

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

**Einfluss eines siRNA-vermittelten Knockdowns von *Foxo1* und
Mtor in valvulären Interstitialzellen unter diabetischen
Stoffwechselbedingungen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Felix Alexander Kraft

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Timm Joachim Filler

Für meine Großmutter, die mir von frühester Erinnerung an eine Begeisterung für die Natur, das Leben in ihr und ihre Geheimnisse vermittelt hat. Ohne sie hätte ich diesen Lebensweg womöglich nicht eingeschlagen und diese Arbeit wäre nie entstanden.

I. Zusammenfassung

Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD) ist die häufigste Herzklappenerkrankung weltweit und führt durch progressive Fibrosierung und Kalzifizierung der Aortenklappe zur symptomatischen Aortenklappenstenose. Der kardiovaskuläre Risikofaktor Diabetes ist hier mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Aortenklappenstenose assoziiert. Die Erforschung beteiligter Signalwege ist daher von großer Bedeutung.

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese der CAVD spielen valvuläre Interstitialzellen (VICs), die unter diabetischen Stoffwechselbedingungen eine Insulinresistenz entwickeln können. Darüber hinaus werden Insulin-sensitive mitogene Signalwege aktiviert, welche essenzielle zelluläre Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Metabolismus und Apoptose regulieren.

Von besonderer Bedeutung ist hierbei der dem Insulinrezeptor nachgeschaltete AKT/GSK α / β -Signalweg. In VICs werden unter anderem die Signalproteine FOXO1 und MTOR durch diabetische Bedingungen reguliert. *In vitro*-Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, dass die Insulinresistenz in VICs MTOR-vermittelt ist. Der Einfluss dieser mitogenen Signalwege im Kontext von CAVD und Diabetes ist bislang jedoch nur unzureichend charakterisiert.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle von FOXO1 und MTOR in VICs unter diabetischen Stoffwechselbedingungen wurden VICs aus Schafsherzklappen isoliert und in einer zweidimensionalen Zellkultur gehalten. Die gezielte Herunterregulation der *Foxo1* und *Mtor*-mRNA erfolgte mittels siRNA-Transfektion über eine Woche. Zur Simulation diabetischer Bedingungen wurden die Zellen entweder unter normoglykämischen (NG) oder hyperglykämischen (HG) und hyperinsulinämischen (HI) Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden Zelllysate und -überstände hinsichtlich der Expression CAVD-relevanter Marker auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Zusätzlich wurden Interaktionen von *Foxo1* und *Mtor* mit AKT sowie dem ERK1/2-Signalweg untersucht, um regulatorische Zusammenhänge innerhalb mitogener Signalwege in VICs zu charakterisieren.

Für den *Foxo1-Knockdown* (*siFoxO1*) konnte eine signifikante Herunterregulation des α SMA-Proteins sowie der *Acta2*- und *Colla1*-mRNA unter NG-Bedingungen erzielt werden. Unter HG+HI-Bedingungen führte *siFoxo1* zu einer signifikanten Hochregulation des MMP9- und MTOR-Proteins. Sowohl unter NG-, als auch HG+HI-Bedingungen wurden die *Has2*- und *Opn*-mRNA-Expression sowie die ERK2-Proteinexpression hochreguliert. Die *Dcn*-mRNA-Expression wurde unter beiden Bedingungen herunterreguliert. Die Expression der *Mmp2*-, *Mmp9*- und *Bgn*-mRNA, des ALP-, MMP2-, AKT- und ERK1-Proteins, der Kollagenhelices und der HA blieben unbeeinflusst.

Der *Mtor-Knockdown* (*siMtor*) führte zu einer signifikanten Hochregulation des ERK1-Proteins unter NG-Bedingungen, während die *Colla1*-mRNA signifikant herunterreguliert wurde. Unter HG+HI-Bedingungen kam es zu einer signifikanten Herunterregulation der *Mmp2*-mRNA-Expression. Sowohl unter NG-, als auch HG+HI-Bedingungen wurden das α SMA-, FOXO1- und ERK2-Protein signifikant hochreguliert, während die *Dcn*-mRNA-Expression signifikant herunterreguliert wurde. Die Expression der *Acta2*-, *Opn*-, *Colla1*-, *Mmp9*-, *Has2*- und *Bgn*-mRNA, des ALP-, MMP9- und AKT-Proteins, der Kollagenhelices und der HA blieben von *siMtor* unbeeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass *Foxo1* und *Mtor* Schlüsselmoleküle der CAVD beeinflussen, wobei sich ihre Effekte unter diabetischen Stoffwechselbedingungen teilweise unterscheiden. Eine eindeutige protektive oder schädigende Rolle lässt sich aufgrund der heterogenen Wirkungen derzeit nicht ableiten. Zudem weisen die Daten auf eine gegenseitige Regulation von *Foxo1* und *Mtor* sowie auf deren Interaktion mit dem ERK1/2-Signalweg hin, was auf komplexe Regulationsmechanismen zwischen den einzelnen mitogenen Signalwegen in VICs schließen lässt.

II. Abstract

Calcific aortic valve disease (CAVD) is the most common heart valve disease worldwide and leads to symptomatic aortic valve stenosis through progressive fibrosis and calcification of the aortic valve. The cardiovascular risk factor diabetes is associated with an increased risk of developing aortic valve stenosis. Research into the involved signaling pathways is therefore of great importance.

Valvular interstitial cells (VICs) play a central role in the pathogenesis of CAVD, as they can develop insulin resistance under diabetic metabolic conditions. In addition, insulin-sensitive mitogenic signaling pathways are activated, which regulate essential cellular processes such as growth, proliferation, metabolism, and apoptosis.

The AKT/GSK α/β signaling pathway downstream of the insulin receptor is of particular importance here. In VICs, the signaling proteins FOXO1 and MTOR, among others, are regulated by diabetic conditions. In vitro studies also suggest that insulin resistance in VICs is MTOR-mediated. However, the influence of these mitogenic signaling pathways in the context of CAVD and diabetes has not yet been sufficiently characterized.

To investigate the role of FOXO1 and MTOR in VICs under diabetic metabolic conditions in more detail, VICs were isolated from sheep heart valves and maintained in a two-dimensional cell culture. *Foxo1* and *Mtor* mRNA were specifically downregulated by siRNA transfection over a period of one week. To simulate diabetic conditions, the cells were cultured under either normoglycemic (NG) or hyperglycemic (HG) and hyperinsulinemic (HI) conditions. Cell lysates and supernatants were then analyzed for the expression of CAVD-relevant markers at the mRNA and protein levels. In addition, interactions of *Foxo1* and *Mtor* with AKT and the ERK1/2 signaling pathway were investigated to characterize regulatory relationships within mitogenic signaling pathways in VICs.

Foxo1 knockdown (si*Foxo1*) resulted in significant downregulation of α SMA protein as well as *Acta2* and *Colla1* mRNA under NG conditions. Under HG+HI conditions, si*Foxo1* led to a significant upregulation of MMP9 and MTOR protein. Under both NG and HG+HI conditions, *Has2* and *Opn* mRNA expression as well as ERK2 protein expression were upregulated. *Dcn* mRNA expression was downregulated under both conditions. The expression of *Mmp2*, *Mmp9* and *Bgn* mRNA, ALP, MMP2, AKT, and ERK1 protein, collagen helices, and HA remained unaffected.

Mtor knockdown (si*Mtor*) led to significant upregulation of ERK1 protein under NG conditions, while *Colla1* mRNA was significantly downregulated. Under HG+HI conditions, there was significant downregulation of *Mmp2* mRNA expression. Under both NG and HG+HI conditions, α SMA, FOXO1, and ERK2 protein were significantly upregulated, while *Dcn* mRNA expression was significantly downregulated. The expression of *Acta2*, *Opn*, *Colla1*, *Mmp9*, *Has2*, and *Bgn* mRNA, ALP, MMP9, and AKT protein, collagen helices, and HA remained unaffected by si*Mtor*.

The results show that *Foxo1* and *Mtor* influence key molecules of CAVD, although their effects differ somewhat under diabetic metabolic conditions. Due to the heterogeneous effects, it is currently not possible to deduce a clear protective or damaging role. In addition, the data indicate mutual regulation of *Foxo1* and *Mtor* as well as their interaction with the ERK1/2 signaling pathway, suggesting complex regulatory mechanisms between the individual mitogenic signaling pathways in VICs.

III. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ-	mikro-
- ²	Quadrat-
- ³	Kubik-
A	Ampere
ACTA2	<i>actin alpha 2</i>
AKT	Proteinkinase B, PKB
ALP	alkalische Phosphatase
ALPL	<i>alkaline phosphatase liver/bone/kidney</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BGN	<i>Biglykan</i>
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAVD	kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (engl. <i>calcific aortic valve disease</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary desoxyribonucleid acid</i>)
COL1A1	<i>collagen I type 1</i>
C _T	Schwellenzyklus (engl. <i>cycle threshold</i>)
DC	detergenzkompatibel (engl. <i>detergent compatible</i>)
DCN	Decorin
dest.	destilliert (<i>lat. destillata</i>)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> = DNA)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELN	<i>elastin</i>
EndMT	Endothelial-mesenchymale Transition
engl.	englisch
ERK1/2	<i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i> = FBS)
FoxO1	<i>forkhead box protein O1</i>
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT1	Glucosetransporter 1
GSKα/β	Glykogensynthase-Kinase α/β
H ₂ O	Wasser
HA	Hyaluronsäure (engl. <i>hyaluronic acid</i>)
HAS2	<i>hyaluronan synthase 2</i>
HCl	Salzsäure
HG	Hyperglykämie
HI	Hyperinsulinämie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>

IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG / IgM	Immunglobulin G / M
l	Liter
lat.	lateinisch
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	<i>low density lipoproteine</i>
LMNA	<i>lamin A/C</i>
m	Meter
M	molar
m-	milli-
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEM	Minimum Essential Medium
MMP(2/9)	Matrix-Metalloproteinase(2/9)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>engl. messenger ribonucleic acid</i>)
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1/2	<i>mechanistic target of rapamycin complex 1/2</i>
n-	nano-
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-lightchain-enhancer' of activated B-cells</i>
NG	Normoglykämie
NZ-origin	Herkunft Neuseeland (<i>engl. New Zealand origin</i>)
OPN	Osteopontin
oxLDL	Oxidiertes <i>low density lipoproteine</i>
p-	pico-
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PG	Proteoglykane
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl. Quantitative polymerase chain reaction</i>)
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RIPA	Radioimmunpräzipitationsprobe (<i>engl. radioimmunoprecipitation assay = RIPA</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13a/29	<i>ribosomal protein L13a/L29</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>engl. real-time-polymerase chain reaction</i>)
Runx-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
sdLDL	<i>small dense low density lipoproteine</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TBS-T	<i>Engl. Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFβ1	<i>tumor growth factor β1</i>
TLR3	<i>toll-like receptor 3</i>
U	Einheiten (<i>engl. units</i>)
V	Volt
VECs	Valvuläre Endothelzellen (<i>engl. valvular endothelial cells</i>)
VICs	Valvuläre Interstitialzellen (<i>engl. valvular interstitial cells</i>)

W
 α SMA

Watt
alpha smooth muscle actin

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden verschiedene Schreibweisen für die untersuchten Gene, ihre mRNA, ihr translatiertes Protein sowie die verwendete siRNA gewählt. Die Gene und ihre mRNA wurden kursiv und mit einem großen Anfangsbuchstaben geschrieben (z.B. *Foxo1*), während das zugehörige Protein komplett groß und nicht kursiv geschrieben wurde (z.B. FOXO1). Die siRNAs wurden kursiv und mit großem Anfangsbuchstaben geschrieben sowie zusätzlich mit dem Präfix „si-“ versehen (z.B. *siFoxo1*). Englische und lateinische Begriffe wurden ebenfalls kursiv geschrieben.

