizarin- und ALP- gefärbten Schnitte wurden mittels ImageJ Software Version 1.50i (National Institute of Health) [56] gemäß ihren gefärbten Bereichen in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche ausgewertet. Das Produkt ergibt einen prozentualen Anteil.

3.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten sowie Erstellung der Graphen wurde die Software *GraphPad Prism Version 6.01* (GraphPad Prism Software Inc., CA, USA) genutzt. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde bei abhängigen Stichproben und Normalisierung auf die Kontrollbedingung, zum Beispiel bei den mRNA-Daten, der *Wilcoxon Signed Rank Test* und bei unabhängigen Stichproben, wie beispielsweise dem Vergleich der Alizarinrot-Quantifizierung zwischen pd und pd + Metformin, der *Mann-Whitney U test* verwendet. Bei Vergleichen mit mehr als zwei Gruppen und unabhängigen Stichproben wurde der *Kruskal-Wallis test* und *Dunn's multiple*

comparisons test durchgeführt. Bei dem Vergleich von zwei beeinflussenden Variablen und mehreren Gruppen wurde die *two-way analysis of variance (ANOVA)* Methode mit anschließendem *Sidak's* oder *Tukey's multiple comparisons test* angewendet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (*standard error of mean*, SEM) und Vergleiche mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant unterschiedlich angesehen. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Kulturbedingungen zur Induktion von Degeneration und Kalzifizierung

Ein Teil der in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse wurde in der dazugehörigen Publikation von Weber *et al.* [21] veröffentlicht. Um den Lesefluss nicht zu beeinträchtigen, wurden die entsprechenden Ergebnisse abschnittsweise als Zitat markiert, und nicht nach einzelnen Ergebnissen auf die Publikation hingewiesen.

4.1.1 Kulturbedingungen in VICs

Um CAVD in Zell- und Gewebekulturen zu modulieren, sind bestimmte Kulturbedingungen zielführend [21]. In VIC-Kulturen zeigte sich sowohl unter pd- als auch pk-Bedingungen die Induktion von Degeneration nach 7 Tagen Kultivierungsdauer, gemessen in durch Alizarinrot-Färbung nachgewiesenen Kalizumablagerungen (Abb. 6A: mikroskopische Darstellung, B: makroskopische Darstellung, C: 10 % vs. pd: $0,22 \pm 0,01$ vs. $0,95 \pm 0,12$, $p < 0,0001$; 10 % vs. pk: $0,22 \pm 0,01$ vs. $2,04 \pm 0,14$, $p < 0,0001$). Hierbei konnte eine erhöhte Kaliziumablagerung durch pk-Bedingungen im Vergleich zu pd-Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 6C, $0,95 \pm 0,12$ vs. $2,04 \pm 0,14$, $p = 0,0007$). Der Phosphatgehalt in den Kulturüberständen war sowohl in pd- als auch pk-Kulturen im Vergleich zur 10 % Kontrolle zu allen gemessenen Zeitpunkten erhöht (Abb. 6D, Tag 2: 10 % vs. pd: $7,28 \pm 0,90$ vs. $23,13 \pm 7,63$, $p = 0,0043$; 10 % vs. pk: $7,28 \pm 0,90$ vs. $23,47 \pm 7,08$, $p = 0,0035$; Tag 5: 10 % vs. pd: $7,81 \pm 1,74$ vs. $24,22 \pm 10,39$, $p = 0,0031$; 10 % vs. pk: $7,81 \pm 1,74$ vs. $22,85 \pm 7,71$, $p = 0,0067$; Tag 7: 10 % vs. pd: $5,48 \pm 0,19$ vs. $22,29 \pm 8,37$, $p = 0,0025$; 10 % vs. pk: $5,48 \pm 0,19$ vs. $19,51 \pm 3,88$, $p = 0,0116$). Darüber hinaus unterschieden sich der Phosphatgehalt zwischen pd- und pk-Kulturen nicht signifikant (Abb. 6D, pd vs. pk: Tag 2: $23,13 \pm 7,63$ vs. $23,47 \pm 7,08$, $p = 0,9969$; Tag 5: $24,22 \pm 10,39$ vs. $22,85 \pm 7,71$, $p = 0,9508$; Tag 7: $22,29 \pm 8,37$ vs. $19,51 \pm 3,88$, $p = 0,8125$). Der Nachweis von ALP in den Kulturüberständen zeigte unter pd-Bedingungen einen signifikant niedrigeren Anteil an Tag 5 und Tag 7 im Vergleich zur 10 % Kontrolle (Abb. 6E, 10 % vs. pd: Tag 2: $1,46 \pm 0,11$ vs. $1,42 \pm 0,12$, $p = 0,5689$; Tag 5: $1,66 \pm 0,15$ vs. $1,27 \pm 0,07$, $p < 0,0001$; Tag 7: $1,72 \pm 0,13$ vs. $1,51 \pm 0,12$, $p < 0,0001$). Die Kultivierung unter pk-Bedingungen führte an allen drei gemessenen Zeitpunkten zu einer signifikant erniedrigten ALP-Aktivität, verglichen mit der 10 % Kontrolle (Abb. 6E, 10 % vs. pk: Tag 2: $1,46 \pm 0,11$ vs.

$0,64 \pm 0,06$, $p < 0,0001$; Tag 5: $1,66 \pm 0,15$ vs. $0,66 \pm 0,07$, $p < 0,0001$; Tag 7: $1,66 \pm 0,15$ vs. $0,66 \pm 0,10$, $p < 0,0001$) [21].

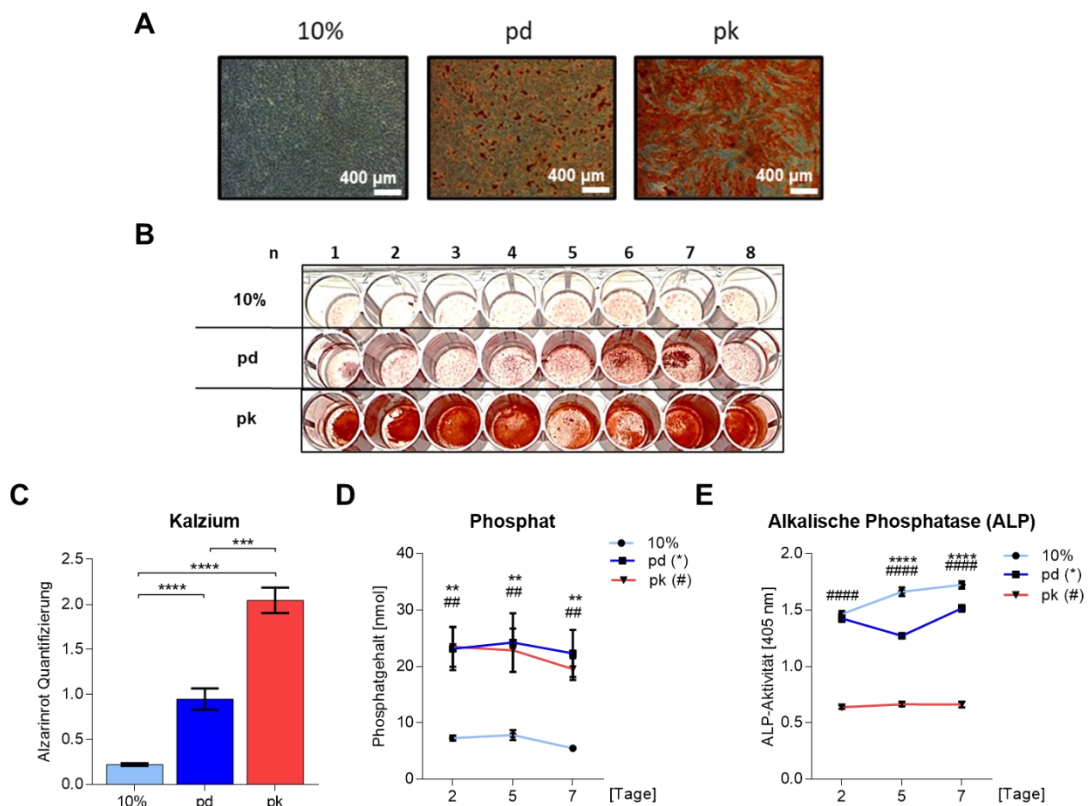


Abb. 6: Etablierung der pro-degenerativen (pd) und pro-kalzifizierenden (pk) Kulturbedingungen in VIC-Kulturen

A Mikroskopische Präsentation der kultivierten valvulären Interstitialzellen (VICs) unter Kontrollbedingungen (10 %), pro-degenerativen (pd)- und pro-kalzifizierenden (pk)-Kulturbedingungen von einem exemplarischen n an Kulturtag 7. Die Skala zeigt 400 Mikrometer (μm). Rot angefärbte Anteile indizieren Kalziumablagerungen. **B** Makroskopischer Ausschnitt der mit kultivierten VICs bestückten 48-Well-Platte unter Kontrollbedingungen (10 %), pd- und pk-Kulturbedingungen von acht exemplarischen n an Tag 7, fotografiert auf dem Leuchtpad. Rot angefärbte Anteile indizieren Kalziumablagerungen. **C** Quantifizierung der Kalziumablagerungen mittels Alizarinrot-Färbung an Kulturtag 7 für die Kulturbedingungen 10 % (n = 52), pd (n = 52) und pk (n = 39). **D** Quantifizierung des Phosphatgehalts in Nanomol (nmol) für die Kulturbedingungen 10 % (n = 4), pd (n = 4) und pk (n = 4) an den Tag 2, 5 und 7. Statistischer Vergleich am jeweiligen Tag zwischen 10 % vs. pd (*), 10 % vs. pk (#) und pd vs. pk. **E** Quantifizierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) in unter 10 % (n = 16), pd (n = 16) und pk (n = 16) Bedingungen kultivierten VICs, an Kulturtag 2, 5 und 7. Statistischer Vergleich am jeweiligen Tag zwischen 10 % vs. pd (*) und 10 % vs. pk (#). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. Angabe der Signifikanzniveaus wie folgt: **/## p $\leq$ 0,01, *** p $\leq$ 0,001, ****/##### p $\leq$ 0,0001. Modifiziert nach [21].

4.1.2 Kulturbedingungen in AK

Zur Etablierung der Kulturbedingungen in AK wurden diese unter 10 %-, pd- und pk-Kulturbedingungen für 28 Tage kultiviert (Abb. 7A). Hierbei zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an kalzifizierten Arealen in pd- und pk-Kulturen verglichen mit der 10 % Kontrolle (Abb. 7B: 10 % vs. pd: $1,89 \pm 0,97$ vs. $29,50 \pm 2,59$, $p = 0,0009$; 10 % vs. pk: $1,89 \pm 0,97$ vs. $26,53 \pm 3,34$, $p = 0,0046$). In Bezug auf den Phosphatgehalt in den Kulturüberständen konnte ein signifikant höherer Phosphatgehalt in pd- und pk-Kulturen zu allen gemessenen Zeitpunkten festgestellt werden, verglichen mit der 10 % Kontrolle (Abb. 7C, 10 % vs. pd: *, Tag 3: $2,35 \pm 0,11$ vs. $6,90 \pm 0,12$, $p < 0,0001$; Tag 6: $2,44 \pm 0,24$ vs. $7,65 \pm 0,19$, $p < 0,0001$; Tag 9: $2,14 \pm 0,22$ vs. $6,25 \pm 0,26$, $p < 0,0001$; Tag 12: $1,90 \pm 0,11$ vs. $7,44 \pm 0,41$, $p < 0,0001$; Tag 15: $1,16 \pm 0,20$ vs. $5,42 \pm 0,15$, $p < 0,0001$; Tag 18: $1,36 \pm 0,09$ vs. $6,00 \pm 0,28$, $p < 0,0001$; Tag 21: $1,10 \pm 0,06$ vs. $5,65 \pm 0,37$, $p < 0,0001$; Tag 24: $1,34 \pm 0,06$ vs. $8,22 \pm 0,59$, $p < 0,0001$, Tag 27: $1,60 \pm 0,06$ vs. $8,43 \pm 0,48$, $p < 0,0001$; 10 % vs. pk: #, Tag 3: $2,35 \pm 0,11$ vs. $4,49 \pm 0,06$, $p < 0,0001$; Tag 6: $2,44 \pm 0,24$ vs. $4,30 \pm 0,35$, $p < 0,0001$; Tag 9: $2,14 \pm 0,22$ vs. $3,41 \pm 0,29$, $p = 0,001$; Tag 12: $1,90 \pm 0,11$ vs. $4,51 \pm 0,20$, $p < 0,0001$; Tag 15: $1,16 \pm 0,20$ vs. $4,00 \pm 0,16$, $p < 0,0001$; Tag 18: $1,36 \pm 0,09$ vs. $4,00 \pm 0,12$, $p < 0,0001$; Tag 21: $1,10 \pm 0,06$ vs. $4,22 \pm 0,16$, $p < 0,0001$; Tag 24: $1,34 \pm 0,06$ vs. $5,08 \pm 0,28$, $p < 0,0001$, Tag 27: $1,60 \pm 0,06$ vs. $5,26 \pm 0,17$, $p < 0,0001$). Interessanterweise zeigte sich ein höherer Phosphatgehalt in pd-Kulturen, verglichen mit pk-Kulturen zu jedem gemessenen Zeitpunkt (Abb. 7C, pd vs. pk: +, Tag 3: $6,90 \pm 0,12$ vs. $4,49 \pm 0,06$, $p < 0,0001$; Tag 6: $7,65 \pm 0,19$ vs. $4,30 \pm 0,35$, $p < 0,0001$; Tag 9: $6,25 \pm 0,26$ vs. $3,41 \pm 0,29$, $p < 0,0001$; Tag 12: $7,44 \pm 0,41$ vs. $4,51 \pm 0,20$, $p < 0,0001$; Tag 15: $5,42 \pm 0,15$ vs. $4,00 \pm 0,16$, $p = 0,0002$; Tag 18: $6,00 \pm 0,28$ vs. $4,00 \pm 0,12$, $p < 0,0001$; Tag 21: $5,65 \pm 0,37$ vs. $4,22 \pm 0,16$, $p = 0,0002$; Tag 24: $8,22 \pm 0,59$ vs. $5,08 \pm 0,28$, $p < 0,0001$; Tag 27: $8,43 \pm 0,48$ vs. $5,26 \pm 0,17$, $p < 0,0001$). Die ALP-Aktivität war zu allen gemessenen Zeitpunkten am niedrigsten unter pk-Kulturbedingungen, sowie am höchsten in der 10 % Kontrolle (Abb. 7D). Hier zeigten sich an allen gemessenen Kultivierungszeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Bedingungen (Abb. 7D, 10 % vs. pd, *: Tag 3: $2,82 \pm 0,04$ vs. $2,38 \pm 0,07$, $p < 0,0001$; Tag 6: $2,52 \pm 0,05$ vs. $1,87 \pm 0,09$, $p < 0,0001$; Tag 9: $2,81 \pm 0,04$ vs. $2,42 \pm 0,08$, $p = 0,0005$; Tag 12: $2,30 \pm 0,08$ vs. $1,64 \pm 0,13$, $p < 0,0001$; Tag 15: $2,00 \pm 0,03$ vs. $1,51 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; Tag 18: $1,60 \pm 0,06$ vs. $1,04 \pm 0,09$, $p < 0,0001$; Tag 21: $1,80 \pm 0,05$ vs. $1,44 \pm 0,06$, $p = 0,0016$; Tag 24: $1,64 \pm 0,04$ vs. $1,28 \pm 0,12$, $p = 0,0013$; Tag 27: $1,91 \pm 0,04$ vs. $1,51 \pm 0,03$, $p = 0,0027$; 10 % vs. pk, #: Tag 3: $2,82 \pm 0,04$ vs. $1,50 \pm 0,11$, $p < 0,0001$; Tag 6: $2,52 \pm 0,05$ vs. $0,89 \pm 0,14$, $p < 0,0001$; Tag 9: $2,81 \pm 0,04$ vs. $1,12 \pm 0,09$, $p < 0,0001$; Tag 12: $2,30 \pm 0,08$ vs. $0,64 \pm 0,05$, $p < 0,0001$;

Tag 15: $2,00 \pm 0,03$ vs. $0,49 \pm 0,04$, $p < 0,0001$; Tag 18: $1,60 \pm 0,06$ vs. $0,24 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; Tag 21: $1,80 \pm 0,05$ vs. $0,33 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; Tag 24: $1,64 \pm 0,04$ vs. $0,19 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; Tag 27: $1,91 \pm 0,04$ vs. $0,32 \pm 0,01$, $p < 0,0001$; pd vs. pk, +: Tag 3: $2,38 \pm 0,07$ vs. $1,50 \pm 0,11$, $p < 0,0001$; Tag 6: $1,87 \pm 0,09$ vs. $0,89 \pm 0,14$, $p < 0,0001$; Tag 9: $2,42 \pm 0,08$ vs. $1,12 \pm 0,09$, $p < 0,0001$; Tag 12: $1,64 \pm 0,13$ vs. $0,64 \pm 0,05$, $p < 0,0001$; Tag 15: $1,51 \pm 0,02$ vs. $0,49 \pm 0,04$, $p < 0,0001$; Tag 18: $1,04 \pm 0,09$ vs. $0,24 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; Tag 21: $1,44 \pm 0,06$ vs. $0,33 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; Tag 24: $1,28 \pm 0,12$ vs. $0,19 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; Tag 27: $1,51 \pm 0,03$ vs. $0,32 \pm 0,01$, $p < 0,0001$) [21].