IV. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Relevanz.....	1
1.1.1 Bedeutung der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung	1
1.1.2 Bedeutung des Diabetes mellitus.....	1
1.1.3 Zusammenhang der beiden Krankheitsentitäten.....	2
1.2 Aktueller Stand der Forschung	3
1.2.1 Valvuläre Interstitialzellen und CAVD.....	3
1.2.2 Einfluss diabetischer Stoffwechselbedingungen auf valvuläre Interstitialzellen und ihre extrazelluläre Matrix	4
1.2.3 Bedeutung mitogener Signalwege des Insulinrezeptors in der CAVD unter diabetischen Stoffwechselbedingungen.....	5
1.3 Ziele der Arbeit.....	6
2. Material und Methoden	8
2.1 Material.....	8
2.1.1 siRNA	8
2.1.2 Primer für semi-quantitative RT-PCR	8
2.1.3 Antikörper.....	10
2.1.3.1 Primärantikörper	10
2.1.3.2 Sekundärantikörper	11
2.1.4 Versuchskits.....	11
2.1.5 Reagenzien und Chemikalien.....	12
2.1.6 Pufferlösungen.....	14
2.1.7 Nährmedien.....	19
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.9 Laborgeräte	22
2.1.10 Software	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Erstellung <i>custom</i> -designter siRNA-Sequenzen.....	23
2.2.2 Zellisolation und -kultivierung.....	24
2.2.3 Lipidbasierte Transfektion der Zellkulturen	25
2.2.4 RNA-Isolation und Bestimmung der mRNA-Konzentration und Integrität....	27
2.2.5 Semi-quantitative RT-PCR	27
2.2.6 Western Blots.....	28
2.2.7 LDH-Assays aus Überständen	30
2.2.8 ALP-Assays aus Überständen.....	31
2.2.9 Flamingo-Fluoreszenzfärbung aus Überständen.....	32

2.2.10	Gel-Zymographie aus Überständen	33
2.2.11	Hyaluronsäure-Assays aus Überständen.....	34
2.2.12	GAG-Assays aus Zelllysaten	34
3.	Ergebnisse.....	36
3.1	Etablierungsarbeiten.....	36
3.2	Hauptversuch	39
3.2.1	Kontrolle der Effektivität des Gen- <i>Knockdowns</i> von <i>Foxo1</i> und <i>Mtor</i>	39
3.2.2	Einfluss der Behandlungen auf die Zellvitalität.....	40
3.2.3	Einfluss des Gen- <i>Knockdowns</i> auf Differenzierungs- und Degenerationsmarker.....	42
3.2.4	Einfluss des Gen- <i>Knockdowns</i> auf Kollagen-assoziierte Gene	46
3.2.5	Einfluss des Gen- <i>Knockdowns</i> auf GAG und PG.....	52
3.2.6	Interaktionen des Gen- <i>Knockdowns</i> mit mitogenen Signalwegen.....	57
4.	Diskussion	62
4.1	Interpretation der Ergebnisse	62
4.1.1	Differenzierungs- und Degenerationsmarker.....	62
4.1.2	Kollagen-assoziierte Gene	64
4.1.3	Glykosaminoglykane und Proteoglykane	66
4.1.4	Mitogene Signalwege.....	68
4.2	Limitationen der Arbeit.....	71
4.3	Ausblick	73
5.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	75
6.	Anhang.....	81
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	81
7.	Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Relevanz

1.1.1 Bedeutung der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung

Bei der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (CAVD; engl. *calcific aortic valve disease*) handelt es sich um die häufigste Herzklappenerkrankung der westlichen Welt [1]. Die CAVD zeichnet sich durch eine progressive Verdickung der Taschenklappen und eine zusätzliche Kalzifizierung im Rahmen entzündlicher Prozesse aus. Dies führt schlussendlich zu einer verringerten Elastizität der Klappe, wodurch eine symptomatische Aortenklappenstenose hervorgerufen werden kann [2]. Weltweit wurde die Prävalenz der CAVD im Jahr 2020 auf 13,03 Millionen Fälle geschätzt. Von diesen Fällen verstarben im selben Jahr geschätzt 140 000 [3]. In den nächsten Jahren ist mit einem massiven Anstieg der Prävalenz und damit der Krankheitslast weltweit zu rechnen. Dies lässt sich vermutlich auf den demographischen Wandel der westlichen Welt und die steigende Lebenserwartung in Entwicklungsländern zurückzuführen [1].

Zu den häufigen Ursachen der CAVD zählen klassische Risikofaktoren der Atherosklerose, wie zum Beispiel ein höheres Alter, männliches Geschlecht, Rauchen, arterielle Hypertonie, sowie hohe Lipoprotein (a)- und *low density lipoproteine*- (LDL-) Spiegel [4]. Besonders der kardiovaskuläre Risikofaktor Diabetes mellitus ist aufgrund seiner dramatisch steigenden Inzidenz weltweit von großer sozio-ökonomischer Bedeutung [5].

Die aktuellen Behandlungsoptionen der CAVD sind beschränkt, wobei der Fokus auf invasiven Maßnahmen wie dem operativen und transarteriellen Aortenklappenersatzes liegt. Medikamentös-präventive Maßnahmen existieren bisher nicht [6].

1.1.2 Bedeutung des Diabetes mellitus

Unter Diabetes mellitus versteht man eine Stoffwechselerkrankung, die sich durch erhöhte Glukosespiegel auszeichnet, welcher entweder durch einen Insulinmangel (Typ 1) oder eine verminderte Insulinsensitivität (Typ 2) verursacht wird. Beim Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) handelt es sich also um eine chronische Erkrankung, die mit einer Hyperglykämie und einem dysregulierten Zucker-, Lipid- und Proteinmetabolismus einhergeht. Die Ursache hierfür liegt in einer insuffizienten Insulinsekretion, oder in einer Insulinresistenz des

Zielgewebes. Die beiden Pathomechanismen können allerdings auch kombiniert vorkommen [7].

Die Risikofaktoren für die Entwicklung eines T2DM sind vielfältig: Zunächst spielen die genetische Prädisposition und ein höheres Lebensalter eine Rolle. Darüber hinaus beeinflusst auch ein ungesundes Verhalten wie Nikotinabusus und Bewegungsmangel die T2DM-Entwicklung. Auch ungünstige Ernährungsweisen wie z.B. der übermäßige Konsum von zuckerhaltigen Getränken oder verarbeitetem Fleisch können dazu beitragen [8]. Den wichtigsten Risikofaktor für T2DM stellen Übergewicht und Adipositas dar, deren Prävalenzen ebenfalls in den letzten Jahren zugenommen haben [9].

Diabetes ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit. 2024 waren etwa 589 Millionen Menschen im Alter zwischen 20 und 79 Jahren daran erkrankt, was 11 % dieser Altersgruppe entspricht. Nur 9,1 Millionen Menschen weisen einen Diabetes mellitus Typ 1 auf. Bis 2050 prognostiziert der *International Diabetes Federation Diabetes Atlas* etwa 853 Millionen von Diabetes betroffene, also einen Anstieg um 45 %. Hinzu kommen aktuell noch etwa 635 Millionen Menschen mit einer gestörten Glukosetoleranz und 488 Millionen mit erhöhten Nüchtern glukosespiegeln von 110-125 mg/dl, was einem Prädiabetes entspricht [5]. Auch für Patienten mit einem Prädiabetes ist das Risiko kardiovaskulär zu erkranken erhöht [10]. Bereits 2024 gingen 9,3 %, also etwa 3,4 Millionen, aller weltweiten Sterbefälle auf die Folgen eines Diabetes zurück. Umgerechnet wurde 2024 eine Billion US-Dollar weltweit an Gesundheitsausgaben für Diabetes mellitus ausgegeben [5]. Die sozio-ökonomische Bedeutung des Diabetes mellitus ist daher nicht zu unterschätzen.

Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten des T2DM umfassen unter anderem einen medikamentösen Ansatz, körperliche Betätigung [11], die Umstellung der Ernährung [7], sowie die Therapie der Folgeerkrankungen.

1.1.3 Zusammenhang der beiden Krankheitsentitäten

Dass zwischen T2DM und der CAVD ein Zusammenhang besteht, ist schon länger bekannt. Das Risiko, eine Aortenklappenstenose zu entwickeln, also eine Folge der CAVD, ist etwa 34 % höher, wenn ein T2DM vorliegt [12].

Der genaue Pathomechanismus, der diesen Zusammenhang hervorruft, ist weitestgehend unbekannt. Ähnlich wie bei der Atherosklerose scheint T2DM unter anderem zwei wesentliche Komponenten der CAVD, nämlich Entzündungsprozesse und Kalzifizierung,

zu verstärken [13]. Was allerdings im Detail auf zellulärer und molekularer Ebene passiert, wurde erst in den letzten Jahren genauer erforscht und lässt auch weiterhin viele Fragen offen.

1.2 Aktueller Stand der Forschung

1.2.1 Valvuläre Interstitialzellen und CAVD

Valvuläre Interstitialzellen (VICs, engl. *valvular interstitial cells*) stellen den Hauptzelltyp der Aortenklappe dar und sind in allen ihrer Schichten aufzufinden [14]. Unter physiologischen Bedingungen nehmen sie eine ruhende Form ein und lassen sich in ihrer Funktion mit Bindegewebsfibroblasten vergleichen: Sie produzieren Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), zu denen Glykosaminoglykane (GAG), Proteoglykane (PG), Elastin und Kollagen gehören. Gleichzeitig synthetisieren sie auch EZM-degradierende Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und tragen somit zum Erhalt der Struktur und der Funktion der Aortenklappe bei [15].

Unter dem Einfluss der bereits beschriebenen Risikofaktoren für die CAVD kommt es an der Aortenklappe zu erhöhtem Scherstress, endothelialen Schäden, und einer Anreicherung von oxidiertem LDL (oxLDL) in der Klappe [2]. All dies wirkt als pro-inflammatorischer Reiz, der die Migration von T-Lymphozyten und Makrophagen in die Klappe fördert. Diese Zellen schütten Zytokine aus, die die VICs aktivieren. [16]. Unter der Aktivierung versteht man eine Steigerung der Proliferation und eine Differenzierung zu einem myofibroblastischen Zelltyp. Diese aktivierte Form der VICs zeigt eine verstärkte Produktion von EZM-Bestandteilen und Proteinase, wodurch sie eine fibrotischen Verdickung der Aortenklappe herbeiführen [17]. Dieser Umbauprozess wird auch *Remodeling* genannt. Ein Teil der aktivierten VIC-Population differenziert sich zu einem osteoblastischen Phänotyp, welcher sich unter anderem durch eine gesteigerte Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Osteocalcin und *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) auszeichnet [18, 19]. All diese Proteine treiben die Kalzifizierung der Klappe und damit ihre Versteifung voran. Als Kernaspekte der CAVD lassen sich also die Aktivierung und Differenzierung der VICs betrachten, welche unter dem inflammatorischen Einfluss kardiovaskulärer Noxen zu einer Verdickung und Kalzifizierung der Klappe führen.

1.2.2 Einfluss diabetischer Stoffwechselbedingungen auf valvuläre Interstitialzellen und ihre extrazelluläre Matrix

Bei VICs handelt es sich um Insulin-sensitive Zellen [20], was sich durch das Vorhandensein eines Insulin- und eines *insulin-like growth factor 1*- (IGF1-)Rezeptors erklären lässt [21]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass VICs bei Überstimulation mit Insulin und hyperglykämischem Nährmedium eine Insulinresistenz entwickeln können [20]. Angetrieben wird diese Resistenzentwicklung vor allem durch die Hyperinsulinämie, welche zu einer verminderten Phosphorylierung im AKT/GSK α / β -Signalweg führt, welcher dem Insulinrezeptor nachgeschaltet ist [21]. Dieser Effekt konnte auch im dreidimensionalen Modell mit explantierten ovinen Aortenklappen unter dynamischen Flussbedingungen nachgewiesen werden [22]. Demnach lässt sich die Insulinresistenz als einer der zentralen Mechanismen der T2DM-Entstehung peripherer Zielgewebe auch auf VICs übertragen. Interessanterweise konnte der Glukosetransporter Typ 1 als meistvorhandener Glukosetransporter auf VICs nachgewiesen werden, welcher allerdings Insulin-unabhängig ist. Dadurch bleibt die Glukoseaufnahme in VICs von der Insulinresistenz unbeeinflusst [21].