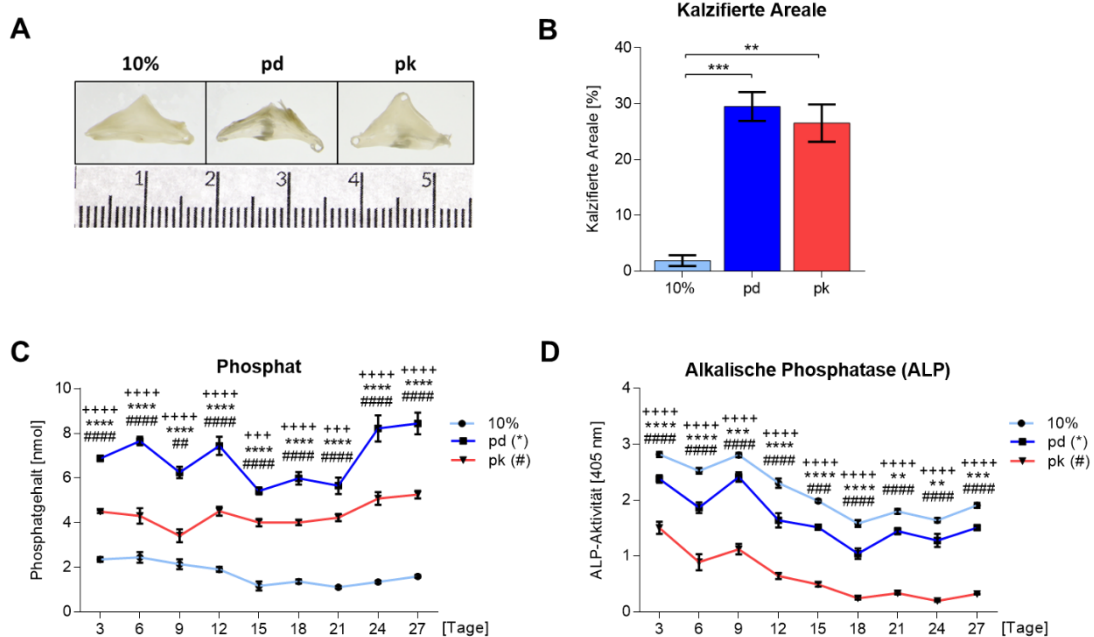


Abb. 7: Etablierung der Kulturbedingungen pro-degenerativ (pd) und pro-kalzifizierend (pk) in AK-Kulturen

A Exemplarische Präsentation von jeweils einer Aortenklappentasche (AK) kultiviert unter der jeweiligen Kulturbedingung 10 %, pro-degenerativ (pd) oder pro-kalzifizierend (pk), fotografiert auf dem Leuchtpad. **B** Quantifizierung der kalzifizierten Areale der kultivierten AK für 10 % (n = 5), pd (n = 24) und pk (n = 16), dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. **C** Quantifizierung des Phosphatgehalts in Nanomol (nm) in den Kulturüberständen für 10 % (n = 3 – 5), pd (n = 3 – 5) und pk (n = 5) an den Kulturtagen 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 und 27, dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM. *** $p \leq 0,001$; ****/####/++++ $p \leq 0,0001$. **D** Quantifizierung der ALP-Aktivität in den Kulturüberständen für 10 % (n = 5), pd (n = 5) und pk (n = 5) an den Kulturtagen 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 und 27, dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ****/####/++++ $p \leq 0,0001$. Modifiziert nach [21].

4.1.3 Histologische Färbungen der AK

Zur genaueren Etablierung und Analyse der Kulturbedingungen wurden die für 28 Tage kultivierten AK nach der Ernte mit fünf verschiedenen histologischen Färbungen angefärbt (Abb. 8). Zum Nachweis von Kalziumablagerungen wurden die Alizarinrot- und die Von Kossa-Färbung genutzt. Als Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung eingesetzt. Zur Beurteilung der EZM wurde die Movat Pentachrom-Färbung genutzt, welche alle Komponenten des Bindegewebes darstellt. Zuletzt wurde zum Nachweis der ALP-Aktivität die ALP-Färbung eingesetzt [21].

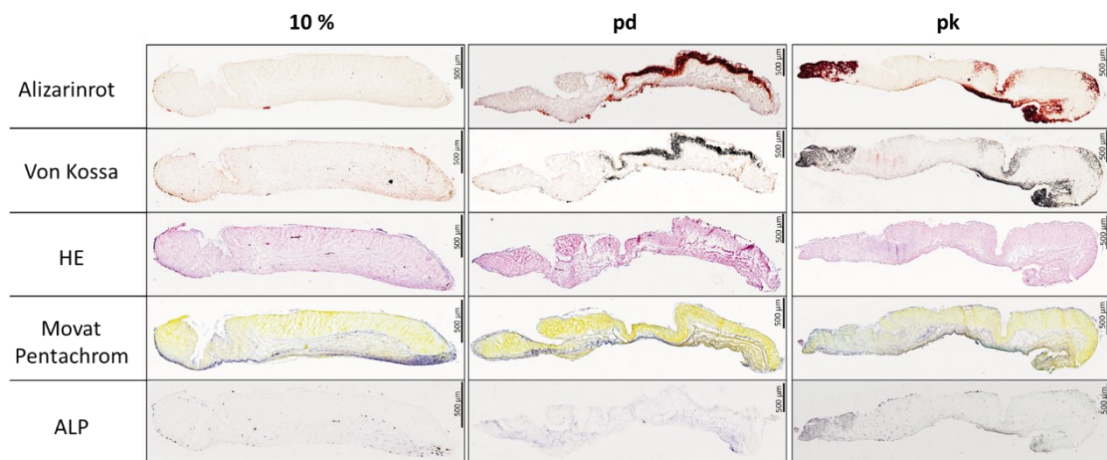


Abb. 8: Histologische Darstellung der Kulturbedingungen in AK nach 28 Tagen Kulturdauer

Für die drei Kulturbedingungen 10 %, pro-degenerativ (pd) und pro-kalzifizierend (pk) sind die fünf ausgewählten histologischen Färbungen exemplarisch mit einem n gezeigt. Dargestellt sind die Kalziumfärbungen Alizarinrot und Von Kossa, die Übersichtsfärbung Hämatoxylin-Eosin (HE), die Movat Pentachrom-Färbung zur Darstellung von Bindegewebe und die alkalische Phosphatase (ALP)-Färbung zum Nachweis der ALP-Aktivität. Modifiziert nach [21].

4.2 Das orale Antidiabetikum Metformin

Dieser Promotionsarbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass das orale Antidiabetikum Metformin den Degenerationsprozess von Aortenklappen positiv beeinflussen kann. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden nach Etablierung der genutzten Kulturbedingungen die VICs und AK mit dem oralen Antidiabetikum Metformin behandelt. Nach Etablierung der Kulturbedingungen wurde im Folgenden die auf organischem Phosphat beruhende, ALP-abhängige Kulturbedingung pd genutzt.

4.2.1 Etablierung der Metformin-Konzentration

Zur Etablierung der Konzentration von Metformin wurden unter pd-Bedingungen kultivierte VICs mit Metformin in verschiedenen Konzentrationen behandelt (0,5; 1; 2; 2,5; 5 und 10 mM). In der Alizarinrot-Färbung im Well konnte bei Behandlung mit Metformin für die Konzentrationen 2,5; 5; und 10 mM eine signifikant geringere Kalziumablagerung festgestellt werden, verglichen mit der pd-Kontrolle (Abb. 9A; pd: $1,04 \pm 0,18$; Metformin 2,5 mM: $0,18 \pm 0,01$, $p < 0,0001$; 5 mM: $0,17 \pm 0,01$, $p < 0,0001$; 10 mM: $0,18 \pm 0,01$, $p < 0,0001$). Daraufgehend wurde die Kalziummenge in den Kulturen in Relation zur Proteinmenge in Milligramm (mg) für die pd-Kontrolle und die Metformin-Konzentrationen 2, 5 und 10 mM bestimmt (Abb. 9B). Hierbei zeigte sich 10 mM Metformin mit einer signifikant niedrigeren Kalziummenge pro mg Protein ($0,24 \pm 0,15$ mg), verglichen mit der pd-Kontrolle ($1,18 \pm 0,30$ mg, $p = 0,0446$). In den folgenden Experimenten wurde daher eine Metformin-Konzentration von 10 mM genutzt.

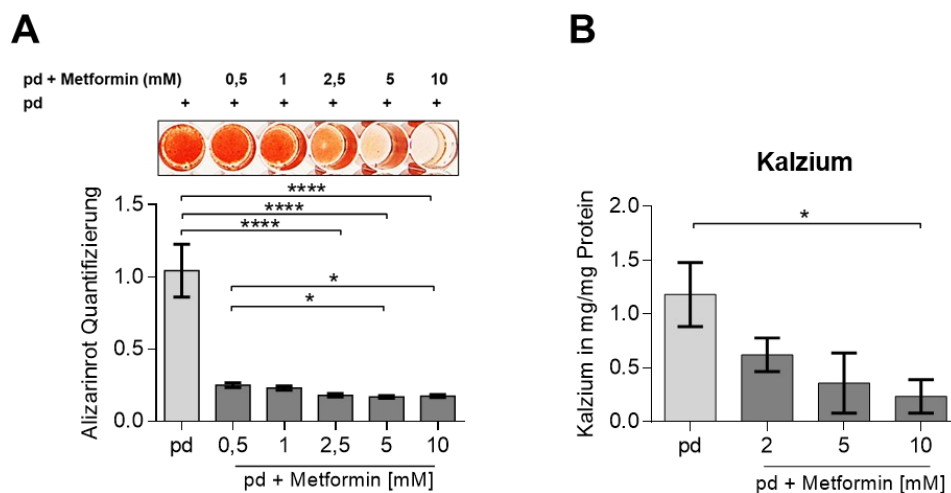


Abb. 9: Etablierung der Metformin-Konzentration

A Alizarinrot-Färbung von für 7 Tage kultivierten VICs im Well. Vergleich von der pro-degenerativen (pd)-Kontrolle mit den Metformin-Konzentrationen 0,5; 1; 2,5; 5 und 10 Millimolar (mM). Exemplarische visuelle Darstellung eines n (oben) und Quantifizierung (unten; $n = 12$). **B** Quantifizierung der Kalziummenge in VIC-Kulturen für die pd-Kontrolle sowie die Metformin-Konzentrationen 2, 5 und 10 mM ($n = 5$). Graphen sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$.

4.3 Degenerationsanalysen

4.3.1 Degeneration in VICs

Nach Etablierung der Arbeitskonzentration von Metformin wurde zunächst der Effekt einer Metformin-Behandlung auf VICs untersucht. In der Alizarinrot-Färbung im Well

zeigte sich auch in einer größeren Stichprobe eine Hemmung der Degeneration, verglichen mit der pd-Kontrolle (Abb. 10A – C). Dies wird schon visuell beim Anblick der ausgeschnittenen Wells deutlich (Abb. 10A), wobei die rote Färbung Kalziumablagerungen als Zeichen der Degeneration darstellt. In der mikroskopischen Darstellung (Abb. 10B) konnte dies bestätigt werden. Im Folgenden wurde die Kalziumablagerung mittels Alizarinrot-Färbung quantifiziert (Abb. 10C). Hier konnte eine signifikant niedrigere Kalziumablagerung in den mit Metformin behandelten VIC-Kulturen ($0,38 \pm 0,05$), verglichen mit der pd-Kontrolle ($1,38 \pm 0,18$, $p < 0,0001$).

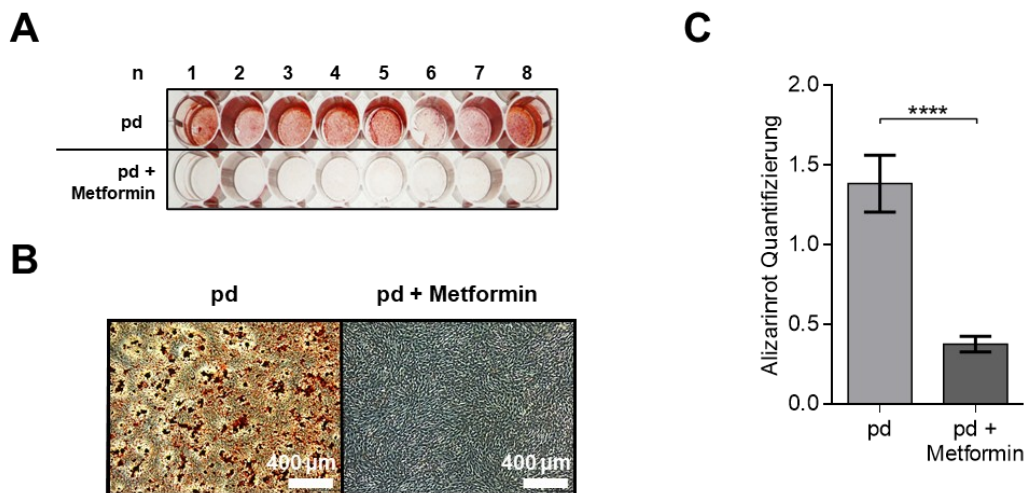


Abb. 10: Metformin hemmt die Degeneration in VICs

A Dargestellt ist ein Ausschnitt der mit Alizarinrot angefärbten Zellen auf einer 48-Well Platte, auf der die VICs ($n = 8$) kultiviert und mit pro-degenerativen (pd)- sowie pd + Metformin-Behandlungen für 7 Tage kultiviert wurden. Die rote Farbe indiziert Kalziumablagerungen. **B** Mikroskopische Darstellung einer exemplarischen mit pd und pd + Metformin behandelten VIC-Kultur. Die Skala zeigt 400 Mikrometer (μm). **C** Quantifizierung der Kalziumablagerungen in den Alizarinrot gefärbten VICs nach Behandlung pd und pd + Metformin bei einer Kulturzeit von sieben Tagen ($n = 28$). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. **** $p \leq 0,0001$.

4.3.2 Degeneration in AK nach 28 Tagen

Im Folgenden wurde die Wirkung der Metformin-Behandlung auf AK untersucht. Die für 28 Tage unter pd-Bedingungen sowie mit pd und Metformin kultivierten AK wurden geerntet und auf einem Leuchtpad fotografiert (Abb. 11A). Bei der Quantifizierung der kalzifizierten Klappenareale resultierte die Metformin-Behandlung in einem signifikant niedrigen Anteil in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche (Abb. 11B: pd: $34,30 \pm 5,35$ %; pd + Metformin: $12,60 \pm 3,29$ %, $p = 0,0052$).

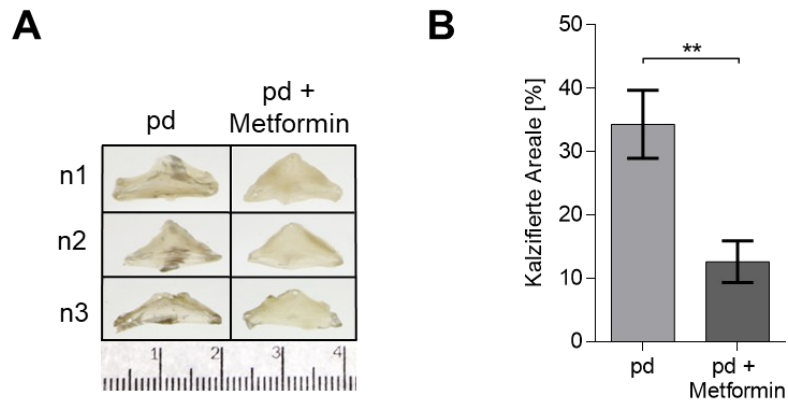


Abb. 11: Metformin reduziert die Kalzifizierung von AK nach 28 Tagen Kultivierungsdauer

A Exemplarische Darstellung von jeweils drei AK, die entweder unter pro-degenerativen (pd)-Bedingungen (links) oder unter pd-Bedingungen mit Metformin-Behandlung (rechts) für 28 Tage kultiviert wurden. **B** Quantifizierung der kalzifizierten Areale in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche nach Behandlung mit pd oder pd + Metformin und einer Kulturzeit von 28 Tagen (n = 11). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. ** p ≤ 0,01.

Der in den kalzifizierten Arealen beobachtete Effekt wurde in der Histologie mittels Alizarinrot-Färbung und dessen Quantifizierung bestätigt (Abb. 12A). Hierbei zeigte sich eine deutliche Inhibition der Degeneration durch Metformin, gemessen an der durch Alizarinrot gefärbten Klappentaschenareale in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche (Abb. 12B; p = 0,0175) in kultivierten AK unter pd-Bedingungen (15,20 ± 2,14 %) und Metformin-Behandlung (6,13 ± 1,88 %).

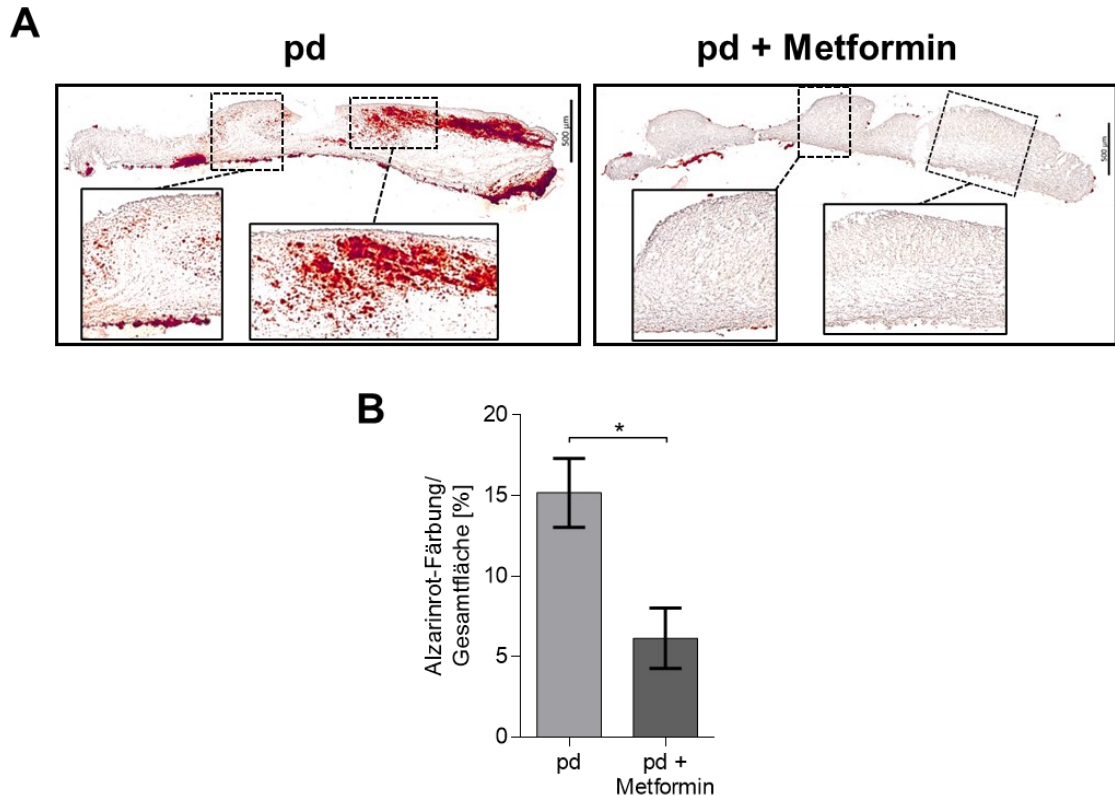


Abb. 12: Alizarinrot-Färbung von AK nach 28 Tagen Kulturdauer

A Repräsentative mikroskopische Aufnahmen jeweils einer AK behandelt mit pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin nach 28 Tagen Kulturdauer. Skala zeigt 500 Mikrometer (μM).

B Quantifizierung der Alizarinrot gefärbten Klappentaschenareale in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche für pd und pd + Metformin ($n = 7$). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

* $p \leq 0,05$.

4.3.3 Degeneration in AK nach 56 Tagen

Im Folgenden wurde die Kultivierungsdauer der AK auf 56 Tage verlängert, um einen Langzeit-Effekt zu simulieren. Auch hier präsentierte sich Metformin als potenter Inhibitor der Degeneration, gemessen an der reduzierten kalzifizierten Fläche im Vergleich zur respektiven pd-Kontrolle (Abb. 13A + B; pd: $50,00 \pm 7,41 \%$; pd + Metformin: $22,60 \pm 7,96 \%$, $p = 0,0317$).

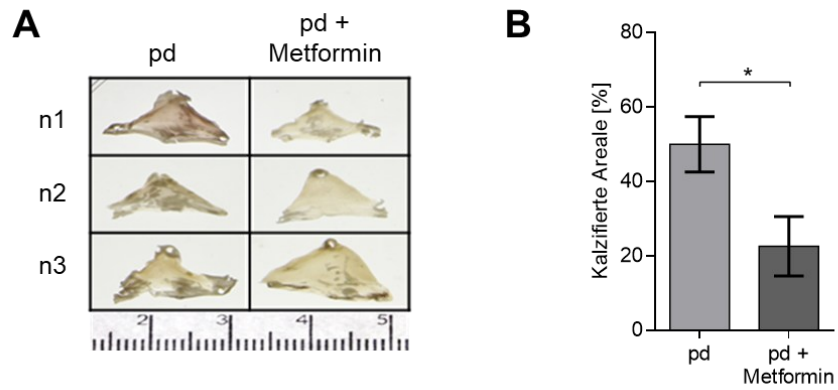


Abb. 13: Metformin reduziert die Kalzifizierung von AK nach 56 Tagen Kultivierungsdauer

A Repräsentative Darstellung von jeweils drei AK, die entweder unter pro-degenerativen (pd)-Bedingungen (links) oder unter pd-Bedingungen mit Metformin-Behandlung (rechts) für 56 Tage kultiviert wurden.

B Quantifizierung der kalzifizierten Areale in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche nach Behandlung mit pd oder pd + Metformin und einer Kulturzeit von 56 Tagen (n = 5). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

* p ≤ 0,05.

Der anti-degenerative Langzeit-Effekt von Metformin ließ sich auch in der histologischen Analyse bestätigen (Abb. 14A + B). Metformin zeigte auch hier eine deutliche Reduktion der Alizarinrot gefärbten Klappentaschenareale im Vergleich zur pd-Kontrolle (pd: 56,40 ± 5,43 %; pd + Metformin: 22,10 ± 3,85 %, p = 0,0002) und bestätigt damit die reduzierte Kalziumablagerung.

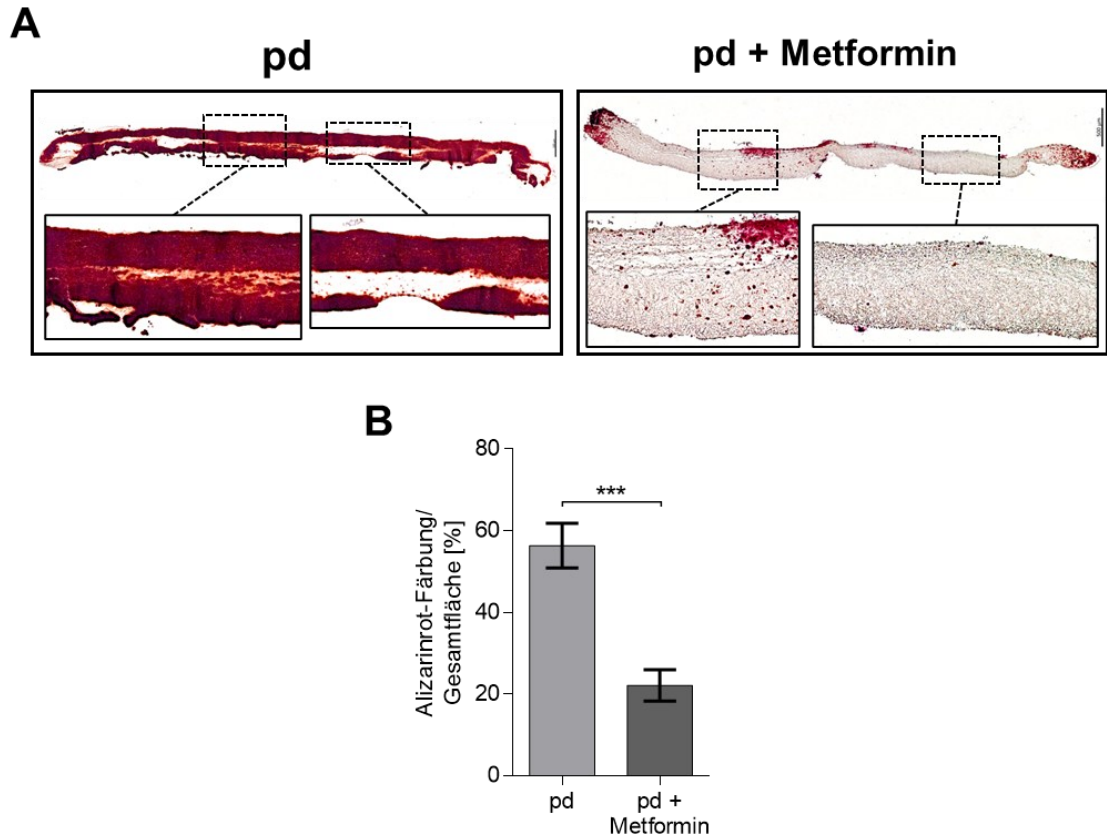


Abb. 14: Alizarinrot-Färbung von behandelten AK nach 56 Tagen Kulturdauer

A Repräsentative mikroskopische Aufnahmen jeweils einer AK behandelt mit pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin nach 56 Tagen Kulturdauer. Skala zeigt 500 Mikrometer (μm).

B Quantifizierung der Alizarinrot gefärbten Klappentaschenareale in Relation zur Gesamtklappentaschenfläche für pd und pd + Metformin ($n = 8$). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

*** $p \leq 0,001$.

4.4 Myofibroblastische Differenzierung

Die Progression von CAVD ist charakterisiert durch die Differenzierung von VICs zu aktivierten, myofibroblastischen Phänotypen (aVICs) [16]. Im Folgenden wurde daher die Wirkung von Metformin auf die myofibroblastische Differenzierung und zelluläre Homöostase untersucht.

4.4.1 Zytotoxizität

Zur Evaluierung der Zytotoxizität und zellulären Homöostase wurde der Gehalt an Laktatdehydrogenase (LDH) in den Kulturüberständen der VIC- und AK-Kulturen untersucht. Es zeigte sich ein signifikant verringerter LDH-Gehalt in VIC-Kulturen durch Behandlung mit Metformin ($0,09 \pm 0,01$) unter pd-Bedingungen, verglichen mit der Kontrolle ($0,20 \pm 0,01$) an Kulturtag 7 (Abb. 15: $p = 0,0079$).

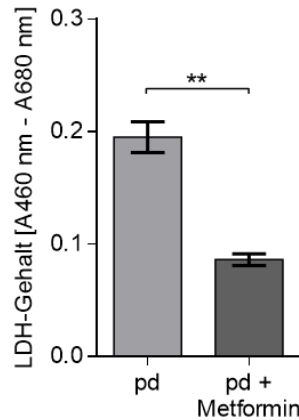


Abb. 15: Metformin reduziert den Laktatdehydrogenase-Gehalt in VIC-Kulturen

Quantifizierung des Laktatdehydrogenase (LDH)-Gehaltes in VIC-Kulturen an Kulturtag 7 für pro-degenerative (pd)-Bedingungen und pd + Metformin, gemessen bei einer Wellenlänge von 460 Nanometer (nm) – 680 nm (n = 5). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. ** p ≤ 0,01.

Darüber hinaus wurde der LDH-Gehalt in Kulturüberständen von AK an jedem dritten Kulturtag bis zu 27 Tagen erhoben. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt zeigte sich ein durch Behandlung mit Metformin unter pd-Bedingungen reduzierter LDH-Gehalt, verglichen mit der pd-Kontrolle (Abb. 16: pd + Metformin vs. pd: Tag 3: $0,08 \pm 0,005$ vs. $0,20 \pm 0,02$, p < 0,0001; Tag 6: $0,09 \pm 0,01$ vs. $0,21 \pm 0,02$, p < 0,0001; Tag 9: $0,10 \pm 0,01$ vs. $0,22 \pm 0,02$, p < 0,0001; Tag 12: $0,09 \pm 0,01$ vs. $0,24 \pm 0,05$, p < 0,0001; Tag 15: $0,12 \pm 0,02$ vs. $0,27 \pm 0,04$, p < 0,0001; Tag 18: $0,09 \pm 0,04$ vs. $0,24 \pm 0,05$, p < 0,0001; Tag 21: $0,12 \pm 0,02$ vs. $0,29 \pm 0,06$, p < 0,0001; Tag 24: $0,11 \pm 0,03$ vs. $0,27 \pm 0,08$, p < 0,0001; Tag 27: $0,21 \pm 0,04$ vs. $0,36 \pm 0,09$, p < 0,0001).

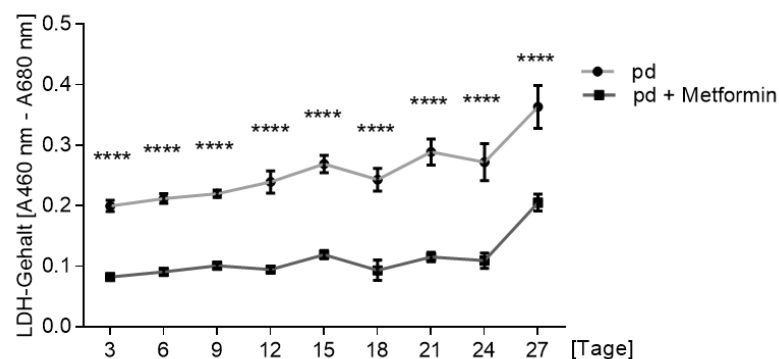


Abb. 16: Metformin reduziert den Laktatdehydrogenase-Gehalt in AK-Kulturen

Quantifizierung des Laktatdehydrogenase (LDH)-Gehalts in AK-Kulturen für die Kulturbedingungen pro-degenerativ (pd) und pd + Metformin (n = 7). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Kulturtag 3 bis Kulturtag 27 in Mittelwerten ± SEM. **** p ≤ 0,0001.

4.4.2 Proteinanalysen

Mittels Western Blot-Analysen wurde die Proteinexpression myofibroblastischer Marker in den Kulturen gemessen. Als respektive Kontrolle wurde die pd-Kulturbedingung gewählt und die relative Proteinexpression des gesuchten Markers dargestellt.

In VICs bewirkte die Behandlung mit Metformin unter pd-Bedingungen keinen signifikanten Effekt auf die Proteinexpression von α -SMA (Abb. 17A + B: pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,01 \pm 0,05$, $p = 0,6441$) nach 7 Tagen Kulturdauer. Ebenso zeigte die Behandlung von VICs mit Metformin unter pd-Bedingungen keinen signifikanten Effekt auf die Proteinexpression des Markers VIM (Abb. 17B + C, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,95 \pm 0,08$, $p = 0,5477$).

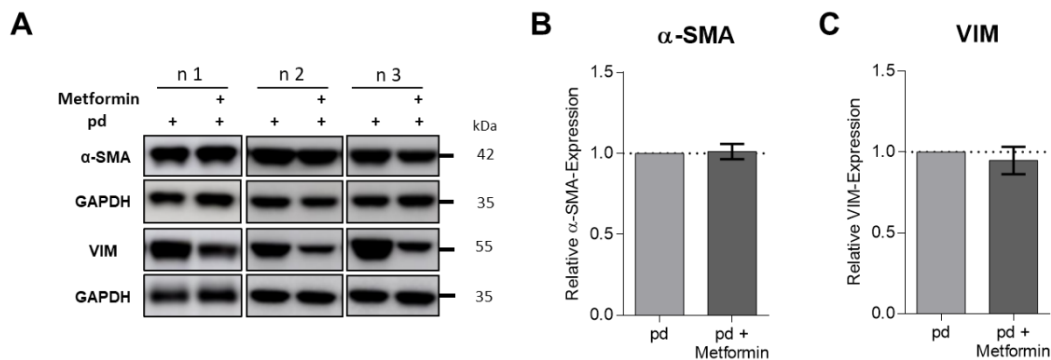


Abb. 17: Die Proteinexpression myofibroblastischer Marker in VIC-Kulturen

Die *alpha smooth muscle actin* (α -SMA) und Vimentin (VIM)-Proteinexpression in VIC-Kulturen nach Behandlung mit pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** Repräsentative Aufnahmen der Western Blot-Banden von α -SMA und VIM für drei exemplarische n. Semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung für die Bedingungen pd und pd + Metformin für **B** α -SMA (n = 17) und **C** VIM (n = 17). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

Im Folgenden wurde die Proteinexpression der Marker α -SMA und VIM in AK untersucht. In der durchgeführten Western Blot-Analyse zeigte sich für AK keine signifikant regulierte Expression von α -SMA nach 28 Tagen Metformin-Behandlung unter pd-Bedingungen im Vergleich zur respektiven pd-Kontrolle (Abb. 18A + B, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,14 \pm 0,24$, $p = 1,0$). In AK ließ sich jedoch eine signifikant erhöhte VIM-Proteinexpression nach 28 Tagen Metformin-Behandlung unter pd-Bedingungen nachweisen, verglichen mit der respektiven pd-Kontrolle (Abb. 18A + C, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,68 \pm 0,15$, $p = 0,0002$).

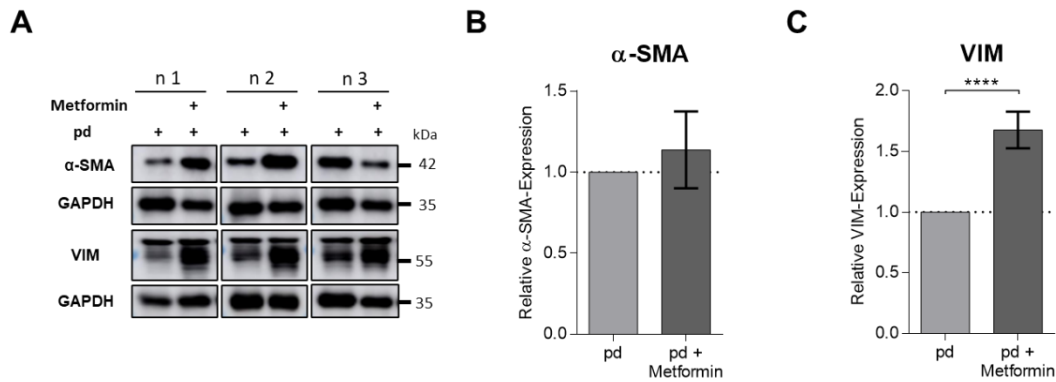


Abb. 18: Die Proteinexpression myofibroblastischer Marker in AK-Kulturen

Die *alpha smooth muscle actin* (α-SMA) und Vimentin (VIM)-Proteinexpression in AK-Kulturen nach Behandlung mit pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** Repräsentative Aufnahmen der Western Blot-Banden von α-SMA und VIM für drei exemplarische n. Semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung für die Bedingungen pd und pd + Metformin für **B** α-SMA (n = 14) und **C** VIM (n = 15). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. **** p ≤ 0,0001.

4.4.3 Genexpression

Anschließend wurde die Genexpression der myofibroblastischen Marker *alpha smooth muscle actin* (ACTA-2) und Vimentin (VIM) untersucht. Hierbei ergab sich eine signifikante Reduktion der ACTA-2 mRNA-Expression durch Behandlung mit Metformin unter pd-Bedingungen im Vergleich zur pd-Kontrolle (Abb. 19A, pd: 1,00 ± 0,00; pd + Metformin: 0,56 ± 0,08, p = 0,0313). Die VIM mRNA-Expression zeigte sich in VICs durch Metformin-Behandlung unter pd-Bedingungen nicht signifikant moduliert (Abb. 19B, pd: 1,00 ± 0,00; pd + Metformin: 1,14 ± 0,18, p = 1,0).

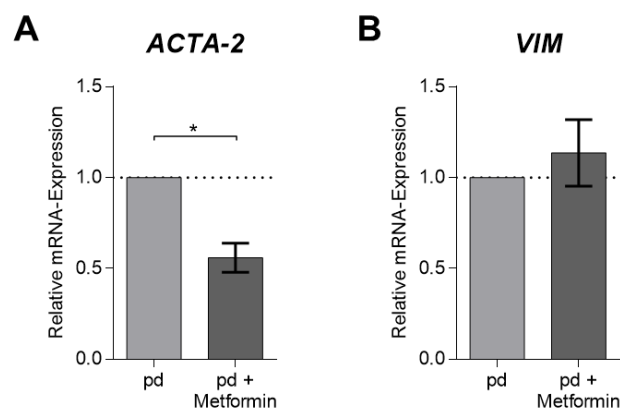


Abb. 19: Die Genexpression myofibroblastischer Marker in VIC-Kulturen

Die *alpha smooth muscle actin* (ACTA-2) und Vimentin (VIM)-Genexpression in VIC-Kulturen nach Behandlung mit pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin wurde mittels qPCR untersucht. Quantifizierung der relativen Genexpression für **A** ACTA-2 (n = 6) und **B** VIM (n = 6). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. * p ≤ 0,05.

Es wurde außerdem die Genexpression von myofibroblastischen Markern in AK untersucht, welche für 28 Tage unter pd-Bedingungen mit oder ohne Metformin-Behandlung kultiviert wurden. Wie in VICs zeigte sich eine Reduktion der *ACTA-2* mRNA-Expression durch Metformin-Behandlung (Abb. 20A, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,63 \pm 0,08$, $p = 0,0625$). Statistisch konnte hier jedoch nur ein Trend ohne Nachweis einer Signifikanz gezeigt werden. In AK zeigte sich eine signifikant gesteigerte *VIM* mRNA-Expression durch die Behandlung mit Metformin unter pd-Bedingungen verglichen mit der pd-Kontrolle (Abb. 20B, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $3,30 \pm 0,92$, $p = 0,0313$).

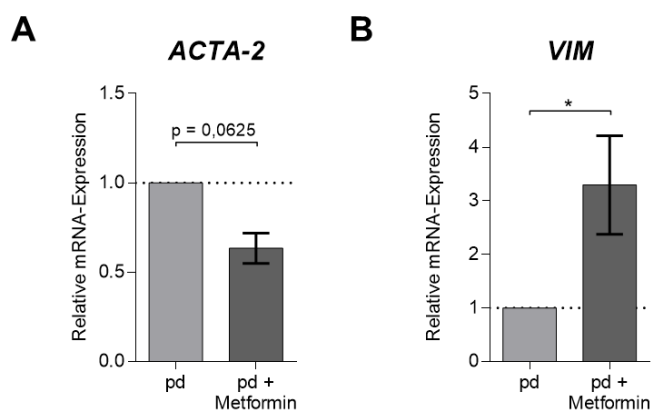


Abb. 20: Die Genexpression myofibroblastischer Marker in AK-Kulturen

Die *alpha smooth muscle actin* (*ACTA-2*) und *Vimentin* (*VIM*)-Genexpression in AK-Kulturen nach Behandlung mit pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin wurde mittels qPCR untersucht. Quantifizierung der relativen Genexpression für **A** *ACTA-2* ($n = 5$) und **B** *VIM* ($n = 6$). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$.