Gleichzeitig weisen VICs auch erhöhte Proliferationsraten unter hyperinsulinämischen Bedingungen auf [21]. Darüber hinaus war in humanen Aortenklappen diabetischer Patienten ein höherer Anteil der EZM-Komponente Biglykan (BGN) nachzuweisen als bei Nichtdiabetikern [23]. In einem *in vitro*-Modell konnte auch eine verstärkte Expression des Kollagen Typ 1-Gens (*collagen I type I, Colla1*) unter einem kombinierten Stimulus aus Hyperglykämie und Hyperinsulinämie als Hinweis auf Differenzierungsprozesse und EZM-Umbau nachgewiesen werden. Dem gegenübergestellt gelang im selben Modell kein Nachweis einer erhöhten *Opn*-Genexpression oder vermehrter Kalziumablagerungen als mögliche Marker für fortgeschrittene Kalzifizierungsprozesse [21].

Somit lassen sich VICs als Insulin-sensitive Zellen identifizieren, welche unter den diabetischen Stoffwechselbedingungen Hyperglykämie und Hyperinsulinämie mit einer Insulinresistenz reagieren und frühe Umbauprozesse mit Veränderungen der EZM durchlaufen.

1.2.3 Bedeutung mitogener Signalwege des Insulinrezeptors in der CAVD unter diabetischen Stoffwechselbedingungen

Neben den klassischen Signalwegen des Insulinrezeptors, die den Glukosestoffwechsel regulieren, gibt es zusätzliche mitogene Signalwege, die auf Insulin reagieren können. Bei mitogenen Signalwegen handelt es sich um Kaskaden miteinander reagierender Enzyme, die empfindlich auf verschiedene Stimuli reagieren und dadurch zelluläre Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Überleben induzieren. Durch diese zentralen Mechanismen sind die Signalwege fest im Genom eukaryotischer Zellen verankert [24, 25]. Einen dieser Stimuli stellt Insulin, bzw. der Insulinrezeptor dar [26]. Ein hoher Insulinspiegel repräsentiert ein hohes Nährstoffangebot in Form von Glukose, welches das Wachstum begünstigt. Der Insulinrezeptor kann zusätzlich durch IGF1, also einen Wachstumsfaktor, aktiviert werden [27].

Ein wichtiges Ziel des Insulinrezeptors stellt der zuvor bereits erwähnte AKT/GSK α / β -Signalweg dar. Die Serin/Threonin-Kinase AKT steuert mittels Phosphorylierung weitere *downstream*-Substrate und nimmt dadurch Einfluss auf die bereits genannten mitogenen Prozesse [28].

Eines der AKT-Substrate ist der Transkriptionsfaktor FOXO1 (*forkhead box protein O1*), welches bei Aktivierung des AKT/GSK α / β -Signalweges ebenfalls phosphoryliert wird. Dadurch wird es in seiner Funktion gehemmt und aus dem Zellkern geschleust. Im Zytoplasma wird es daraufhin ubiquitiniert und abgebaut [29]. FOXO1 spielt in seiner aktivierten Form eine wichtige Rolle in der Homöostase von Geweben, da es wiederum Gene aktiviert, welche Zell-Zyklus-Arrest, Apoptose, Autophagie, die Reaktion auf oxidativen Stress, Immunmodulation und Metabolismus beeinflussen [30]. Somit schränkt eine Zellstimulation mit Insulin diese Funktionen ein.

In einer früheren Arbeit mit einem *in vitro*-Modell mit ovinen VICs konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von FOXO1 nach einem akuten Insulinstimulus unter normoglykämischen (NG) Bedingungen zunimmt, nicht aber wenn bereits diabetische Stoffwechselbedingungen vorlagen [31], was sich mit der zuvor beschriebenen Insulinresistenzentwicklung der VICs deckt. Jedoch ließ sich dieser Regulationsmechanismus in derselben Arbeit nach Inhibition von FOXO1 auf Proteinebene mittels AS1842856 nicht nachweisen, sodass bei kritisch zu betrachtender Relevanz von FOXO1 für den Zusammenhang zwischen T2DM und CAVD in diese Richtung keine weiteren Untersuchungen angestellt wurden [31]. Dem gegenübergestellt konnte in humanen

Aortenklappen kürzlich gezeigt werden, dass FOXO1 bei bereits vorliegender CAVD herunterreguliert ist und bei induzierter Überexpression im *in vitro*-Modell osteogene Prozesse hemmen kann [32]. Inwiefern FOXO1 bei zusätzlich vorliegenden diabetischen Stoffwechselbedingungen relevant ist, bleibt jedoch weiterhin unklar.

Ein weiteres Substrat von AKT ist MTOR (*mechanistic target of rapamycin*), welches im Gegensatz zu FOXO1 durch AKT indirekt aktiviert wird [28]. MTOR ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche als katalytische Untereinheit der Proteinkomplexe *MTOR complex 1* (MTORC1) und *MTOR complex 2* (MTORC2) dient. Diese stimulieren über ihre jeweiligen Signalkaskaden Zellwachstum, -überleben und -proliferation [33].

Für MTOR konnte bereits im *in vitro*-Modell mit ovinen VICs gezeigt werden, dass die Aktivierung im Sinne einer Phosphorylierung mittels akutem Insulinstimulus niedriger ausfällt, wenn bereits diabetische Stoffwechselbedingungen vorlagen. Decorin (DCN), BGN und die MMP2 als relevante Marker in der CAVD zeigten sich in VICs unter diesen Stoffwechselbedingungen erhöht, konnten in derselben Arbeit jedoch mittels Rapamycin als MTOR-Inhibitor signifikant herunterreguliert werden [31].

Somit ist mTOR als wichtiger Mediator in den Prozessen der CAVD unter diabetischen Stoffwechselbedingungen einzuordnen.

1.3 Ziele der Arbeit

Die Datenlage zur Rolle mitogener Zielgene des Insulinrezeptorsignalweges in der Entstehung der CAVD unter diabetischen Stoffwechselbedingungen ist eingeschränkt. Daher war das Ziel dieser Arbeit festzustellen, ob FOXO1 und MTOR unter diabetischen Bedingungen zur CAVD-Entstehung beitragen, oder ob sie möglicherweise auch eine protektive Funktion besitzen. Dafür wurden ovine VICs in *in vitro*-Zellkulturen mit *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) gegen die beiden Zielgene mithilfe eines lipidbasierten Systems transfiziert.

Die behandelten Zellen wurden in zwei Gruppen eingeteilt; eine mit NG-Nährmedium behandelte Gruppe und eine mit hyperglykämischem und hyperinsulinämischem (HG+HI) Nährmedium behandelte Gruppe. Die HG+HI-Behandlung diene dabei der Simulation diabetischer Stoffwechselbedingungen. In jeder der beiden Gruppen gab es jeweils eine Behandlung mit siRNA gegen *Foxo1* und eine mit siRNA gegen *Mtor*. Die siRNA sollte die

mRNA der Zielgene komplementär binden und damit deaktivieren. Zusätzlich gab es eine weitere Behandlung mit funktionsloser siRNA als Negativkontrolle.

Aus den Zellkulturen wurden Überstände des Nährmediums abgenommen und die Zellen geerntet, um daraus die Expression verschiedener Schlüsselmoleküle in der CAVD auf ihren Zusammenhang mit *Foxo1* und *Mtor* hin bei NG-Bedingungen und diabetischen Stoffwechselbedingungen auf mehreren Ebenen zu untersuchen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten in Zukunft dazu beitragen, durch ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen das Risiko der CAVD-Entstehung bei (prä)diabetischen Patienten zu verringern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 siRNA

Bezeichnung	Leitstrang (5'→3'), siRNA_id	Folgestrang (5'→3'), siRNA_id	Hersteller
<i>forkhead box protein O1</i> (FOXO1)	CGACAACUGGAGUACCUUU, s554880	AAAGGUACUCCA GUUGUCG, s554881	Life Technologies Corporation Silencer® Select Custom
<i>lamin A/C</i> (LMNA)	GGAUAAUGCCAGACAGUC, s554882	GCCUCCAGUGUUACAGUC, s554883	Life Technologies Corporation Silencer® Select Custom
<i>mechanistic target of rapamycin kinase</i> (mTOR)	GCAAGGAUCUCAUGGGUUU, s554878	AAACCCAUGAGAUCCUUGC, s554879	Life Technologies Corporation Silencer® Select Custom
SilencerR Select Negative Control #1 siRNA			Life Technologies Corporation Silencer® Select Custom

2.1.2 Primer für semi-quantitative RT-PCR

Bezeichnung	Leitstrang (5'→3')	Folgestrang (5'→3')	Hersteller
<i>actin alpha 2</i> (ACTA2)	GATAGAGCACGGCATCATCA	GAAGGGTTGGATGCTCTTCA	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i> (ALPL)	CAACACCAACGTGGCTAAGA	GTTGTGGTGGAGCTGACCTT	euromins Genomics
<i>biglycan</i> (BGN)	TCTGCTCCGCTACTCCAAGT	TTGTTGTCCAAGTGCAGCTC	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>collagen I type 1, alpha 1</i> (COL1A1)	AAGACATCCCA CCAGTCACC	TAAGTTCGTCGCA GATCAGC	euromins Genomics

<i>decorin</i> (DCN)	CCAAAGTGCGA AAGTCTGTG	TTCAATGCCTGAG CTCTTCA	eurofins Genomics
<i>forkhead box O1</i> (FOXO1)	GGATGGAGACA CGTTGGATT	GGGTGAAGGACAT CTTTGGA	eurofins Genomics
<i>hyaluronan synthase 2</i> (HAS2)	CACAGACAGGC TGAGGACAA	TCCAAGGAGGAGA GAGACTCC	eurofins Genomics
<i>hypoxanthine phosphoribosyltransfe rase 1</i> (HPRT1)	GCTACTGTAAC GACCAGTCAAC A	GCATTGTCTTCCC AGTGTCA	eurofins Genomics
<i>lamin A/C</i> (LMNA)	CTCCTACCTCCT GGGCAACT	GAGGTGAGGAAG AAGCATGG	eurofins Genomics
<i>matrix metalloproteinase 2</i> (MMP2)	TGACAAGGACG GCAAGTATG	GTAAGATGTGCCC TGGAAGC	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>matrix metalloproteinase 9</i> (MMP9)	TAGCACGCACG ACATCTTTC	GCCCACATAGTCC ACCTGAT	eurofins Genomics
<i>mechanistic target of rapamycin</i> (MTOR)	AGCACCATCAA CCTCCAAAA	AGCCATTCCAACC AATCATC	eurofins Genomics
<i>osteopontin</i> (OPN)	GATGGCCGAGG TGATAGTGT	TCGTCTTCTTAGGT GCGTCA	eurofins Genomics, Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>ribosomal protein L13a</i> (RPL13A)	GATCCCACCAC CCTATGACA	CTTCAGACGCACA ACCTTGA	eurofins Genomics
<i>ribosomal protein L29</i> (RPL29)	CCAAGTCCAAG AACCACACC	TATCGTTGTGATC GGGGTTT	eurofins Genomics