4.4.4 Proliferation

Die myofibroblastische Differenzierung kann außerdem mit einer verstärkten Proliferation als Reparaturmechanismus einhergehen [17]. Im Folgenden wurde die zelluläre Proliferation von VICs im Kurzzeitversuch mittels Inkorporierung von BrdU und dessen Antikörper-vermittelten Visualisierung und Absorptionsmessung bei 450 nm nachgewiesen. Es wurden die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden untersucht. Es konnte eine signifikante Reduktion der zellulären Proliferation durch Behandlung mit Metformin unter pd-Bedingungen nach 48 und 72 Stunden verglichen mit der pd-Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 21, 24 Stunden: pd: $0,89 \pm 0,15$, pd + Metformin: $0,84 \pm 0,34$, $p = 0,9299$; 48 Stunden: pd: $1,25 \pm 0,22$, pd + Metformin: $0,85 \pm 0,21$, $p = 0,0003$; 72 Stunden: pd: $1,47 \pm 0,12$, pd + Metformin: $0,89 \pm 0,24$, $p < 0,0001$).

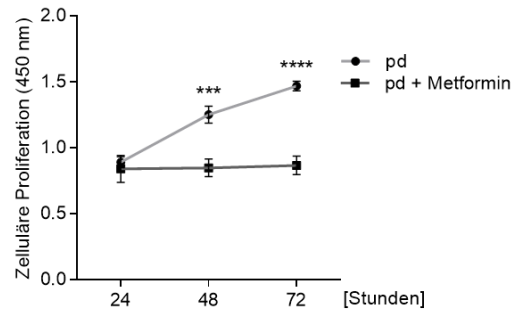


Abb. 21: Metformin reduziert die zelluläre Proliferation in VIC-Kulturen nach 48 und 72 Stunden

Die zelluläre Proliferation wurde in VIC-Kulturen für die Behandlungen pro-degenerativ (pd) und pd + Metformin mittels Inkorporierung von 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) und dessen Antikörper-vermittelten Visualisierung nachgewiesen (n = 10 – 12). Dargestellt ist der zeitliche Verlauf für die Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden in Mittelwerten $\pm$ SEM. *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Um die Wirkung von Metformin auf die myofibroblastische Differenzierung und valvuläre Homöostase zu untersuchen, wurde in AK ebenfalls die Proliferation investigiert. Dafür wurde die DAPI-Färbung genutzt. Dabei konnten Zellkerne auf für 28 Tage kultivierten AK sowohl nach Behandlung mit pd-Bedingungen als auch pd + Metformin nachgewiesen werden (Abb. 22A). Die Quantifizierung der gefärbten Zellkerne pro AK-Fläche in μm^2 zeigte eine signifikante Hemmung der Proliferation durch die Behandlung mit Metformin im Vergleich zur pd-Kontrolle (Abb. 22B, pd: $0,003 \pm 0,0001$ Zellkerne/ μm^2 , pd + Metformin: $0,002 \pm 0,0004$ Zellkerne/ μm^2 , $p = 0,0317$).

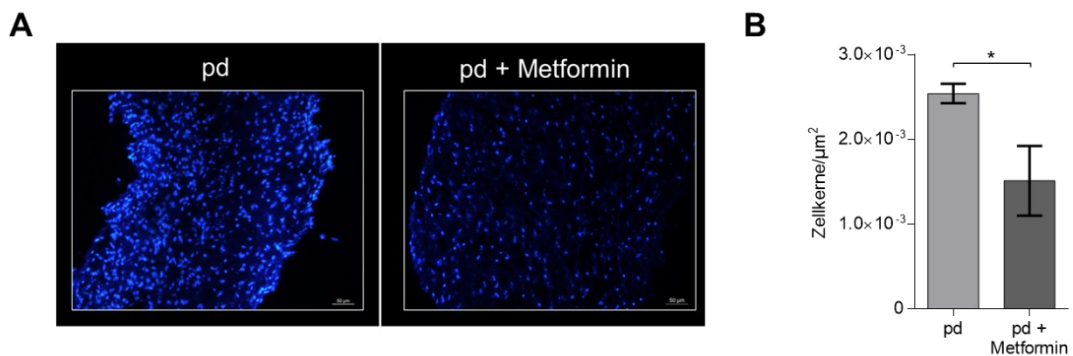


Abb. 22: Quantifizierung der Zellkerne pro AK-Fläche

Zur Quantifizierung der Zellkerne pro AK-Fläche (in Quadratmikrometer (μm^2)) wurde die 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung genutzt. **A** Repräsentative Darstellung eines n für pro-degenerative (pd)-Bedingungen und pd + Metformin. Die leuchtend blau angefärbten Areale zeigen die Zellkerne (Skala = 50 Mikrometer (μm)). **B** Quantifizierung der Zellkerne pro AK-Fläche (μm^2) für pd und pd + Metformin (n = 5). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$.

4.5 Osteoblastische Differenzierung

Der Übergang von VICs zur Fibrokalzifizierung kann außerdem durch eine Differenzierung zu osteoblastischen Phänotypen (obVICs) gekennzeichnet sein [17]. Zur Evaluierung der osteoblastischen Differenzierung wurde die ALP sowie die Genexpression der Marker *OPN*, *OCAL*, *BMP-2* und *RUNX2* investigated.

4.5.1 ALP

Zuerst wurde die ALP in VICs untersucht. Mittels einer Kombination aus NBT und BCIP wurden die VIC-Kulturen im Well angefärbt, um die ALP-Aktivität kolorimetrisch nachzuweisen (Abb. 23A). In der Quantifizierung zeigte sich ein Trend zur Reduktion der ALP-Aktivität pro Gesamtfläche durch Metformin-Behandlung unter pd-Bedingungen, verglichen mit der pd-Kontrolle (Abb. 23B, pd: $2,46 \pm 0,44$ %, pd + Metformin: $0,83 \pm 0,24$ %, $p = 0,0571$). Es wurde außerdem die ALP-Aktivität in den Kulturüberständen, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm, untersucht. Die Behandlung mit Metformin unter pd-Bedingungen führte zu einer signifikanten Reduktion der ALP-Aktivität in den Kulturüberständen, verglichen mit der pd-Kontrolle (Abb. 23C) an Tag 2 (pd: $1,47 \pm 0,02$, pd + Metformin: $1,15 \pm 0,02$, $p < 0,0001$), Tag 5 (pd: $1,23 \pm 0,04$, pd + Metformin: $1,01 \pm 0,03$, $p < 0,0001$) und Tag 7 (pd: $1,52 \pm 0,02$, pd + Metformin: $1,19 \pm 0,02$, $p < 0,0001$). An Tag 7 wurde außerdem die gemessene ALP-Aktivität in den Kulturüberständen in Relation zum gemessenen Proteingehalt in den VIC-Kulturen gesetzt. Hierbei konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der ALP-Aktivität durch Behandlung mit Metformin nachgewiesen werden (Abb. 23D, pd: $4,20 \pm 0,06$, pd + Metformin: $3,14 \pm 0,05$ %, $p < 0,0001$).

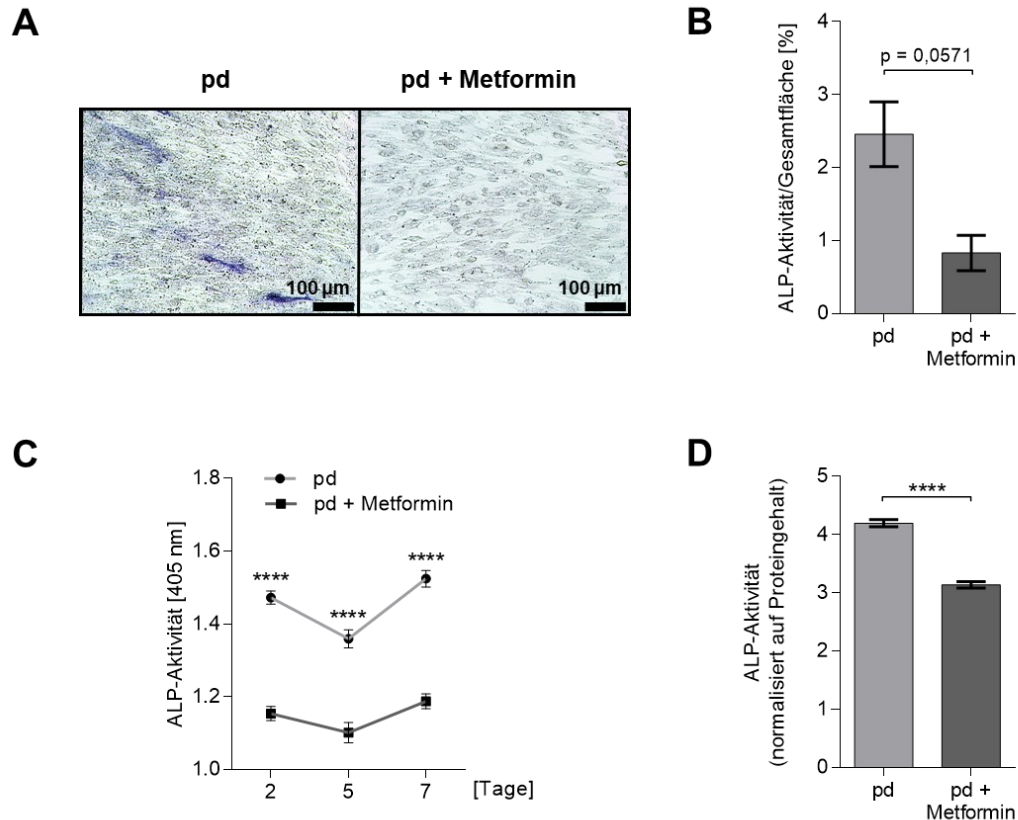


Abb. 23: Metformin-Behandlung reduziert die ALP-Aktivität in VIC-Kulturen

A Dargestellt ist der kolorimetrische Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) im Well der kultivierten valvulären Interstitialzellen (VICs) nach Behandlung mit pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin eines exemplarischen n. Die lila angefärbten Anteile indizieren die ALP-Aktivität. Die Skala zeigt 100 Mikrometer (μ m). **B** Quantifizierung der angefärbten Areale (= ALP-Aktivität) in Relation zur Gesamtfläche in Prozent für pd (n = 3) und pd + Metformin (n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. **C** Dargestellt ist die Quantifizierung der ALP-Aktivität in den VIC-Kulturüberständen gemessen an den Kulturtagen 2, 5 und 7 für pd und pd + Metformin (n = 16). Präsentiert sind Mittelwerte $\pm$ SEM. **** p $\leq$ 0,0001. **D** Dargestellt ist die ALP-Aktivität gemessen in den Kulturüberständen an Tag 7 in Relation zum Proteingehalt der VIC-Kulturen für pd und pd + Metformin und präsentiert als Mittelwerte $\pm$ SEM. **** p $\leq$ 0,0001.

Die ALP-Aktivität wurde auch in AKT-Kulturen untersucht. Die nach 28 Tagen unter pd-Bedingungen oder pd + Metformin behandelten AK wurden nach der Ernte mit der Kombination aus NBT und BCIP angefärbt (Abb. 24A). Bei der Quantifizierung der lila angefärbten Areale ergab sich durch die Behandlung mit Metformin ein signifikant geringerer Anteil ($0,97 \pm 0,50$ %) im Vergleich zur pd-Kontrolle ($4,64 \pm 1,06$ %), was eine durch Metformin-Behandlung indizierte Reduktion der ALP-Aktivität andeutet (Abb. 24B, p = 0,0031). Zudem wurde die ALP-Aktivität in den Kulturüberständen der über 28 Tage kultivierten AK an verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 24C). Hierbei zeigte sich an Kulturtag 3, 9, 15 und 21 eine signifikant niedrigere ALP-Aktivität in den mit Metformin

behandelten Kulturen (Abb. 24C, pd vs. pd + Metformin: Tag 3: $1,37 \pm 0,06$ vs. $1,15 \pm 0,08$, Tag 9: $1,61 \pm 0,09$ vs. $1,41 \pm 0,05$; Tag 15: $0,83 \pm 0,09$ vs. $0,68 \pm 0,12$; Tag 21: $1,11 \pm 0,07$ vs. $0,90 \pm 0,06$). Lediglich an Kulturtag 28 war kein signifikanter Unterschied nachweisbar (Abb. 24C, Tag 28, pd: $1,06 \pm 0,10$; pd + Metformin: $0,97 \pm 0,10$, $p = 0,2031$). Die an Kulturtag 28 in den Kulturüberständen detektierte ALP-Aktivität zeigte sich in Relation zum in den AK gemessenen Proteingehalt jedoch durch Metformin-Behandlung signifikant reduziert (Abb. 24D, pd: $0,38 \pm 0,04$; pd + Metformin: $0,24 \pm 0,004$, $p = 0,0286$).

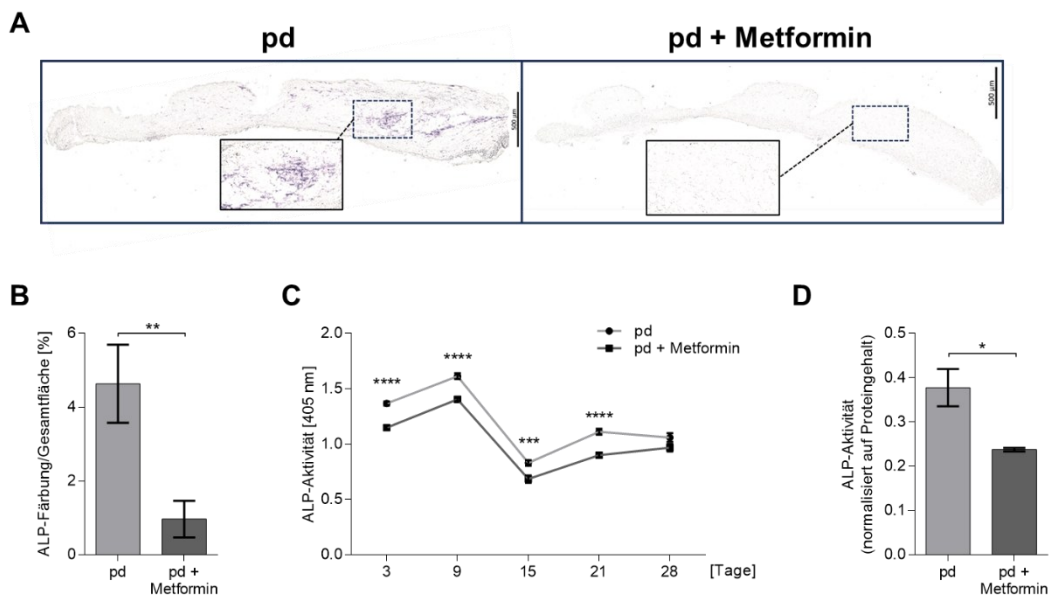


Abb. 24: Metformin-Behandlung reduziert die ALP-Aktivität in AK-Kulturen

A Dargestellt ist der kolorimetrische Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP) in der mit einer Kombination aus NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) und BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt) angefärbten Aortenklappentaschen (AK) mit einem exemplarischen n für pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin. Die lila angefärbten Anteile indizieren die ALP-Aktivität. Die Skala zeigt 500 Mikrometer (µm). **B** Quantifizierung der angefärbten Areale (= ALP-Aktivität) in Relation zur AK-Fläche in Prozent für pd (n = 10) und pd + Metformin (n = 7). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. ** p ≤ 0,01. **C** Dargestellt ist die Quantifizierung der ALP-Aktivität in den AK-Kulturüberständen, gemessen an den Kulturtagen 3 (n = 12), 9 (n = 12), 15 (n = 13), 21 (n = 7) und 28 (n = 7) für pd und pd + Metformin. Präsentiert sind Mittelwerte ± SEM. *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001. **D** Dargestellt ist die ALP-Aktivität gemessen in den Kulturüberständen an Tag 28 in Relation zum Proteingehalt der AK für pd und pd + Metformin und präsentiert als Mittelwerte ± SEM (n = 4). * p ≤ 0,05.

4.5.2 Genexpression osteoblastischer Marker

Im nächsten Schritt wurde die mRNA-Expression der osteoblastischen Marker *OPN*, *OCAL*, *BMP-2* und *RUNX2* in VIC-Kulturen, die entweder unter pd-Bedingungen oder pd + Metformin für 7 Tage kultiviert wurden, mittels qPCR untersucht (Abb. 25).

In den kultivierten VICs ließ sich eine durch Metformin-Behandlung induzierte Steigerung der *OPN* mRNA-Expression nachweisen (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,74 \pm 0,29$, $p = 0,0313$). Im Kontrast dazu war *BMP-2* gegensätzlich reguliert und die Metformin-Behandlung resultierte in einer signifikant reduzierten mRNA-Expression (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,24 \pm 0,04$, $p = 0,0313$). Die mRNA-Expression von *OCAL* (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,02 \pm 0,16$, $p = 1,00$) und *RUNX2* (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,12 \pm 0,11$, $p = 0,4375$) war zudem nicht signifikant durch die Behandlung mit Metformin reguliert.

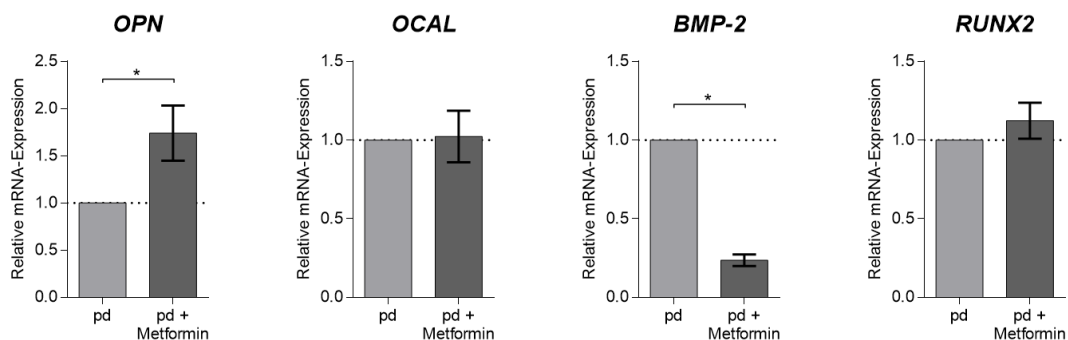


Abb. 25: mRNA-Expression osteoblastischer Differenzierungsmarker in VICs

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Marker Osteopontin (*OPN*), Osteocalcin (*OCAL*), *Bone morphogenetic protein 2* (*BMP-2*) und *Runt-related transcription factor 2* (*RUNX2*) in valvulären Interstitialzellen (VICs) nach 7 Kulturtagen für pro-degenerative (pd)-Bedingungen und pd + Metformin ($n = 6$). Präsentiert sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$.

Die mRNA-Expression der osteoblastischen Gene wurde außerdem in für 28 Tage unter pd-Bedingungen und Metformin-Behandlung kultivierten AK untersucht (Abb. 26).