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primärantikörper

Bezeichnung / Spezies	Verdünnung	Blockierlösung	Hersteller	Katalog-nummer
AKT (pan) (<i>rabbit</i>)	1:1000 (5 % BSA / TBS-T)	5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Inc.	#4691
<i>alpha smooth muscle actin</i> (α SMA) (<i>rabbit</i>)	1:1000 (5 % <i>skimmed milk protein</i> (Milk) / TBS-T)	5 % <i>Milk</i> / TBS-T	Sigma-Aldrich	A5228
Alpha-Tubulin (<i>mouse</i>)	1:10.000 (TBS-T)	5 % BSA / TBS-T	Sigma-Aldrich	T6199
<i>collagen type 1</i> (<i>mouse</i>)	1:2000 (5 % <i>Milk</i> / TBS-T)	5 % <i>Milk</i> / TBS-T	Sigma-Aldrich	C2456
<i>extracellular signal regulated kinases 1/2</i> (ERK1/2) (engl. <i>mouse</i> , Maus)	1:400 (5 % <i>Milk</i> / TBS-T)	5 % <i>Milk</i> / TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Inc	514302
FOXO1 (<i>rabbit</i>)	1:500 (5 % BSA / TBS-T)	5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Inc.	#2880
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GAPDH (<i>rabbit</i>)	1:5.000 (TBS-T)	5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Inc.	CS2118
MTOR (engl. <i>rabbit</i> , Hase)	1:1000 (5 % Bovines Serumalbumin (BSA) / <i>Tris-buffered saline</i>)	5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Inc.	#2983

	<i>with Tween20</i> (TBS-T))			
--	---------------------------------	--	--	--

2.1.3.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Goat anti-mouse (engl. Ziege gegen Maus) IgG+IgM (Immunglobulin G / M)	1:10000 (TBS-T)	Santa Cruz Biotechnology	Nicht verfügbar
Goat anti-rabbit IgG	1:10000 (TBS-T)	Dianova	111-035-003

2.1.4 Versuchskits

Material	Hersteller	Katalognummer
Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay	Biocolor Ltd.	B3000
CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit	Invitrogen™	C20300 / C20301
Hyaluronic Acid (HA) Quantitative Test Kit	Corgenix	029-001
Phosphatase Substrate Kit	ThermoFisher Scientific Inc.	37620
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	205311
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106
SuperSignal West Femto	ThermoFisher Scientific Inc.	34096
WesternBright Quantum	Advansta	541015

2.1.5 Reagenzien und Chemikalien

Material	Hersteller	Katalog-nummer
0,4 % Trypanblau-Lösung	VWR Chemicals	K940
10x Tris-Glycin- <i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS, engl., Natriumlaurylsulfat) Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc.	J61006.K2
Albumin Fraction V, <i>NZ-Origin</i> (Herkunft Neuseeland, engl. <i>New Zealand origin</i>)	Carl Roth	8076
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	248614
Brij® L23 Solution	Sigma-Aldrich	B4184
Brilliant Blau G250 (C.I.42665)	Carl Roth	9598
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich	B0126
Buffer RLT	Qiagen	79216
Calciumchlorid (CaCl ₂) 98 %	Carl Roth	CN93
<i>collagen I, Rat Tail</i> (engl., Rattenschwanz)	Corning®	354236
cOmplete Tablets, Mini, Ethylenediamintetraacetic acid (EDTA, engl., Ethylendiamintetraessigsäure)-free, EASYpack (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics GmbH	04 693 159 001
CXR Reference Dye	Promega Corporation	C5411
DC™ (engl. <i>detergent compatible</i> , detergenzkompatibel) Protein Assay Reagent A + B	Biorad	5000113
DC™ Protein Assay Reagent B	Biorad	5000114
dH ₂ O DEMI-WASSER	Fischar	Apotheke
Diethanolamine Substrate Buffer (5x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	34064
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	MERCK	106574
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc.	R0861

DMEM, niedriger Glukosegehalt, GlutaMAX™ Supplement, Pyruvat	Gibco™	10567014
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), hoher Glukosegehalt, GlutaMAX™ Supplement, Pyruvat	Gibco™	10569010
Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline (PBS, engl., phosphatgepufferte Salzlösung), no calcium, no magnesium	Gibco™	14190144
EDTA Dinatriumsalz	Carl Roth	8043.1
Essigsäure 100 %	Carl Roth	3738
Ethanol 96 %	Fischar	Apotheke
Fetal Bovine Serum (engl., fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich	F7524
Flamingo™ Fluorescent Gel Stain 10x	Biorad	1610492
Gelatine from bovine skin (engl. aus Rinderhaut)	Sigma-Aldrich	G9391
Glycerin ROTIPURAN® 99,5 %	Carl Roth	3783
Glycin	Serva	23391
GoTaq quantitative polymerase chain reaction (qPCR, engl., quantitative Polymerase-Kettenreaktion) Master Mix	Promega Corporation	A6001
<i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-grade Ethanol (EtOH)</i>	Sigma-Aldrich	SZBF236EV
Insulin	Sigma-Aldrich	15523
L-Cystein-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	C7477
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektionsreagenz	Invitrogen™	13778150
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MERCK	1.05833.0250
Methanol	VWR Chemicals	20847.320
Minimum essential medium (MEM) Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung (100×)	Gibco™	11140050
Natriumacetat	Sigma-Aldrich	S2889
Natriumchlorid, 1 kg ≥99,5 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth	3957
Natriumhydroxid (NaOH), 1 kg ≥98 %, p.a., ISO, in Plätzchen	Carl Roth	6771

Nuclease-Free Water	Promega Corporation	P1196
Opti-MEM™ I Serumreduziertes Medium	Gibco™	31985062
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	
Papain	Carl Roth	8933
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco™	15140122
PhosSTOP EASYpack (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche	04 906 837 001
p-Nitrophenylphosphat (PNPP) Tabletten	Thermo Scientific	34047
Radioimmunpräzipitationsprobe- (engl. radioimmunoprecipitation assay, RIPA) Puffer	Sigma-Aldrich	R0278
RDD Puffer für DNS (Desoxyribonukleinsäure, engl. desoxyribonucleic acid, DNA)-Verdau	Qiagen	79254
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen	79254
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth	A515
SDS Pellets	Carl Roth	CN30
Skim Milk Powder (<i>Milk</i>)	Sigma-Aldrich	70166
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad	161-0801
Tris-Base	MERCK	1.08382.2500
Tris-Hydrochlorid, 2,5kg PUFFERAN® ≥99 %, p.a.	Carl Roth	9090
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red	Gibco™	25200056
Tween® 20	Sigma-Aldrich	P1379

2.1.6 Pufferlösungen

1 % Gelatinelösung	
Gelatine from bovine skin	5 g
Dulbeccos's PBS, no calcium, no magnesium	500 ml

10 % APS	
APS	1 g
Aqua dest. (lat., destilliertes Wasser)	ad 10 ml

10 % SDS	
SDS-Pellets	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml

10 % Trenngel	
Aqua dest.	4850 µl
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	2500 µl
Trenngelpuffer	2500 µl
10 % SDS	100 µl
TEMED	10 µl
10 % APS	50 µl

2 % Coomassie G250-Lösung	
Brilliant Blau G250 (C.I.42665)	10 g
Aqua dest.	ad 500 ml

4 % Sammelgel	
Aqua dest.	3180 µl
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	500 µl
Sammelgelpuffer	1260 µl
10 % SDS	50 µl
TEMED	10 µl
10 % APS	25 µl

5 % BSA-Lösung	
Albumin Fraction V, NZ-Origin	2,5 g
TBS-T (1x)	50 ml

5 % Milchpulverlösung		
TBS-T (1x)	50 ml	
Skim Milk Powder	2,5 g	

cDNA-Synthese Mix		
Reagenz	Volumen pro Probe	Arbeitsschritt
Probe	Volumen X in µl nach RNA-Konzentration	Schritt 1
Nuclease-Free Water	12 µl - X µl	
gDNA Wipeout Buffer	2 µl	
Reverse Transkriptase (RT) Buffer	4 µl	Schritt 2
RT Primer Mix	1 µl	
Reverse Transkriptase	1 µl	

<i>Destain Lösung</i>	
Essigsäure 100 %	150 ml
Methanol	450 ml
Aqua dest.	900 ml

<i>Developing Puffer (10x)</i>	
Tris-Base	12,1 g
Tris-Hydrochlorid, 2,5kg PUFFERAN® ≥99 %, p.a.	63 g
Natriumchlorid, 1 kg ≥99,5 %, p.a., ACS, ISO	117 g
Brij® L23 Solution	20 ml
CaCl ₂ 98 %	7,4 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,1017 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Färbelösung (1x) pro Gel	
Flamingo™ Fluorescent Gel Stain 10x	5 ml
Aqua dest.	45 ml

Fixierlösung	
Ethanol 96 %	400 ml
Essigsäure 100 %	100 ml
Aqua dest.	500 ml

Laemmli-Puffer (6x), pH: 6,8	
Tris-Salzsäure (HCl)-Lösung	3,75 ml (1M)
Glycerin ROTIPURAN® 99,5 %	6 ml
SDS Pellets	1,26 g
DTT	0,93 g
Bromophenol Blue	0,009 g
Aqua dest.	10ml

Laufpufferkonzentrat (10x), pH: 8,3	
Tris-Base	60,57 g
Glycine	285,27 g
SDS-Pellets	20 g
Aqua dest.	ad 2 l

Papain <i>Extraction Reagent</i>	
Natriumphosphat-Puffer	50ml (0,2 M)
Natriumacetat	400 mg
EDTA	200 mg
L-Cystein-Hydrochlorid	40mg
Papain-Lösung	250 µl

Papain-Lösung	
Papain	20 mg
Aqua dest.	1 ml

RDD / Dnase Master Mix	
RDD Puffer für DNA Verdau	70 µl
Rnase-Free Dnase Set	10µl

Realtime (RT)-PCR Master Mix	
Reagenz	Volumen pro Well
<i>complementary</i> DNA (cDNA) (5 ng/µl)	2 µl
GoTaq ® qPCR Master Mix (versetzt mit 25 µl CXR Reference Dye pro ml)	10 µl
Nuclease-Free Water	7,4 µl
Primer <i>forward</i> (engl., vorwärts) (10 pmol/µl)	0,3 µl
Primer <i>reverse</i> (engl. rückwärts) (10 pmol/µl)	0,3µl

Renaturing (engl. Renaturierung) Puffer (10x)	
Triton™ X-100	125 ml
Aqua dest.	ad 500 ml

Sammelgelpuffer, pH: 6,8	
Tris-Base	18,17 g
Aqua dest.	ad 300 ml

Sample Puffer (5x)	
Tris-HCl-Lösung	1,56 ml (0,5 M)
Glycerin ROTIPURAN® 99,5 %	5 ml
10 % SDS	1,05 ml
0,1 % Bromphenolblau	1,25 ml
Aqua dest.	ad 10 ml

Stripping Puffer, pH: 2,3	
Glycine	15 g
10 % SDS	100 ml
Tween® 20	1 ml
Aqua dest.	ad 1 l

TBS-T (10x), pH: 7,6	
Tris-Base	48,46 g
Natriumchlorid, 1 kg $\geq 99,5$ %, p.a., ACS, ISO	175,32 g
Tween® 20	20 ml
Aqua dest.	ad 2 l

Transferpufferkonzentrat (10x), pH: 8,3	
Tris-Base	60,57 g
Glycine	285,27 g
Aqua dest.	ad 2 l

Trenngelpuffer, pH: 8,8	
Tris-Base	45,43 g
Aqua dest.	ad 250 ml

2.1.7 Nährmedien

Normoglykämisches Nährmedium	
DMEM, niedriger Glukosegehalt, GlutaMAX™ Supplement, Pyruvat	500 ml
Fetal Bovine Serum	50 ml
MEM Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung (100×)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	5 ml

Hyperglykämisches Nährmedium	
DMEM, hoher Glukosegehalt, GlutaMAX™ Supplement, Pyruvat	500 ml
Fetal Bovine Serum	50 ml
MEM Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung (100×)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	5 ml