Die relative mRNA-Expression des Markers *OPN* zeigte sich signifikant reduziert in den mit Metformin behandelten AK (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,04 \pm 0,02$, $p = 0,0313$). Gegensätzlich verhielt sich die *OCAL* mRNA-Expression, welche durch Metformin-Behandlung signifikant hochreguliert war (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $4,72 \pm 1,26$, $p = 0,0313$). In AK ließ sich keine Regulation von *BMP-2* (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,28 \pm 0,18$, $p = 0,2188$) und *RUNX2* (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $1,09 \pm 0,23$, $p = 0,6875$) durch Metformin-Behandlung nachweisen im Vergleich zur pd-Kontrolle.

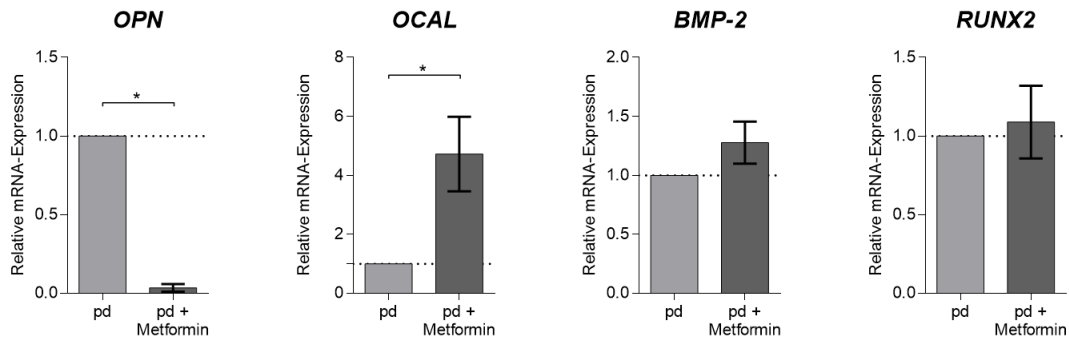


Abb. 26: mRNA-Expression osteoblastischer Differenzierungsmarker in AK

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Marker Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCAL), *Bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) und *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) in Aortenklappentaschen (AK) nach 28 Kulturtagen für pro-degenerative (pd)-Bedingungen und pd + Metformin (n = 6). Präsentiert sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$.

4.6 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Im Folgenden wurde die mRNA-Expression von Genen, die in den EZM-Umbau und dessen Regulierung implementiert sind, untersucht. Dazu wurden die Gene *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *TGF- β 1*, *MMP-2* und *MMP-9* beleuchtet. Zudem wurden in AK histologische Analysen zur Beurteilung von Veränderungen in der EZM-Architektur durchgeführt.

4.6.1 EZM in VICs

Die relative mRNA-Expression der in den EZM-Umbau beteiligten Gene wurde in für 7 Tage unter pd-Bedingungen und pd + Metformin behandelten VIC-Kulturen mittels qPCR untersucht (Abb. 27).

In Bezug auf die Expression von Kollagenen in VICs ließ sich eine signifikante Herunterregulierung von Kollagen Typ 1 (*COL1A1*, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,42 \pm 0,07$, $p = 0,0313$) sowie Kollagen Typ 5 (*COL5A1*, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,65 \pm 0,08$, $p = 0,0313$) durch Behandlung mit Metformin feststellen. Die relative mRNA-Expression von Kollagen Typ 3 (*COL3A1*, pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,71 \pm 0,11$, $p = 0,0625$) zeigte sich durch Metformin-Behandlung in Richtung eines Trends reduziert, jedoch ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz. Ebenso war in VICs eine Reduktion der relativen *TGF- β* mRNA-Expression durch Behandlung mit Metformin, verglichen mit der pd-Kontrolle, nachweisbar (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,40 \pm 0,06$, $p = 0,0313$). Die Regulation der untersuchten Matrix-Metalloproteinasen (*MMP-2* und *MMP-9*) zeigte sich durch Behandlung mit Metformin nicht einheitlich reguliert. Die relative *MMP-2* mRNA-Expression war nicht

wesentlich moduliert durch Behandlung mit Metformin (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,96 \pm 0,04$, $p = 0,437$), während die relative *MMP-9* mRNA-Expression durch Metformin signifikant herunterreguliert imponierte (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,68 \pm 0,12$, $p = 0,0313$).

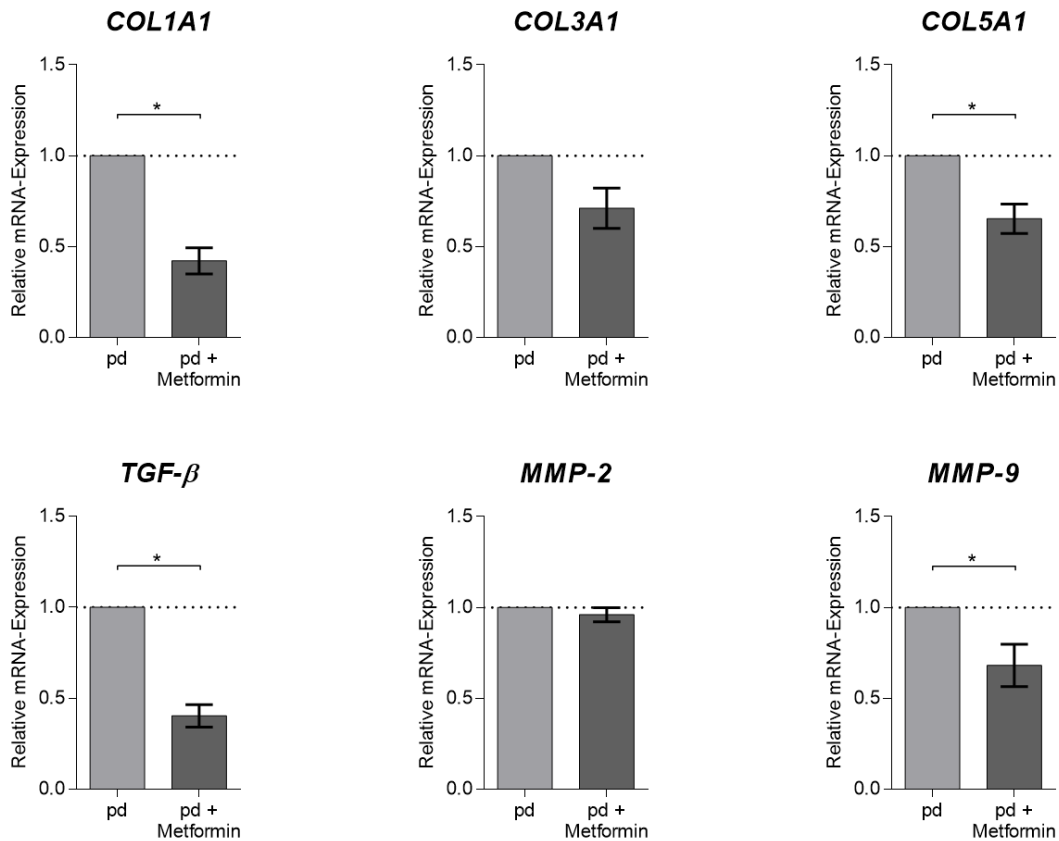


Abb. 27: mRNA-Expression extrazellulärer Matrix (EZM) Marker in VICs

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Marker Kollagen Typ 1 (*COL1A1*), Kollagen Typ 3 (*COL3A1*), Kollagen Typ 5 (*COL5A1*), *Transforming growth factor-β* (*TGF-β*), Matrix-Metalloproteinase (*MMP*)-2 und *MMP*-9 in valvulären Interstitialzellen (VICs) nach 7 Kulturtagen für pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und pd + Metformin ($n = 6$). Präsentiert sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$.

4.6.2 EZM in AK

Die relative mRNA-Expression der in den EZM-Umbau beteiligten Gene wurde außerdem in für 28 Tage unter pd-Bedingungen und pd + Metformin behandelten AK mittels qPCR untersucht (Abb. 28).

Hierbei ergab sich eine Hochregulierung von *COL1A1* (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $3,67 \pm 1,44$, $p = 0,0625$) induziert durch Metformin-Behandlung, welche sich als Trend, jedoch nicht statistisch signifikant präsentierte. Metformin-Behandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von *COL3A1* (pd: $1,00 \pm 0,00$;

pd + Metformin: $0,91 \pm 0,17$, $p = 0,4375$). Vergleichbar mit der Regulation in VICs induzierte Metformin-Behandlung eine signifikante Reduktion der *COL5A1* mRNA-Expression (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,36 \pm 0,08$, $p = 0,0313$). Die relative *TGF- β* mRNA-Expression (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,36 \pm 0,08$, $p = 0,0313$) war durch Metformin-Behandlung reduziert im Vergleich zur pd-Kontrolle.

Interessanterweise zeigte sich in AK eine gegensätzliche Regulation von *MMP-2* und *MMP-9*. Die relative *MMP-2*-mRNA-Expression (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $2,86 \pm 0,59$, $p = 0,0313$) war durch Behandlung mit Metformin signifikant erhöht, während die relative *MMP-9*-mRNA-Expression (pd: $1,00 \pm 0,00$; pd + Metformin: $0,04 \pm 0,02$, $p = 0,0313$) signifikant herunterreguliert war.

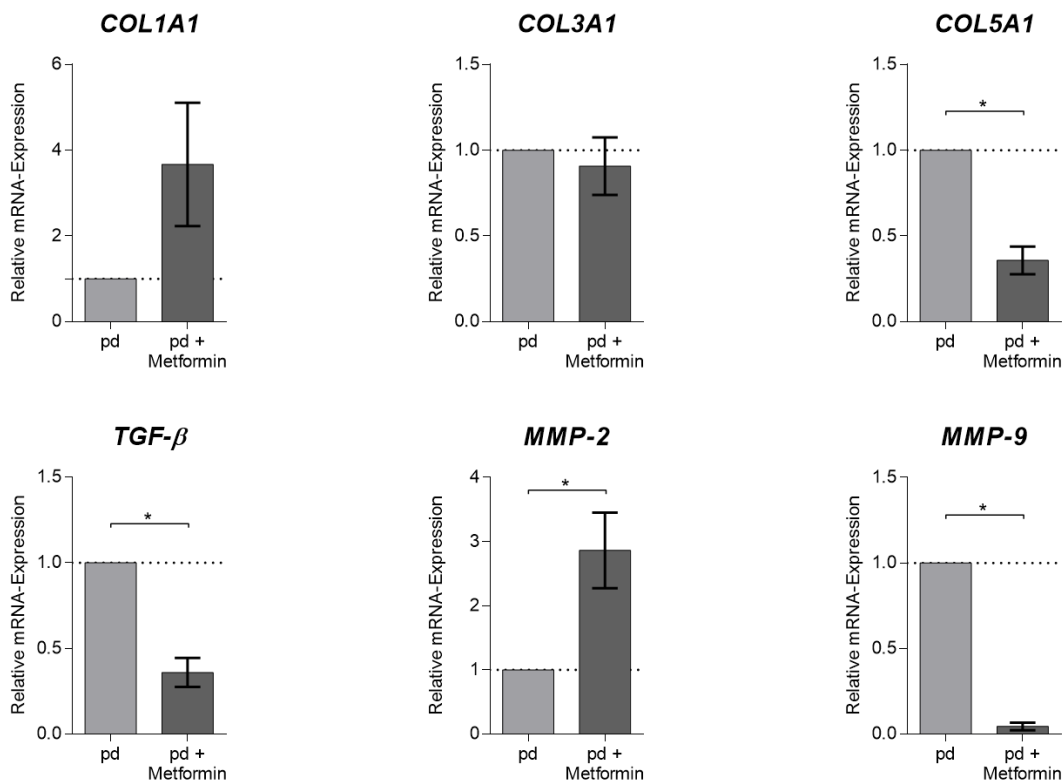


Abb. 28: mRNA-Expression extrazellulärer Matrix (EZM) Marker in AK

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Marker Kollagen Typ 1 (*COL1A1*), Kollagen Typ 3 (*COL3A1*), Kollagen Typ 5 (*COL5A1*), *Transforming growth factor- β* (*TGF- β*), Matrix-Metalloproteinase (*MMP*)-2 und *MMP*-9 in Aortenklappentaschen (AK) nach 28 Kulturtagen für pro-degenerative (pd)-Bedingungen und pd + Metformin ($n = 5 - 6$). Präsentiert sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$.

Zur Beurteilung von Veränderungen in der Architektur der EZM wurden die für 28 oder 56 Tage kultivierten AK mit der Movat Pentachrom-Färbung angefärbt. Repräsentativ ist für jeden Zeitpunkt jeweils eine pd-Kontrolle sowie eine Metformin-Behandlung dargestellt (Abb. 29). Nach 28 Kultivierungstagen zeigte sich unter pd-Bedingungen eine

dickere Fibrosaschicht, die deutlich kollagenreich (gelbe Anfärbung) imponiert, sowie eine teilweise desorganisierte EZM-Struktur, verglichen mit der Metformin-Behandlung. Nach 56 Tagen Kultivierungszeit zeigte sich unter pd-Bedingungen ein deutlich aggraviertes Bild mit uneinheitlich verdickten Klappenarealen, einer gestörten EZM-Struktur sowie der Anlagerung von Proteoglykanen (blau) in allen drei Klappenschichten. Die Behandlung mit Metformin schützte die EZM-Struktur visuell und behielt die trilaminare Architektur der AK bei.

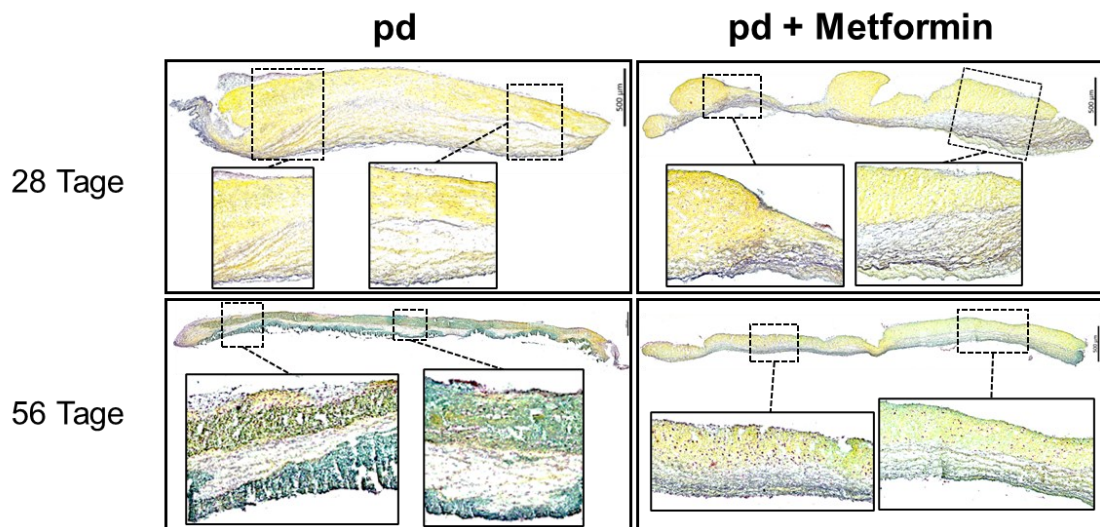


Abb. 29: Movat Pentachrom-Färbung der für 28 und 56 Tage kultivierten AK

Dargestellt ist ein repräsentatives n der mit Movat Pentachrom angefärbten Aortenklappentaschen (AK), welche unter pro-degenerativen (pd)-Bedingungen oder unter pd + Metformin für entweder 28 Tage (oben) oder 56 Tage (unten) kultiviert wurden. Die Skala zeigt 500 Mikrometer (µm).

4.7 Der AMPK-Signalweg

Im Folgenden wurde der AMPK-Signalweg in VICs und AK näher beleuchtet. Um zu überprüfen, ob der AMPK-Signalweg in den hier untersuchten ovinen VICs und AK unter Metformin-Behandlung hochreguliert ist, wurde die AMPK-Phosphorylierung in Proteinanalysen mittels Western Blot untersucht.

4.7.1 AMPK-Phosphorylierung in VICs

In VICs wurde zunächst im Kurzzeit-Versuch die AMPK-Phosphorylierung durch Behandlung mit Metformin zu den Zeitpunkten 1, 3 und 6 Stunden unter Kontrollbedingungen (10 % Kulturmedium) untersucht (Abb. 30A). Hier zeigte sich bei der semiquantitativen, Densitometrie-basierten Auswertung der Western Blot-Banden nach 6 Stunden eine um etwa 180 % gesteigerte relative AMPK-Phosphorylierung durch Behandlung mit Metformin (Abb. 30B, p-AMPK (6 Stunden) Kontrolle vs. Metformin: $1,00 \pm 0,14$ vs. $2,80 \pm 0,28$, $p < 0,0001$). Zudem war zum 6-Stunden-Zeitpunkt das Phosphorylierungslevel in den mit Metformin behandelten VICs signifikant erhöht (Abb. 30B, Metformin (6 Stunden) AMPK vs. p-AMPK: $1,21 \pm 0,07$ vs. $2,80 \pm 0,28$, $p < 0,0001$).

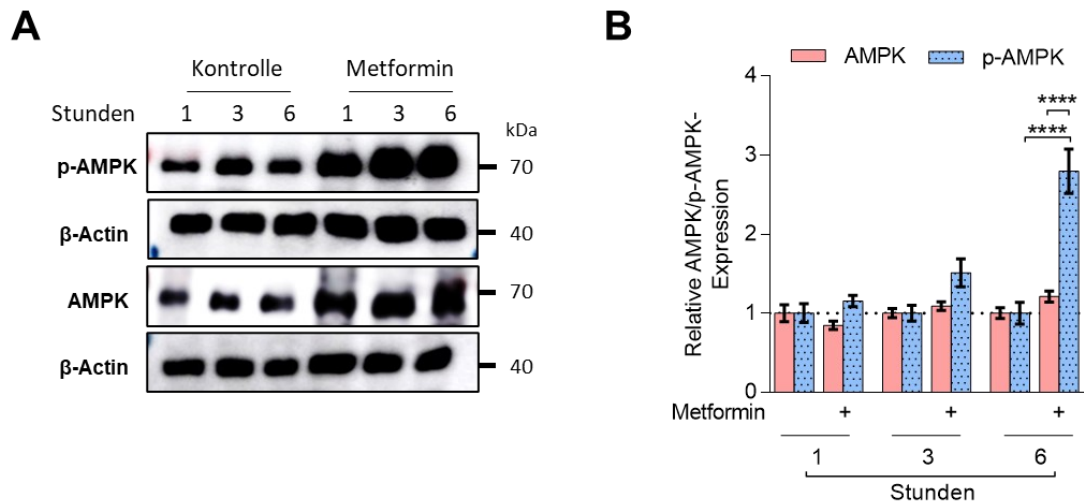


Abb. 30: Kurzzeit AMPK-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen und Metformin-Behandlung in VICs

Die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α (AMPK)-Phosphorylierung in valvulären Interstitialzellen (VICs) nach Behandlung mit 10 % Kulturmedium (Kontrolle) und Metformin-Behandlung zu den Zeitpunkten 1, 3 und 6 Stunden wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** Repräsentative Aufnahmen der Western Blot-Banden von AMPK und der phosphorylierten Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase α (p-AMPK) sowie der jeweils mitgeführten β -Actin-Kontrolle für ein n. **B** Semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung der relativen AMPK-Phosphorylierung für die 10 % Kontrolle sowie Metformin-Behandlung zu den Zeitpunkten 1, 3 und 6 Stunden, normiert auf die β -Actin-Kontrolle (n = 6). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. **** $p \leq 0,0001$.

Im nächsten Schritt wurde die AMPK-Phosphorylierung in VICs unter pd-Bedingungen untersucht (Abb. 31A + B). Hier zeigte sich nach 7 Kultivierungstagen unter Metformin-Behandlung eine um etwa 28 % erhöhte relative AMPK-Phosphorylierung (Abb. 31B, pd + Metformin AMPK vs. p-AMPK: $0,88 \pm 0,02$ vs. $1,12 \pm 0,05$, $p = 0,0002$).

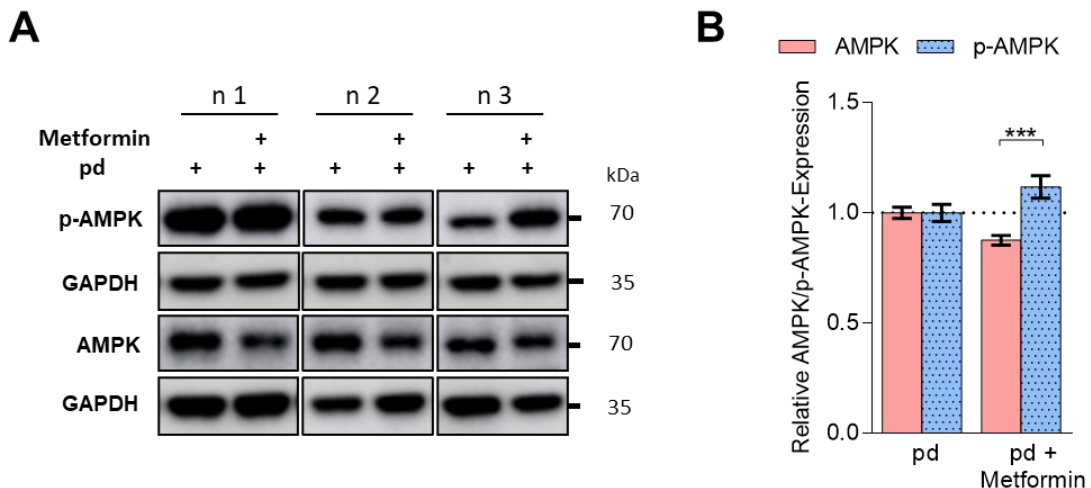


Abb. 31: AMPK-Phosphorylierung unter pd-Bedingungen und Metformin-Behandlung in VICs

Die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α (AMPK)-Phosphorylierung in valvulären Interstitialzellen (VICs) nach Kultivierung unter pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und mit Metformin-Behandlung für 7 Tage wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** Repräsentative Aufnahmen der Western Blot-Banden von AMPK und der phosphorylierten Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase α (p-AMPK) sowie der jeweils mitgeführten Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Kontrolle für drei exemplarische n. **B** Semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung der relativen AMPK-Phosphorylierung für die pd-Kontrolle sowie Metformin-Behandlung nach 7 Tagen, normiert auf die GAPDH-Kontrolle (n = 11). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. *** $p \leq 0,001$.

4.7.2 AMPK-Phosphorylierung in AK

Die AMPK-Phosphorylierung wurde danach in AK untersucht (Abb. 32A + B). Auch hier konnte nach 28 Tagen Kultivierung unter pd-Bedingungen eine um knapp 21 % erhöhte Induktion der AMPK-Phosphorylierung durch Behandlung mit Metformin nachgewiesen werden (Abb. 32B, pd + Metformin AMPK vs. p-AMPK: $1,14 \pm 0,05$ vs. $1,38 \pm 0,07$, $p = 0,0177$). Zudem zeigte sich auch hier ein durch Metformin-Behandlung induziertes, (um 38 %) erhöhtes Phosphorylierungslevel, verglichen mit der pd-Kontrolle (Abb. 32B, p-AMPK pd vs. pd + Metformin: $1,00 \pm 0,05$ vs. $1,38 \pm 0,07$, $p < 0,0001$).

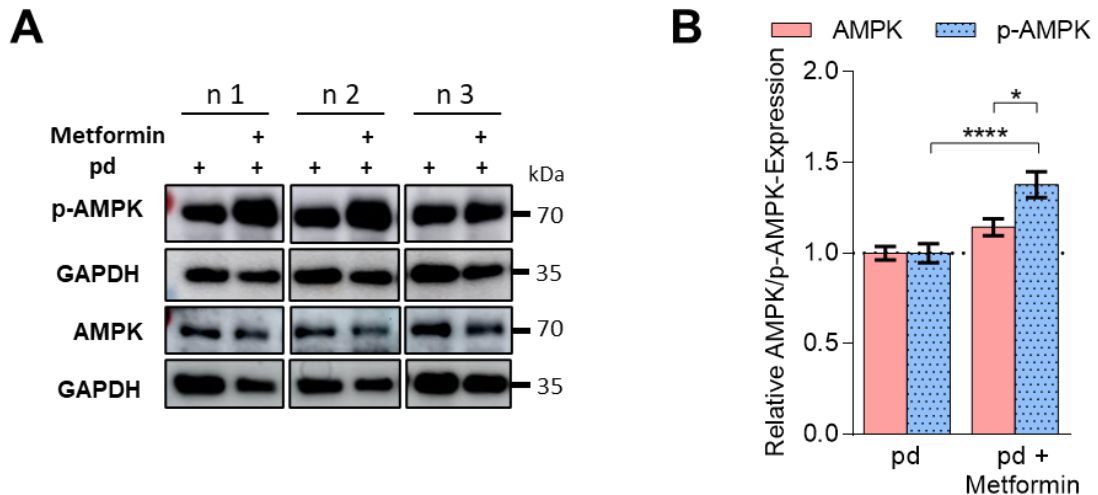


Abb. 32: AMPK-Phosphorylierung unter pd-Bedingungen und Metformin-Behandlung in AK

Die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α (AMPK)-Phosphorylierung in Aortenklappentaschen (AK) nach Kultivierung unter pro-degenerativen (pd)-Bedingungen und mit Metformin-Behandlung für 28 Tage wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** Repräsentative Aufnahmen der Western Blot-Banden von AMPK und der phosphorylierten Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase α (p-AMPK) sowie der jeweils mitgeführten Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Kontrolle für drei exemplarische n. **B** Semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung der relativen AMPK-Phosphorylierung für die pd-Kontrolle sowie Metformin-Behandlung nach 28 Tagen, normiert auf die GAPDH-Kontrolle (n = 15). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$.

4.7.3 Aktivierung und Hemmung des AMPK-Signalwegs

Um zu untersuchen, ob der AMPK-Signalweg eine Stellung in der anti-degenerativen Wirkung von Metformin einnimmt, wurden der AMPK-Induktor AICAR und der AMPK-Inhibitor Dorsomorphin für Versuche mit VICs genutzt. Um die Wirkung auf die für 4 Stunden unter den bestimmten Bedingungen kultivierten VICs zu untersuchen, wurde zunächst die AMPK-Phosphorylierung in Western Blot-Analysen untersucht und mit der 10 % Kulturmedium Kontrolle verglichen (Abb. 33). Dabei zeigte sich, dass Metformin-Behandlung in einer um etwa 120 % gesteigerten relativen AMPK-Phosphorylierung resultierte (Abb. 33B, p-AMPK 10 % vs. p-AMPK Metformin: $1,00 \pm 0,10$ vs. $2,20 \pm 0,25$, $p < 0,0001$), wobei die gleichzeitige Behandlung mit dem AMPK-Induktor Metformin und dem AMPK-Inhibitor Dorsomorphin zu einer dennoch gesteigerten AMPK-Phosphorylierung führte, verglichen mit der Kontrollbedingung (Abb. 33B, p-AMPK 10 % vs. p-AMPK Metformin + Dorsomorphin: $1,00 \pm 0,10$ vs. $2,11 \pm 0,29$, $p < 0,0001$). Im Gegenzug dazu führte die singuläre Behandlung mit Dorsomorphin zu keiner signifikant erniedrigten relativen AMPK-Phosphorylierung, verglichen mit der 10 % Kontrolle (Abb. 33B, p-AMPK 10 % vs. p-AMPK Dorsomorphin: $1,00 \pm 0,10$ vs. $0,82 \pm 0,08$, $p > 0,9999$). Es konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zu der Metformin-Behandlung (p-AMPK Metformin vs. p-AMPK Dorsomorphin: $2,20 \pm 0,25$ vs. $0,82 \pm 0,08$, $p < 0,0001$) und der

Kombination aus Metformin und Dorsomorphin (p-AMPK Metformin + Dorsomorphin vs. p-AMPK Dorsomorphin: $2,11 \pm 0,29$ vs. $0,82 \pm 0,08$, $p < 0,0001$) nachgewiesen werden. Der AMPK-Induktor AICAR zeigte zudem ebenso eine um 210 % signifikant erhöhte AMPK-Phosphorylierung, verglichen mit der 10 % Kontrolle (p-AMPK 10 % vs. p-AMPK AICAR: $1,00 \pm 0,10$ vs. $3,10 \pm 0,31$, $p < 0,0001$).

Das Phosphorylierungslevel war sowohl durch Metformin-Behandlung um etwa 115 % erhöht (Abb. 33B, Metformin AMPK vs. p-AMPK: $1,02 \pm 0,04$ vs. $2,20 \pm 0,25$, $p < 0,0001$) als auch durch Behandlung mit Dorsomorphin + Metformin um etwa 113 % (AMPK vs. p-AMPK Metformin + Dorsomorphin, $0,99 \pm 0,04$ vs. $2,11 \pm 0,29$, $p < 0,0001$) und durch Behandlung mit AICAR um 210 % signifikant erhöht (AMPK vs. p-AMPK AICAR: $1,00 \pm 0,08$ vs. $3,10 \pm 0,30$, $p < 0,0001$).

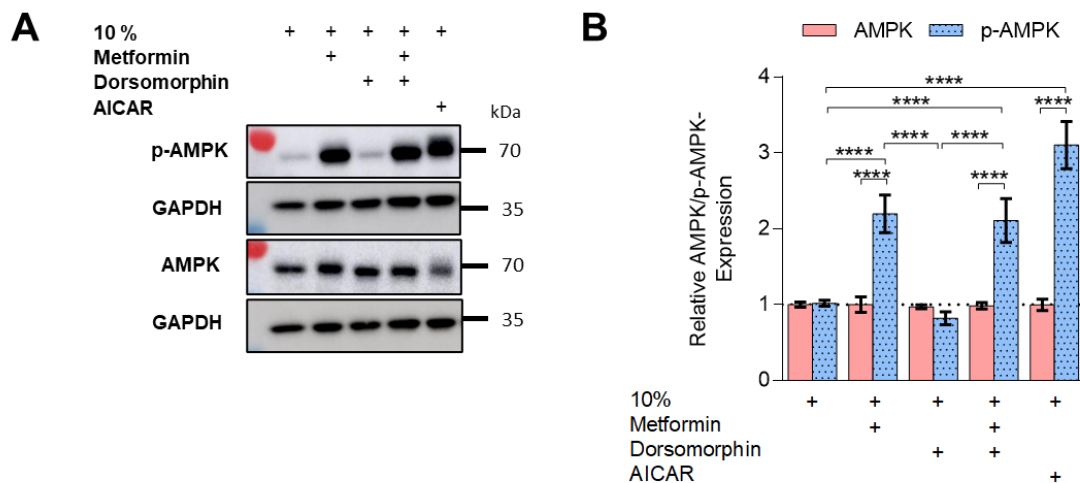


Abb. 33: Kurzzeit AMPK-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen und verschiedenen Behandlung in VICs

Die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α (AMPK)-Phosphorylierung in valvulären Interstitialzellen (VICs) nach Behandlung mit 10 % Kulturmedium (Kontrolle), Metformin, Dorsomorphin, kombinierte Metformin + Dorsomorphin und 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR)-Behandlung nach 4 Stunden wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** Repräsentative Aufnahmen der Western Blot-Banden von AMPK und der phosphorylierten Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase α (p-AMPK) sowie der jeweils mitgeführten Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Kontrolle für ein n. **B** Semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung der relativen AMPK-Phosphorylierung für die 10 % Kontrolle sowie Metformin-Behandlung zum Zeitpunkt 4 Stunden, normiert auf die GAPDH-Kontrolle (n = 12 für 10 %, Metformin, Dorsomorphin und Metformin + Dorsomorphin; n = 10 für AICAR). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. **** $p \leq 0,0001$.

4.7.4 AMPK-Aktivierung in VICs wirkt anti-degenerativ

Im nächsten Schritt wurden VICs für 7 Tage unter pd-Bedingungen mit Metformin und verschiedenen Konzentrationen des AMPK-Induktors AICAR (10, 100 und 1000 μ M)

behandelt, um zu überprüfen, ob die AMPK-Induktion durch AICAR einen mit Metformin vergleichbaren anti-degenerativen Effekt auslöst. Es zeigte sich hier in der im Well durchgeführten Alizarinrot-Färbung sowie anschließender Quantifizierung der bereits vorher etablierte durch Metformin vermittelte anti-degenerative Effekt durch einen signifikant reduzierten Kalziumnachweis (Abb. 34, pd vs. pd + Metformin: $0,97 \pm 0,13$ vs. $0,31 \pm 0,02$, $p < 0,0001$). Außerdem konnte durch AICAR eine konzentrationsabhängige Hemmung der Degeneration nachgewiesen werden mit Signifikanz bei 1000 μM (Abb. 34, pd vs. pd + AICAR 1000 μM : $0,97 \pm 0,13$ vs. $0,45 \pm 0,04$, $p = 0,0022$). In Bezug auf AICAR in einer Konzentration von 10 μM und 100 μM zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur pd-Kontrolle (Abb. 34, pd vs. pd + AICAR 10 μM : $0,97 \pm 0,13$ vs. $0,61 \pm 0,05$, $p = 0,9708$; 100 μM : $0,97 \pm 0,13$ vs. $0,75 \pm 0,08$, $p > 0,9999$). Im Vergleich zu Metformin war der Kalziumnachweis in den AICAR-Konzentrationen 10 μM und 100 μM erhöht (Abb. 34, pd + Metformin vs. pd + AICAR 10 μM : $0,31 \pm 0,02$ vs. $0,97 \pm 0,13$, $p < 0,0001$; 100 μM : $0,31 \pm 0,02$ vs. $0,75 \pm 0,08$, $p < 0,0001$).

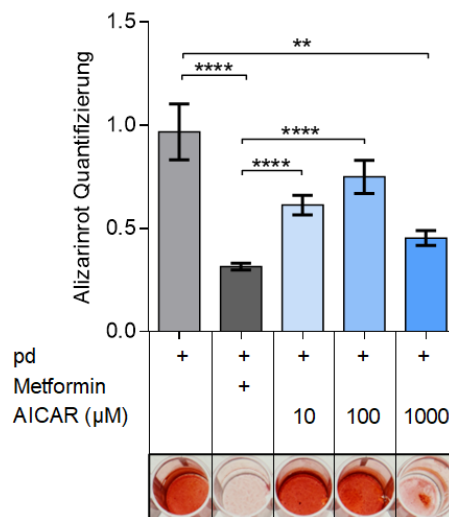


Abb. 34: Der AMPK-Induktor AICAR hemmt die Degeneration von VICs konzentrationsabhängig

Dargestellt ist die Quantifizierung der Kalziumablagerungen der mit Alizarinrot gefärbten valvulären Interstitialzellen (VICs), die unter pd-Bedingungen entweder mit Metformin oder 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid (AICAR) in den Konzentrationen 10, 100 oder 1000 Mikromolar (μM) behandelt und für sieben Tage kultiviert wurden (oben, $n = 18 - 24$). Unterhalb der Legende ist ein Ausschnitt der angefärbten Wells auf einer 48-Well-Platte gezeigt, wobei die rote Farbe die Kalziumablagerungen darstellt. Dargestellt ist ein exemplarisches n mit einem Well pro Bedingung (unten). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

4.7.5 Dorsomorphin antagonisiert dosisabhängig die anti-degenerative Wirkung von Metformin

Als Nächstes wurde der Einfluss der AMPK-Inhibition auf die Degeneration von VICs getestet. Dazu wurden VICs für sieben Tage mit dem AMPK-Inhibitor Dorsomorphin in verschiedenen Konzentrationen (1, 5 und 10 μM) sowie zusätzlich Metformin-Behandlung getestet. Dabei zeigte sich erneut die Hemmung der Kalziumablagerung durch Metformin (Abb. 35, pd vs. pd + Metformin: $2,06 \pm 0,19$ vs. $0,33 \pm 0,03$, $p < 0,0001$). Die Behandlung mit pd + Dorsomorphin in der Konzentration 10 μM resultierte in keinem signifikanten Unterschied zu der pd-Behandlung (pd vs. pd + Dorsomorphin: $2,06 \pm 0,19$ vs. $1,78 \pm 0,13$, $p > 0,9999$), jedoch zeigte sich im Vergleich zu pd + Metformin eine erhöhte Kalziumablagerung (pd + Metformin vs. pd + Dorsomorphin: $0,33 \pm 0,03$ vs. $1,78 \pm 0,13$, $p < 0,0001$). In der Kombination von Metformin + Dorsomorphin konnte bei den Konzentrationen 1 μM und 5 μM eine signifikant niedrigere Kalziumablagerung im Vergleich zur pd-Kontrolle nachgewiesen werden (pd vs. pd + Metformin + Dorsomorphin 1 μM : $2,06 \pm 0,19$ vs. $1,20 \pm 0,06$, $p = 0,0485$; 5 μM : $2,06 \pm 0,19$ vs. $1,09 \pm 0,04$, $p = 0,0037$). Zudem wurde die anti-degenerative Wirkung von Metformin bei 10 μM Dorsomorphin antagonisiert, wie die signifikant erhöhte Kalziumablagerung im Vergleich zu pd + Metformin ($1,26 \pm 0,12$ vs. $0,33 \pm 0,03$, $p = 0,0189$) und der fehlende signifikante Unterschied zur pd-Kontrolle ($1,26 \pm 0,12$ vs. $2,06 \pm 0,19$, $p = 0,0855$) zeigte.