Kryokonservierungsmedium	
Fetal Bovine Serum	11,25 ml
Dimethylsulfoxide	1,25 ml

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
1,000 µl graduated TipOne® Tip, Natural, Racks (sterile)	Starlab	S1111-6810
1,000 µl XL graduated TipOne® Filter Tip, Natural (sterile)	Starlab	S1122-1830
10 µl graduated TipOne® Filter Tip, Natural, Racks (sterile)	Starlab	S1121-3810
10/20 µl XL graduated TipOne® Filter Tip, Racks (sterile)	Starlab	S1120-3810
200 µl graduated TipOne® Filter Tip, Natural (sterile)	Starlab	S1120-8810
200 µl TipOne® Tip, Natural, Racks (sterile)	Starlab	S1111-0810
96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatte, transparent	Greiner Bio-One GmbH	655180
Applied Biosystems™ MicroAmp™ Clear Adhesive Film	fisher scientific	10595025
Blottingpapiere ROTILABO® Dicke 1,5 mm	Carl Roth	CL75.1
CELLSTAR® 6 Well Zellkultur Multiwell Platte	Greiner Bio-One GmbH	657160
CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flasche 175 cm²	Greiner Bio-One GmbH	660175

CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flasche 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH	658175
Eppendorf® PCR tubes colorless, capacity 0.2 mL	Eppendorf SE	0030124332
Eppendorf™ Safe-Lock Tubes® 0.5 mL, PCR Clean	Eppendorf SE	0030123301
Eppendorf™ Safe-Lock Tubes® 1.5 mL, PCR Clean	Eppendorf SE	0030120086
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Falcon™	352196
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Falcon™	352070
Kryoröhrchen Clearline® 2 ml	Kisker Biotech	390708
Leere Gelkassetten, mini, 1,5 mm	Thermo Fisher Scientific	NC2015
Microamp™ Fast Optical Reaktionsmikrotiterplatte mit 96 Wells, mit Barcode, 0,1 ml	Thermo Fisher Scientific	4346906
Mini-PROTEAN® Comb, 10-well, 1.5 mm, 66 µl	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1653365
Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 1.5 mm Integrated Spacers #1653312	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1653312
Nitrocellulose Membrane, Roll, 0.45 µm, 30 cm x 3.5 m	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1620115
Zellkulturschale, (ØxH): 150 x 20 mm, Oberfläche: Standard	SARSTEDT AG Co. KG	83.3903

2.1.9 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Amersham Imager 600	GE Healthcare Life Sciences
Centrifuge 5804R	Eppendorf AG
Color Sprout Plus Mini-Zentrifuge	Biozym
HERAcell 240i CO2 Incubator	ThermoFisher Scientific Inc.
Heraeus Labofuge 300	ThermoFisher Scientific Inc.
HERASAFE KS	ThermoFisher Scientific Inc.
Leica DFC425	Leica Microsystems
Leica DMIL LED	Leica Microsystems
Mini-Protean TetraSystem	Bio-Rad
Mini-Trans-Blot ® Cell	Bio-Rad
NanoQuant plate	Tecan Deutschland GmbH
PowerPac 300 Electrophoresis Power Supply	Bio-Rad
Rotor F-45-30-11	Eppendorf AG
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems Inc.
Systec VX-95	Systec GmbH, the autoclave company
T3000 Thermocycler	Biometra®
Tecan Reader, infinite M1000 PRO	Tecan Deutschland GmbH
Thermomixer 5436	Eppendorf AG
Verstellbare Einkanal-Mikroliterpipetten, verschiedene	Eppendorf AG
Zählkammer Neubauer, Tiefe, 0,0025 mm²	Assistent®

2.1.10 Software

Programm	Hersteller
Application Suite v3.8	Leica Microsystems GmbH
Basic Local Alignment Search Tool® (BLAST®)	National Center for Biotechnology Information
GraphPad Prism 8.4 GraphPad Prism 10.2	GraphPad Software, Inc.
i-control 1.10	Tecan Deutschland GmbH
ImageQuantTL	GE Healthcare Life Sciences

Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Primer3Plus	Whitehead Institute for Biomedical Research, Steve Rozen, Andreas Untergasser and Helen Skaletsky
Primer-Blast	National Center for Biotechnology Information
StepOne™ Software v2.3	Applied Biosystems Inc.

2.2 Methoden

2.2.1 Erstellung *custom-designter* siRNA-Sequenzen

Für den späteren Gen-*Knockdown* mussten die siRNA-Sequenzen eigenständig erstellt und etabliert werden, da diese für das Schafsgenom zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht vorgefertigt käuflich waren. Dies erfolgte nach einem von der Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll zum Primerdesign: Die mRNA- (Boten-Ribonukleinsäure, engl. *messenger ribonucleic acid*) Sequenz der beiden Gene *Foxo1* und *Mtor* der Spezies *Ovis aries* wurde in der Datenbank NCBI Gene [34] ermittelt. Zum Auffinden der Exongrenzen wurde daraufhin die genomische DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl. *desoxyribonucleic acid* = DNA) der Zielgene mit der zugehörigen mRNA in der Software NCBI BLAST [35] abgeglichen, da diese für ovine Gene in der Regel noch nicht in der NCBI-Gendatenbank enthalten sind.

Die ermittelte mRNA-Sequenz und die Exongrenzen wurde in der Primer3Plus-Software zum Erstellen von Primer-Paaren [36] eingefügt und die Einstellungen für das bevorzugte Produkt angepasst. Aus den von der Software vorgeschlagenen Primer-Paaren wurde das am spezifischsten miteinander bindende ausgewählt.

In einem letzten Kontrollschritt wurde dann die Spezifität der ermittelten Primer gegenüber der ursprünglichen mRNA-Sequenz überprüft. Dafür wurden Sie in die Software Primer-Blast von NCBI [37] eingefügt und mit dem gesamten *Ovis aries*-Genom abgeglichen. In dieser Software durften Sie nur mit dem entsprechenden Zielgen binden, da sonst auch weitere, im Versuch nicht betrachtete Gene hätten herunterreguliert werden können. Die Primersequenzen für die siRNA wurden daraufhin dem Hersteller übermittelt und die siRNA bestellt.

2.2.2 Zellisolation und -kultivierung

Für die Versuche wurden ovine VICs verwendet, welche zunächst aus den Herzen von circa zwölf Monate alten Schafen isoliert wurden. Die Herzen wurden vom Schlachthof Laame GmbH & Co. KG in Wuppertal bezogen. Für die Arbeiten war kein Tierversuchsvotum nötig.

Die Isolation erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank, indem aus neun Schafsherzen die Aortenklappen exzidiert wurden. Diese wurden zuerst in Petrischalen mit PBS gewaschen, danach in NG- oder HG-Nährmedium zerkleinert und zuletzt in mit 1 % Gelatinelösung bedeckten Zellkulturflaschen überführt. Danach wurden die Zellen bei 37°C und 5 % pCO₂ inkubiert.

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Dafür wurden sie mit PBS gewaschen und mithilfe von Trypsin-EDTA (0,25 %) von den Zellkulturflaschen gelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde nach Ablösung der Zellen mit Nährmedium aufgehoben. Dann konnten die Zellen in 15 ml-Falcon Tubes überführt, zentrifugiert und in Trypsin-freiem Medium resuspendiert werden. Die resuspendierten Zellen wurden daraufhin in neue Zellkulturflaschen überführt. Diese Schritte wurden bis kurz vor Erreichen der Konfluenz in Passage 2 erneut wiederholt.

Da die Zellen nicht direkt für die vorgesehenen Versuche verwendet wurden, wurden sie in Passage 2 kryokonserviert. Dafür wurden sie wie bei der Subkultivierung zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin von den Zellkulturflaschen gelöst. Danach wurde Nährmedium dazugegeben und die Zellen in 50 ml-Falcon Tubes überführt und zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und die Zellen in fetalem Kälberserum (FKS, engl. *fetal bovine serum* = FBS) mit 10 % DMSO resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden zuletzt in Kryoröhrchen überführt und bei -80° C gelagert.

Beim Wiederauftauen der Zellen für die Versuche wurden diese zügig in DMSO-freiem Nährmedium resuspendiert, um eine übermäßige Schädigung zu vermeiden. Die Zellen wurden dann für fünf Tage kultiviert und konnten daraufhin für die Versuche auf Six-Well-Platten ausgesät werden: Als Zielzellzahl wurden 75.000 Zellen pro Well ausgewählt. Um diese Zahl zu erreichen, wurden die Zellen zunächst wie bei der Subkultivierung vom Flaschenboden gelöst und in 50 ml-Falcon Tubes bis zum Schritt der Resuspension behandelt. Ein Teil der Suspension wurde 1:1 mit 0,4 % Trypanblau-Lösung vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden in dieser Kammer lichtmikroskopisch gezählt und die Zellzahl der Suspension pro ml rechnerisch bestimmt.

So konnte berechnet werden, welches Volumen der Suspension für 75.000 VICs pro Well benötigt wird. Dieses Volumen wurde dann auf die Platten pipettiert, auf welchen bereits Nährmedium vorgelegt wurde. Die Zellen wurden dann bei 37° C und 5 % pCO₂ inkubiert.

2.2.3 Lipidbasierte Transfektion der Zellkulturen

Nach der in 2.2.2 beschriebenen Aussaat der VICs in Six-Well-Platten wurden diese 24 Stunden später mit der entsprechenden siRNA transfiziert: Zunächst wurde das vorhandene Nährmedium abgesaugt und durch 1 ml NG- oder HG+HI-Medium ersetzt. Danach wurden die Transfektionsansätze angelegt. Pro Behandlung wurden je zwei Lösungen angesetzt. Eine Lösung enthielt 125 µl Opti-MEM und 7,5 µl Lipofectamine RNAiMAX pro Well, während eine Zweite 125 µl Opti-MEM und 2,5 µl siRNA-Lösung (10 µM in Nuklease-freiem Wasser) pro Well enthielt. Die beiden Lösungen wurden daraufhin ineinander überführt, für etwa eine Minute manuell geschwenkt und für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit die siRNA in Liposomen aus dem Lipofectamine RNAiMAX eingeschlossen werden konnte.

Von den so erzeugten Transfektionslösungen wurden jeweils 250 µl vorsichtig auf die dafür vorgesehenen *Wells* pipettiert, damit die entstandenen Liposomen nicht beschädigt werden und somit eine optimale Transfektion stattfinden konnte. Die Zellen wurden daraufhin bei 37° C und 5 % pCO₂ für 6 Stunden inkubiert. Danach wurde pro Well 1 ml NG- oder HG+HI-Nährmedium hinzugefügt, um die zytotoxische Wirkung des Lipofectamines abzuschwächen. Die Zellen wurden zuletzt weiter bei 37° C inkubiert.

Um den Einfluss des Transfektionsprozesses an sich auf die Genexpression von *Foxo1* und *Mtor* zu untersuchen, wurde neben einer unbehandelten Kontrolle auch jeweils eine Kontrolle mit Lipofectamin und eine Kontrolle mit funktionsloser, sogenannter *scrambled* siRNA AllStars transfiziert. Um eine generelle Effektivität der Transfektion nachzuweisen, wurde eine Positivkontrolle mit siRNA gegen *Lmna* (Lamin A/C) angelegt, für welches bereits ein erfolgreicher Gen-*Knockdown* in der Arbeitsgruppe etabliert wurde.

Nach circa 72 Stunden Inkubationszeit wurde die Transfektion wie oben beschrieben wiederholt. Die Zellen wurden am Ende der Behandlung weiter bei 37° C inkubiert.

Die Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 48 Stunden. Pro Replikat und Behandlung wurde aus zwei Wells als erstes 1 ml des Überstandes abgenommen und jeweils in einem 1,5 ml Microtube bei -80° C für spätere Versuche eingefroren.

Für die Zellen, bei denen später die RNA isoliert werden sollte, wurde zur Lyse 12,5 ml RLT-Puffer mit 250 µl DTT (2 M) angemischt. Pro Replikat und pro Behandlung wurde dann bei zwei *Wells* das Nährmedium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden pro Well 175 µl der Pufferlösung hinzugefügt und die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgeschabt. Die lysierten Zellen der drei Wells wurden für eine ausreichende Menge RNA gemeinsam in ein 1,5 ml Microtube überführt und bei -80° C für die spätere Weiterverwendung gelagert.

Für die Zellen, bei denen später die Protein- und die GAG-Expression bestimmt werden sollte, wurde für die Zelllyse eine Lösung aus 9 ml RIPA-Puffer, einer Tablette PhosSTOP und einer Tablette Protease-Inhibitor angesetzt. Die Tabletten wurden dafür im RIPA-Puffer zerstoßen und aufgelöst. Bei jeweils zwei Wells pro Replikat und pro Behandlung wurde dann das Nährmedium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Auf jedes Well wurden daraufhin 120 µl der Pufferlösung pipettiert. Aufgrund des Umfangs der Zellernte wurden die in diesem Absatz behandelten Zellen zunächst bei -20° C eingefroren und erst nach 24 Stunden auf Eis aufgetaut, mit dem Zellschaber abgeschabt und pro Replikat und Behandlung jeweils die Zelllysate aus drei Wells in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden dann für die spätere Weiterverwendung bei -80° C eingefroren.

Um während der gesamten Behandlung eine Verfälschung der Ergebnisse durch mögliche Kontaminationen mit Fremdorganismen weitestgehend zu vermeiden, wurden die Six-Well-Platten am Tag der 2. Transfektion und am Tag der Ernte vor Behandlungsbeginn lichtmikroskopisch kontrolliert und fotografiert.

Das hier beschriebene Protokoll wurde zunächst nur mit vier biologischen Replikaten unter NG-Bedingungen etabliert. Ein Teil der Proben wurde hier bereits 72 Stunden nach der ersten Transfektion geerntet und die restlichen Proben 48 Stunden nach der zweiten Transfektion. Da sich der *Knockdown* als effektiv erwies (siehe 3.1) und dementsprechend nicht mehr angepasst werden musste, wurde dieses Protokoll für den Hauptversuch beibehalten und auf neun biologische Replikate ausgeweitet. Auf Basis der Ergebnisse der Etablierungsarbeiten wurde von den verwendeten Kontrollen im Hauptversuch nur die mit *scrambled* siRNA AllStars behandelte Kontrolle weiterverwendet. In den Etablierungsarbeiten wurde der Gen-*Knockdown* mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Das Vorgehen entsprach dabei dem des Hauptversuches (siehe 2.2.4 und 2.2.5), wobei auf eine RNA-Integritätsmessung verzichtet wurde.

2.2.4 RNA-Isolation und Bestimmung der mRNA-Konzentration und Integrität

Für eine spätere Bestimmung der mRNA-Expression wurde die RNA aus den in 2.2.3 gewonnenen Proben isoliert. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und nach einem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll aufbereitet. Mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) wurden die Proben dafür in mehreren Waschschritten mit verschiedenen Puffern per Zentrifugation gefiltert und so von sonstigen Zellbestandteilen bereinigt. Die so gewonnenen RNA-Proben wurden in RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80° C gelagert.

Um später die mRNA-Expression der Proben miteinander in Verhältnis setzen zu können, musste zunächst die Gesamt-RNA-Konzentration gemessen werden, um diese später auf eine einheitliche Konzentration verdünnen zu können. Die RNA-Proben wurden als erstes langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurden sie gemischt und kurz zentrifugiert. Als nächstes wurden jeweils 2 µl der Proben in Doppelbestimmung auf die NanoQuant Plate (Tecan Deutschland GmbH) pipettiert und die Lichtabsorption bei 260 nm mithilfe des Tecan Reader infinite M1000 PRO (Tecan Deutschland GmbH) in der Software i-control 1.10 (Tecan Deutschland GmbH) gemessen. Als Referenz diente eine Probe mit RNase-freiem Wasser. Die gemessenen Werte wurden in Doppelbestimmung gemittelt und ergaben die Gesamt-RNA-Konzentration in ng/µl. Zuletzt wurde das benötigte Volumen der Proben berechnet, in dem sich 1000, 500, 250, oder 100 ng RNA befanden, um später per Verdünnung eine einheitliche Gesamt-cDNA-Konzentration zu erhalten (siehe 2.2.5)

Die Messung der RNA-Integrität der Proben wurde durchgeführt, um die Validität der später gewonnenen Erkenntnisse über die mRNA-Expression besser beurteilen zu können. Die Messungen wurden am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Es wurde ein *Standard Sensitivity RNA Assay* verwendet und die Messungen mithilfe eines *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical Technologies, AATI) durchgeführt.

2.2.5 Semi-quantitative RT-PCR

Nach Bestimmung der mRNA-Konzentrationen in 2.2.4 konnten die Proben in cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure, engl. *desoxyribonucleic acid*) umgeschrieben werden, um mithilfe dieser eine semi-quantitative RT-PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, engl. *real-time polymerase chain reaction*) durchzuführen. Die

cDNA-Synthese wurde mithilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt, indem mit den darin enthaltenen Reagenzien pro Probe ein cDNA-Mastermix mit dem passenden Probenvolumen in Abhängigkeit von der Gesamt-RNA-Konzentration angemischt wurde (genaue Zusammensetzung siehe cDNA-Mastermix Schritt 1 in 2.1.6). Die Reaktionsansätze wurden daraufhin im T3000 Thermocycler (Biometra®) für 2 Minuten auf 42° C erhitzt und danach wieder auf 4° C abgekühlt. Danach wurden pro Probe zusätzlich die Reagenzien des zweiten Schrittes (siehe 2.1.6) hinzugefügt und die Proben zunächst für 30 Minuten erneut auf 42° C und danach für drei Minuten auf 95° C erhitzt. Die so entstandenen cDNA-Proben wurden zuletzt mit RNase-freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C eingefroren.

Für die semi-quantitative RT-PCR, die der indirekten Bestimmung der mRNA-Expression diente, wurde zunächst nach bereits etabliertem Protokoll ein PCR-Mastermix (siehe PCR-Mastermix in 2.1.6) angelegt. Dieser wurde auf eine MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (applied biosystems®) pipettiert und die einzelnen cDNA-Proben in Doppelbestimmung hinzugefügt. Die gesamte Plate wurde mit einem MicroAmp™ Optical Adhesive Film (applied biosystems®) abgedichtet und die PCR im StepOnePlus™ Real-Time PCR System (applied biosystems®) durchgeführt.

Die gewonnenen Daten wurden aus der StepOne™ Software v2.3 (applied biosystems®) nach Excel (Microsoft Corporation) exportiert und das arithmetische Mittel der $\Delta\Delta C_T$ - (Schwellenzyklus, engl. *cycle threshold*) Werte der einzelnen Replikate pro Behandlung in Relation zur Negativkontrolle gesetzt. Die einzelnen Werte wurden dann in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) übertragen und die statistische Signifikanz der Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen allen Behandlungsgruppen mittels non-parametrischem Kruskal-Wallis-Test überprüft und mit dem Standardfehler angegeben. In einigen Fällen wurden auch non-parametrische Mann-Whitney U-Tests für Zweigruppenvergleiche herangezogen. Diese werden in den Abbildungen gesondert gekennzeichnet.

2.2.6 Western Blots

Zur Bestimmung der Proteinexpression nach durchgeführtem Gen-*Knockdown* wurden Western Blots durchgeführt. Dafür wurde zunächst mittels DC- (detergenzkompatiblen, engl. *detergent compatible*) Assay die Gesamtproteinkonzentration der in 2.2.4 gewonnenen Proben bestimmt.

Die DC-Assays wurden nach einem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll durchgeführt: Als erstes wurde eine Verdünnungsreihe mit Albumin *Fraction V* in RIPA-Puffer angelegt. Diese wurde neben den Proben auf eine 96-*Well*-Platte pipettiert und beide daraufhin mit DC™ Protein Assay Reagent A + B behandelt. In einem letzten Schritt wurde dann die Lichtabsorption bei 750 nm mithilfe des Tecan Reader, infinite M1000 PRO (Tecan Deutschland GmbH) gemessen. Mithilfe der Absorptionswerte der Verdünnungsreihe konnte dann in Excel (Microsoft Corporation) die Gesamtproteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

Die Proben konnten daraufhin auf eine einheitliche Gesamtproteinkonzentration verdünnt werden. Dafür wurde RIPA-Puffer verwendet, in dem wie bereits bei der Zellernte eine Tablette PhosSTOP EASYpack (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) und eine Tablette cOmplete Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack (Protease Inhibitor Cocktail Tablets) gelöst wurden. Zuletzt wurde auf jede verdünnte Probe Laemmli-Puffer (siehe Laemmli-Puffer, 2.1.6) gegeben.

Die Western Blots wurden nach den Probenverdünnungen anhand eines bereits etablierten Protokolls durchgeführt: Als erstes wurden Polyacrylamid-Gele gegossen, welche aus einem Trenngel (siehe 10 % Trenngel, 2.1.6) und einem Sammelgel bestanden (siehe 4 % Sammelgel, 2.1.6). Diese Gele wurden in einer *Mini-Trans-Blot*® *Cell* eingespannt und diese wiederum mit einfach verdünntem Laufpuffer gefüllt (siehe Laufpufferkonzentrat (10x), 2.1.6). Als optische Orientierungshilfe wurde jedes Gel mit einer PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder versehen. Nach Befüllung der Geltaschen mit den Proben wurde für circa 15 Minuten eine Elektrophorese durchgeführt (60 V, 3.00 A, 300W), bis die Proben durch das Sammelgel an die Grenze des Trenngels diffundiert sind. Danach wurde die Spannung auf 130 V erhöht, sodass die Proben sich im Trenngel innerhalb einer Stunde aufteilen konnten. Die Gele wurden danach vorsichtig aus ihren Kammern geholt und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt. Auf beiden Seiten wurde dann ein *Whatman-Paper* und ein dünner Schwamm geschichtet und das Ganze in einer Halterung in eine eisgekühlte Blotkammer eingespannt. Die Kammer wurde mit einfach verdünntem Transferpuffer (siehe Transferpufferkonzentrat (10x) befüllt und der Transfer (100 V, 3.00 A, 300W) für 90 Minuten durchgeführt.

Nach abgeschlossenem Transfer der Proben auf die Nitrozellulosemembran wurde diese in ein 50 ml *Falcon Tube* überführt und mit einer Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach später verwendetem Antikörper wurden verschiedene Blockierlösungen verwendet (siehe 2.1.3 und 5 % BSA- / 5 % Milchpulverlösung, 2.1.6).

Die Blockierung hatte den Zweck, dass der später verwendete Antikörper nicht auf der gesamten Oberfläche der Membranen bindet, sondern nur an den Proben. Nach Entfernen der Blockierlösung wurden die vorverdünnten Primärantikörper für die entsprechenden Proteine auf die Membranen pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membranen dreimal für 5 Minuten mit einfach verdünntem TBS-T (siehe TBS-T (10x), 2.1.6) gewaschen. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers wurde danach auf die Membranen pipettiert und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurde der Waschschrift mit TBS-T wiederholt und die Membranen konnten analysiert werden.

Zur Analyse der Membranen mittels Immunodetektion wurden die Membranen je nach Sichtbarkeit der Proteinbanden mit SuperSignal West Femto oder WesternBright Quantum behandelt und im Amersham Imager 600 belichtet. Nach Anfertigen der Fotografien wurden die Membranen mit dem Primär- und Sekundärantikörper für das Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) behandelt und erneut fotografiert. Die Vorgehensweise war dabei identisch zur bereits beschriebenen, wobei allerdings die Inkubationszeit des Primärantikörpers nur eine Stunde betrug.

Die Intensität der einzelnen Proteinbanden wurde in ImageQuant TL (GE Healthcare Life Sciences) bestimmt und die Werte in Excel (Microsoft Corporation) nach demselben Prinzip, wie bei der PCR-Auswertung (siehe 2.2.5), allerdings unter Miteinbezug des Referenzproteins, aufgetragen. Zuletzt wurde die statistische Signifikanz der verschiedenen Proteinexpressionen in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) mittels Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney U-Test überprüft.