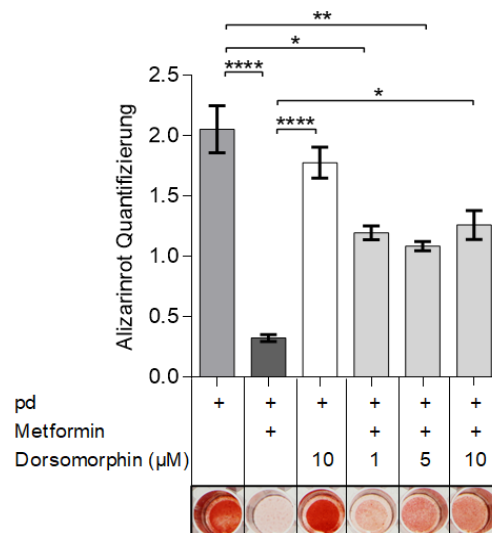


Abb. 35: Dorsomorphin antagonisiert dosisabhängig die anti-degenerative Wirkung von Metformin

Dargestellt ist die Quantifizierung der Kalziumablagerungen der mit Alizarinrot gefärbten valvulären Interstitialzellen (VICs), die unter pd-Bedingungen mit Metformin und/oder Dorsomorphin (1, 5 und 10 Mikromolar (μM)) für sieben Tage kultiviert wurden (oben, $n = 10 - 12$). Unterhalb der Legende ist ein Ausschnitt der angefärbten Wells auf einer 48-Well-Platte gezeigt, wobei die rote Farbe die Kalziumablagerungen darstellt. Gezeigt ist ein exemplarisches n mit einem Well pro Bedingung (unten). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

4.8 Der mTOR-Signalweg

Im nächsten Schritt wurde das durch AMPK gehemmte Protein mTOR näher beleuchtet. Mittels Western Blot wurden VIC-Kulturen unter Kontrollbedingungen (10 % Kulturmedium) und Metformin-Behandlung für 1, 3 und 6 Stunden kultiviert und die Proteinexpression von mTOR und dessen Phosphorylierung (p-mTOR) ermittelt. Dabei zeigte sich in diesem Kurzzeitversuch keine signifikante Hemmung der mTOR-Phosphorylierung (Abb. 36A + B).

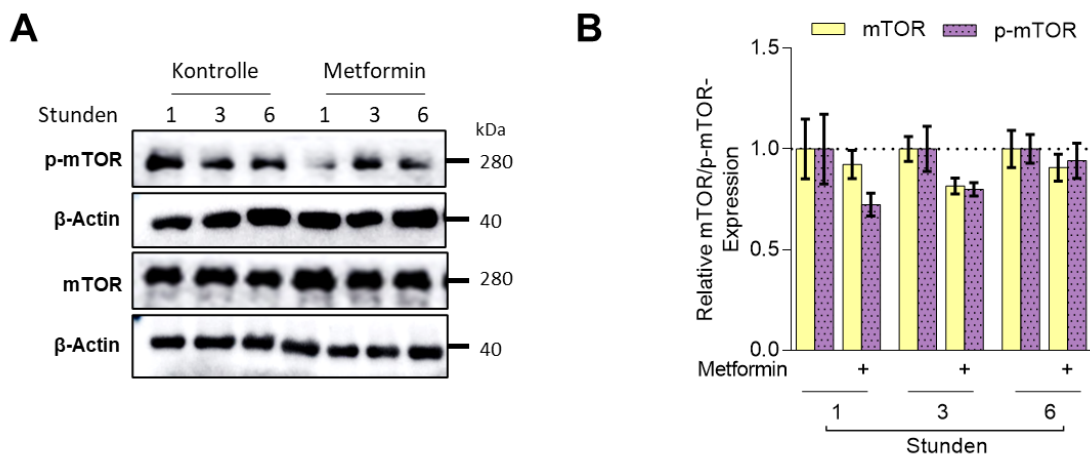


Abb. 36: Kurzzeit mTOR-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen und Metformin-Behandlung in VICs

Die *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Phosphorylierung in valvulären Interstitialzellen (VICs) nach Behandlung mit 10 % Kulturmedium (Kontrolle) und Metformin-Behandlung zu den Zeitpunkten 1, 3 und 6 Stunden wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. **A** Repräsentative Aufnahmen der Western Blot-Banden von mTOR und dem phosphorylierten *mechanistic target of rapamycin* (p-mTOR) sowie der jeweils mitgeführten β -Actin-Kontrolle für ein n. **B** Semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung der relativen mTOR-Phosphorylierung für die 10 % Kontrolle sowie Metformin-Behandlung zu den Zeitpunkten 1, 3 und 6 Stunden, normiert auf die β -Actin-Kontrolle (n = 6). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

5 Diskussion

Die Erkrankung CAVD stellt in der westlichen Welt eine große medizinische Belastung dar, dennoch gibt es keine pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten [8]. Das orale Antidiabetikum Metformin wurde zuletzt in Zusammenhang mit der Protektion gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen gebracht [40, 41] und zeigte in neueren Studien auch in Bezug auf CAVD einen schützenden Effekt [42, 43]. Bis heute fehlen jedoch noch umfassende Daten zu den Effekten von Metformin auf AK, um eine zukünftige Übertragbarkeit in die klinische Praxis zu ermöglichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Forschungsarbeit zeigen, dass Metformin gegen organische phosphatinduzierte Degeneration nicht nur in VIC-Kulturen, sondern auch in ganzen AK im Rahmen eines Aortenklappenspannmodells *in vitro* schützt. Metformin moduliert dabei die myofibroblastische und osteoblastische Differenzierung und erhält die Integrität der EZM. Mechanistisch konnte der AMPK-Signalweg als Schlüsselstelle der anti-degenerativen Wirkung von Metformin bestätigt werden.

5.1 Aspekte der Kulturmodelle und Kulturbedingungen

CAVD beruht auf einem aktiven, multifaktoriellen Prozess, der zu Veränderungen der EZM führt [7, 11]. Dennoch sind die bisherigen Daten aus der Literatur vor allem auf 2D Zellkulturen oder künstlich generierten 3D-Modellen aus VICs basierend, die in Bezug auf die physiologischen und pathologischen Mechanismen Limitationen aufweisen [69, 70]. Explantierte kalzifizierte AK von Patientinnen und Patienten, die sich einem Aortenklappenersatz oder einer Herztransplantation unterziehen, können zwar genutzt werden, aber Krankheitspathologien und Behandlungen können nicht bis zum Endstadium exploriert werden [20]. Experimente mit tierischem Material sind aktuell die einzige Möglichkeit, potenzielle therapeutische Behandlungen zur Verhinderung des Fortschreitens von CAVD über einen längeren Zeitraum zu untersuchen [69, 71, 72]. Das kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entwickelte 3D-Aortenklappenspannmodell [21, 22] stellt eine geeignete Option zur Untersuchung verschiedener therapeutischer Ansätze von CAVD dar, da es die natürlichen Bedingungen besser nachahmen kann und eine Kultivierung über einen langen Zeitraum möglich macht. Für diese Forschungsarbeit wurden zur umfassenden Untersuchung der induzierten Degeneration sowohl VIC-Kulturen als auch AK-Kulturen aus ovinem Material *in vitro* genutzt.

In der Vergangenheit wurde die Bedeutung der Kulturbedingungen für die Degeneration und Verkalkung von humanen VICs hervorgehoben und eine Standardisierung dieser gefordert [23]. Die humanen VICs wiesen dabei Unterschiede in Bezug auf anorganische

und organische phosphatreiche Kulturmedien auf, was Auswirkungen auf die Degeneration und erzielten Ergebnisse gezeigt hat [23]. Dies scheint besonders wichtig, um passagenabhängige Schwankungen in *in vitro* Modellen zu verringern [23]. Für diese Forschungsarbeit wurde mit Einsatz des pd-Mediums, bestehend aus β -GP als Quelle für organisches Phosphat und CaCl_2 als Kalziumlieferant, die Induktion einer ALP-bedingten Degeneration und osteogenen Verschiebung erzielt [21-25]. Das pk-Medium mit NaH_2PO_4 als anorganischer Phosphatlieferant wurde damit verglichen, welches eine ALP-unabhängige Kalzifizierung auslöst [21, 23, 26, 27].

Nach Etablierung der Kulturbedingungen in den AK-Kulturen im Aortenklappenspannmodell wurde die Bedingung pd genutzt, um die Effekte von Metformin zu untersuchen. Die Kulturbedingung wurde gewählt, da in Bezug auf durch organisches Phosphat ausgelöste Degeneration noch eine Wissenslücke besteht. Dies ist besonders wichtig, weil organische Phosphate aktiv zur Verkalkung von AK beitragen, indem sie nicht nur anorganisches Phosphat bereitstellen, sondern auch Hotspots für Kalziumablagerungen bereitstellen, die die Versteifung von Herzklappen fördern [73]. Die Progression von CAVD wird also direkt von der Doppelrolle der organischen Phosphate beeinflusst, die sowohl als Quelle als auch als Katalysator für Kalziumanreicherungen fungieren. Die gezielte Beeinflussung dieser Doppelrolle könnte einen neuen therapeutischen Ansatz für CAVD darstellen und war deshalb für diese Promotionsarbeit von Bedeutung.

5.2 Metformin hemmt die Degeneration von VICs und AK

In den für diese Forschungsarbeit durchgeführten Experimenten präsentiert sich das orale Antidiabetikum Metformin als potenter Inhibitor der durch pd-Bedingungen ausgelösten Degeneration sowohl in VICs als auch in AK. Dieser Effekt konnte in AK bis zu einem Zeitpunkt von 56 Tagen nachgewiesen werden und spiegelt dabei einen modulierten Langzeiteffekt von CAVD wider.

Initiation und Progression der CAVD können mit einer Hochregulierung der *ACTA-2*-Expression und einer Herunterregulierung von *VIM* einhergehen, was die Differenzierung von VICs in aktivierte, myofibroblastische Phänotypen widerspiegeln kann [16, 18, 74]. Die hier aufgeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Metformin in der Lage ist, die myofibroblastische Differenzierung in VICs und AK zu modulieren, wobei dabei die Differenzierung auf Gen- und Proteinebene nicht einheitlich ausfällt. Darüber hinaus unterstreichen die verringerte Proliferationsrate und die konstant verringerte LDH-Sekretion als Zeichen der Zytotoxizität unter Metformin-Behandlung die schützenden Eigenschaften sowohl in VICs als auch in AK [17]. Neben der myofibroblastischen Differenzierung trägt auch die osteoblastische Differenzierung zur

Progression von CAVD bei [16]. Metformin-Behandlung milderte die frühe osteoblastische Differenzierung, was sich in einer verringerten ALP-Aktivität zeigte, und verringerte die Biomineralisierung in VICs und AK. ALP wird in Gegenwart von organischem Phosphat hochreguliert und spielt eine zentrale Rolle im Verkalkungsprozess, während eine erhöhte ALP-Aktivität auf eine frühe osteoblastische Differenzierung hinweist [16, 19, 75]. Zu den komplexen Mechanismen, die der osteogenen Differenzierung zugrunde liegen, gehören auch die Hochregulierung von Genexpressionsmarkern wie *BMP-2*, *RUNX2* und die Modulation von *OPN* und *OCAL* [16, 17, 19, 76, 77]. Eine Studie von En *et al.* hatte vor Kurzem darauf hingedeutet, dass Metformin die durch anorganisches Phosphat induzierte osteoblastische Differenzierung hemmt, indem es *BMP-2* und *OPN* auf Proteinebene verringert [42]. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde die Genexpression dieser osteogenen Differenzierungsmarker in Gegenwart von organischem Phosphat untersucht, welche sich nicht einheitlich moduliert zeigte: Es wurde eine umgekehrte Regulation von *OPN* mit einer Hochregulierung in VICs und einer Herunterregulierung in AK durch Metformin-Behandlung beobachtet. Die *OCAL*-Genexpression ist in AK unter pd-Bedingungen, die mit Metformin behandelt wurden, erhöht, während neuere Studien widersprüchliche Ergebnisse zur Regulation von Osteocalcin durch Metformin gezeigt haben [78-81]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit von 3D-Modellen, da das Vorhandensein von EZM-Komponenten und die damit unterschiedlichen biomechanischen Bedingungen diese Marker stark beeinflussen können [82]. Außerdem könnten die Expression dieser Marker zeit- und stadienabhängig sein. Diese Aspekte machen es schwierig, die Genexpression von Markern wie *BMP-2*, *OPN*, *OCAL* und *RUNX2* direkt mit einer bestimmten pathologischen Beobachtung in Verbindung zu bringen.

Die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins TGF- β 1, einem wichtigen Regulator bei degenerativen Prozessen und der Anpassung an Gewebeschäden [83, 84], wurde durch Metformin einheitlich verringert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Liu *et al.*, die Metformin als Konditionierer der TGF- β 1-induzierten osteoblastischen Differenzierung in humanen Aorten-VICs gezeigt hat [85].

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse einen potenten Effekt der Degenerationshemmung von VICs und AK durch Metformin *in vitro* in Gegenwart von organischem Phosphat, eine Modulation der myofibroblastischen und frühen osteogenen Differenzierung, sowie eine uneinheitliche Regulation der Degenerationsmarker auf RNA-Ebene.

5.3 Metformin schützt die EZM

Metformin zeigte in den durchgeführten Experimenten einen schützenden Effekt auf die Integrität der EZM. CAVD basiert auf einer komplexen Pathogenese, bei der die Interaktion und Kommunikation der vorhandenen Zelltypen und der umgebenden EZM eine große Rolle spielt [16, 17, 86]. Daher wird der Rolle der EZM eine große Relevanz zugesprochen, welche bei der Nutzung von einzig 2D-Zellmonokulturen durch das Fehlen einer physiologischen EZM vernachlässigt wird [20, 87]. Das genutzte 3D-Aortenklappenspannmodell bietet eine EZM-Struktur und ermöglicht dadurch strukturelle Analysen [21, 22]. Neben strukturellen Kriterien ist es etabliert, dass MMPs bei CAVD hochreguliert sind und degenerative Prozesse beschleunigen können, indem sie den kalzifizierenden und fibrotischen Umbau der EZM fördern [88, 89]. Insbesondere MMP-9 wird von aktivierten VICs sezerniert und wurde bei der Aortenklappenstenose als vermehrt nachgewiesen [88, 89]. In dieser Forschungsarbeit bewirkte eine Metformin-Behandlung sowohl in VICs als auch AK eine verringerte *MMP-9* Expression auf RNA-Ebene, was den protektiven Effekt von Metformin auf die EZM unterstützt. Interessanterweise war die *MMP-2*-Expression in VICs durch Metformin unverändert, während sie in AK hochreguliert war. Obwohl die Hochregulierung von *MMP-2* zunächst auf einen pro-degenerativen Stimulus hindeuten könnte, könnte dies auch als Zeichen der komplexen Natur der CAVD-Pathogenese gewertet werden. In der Literatur wird zudem von segelspezifischen Unterschieden in Bezug auf das Verkalkungspotential von Aortenklappen berichtet [90], welche nicht in diese Forschungsarbeit mit einbezogen worden sind.

Die protektiven Eigenschaften von Metformin auf den EZM-Umbau werden durch die Modulation der Kollagenexpression auf RNA-Ebene weiter unterstützt [12]. Die Behandlung mit Metformin führte zu einer konstant verringerten Expression der untersuchten Kollagene in VICs. In AK konnte zuletzt von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine pd-Behandlung von AK über 28 Tage die Genexpression von Kollagenen verstärkt [21]. In der vorliegenden Arbeit verringerte die Behandlung mit Metformin die Expression von *COL5A1* in AK, während die *COL1A1*-Expression erhöht war. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bis zu etwa 70 % der physiologischen Aortenklappen-Kollagenmatrix aus *COL1A1* besteht [91, 92] und damit eine erhöhte Expression in AK nach Metformin-Behandlung erklärt werden könnte. Jüngste Hinweise deuten zudem auf geschlechtsspezifische Unterschiede im fibrokalzifizierenden EZM-Umbau hin [93]. Dabei wurde bei männlichen VICs ein verstärkter myofibroblastischer Umbau festgestellt, während weibliche VICs eine höhere Kollagenproduktion, MMP-Levels und Stoffwechselaktivität aufwiesen. Dies ist relevant, da in dieser Arbeit keine geschlechtsspezifischen Auswirkungen und Unterschiede untersucht worden sind.

Darüber hinaus zeigen die histologischen Veränderungen über 56 Kulturtage, dass Metformin die Integrität der EZM schützt, wobei es sich um einen fortlaufenden Prozess mit Hemmung der Desorganisation handelt.

5.4 Der AMPK-Signalweg

In dieser Forschungsarbeit wurden auch die durch Metformin induzierten Signalwege untersucht. Metformin aktiviert AMPK, ein Enzym, welches Zellwachstum und Autophagie koordiniert [32, 44]. Die Literatur legt nahe, dass Metformin die Verkalkung von VICs in einer AMPK-anhängigen Weise aufhält und die osteoblastische Differenzierung durch AMPK-Aktivierung mildert [42, 85]. In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung mit Metformin unter pd-Bedingungen zu einer Induktion der AMPK-Phosphorylierung sowohl in VICs als auch in AK. In der Behandlung mit dem AMPK-Induktor AICAR und dem AMPK-Inhibitor Dorsomorphin konnte der AMPK-Signalweg als Schlüsselstelle im anti-degenerativen Effekt von Metformin in VICs bestätigt werden, was einhergeht mit den Ergebnissen von En *et al.* in humanen aortalen VICs unter anorganischer phosphatinduzierter Kalzifizierung [42]. Tatsächlich induziert Metformin über die AMPK-Phosphorylierung mehrere Stoffwechselwege, darunter Autophagie und Zellwachstum durch die Hemmung von mTOR [44, 46, 47]. In dieser Forschungsarbeit konnte im Kurzzeitversuch über 6 Stunden keine signifikante Hemmung von mTOR durch Metformin-Behandlung nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass die Dauer der Behandlung hier eine Rolle spielen könnte. In embryonalen Fibroblasten von Mäusen konnte beispielsweise eine Inhibition von mTORC1 durch Metformin in einer Konzentration von 10 mM nach 24 Stunden Behandlung nachgewiesen werden, welche sich als AMPK-unabhängig erwies [94]. Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass Metformin-induzierte Autophagie die Verkalkung von aus Ratten gewonnenen VICs mildert [43]. Der Effekt von Metformin-induzierter Autophagie auf ganze AK ist jedoch noch nicht hinreichend erforscht. Die hier dargestellten Ergebnisse unterstreichen zusammen mit den oben erwähnten, bereits veröffentlichten Daten die vielfältigen und potenziell vorteilhaften Wirkmechanismen von Metformin, die seine Verwendung als Therapeutikum für CAVD begünstigen könnten. Nichtsdestotrotz sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine Translation der Ergebnisse zu ermöglichen.

5.5 Limitationen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit entstammen *in vitro* Experimenten, sodass die Übertragung auf eine klinische Anwendung begrenzt ist. Hierbei gilt zu berücksichtigen,

dass sich die 2D-Experimente auf VIC-Monokulturen konzentrieren und die Komplexität des interzellulären Zusammenspiels zwischen VICs und anderen Zelltypen, insbesondere VECs, nicht berücksichtigt wird. Obwohl dies durch Einbeziehung des 3D-Aortenklappenspannmodells adressiert wurde, wird in diesem Modell eine passive Spannung ohne dynamische Scherbelastung auf das AK-Gewebe ausgeübt. Damit fehlt der Einfluss der hämodynamischen Kräfte in einem physiologischen Blutsystem. Darüber hinaus wurde die Degeneration durch spezifische Kulturbedingungen induziert, die die pathophysiologischen *in vivo* Bedingungen, die zu CAVD führen, nicht vollständig widerspiegeln, sondern nur modellieren können. Auch wenn diese Forschungsarbeit relevante Erkenntnisse liefert, müssen *in vivo* Studien, insbesondere Tierstudien, den Weg zur klinischen Umsetzung bahnen. Dies ist unabdingbar, um unser Verständnis von Metformin und seinem potenziellen Nutzen für die Behandlung von CAVD zu verbessern.