2.2.7 LDH-Assays aus Überständen

Die Zytotoxizität des Gen-*Knockdowns* wurde anhand der LDH (Lactatdehydrogenase)-Spiegel in den abgenommenen Überständen überprüft. Die LDH wird beim Untergang von Zellen aus dem Zytoplasma freigesetzt und kann daher in Überständen nachgewiesen werden. Die LDH-Spiegel wurden mithilfe des CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kits nach etabliertem Protokoll gemessen. Das Prinzip des Kits beruht darauf, dass abhängig von der in den Proben enthaltenen LDH-Konzentration eine bestimmte Menge Substrat pro Zeit umgesetzt wird, welches dann absorptionsphotometrisch gemessen werden kann. Daraus kann indirekt die LDH-Konzentration ermittelt werden.

Als erstes wurde eine Substrat-Stocklösung aus dem Substrat-Mix des Kits und Aqua dest. angelegt. Zu dieser wurde dann eine Puffer-Stocklösung hinzugefügt, sodass eine fertige Reaktionslösung entstand. Zusätzlich wurde eine LDH-Positivkontrolle aus dem Kit mit 1% BSA in PBS-Lösung angelegt.

Die Proben und die LDH-Positivkontrolle wurden für den Assay in Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-Platte pipettiert und die Negativkontrolle als *Background Control* ausgewählt. Diese *Background Control* wurde direkt mit einer Stopp-Lösung behandelt. Danach wurde auf alle Proben die Reaktionslösung pipettiert und die Platte für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde auf alle Proben, bis auf die *Background Control*, die Stopp-Lösung pipettiert und die Lichtabsorption bei 490 und 680 nm im Tecan Reader, infinite M1000 PRO (Tecan Deutschland GmbH) gemessen.

Die Auswertung erfolgte in Excel (Microsoft Corporation) normiert auf die in 2.2.6 bestimmte Gesamtproteinkonzentration der Proben und in Relation zum LDH-Spiegel der Negativkontrolle. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) mittels Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney U-Test überprüft.

2.2.8 ALP-Assays aus Überständen

Zur Beurteilung früher degenerativer Veränderungen nach dem Gen-*Knockdown* wurde die ALP-Expression in den gewonnenen Überständen mittels Phosphatase Substrate Kit und eigens etabliertem Protokoll ermittelt. Die ALP trägt zu Kalzifizierungsprozessen im Herzkklappengewebe bei.

Zur Durchführung des Assays wurden zunächst die Proben auf Eis aufgetaut und die im Kit enthaltenen PNPP-Tabletten auf Raumtemperatur erwärmt. Die Proben wurden in Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt. Der im Kit enthaltene Diethanolamine Substrate Buffer (5x) wurde einfach verdünnt und in 10 ml des 1x Puffers dann zwei PNPP-Tabletten gelöst.

Die Proben wurden in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte pipettiert und wie beim LDH-Assay die Negativkontrolle als *Background Control* ausgewählt. Auf diese wurde sofort eine NaOH-Lösung (2 M) als Stopplösung pipettiert. Dann wurde zu jeder Probe die PNPP-Lösung hinzugefügt und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde dann auf alle restlichen Proben ebenfalls die NaOH-Lösung pipettiert.

Die Lichtabsorption der Proben bei 405 nm wurde mittels Tecan Reader gemessen und die Ergebnisse nach demselben Prinzip wie die LDH-Assays ausgewertet.

2.2.9 Flamingo-Fluoreszenzfärbung aus Überständen

Zur Beurteilung der Kollagen-Expression in den Proben wurde mit den Überständen eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die einzelnen Kollagen Typ 1-Bestandteile voneinander zu trennen. Diese wurden dann mithilfe einer Flamingo-Färbung sichtbar gemacht.

Zu diesem Zwecke wurden die Proben als erstes mit Laemmli-Puffer (siehe Laemmli-Puffer (6x), 2.1.6) versetzt, danach bei 95° C im Thermomixer (Eppendorf AG) für 10 Minuten erhitzt und zuletzt kurz zentrifugiert. Gleichzeitig wurde eine Positivkontrolle angelegt, indem unter sterilen Bedingungen *Collagen I, Rat Tail* aus einer Stocklösung mit DPBS auf 1,2 mg/ml verdünnt wurde. Danach wurde die Lösung mit DPBS mit Laemmli-Puffer auf eine Endkonzentration auf 1,0 mg/ml verdünnt und zuletzt für 10 Minuten im Thermomixer auf 95° C erhitzt.

Wie bei den Western Blots (siehe 2.2.6) wurden Gele aus Sammel- und Trenngelpuffer gegossen und in einer Elektrophoresekammer eingespannt, die mit Laufpuffer gefüllt wurde. Die Proben wurden nach biologischem Replikat getrennt und gemeinsam mit der Positivkontrolle, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder und Zellkulturmedium mit Laemmli-Puffer als Negativkontrolle in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde dann bei 60 V so lange durchgeführt, bis die Proben das Trenngel erreichten und daraufhin die Spannung auf 180 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Lauffront der Proben das Ende des Gels erreicht hatte.

Die Gele wurden zur anschließenden Färbung aus den Kammern entnommen und das Sammelgel abgetrennt. Im nächsten Schritt wurden die Gele für zwei Stunden mit Fixierlösung (siehe Fixierlösung, 2.1.6) auf einem Schüttler inkubiert. Nach Entfernung der Fixierlösung und Spülung der Gele mit Wasser wurde die Flamingo Färbelösung (siehe Färbelösung (1x), 2.1.6) hinzugefügt. Die Gele wurden daraufhin lichtgeschützt für circa 12 Stunden weiter auf dem Schüttler inkubiert.

Zur Detektion der Kollagen-Expression musste dann die Färbelösung abgekippt werden und die Gele wurden für einen besseren Kontrast für 10 Minuten in Aqua dest. gelegt. Dann konnten die Gele im Amersham Imager 600 belichtet werden. Die Banden der angefertigten Bilder wurden wie bei den Western Blots in ImageQuant TL analysiert und in Excel

ausgewertet. Wie bei den ALP- und LDH-Assays wurden die Werte auch hier in Relation zur Gesamtproteinkonzentration gesetzt. Abschließend wurden die statistischen Analysen in GraphPad Prism durchgeführt.

2.2.10 Gel-Zymographie aus Überständen

Zum Nachweis der MMP2 und MMP9-Aktivität in den Proben wurde eine Gel-Zymographie durchgeführt. Diese beruht darauf, dass die nach Elektrophorese aufgetrennten MMP durch ihre enzymatische Aktivität die mit Gelatinelösung (siehe 1 % Gelatinelösung, 2.1.6) angemischten Gele zersetzen. Dieser Zersetzungsprozess kann anschließend per Färbung sichtbar gemacht werden.

Als Vorbereitung wurden die Proben mit einem Sample Puffer (siehe *Sample Puffer* (5x), 2.1.6) verdünnt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden Gele gegossen, die Gelatine enthielten. Anschließend wurde mit den Proben eine Gelelektrophorese bei 150 V durchgeführt, bis ihre Lauffront das Ende des Gels erreichte.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele dreimal für 20 Minuten mit einfach verdünntem *Renaturing* Puffer (siehe *Renaturing Puffer* (10x), 2.1.6) auf dem Schüttler inkubiert. Dadurch wurde das SDS aus den Gelen entfernt und die Proteine renaturiert. Anschließend wurde die Gele zweimal für 20 Minuten in einfach verdünntem *Developing* Puffer (siehe *Developing Puffer* (10x), 2.1.6) inkubiert, sodass der Gelatineverdau stattfinden konnte. Zur Verstärkung dieses Effektes wurden die Gele anschließend für 18 Stunden in frischem *Developing* Puffer inkubiert und zuletzt für 20 Minuten in kaltem *Developing* Puffer inkubiert.

Zum Färben der Gele wurden diese für drei Stunden in 2 % Coomassie-Lösung (siehe 2 % Coomassie G250-Lösung, 2.1.6) auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurden die Gele zweimal für eine Stunde in Entfärbelösung (siehe *Destain* Lösung, 2.1.6) auf dem Schüttler inkubiert, mit Leitungswasser gewaschen und zuletzt für 15 Minuten in ebendiesem auf den Schüttler gestellt.

Die Gele wurden abschließend im Amersham Imager 600 belichtet und die Bilder wie bei den Flamingo-Färbungen analysiert und ausgewertet.

2.2.11 Hyaluronsäure-Assays aus Überständen

Zur Beurteilung der Hyaluronsäure-Expression wurden mit den Überständen Hyaluronsäure-Assays durchgeführt. Für diese wurde das Hyaluronic Acid (HA) Quantitative Test Kit (Corgenix) verwendet und die Versuche nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dafür wurden die Überstände im Verhältnis von bis zu 1:400 verdünnt.

Zunächst wurden die Proben, eine Standardreihe und eine Hyaluronsäure-Kontrolle mit einem im Kit enthaltenen Reaktionspuffer verdünnt und diese in Doppelbestimmung auf eine mitgelieferte Mikrotiterplatte pipettiert. Diese Mikrotiterplatte wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Hyaluronsäure an der behandelten Oberfläche binden konnte. Danach wurde die Lösung abgekippt und die Platte dreimal mit PBS aus dem Testkit gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBS gut von der Platte geschüttelt und die Wells mit HRP-konjugiertem HABP behandelt, welches an die Hyaluronsäure band. Die Platte wurde dann erneut für 30 Minuten inkubiert. Das HABP wurde danach wieder entfernt und viermal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurde eine Einkomponentensubstratlösung auf die Wells pipettiert und noch einmal für 30 Minuten inkubiert. Die Umsetzung des Substrats führte zu einer deutlichen Blaufärbung der Lösung.

Zum Beenden der Reaktion wurde zuletzt Stopplösung auf die Wells pipettiert und die Lichtabsorption bei 450 nm im Tecan Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen in Relation zur Gesamtproteinkonzentration.

2.2.12 GAG-Assays aus Zelllysaten

Zur Beurteilung der GAG-Expression in den Zelllysaten wurde mithilfe des Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay Kits ein GAG-Assay durchgeführt.

Die Zelllysate wurden mit einem *Papain Extraction Reagent* (siehe *Papain Extraction Reagent*, 2.1.6) behandelt und für drei Stunden bei 65° C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen inkubiert. Danach wurden diese wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Aqua dest. verdünnt. Die Proben, ein *Reagent blank* und eine Standardreihe wurden als nächstes mit einem *Blyscan dye reagent* behandelt, gut vermischt und für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert.

Die Bindung der GAG mit dem *dye reagent* führte in diesem Zeitraum zu einem Ausfällen der Komplexe, welche dann bei 12.000 rpm für 10 Minuten auf den Grund der

Reaktionsgefäße zentrifugiert wurden. Danach wurde vorsichtig der Überstand abgenommen und ein *dissociation reagent* auf die Proben gegeben. Zum besseren Lösen der gefärbten Komplexe wurden die Proben gevortext und dann noch einmal kurz zentrifugiert, um überschüssigen Schaum zu reduzieren.

Die Proben wurden daraufhin in Doppelbestimmung auf eine 96 Well-Platte pipettiert und die Lichtabsorption bei 656 nm im Tecan Reader gemessen. Analog zu den Vorversuchen wurden die Messwerte dann gegen die Gesamtproteinkonzentration aufgetragen und ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierungsarbeiten

Um die Effektivität des erstellten Transfektionsprotokolls für den Gen-*Knockdown* zu überprüfen, wurde eine RNA-Isolation mit anschließender semi-quantitativer RT-PCR durchgeführt. In der Auswertung wurde dann eine Negativkontrolle, die mit funktionsloser, sogenannter *scrambled* siRNA AllStars behandelt wurde mit den jeweiligen Proben verglichen, die entweder mit siRNA gegen *Foxo1* oder *Mtor* behandelt wurden. Die Negativkontrolle wurde ebenfalls mit einer gänzlich unbehandelten Kontrolle und mit einer, die lediglich mit Lipofectamine behandelt wurde, verglichen, um einen Effekt des reinen Transfektionsprozesses auf die *Mtor*- und *Foxo1*-Expression auszuschließen. Die generelle Effektivität der Transfektion wurde mithilfe einer Positivkontrolle mit siRNA gegen *Lmna* überprüft.