Um Metformin als Therapeutikum für CAVD in der klinischen Routine einzusetzen, sind weitere Schritte erforderlich: Die protektive Wirkung von Metformin sollte *in vivo* unter Verwendung von realitätsnahen CAVD-Tiermodellen zunächst bestätigt werden. Darüber hinaus sollten mögliche Nebenwirkungen adressiert und eine optimale Strategie für die Metformin-Verabreichung festgelegt werden. Dabei sind vor allem die Dauer und der Zeitpunkt, die Dosierung sowie der Applikationsweg von großer Bedeutung. Soweit präklinische Studien die Wirksamkeit und Sicherheit belegen, sollten in klinischen Studien die Vorteile einer Metformin-Behandlung bei CAVD bewertet werden und es sollte erörtert werden, welche Patientinnen und Patienten genau davon profitieren könnten.

Um die protektive Wirkung von Metformin auf Aortenklappen besser zu beurteilen, sollten außerdem weitere Signalwege, insbesondere in Richtung mTOR/p-mTOR, sowie Autophagie, in 3D-Modellen und final *in vivo* untersucht werden.

5.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte dem Antidiabetikum Metformin in ovinen VICs und ganzen AK unter organischer phosphatinduzierter Degeneration *in vitro* ein anti-degenerativer Effekt nachgewiesen werden. Über die Modulation der myofibroblastischen und osteoblastischen Differenzierung bewirkt Metformin protektive Effekte und schützt die EZM. Der AMPK-Signalweg imponiert als Schlüsselstelle des protektiven Effektes von Metformin. Die vorliegenden Ergebnisse ebnen den Weg für weitere Untersuchungen zur Implementierung von Metformin als möglichen therapeutischen Ansatz in der Behandlung von CAVD.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Bruford, E. A. et al. Guidelines for human gene nomenclature. *Nat Genet* **52**, 754-758, doi:10.1038/s41588-020-0669-3 (2020).
2. *Gene/Protein Nomenclature Guidelines and Requirements*, https://academic.oup.com/molehr/pages/Gene_And_Protein_Nomenclature.
Zugriffsdatum: 01.07.2025
3. Donato, M., Ferri, N., Lupo, M. G., Faggin, E. & Rattazzi, M. Current Evidence and Future Perspectives on Pharmacological Treatment of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21218263 (2020).
4. Lindman, B. R. et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16006, doi:10.1038/nrdp.2016.6 (2016).
5. Coffey, S., Cox, B. & Williams, M. J. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* **63**, 2852-2861, doi:10.1016/j.jacc.2014.04.018 (2014).
6. Shu, S. et al. Alerting trends in epidemiology for calcific aortic valve disease, 1990-2019: An age-period-cohort analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes* **9**, 459-473, doi:10.1093/ehjqcco/qcad018 (2023).
7. Yutzey, K. E. et al. Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 2387-2393, doi:10.1161/ATVBAHA.114.302523 (2014).
8. Vahanian, A. et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J* **43**, 561-632, doi:10.1093/eurheartj/ehab395 (2022).
9. Kraler, S., Blaser, M. C., Aikawa, E., Camici, G. G. & Luscher, T. F. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy. *Eur Heart J* **43**, 683-697, doi:10.1093/eurheartj/ehab757 (2022).
10. Lutz, M. et al. Differences in the presentation and management of patients with severe aortic stenosis in different European centres. *Open Heart* **7**, doi:10.1136/openhrt-2020-001345 (2020).

11. Peeters, F. et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment. *Eur Heart J* **39**, 2618-2624, doi:10.1093/eurheartj/ehx653 (2018).
12. Rajamannan, N. M. et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* **124**, 1783-1791, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767 (2011).
13. O'Brien, K. D. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1721-1728, doi:10.1161/01.ATV.0000227513.13697.ac (2006).
14. Hinton, R. B. & Yutzey, K. E. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol* **73**, 29-46, doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142145 (2011).
15. Freeman, R. V. & Otto, C. M. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* **111**, 3316-3326, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738 (2005).
16. Rutkovskiy, A. et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc* **6**, doi:10.1161/JAHA.117.006339 (2017).
17. Liu, A. C., Joag, V. R. & Gotlieb, A. I. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* **171**, 1407-1418, doi:10.2353/ajpath.2007.070251 (2007).
18. Rabkin-Aikawa, E., Farber, M., Aikawa, M. & Schoen, F. J. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis* **13**, 841-847 (2004).
19. Monzack, E. L. & Masters, K. S. Can valvular interstitial cells become true osteoblasts? A side-by-side comparison. *J Heart Valve Dis* **20**, 449-463 (2011).
20. Weber, A. et al. Enzymes of the purinergic signaling system exhibit diverse effects on the degeneration of valvular interstitial cells in a 3-D microenvironment. *FASEB J* **32**, 4356-4369, doi:10.1096/fj.201701326R (2018).

21. Weber, A. et al. Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitial Cells. *Biomedicines* **9**, 474 (2021).
22. Jenke, A. et al. Transforming growth factor-beta1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **319**, H1123-H1141, doi:10.1152/ajpheart.00651.2019 (2020).
23. Goto, S. et al. Standardization of Human Calcific Aortic Valve Disease in vitro Modeling Reveals Passage-Dependent Calcification. *Front Cardiovasc Med* **6**, 49, doi:10.3389/fcvm.2019.00049 (2019).
24. Bogdanova, M. et al. Inflammation and Mechanical Stress Stimulate Osteogenic Differentiation of Human Aortic Valve Interstitial Cells. *Front Physiol* **9**, 1635, doi:10.3389/fphys.2018.01635 (2018).
25. Chen, J. H., Yip, C. Y., Sone, E. D. & Simmons, C. A. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol* **174**, 1109-1119, doi:10.2353/ajpath.2009.080750 (2009).
26. Bouchareb, R. et al. Autotaxin Derived From Lipoprotein(a) and Valve Interstitial Cells Promotes Inflammation and Mineralization of the Aortic Valve. *Circulation* **132**, 677-690, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016757 (2015).
27. Rogers, M. A. et al. Dynamin-Related Protein 1 Inhibition Attenuates Cardiovascular Calcification in the Presence of Oxidative Stress. *Circ Res* **121**, 220-233, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.310293 (2017).
28. ElSayed, N. A. et al. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care* **46**, S140-S157, doi:10.2337/dc23-S009 (2023).
29. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M. & Viollet, B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* **20**, 953-966, doi:10.1016/j.cmet.2014.09.018 (2014).
30. Rena, G., Hardie, D. G. & Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **60**, 1577-1585, doi:10.1007/s00125-017-4342-z (2017).

31. Wang, D. S. et al. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 510-515, doi:10.1124/jpet.102.034140 (2002).
32. Hawley, S. A. et al. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* **11**, 554-565, doi:10.1016/j.cmet.2010.04.001 (2010).
33. Miller, R. A. et al. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* **494**, 256-260, doi:10.1038/nature11808 (2013).
34. Luo, F. et al. Metformin in patients with and without diabetes: a paradigm shift in cardiovascular disease management. *Cardiovasc Diabetol* **18**, 54, doi:10.1186/s12933-019-0860-y (2019).
35. Bai, B. & Chen, H. Metformin: A Novel Weapon Against Inflammation. *Front Pharmacol* **12**, 622262, doi:10.3389/fphar.2021.622262 (2021).
36. Soraya, H. et al. Chronic treatment with metformin suppresses toll-like receptor 4 signaling and attenuates left ventricular dysfunction following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol* **737**, 77-84, doi:10.1016/j.ejphar.2014.05.003 (2014).
37. Dziubak, A., Wojcicka, G., Wojtak, A. & Beltowski, J. Metabolic Effects of Metformin in the Failing Heart. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19102869 (2018).
38. Mary, A. et al. Association between metformin use and below-the-knee arterial calcification score in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* **16**, 24, doi:10.1186/s12933-017-0509-7 (2017).
39. Hua, Y. et al. Metformin and cancer hallmarks: shedding new lights on therapeutic repurposing. *J Transl Med* **21**, 403, doi:10.1186/s12967-023-04263-8 (2023).
40. Petrie, J. R. Metformin beyond type 2 diabetes: Emerging and potential new indications. *Diabetes Obes Metab* **26 Suppl 3**, 31-41, doi:10.1111/dom.15756 (2024).

41. Driver, C. et al. Cardioprotective Effects of Metformin. *J Cardiovasc Pharmacol* **72**, 121-127, doi:10.1097/FJC.0000000000000599 (2018).
42. En, Q., Zeping, H., Yuetang, W., Xu, W. & Wei, W. Metformin alleviates the calcification of aortic valve interstitial cells through activating the PI3K/AKT pathway in an AMPK dependent way. *Mol Med* **27**, 156, doi:10.1186/s10020-021-00416-x (2021).
43. Phadwal, K., Tan, X., Koo, E., Zhu, D. & MacRae, V. E. Metformin ameliorates valve interstitial cell calcification by promoting autophagic flux. *Sci Rep* **13**, 21435, doi:10.1038/s41598-023-47774-6 (2023).
44. Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **13**, 1016-1023, doi:10.1038/ncb2329 (2011).
45. Hardie, D. G. AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* **20**, 939-952, doi:10.1016/j.cmet.2014.09.013 (2014).
46. Zhang, C. S. et al. Metformin Activates AMPK through the Lysosomal Pathway. *Cell Metab* **24**, 521-522, doi:10.1016/j.cmet.2016.09.003 (2016).
47. Howell, J. J. et al. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab* **25**, 463-471, doi:10.1016/j.cmet.2016.12.009 (2017).
48. Sciarretta, S., Forte, M., Frati, G. & Sadoshima, J. The complex network of mTOR signalling in the heart. *Cardiovasc Res* **118**, 424-439, doi:10.1093/cvr/cvab033 (2022).
49. Jeon, S. M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* **48**, e245, doi:10.1038/emm.2016.81 (2016).
50. Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 251-262, doi:10.1038/nrm3311 (2012).
51. Zhou, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**, 1167-1174, doi:10.1172/JCI13505 (2001).

52. Sinnett, S. E. & Brenman, J. E. Past strategies and future directions for identifying AMP-activated protein kinase (AMPK) modulators. *Pharmacol Ther* **143**, 111-118, doi:10.1016/j.pharmthera.2014.02.008 (2014).
53. Yu, P. B. et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* **4**, 33-41, doi:10.1038/nchembio.2007.54 (2008).
54. Puchtler, H., Meloy, S. N. & Terry, M. S. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem* **17**, 110-124, doi:10.1177/17.2.110 (1969).
55. De Jong, A. S., Van Kessel-van Vark, M. & Raap, A. K. Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. *Histochem J* **17**, 1119-1130, doi:10.1007/BF01002537 (1985).
56. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675, doi:10.1038/nmeth.2089 (2012).
57. Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, doi:10.1101/pdb.prot095497 (2018).
58. Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7 (1985).
59. Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 815-820, doi:10.1016/0006-291x(67)90391-9 (1967).
60. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, doi:10.1038/227680a0 (1970).
61. Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203, doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5 (1981).

62. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354, doi:10.1073/pnas.76.9.4350 (1979).
63. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
64. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. & Zeller, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* **2008**, pdb prot4986, doi:10.1101/pdb.prot4986 (2008).
65. Movat, H. Z. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol* **60**, 289-295 (1955).
66. Russell, H. K., Jr. A modification of Movat's pentachrome stain. *Arch Pathol* **94**, 187-191 (1972).
67. Meloan, S. N. & Puchtler, H. Chemical Mechanisms of Staining Methods: Von Kossa's Technique: What von Kossa Really Wrote and a Modified Reaction for Selective Demonstration of Inorganic Phosphates. *Journal of Histotechnology* **8**, 11-13, doi:10.1179/his.1985.8.1.11 (1985).
68. Wilson, W. D. et al. DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* **29**, 8452-8461, doi:10.1021/bi00488a036 (1990).
69. Bowler, M. A. & Merryman, W. D. In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system. *Cardiovasc Pathol* **24**, 1-10, doi:10.1016/j.carpath.2014.08.003 (2015).
70. Duval, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* **32**, 266-277, doi:10.1152/physiol.00036.2016 (2017).
71. Sider, K. L., Blaser, M. C. & Simmons, C. A. Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflam* **2011**, 364310, doi:10.4061/2011/364310 (2011).
72. Miller, J. D., Weiss, R. M. & Heistad, D. D. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res* **108**, 1392-1412, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234138 (2011).

73. Back, M. & Michel, J. B. From organic and inorganic phosphates to valvular and vascular calcifications. *Cardiovasc Res* **117**, 2016-2029, doi:10.1093/cvr/cvab038 (2021).
74. Dweck, M. R., Boon, N. A. & Newby, D. E. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* **60**, 1854-1863, doi:10.1016/j.jacc.2012.02.093 (2012).
75. Mathieu, P. et al. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *Journal of Heart Valve Disease* **14**, 353-357 (2005).
76. Scatena, M., Liaw, L. & Giachelli, C. M. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2302-2309, doi:10.1161/ATVBAHA.107.144824 (2007).
77. Lok, Z. S. Y. & Lyle, A. N. Osteopontin in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 613-622, doi:10.1161/ATVBAHA.118.311577 (2019).
78. Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M. & Sugimoto, T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Bioph Res Co* **375**, 414-419, doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.034 (2008).
79. Liu, Q. et al. Metformin Alleviates the Bone Loss Induced by Ketogenic Diet: An In Vivo Study in Mice. *Calcif Tissue Int* **104**, 59-69, doi:10.1007/s00223-018-0468-3 (2019).
80. Phadwal, K. et al. Metformin protects against vascular calcification through the selective degradation of Runx2 by the p62 autophagy receptor. *J Cell Physiol* **237**, 4303-4316, doi:10.1002/jcp.30887 (2022).
81. Cao, X. et al. Metformin inhibits vascular calcification in female rat aortic smooth muscle cells via the AMPK-eNOS-NO pathway. *Endocrinology* **154**, 3680-3689, doi:10.1210/en.2013-1002 (2013).
82. Selig, J. I. et al. Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22136976 (2021).

83. Toma, I. & McCaffrey, T. A. Transforming growth factor-beta and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res* **347**, 155-175, doi:10.1007/s00441-011-1189-3 (2012).
84. Jian, B., Narula, N., Li, Q. Y., Mohler, E. R., 3rd & Levy, R. J. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* **75**, 457-465; discussion 465-456, doi:10.1016/s0003-4975(02)04312-6 (2003).
85. Liu, F. et al. Metformin ameliorates TGF-beta1-induced osteoblastic differentiation of human aortic valve interstitial cells by inhibiting beta-catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **500**, 710-716, doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.141 (2018).
86. Hjortnaes, J. et al. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis* **242**, 251-260, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.008 (2015).
87. Kook, Y. M., Jeong, Y., Lee, K. & Koh, W. G. Design of biomimetic cellular scaffolds for co-culture system and their application. *J Tissue Eng* **8**, 2041731417724640, doi:10.1177/2041731417724640 (2017).
88. Fondard, O. et al. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J* **26**, 1333-1341, doi:10.1093/eurheartj/ehi248 (2005).
89. Perrotta, I., Sciangula, A., Aquila, S. & Mazzulla, S. Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Calcified Human Aortic Valves: A Histopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **24**, 128-137, doi:10.1097/PAI.000000000000144 (2016).
90. Masjedi, S., Amarnath, A., Baily, K. M. & Ferdous, Z. Comparison of calcification potential of valvular interstitial cells isolated from individual aortic valve cusps. *Cardiovasc Pathol* **25**, 185-194, doi:10.1016/j.carpath.2015.12.002 (2016).
91. Schoen, F. J. Aortic valve structure-function correlations: Role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *Journal of Heart Valve Disease* **6**, 1-6 (1997).

92. Eriksen, H. A. et al. Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* **189**, 91-98, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.034 (2006).
93. Simon, L. R., Scott, A. J., Figueroa Rios, L., Zembles, J. & Masters, K. S. Cellular-scale sex differences in extracellular matrix remodeling by valvular interstitial cells. *Heart Vessels* **38**, 122-130, doi:10.1007/s00380-022-02164-2 (2023).
94. Kalender, A. et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* **11**, 390-401, doi:10.1016/j.cmet.2010.03.014 (2010).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die meine Promotion maßgeblich unterstützt und ermöglicht haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari bedanken. Nicht nur für die Ermöglichung des Promotionsthemas und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Experimentellen Chirurgie der Klinik für Herzchirurgie, sondern auch für die persönliche Förderung und Unterstützung, die maßgeblich zu meiner Entwicklung und der Prägung meines Wunsches Herzchirurgin zu werden, beigetragen haben. Meinen tiefen Dank möchte ich auch für die Unterstützung meiner über diese Promotionsarbeit hinausreichenden wissenschaftlichen und klinischen Entwicklung sowie meines prägenden Forschungsaufenthaltes in Kanada aussprechen.

Außerdem möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Lichtenberg dafür danken, dass ich meine Promotionsarbeit in der Klinik für Herzchirurgie durchführen durfte, und ich bin der gesamten Klinik für Herzchirurgie für die konstruktive Kritik sowie hilfreichen Anregungen zum Dank verpflichtet.

Herrn Dr. rer. nat. Andreas Weber möchte ich für die Initiation des Forschungsthemas sowie die damit verbundene Begeisterung und Förderung, sowie die Einarbeitung und Unterstützung im Labor, danken.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. rer. nat. Vera Schmidt für die Einarbeitung in die Methodik und die unzähligen gemeinsamen Stunden im Labor danken. Die Zeit im Labor hätte ich mir ohne sie nicht vorstellen können.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth für die konstruktive Kritik und die hilfreichen Anregungen, ohne die die Fertigstellung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke darüber hinaus dem gesamten Team der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors. Danke für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, unterhaltsame Mittagspausen, Sommerfeste und Jahrestagungen.

Abschließend gilt mein besonderer Dank den Menschen, die meinen täglichen Rückhalt bilden: Meiner Familie sowie meinen Freundinnen und Freunden. Ich danke meinen Eltern Gerlind und Hinnerk für die bedingungslose Unterstützung, die fortwährende Ermutigung und das liebevolle Verständnis. Meinem Bruder Gerrit danke ich dafür, dass er immer ein Vorbild für mich ist und mich in all meinen Vorhaben unterstützt. Danken möchte ich auch meinen Freundinnen und Freunden für die lieben Worte und Gedanken, die mich immer unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Freundin Milla für die fortwährende Motivation und die verständnisvolle Geduld. Ohne Eure Hilfe und Liebe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Danke!