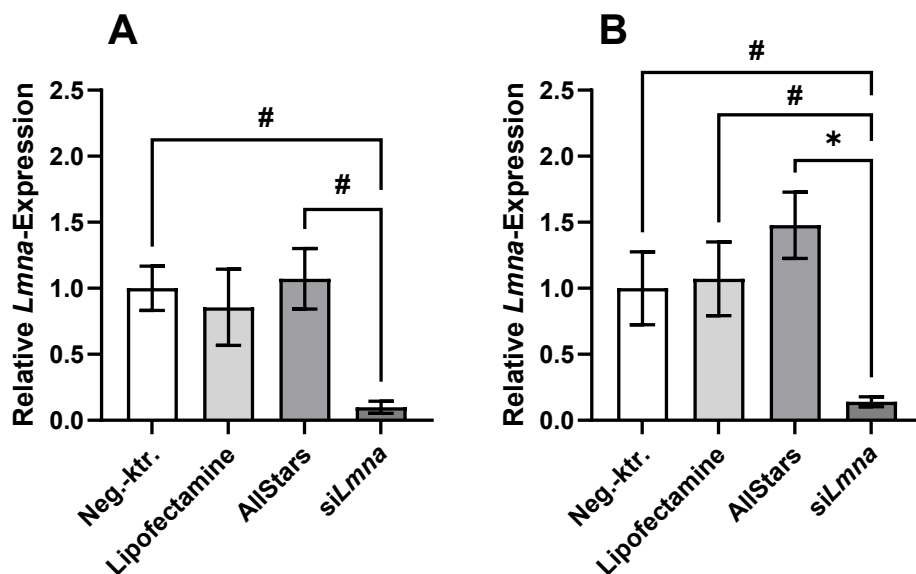


Abb. 1: Relative mRNA-Expression von *Lmna* 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Lmna*

Relative mRNA-Expression von *Lmna* 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Lmna* in Relation zu einer unbehandelten, einer mit Lipofectamine behandelten und einer mit der *scrambled* siRNA AllStars behandelten Kontrolle (n=4). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test; # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: AllStars = *scrambled* siRNA; *Lmna* = Lamin A/C; Neg.-ktr. = unbehandelte Negativkontrolle; siLmna = siRNA gegen Lamin A/C.

Anhand der Positivkontrolle mit siRNA gegen *Lmna* konnte bereits 72 Stunden nach der ersten Transfektion eine signifikante Herunterregulation der *Lmna*-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle um etwa 90 % nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Auch im Vergleich zu *scrambled* siRNA AllStars war dieser Unterschied

signifikant ($p < 0,05$). Die Behandlung der Zellen nur mit Lipofectamine zeigte keine signifikante Abweichung der *Lmna*-Expression verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Abb. 1A). 48 Stunden nach der zweiten Transfektion ließ sich eine signifikante Herunterregulation der *Lmna*-Expression in den mit siRNA gegen *Lmna* behandelten Proben gegenüber allen Kontrollen nachweisen ($p < 0,05$). Die Herunterregulation gegenüber der unbehandelten Negativkontrolle lag hier bei ca. 86 % (siehe Abb. 1B).

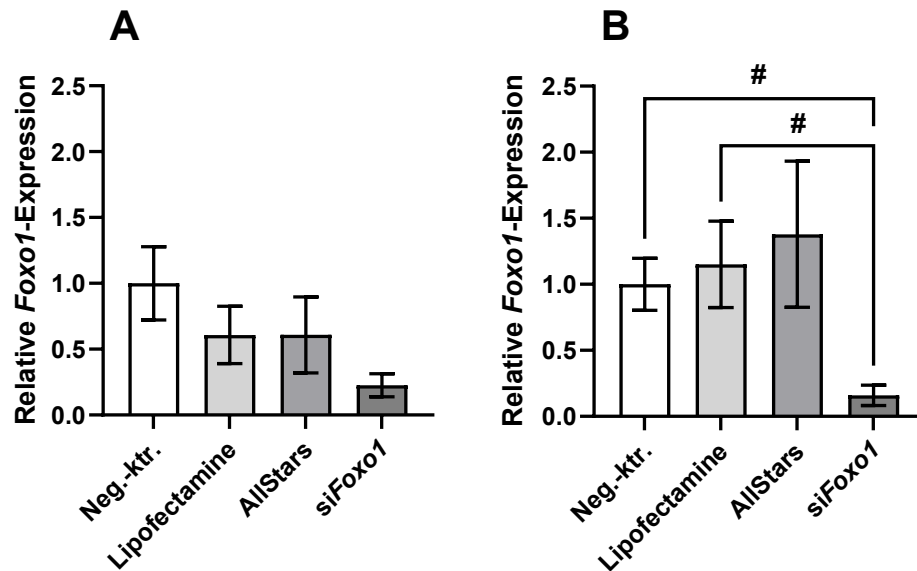


Abb. 2: Relative mRNA-Expression von *Foxo1* 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1*

Relative mRNA-Expression von *Foxo1* 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* in Relation zu einer unbehandelten, einer mit Lipofectamine behandelten und einer mit der *scrambled* siRNA AllStars behandelten Kontrolle ($n=4$). # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: AllStars = *scrambled* siRNA; *Foxo1* = *Forkhead box protein O1*; Neg.-ktr. = unbehandelte Negativkontrolle; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*.

Für den *Foxo1*-Knockdown zeigte sich, dass die 72 Stunden nach der ersten Transfektion geernteten Zellen, die mit siRNA gegen *Foxo1* behandelt wurden, etwa 77 % weniger *Foxo1*-mRNA aufwiesen als die unbehandelte Kontrolle. Dieser Effekt war allerdings nicht signifikant. Signifikante Unterschiede der *Foxo1*-Expression zwischen den einzelnen Kontrollen traten nicht auf (siehe Abb. 2A). Nach weiteren 48 Stunden zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der *Foxo1*-Expression um 84 % unter dem *Foxo1*-Knockdown gegenüber der Negativkontrolle ($p < 0,05$). Gegenüber Lipofectamine war die Herunterregulation ebenfalls signifikant ($p < 0,05$). Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kontrollen, was die *Foxo1*-Expression anging (siehe Abb. 2B).

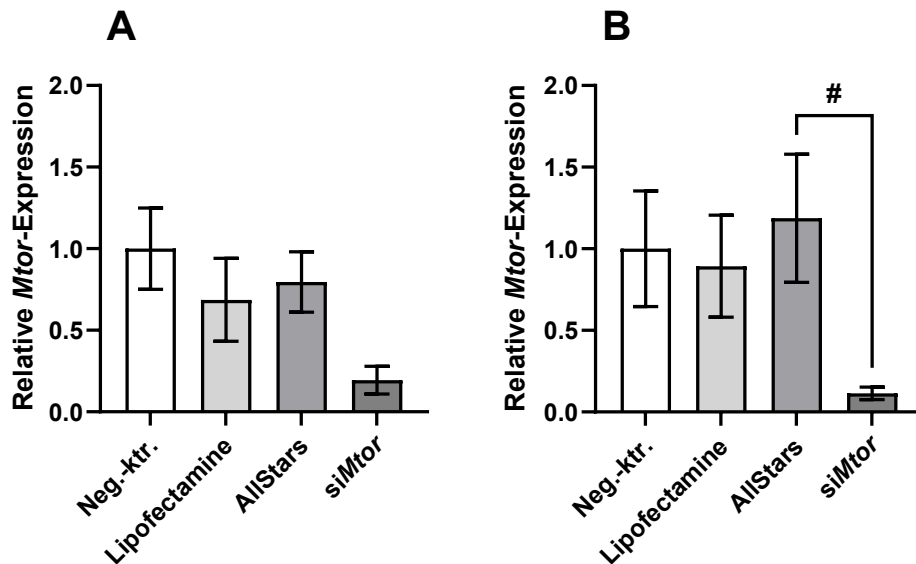


Abb. 3: Relative mRNA-Expression von *Mtor* 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor*

Relative mRNA-Expression von *Mtor* 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Mtor* in Relation zu einer unbehandelten, einer mit Lipofectamine behandelten und einer mit der *scrambled* siRNA AllStars behandelten Kontrolle (n=4). # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: AllStars = *scrambled* siRNA; *Mtor* = *Mechanistic target of Rapamycin*; Neg.-ktr. = unbehandelte Negativkontrolle; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Ähnliche Effekte wie bei *Foxo1* zeigten sich auch beim *Mtor-Knockdown*: 72 Stunden nach der ersten Transfektion wiesen die Proben, die mit siRNA gegen *Mtor* behandelt wurden, ca. 81% weniger *Mtor*-mRNA auf als die unbehandelte Kontrolle, wobei dieser Effekt jedoch nicht signifikant war (siehe Abb. 3A). 48 Stunden nach der zweiten Transfektion zeigte sich ein Abwärtstrend von ca. 88 %, welcher auch nicht signifikant war. Nun zeigte sich jedoch eine signifikant geringere *Mtor*-Expression im Vergleich zur Kontrolle mit AllStars ($p < 0,05$) (siehe Abb. 3B). Die verschiedenen Kontrollen wiesen zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der *Mtor*-mRNA-Expression auf (siehe Abb. 3A+B).

Obwohl in dieser Auswertung einige Messwerte keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen aufwiesen, wurde das Transfektionsprotokoll trotzdem für den Hauptversuch beibehalten, da sich in allen Fällen ein starker Abwärtstrend abzeichnete. Da dieser Trend 48 Stunden nach der zweiten Transfektion verhältnismäßig am stärksten ausfiel, wurde die Zellernte im Hauptversuch auf diesen Zeitpunkt beschränkt und dann noch einmal mit einer größeren Anzahl biologischer Replikate (n=9) überprüft (siehe 3.2.1). Zum Erhalt möglichst aussagekräftiger Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche die *scrambled* siRNA AllStars

als Negativkontrolle verwendet, da diese den reinen Transfektionsprozess miteinbezog und keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollen aufwies.

3.2 Hauptversuch

3.2.1 Kontrolle der Effektivität des Gen-Knockdowns von *Foxo1* und *Mtor*

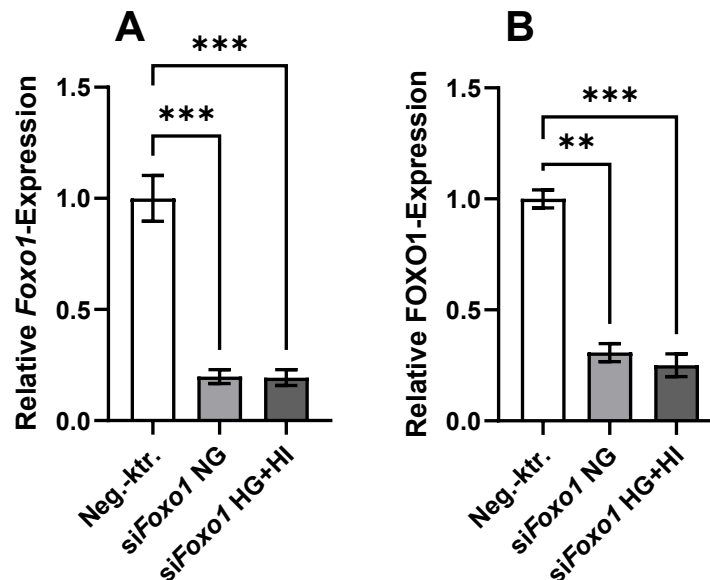


Abb. 4: Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Foxo1* nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen

Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Foxo1* nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: *Foxo1* = *Forkhead box protein O1*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*.

Der in den Etablierungsarbeiten beobachtete *Knockdown*-Effekt der Transfektion wurde im Hauptversuch noch einmal mit einer größeren Probenanzahl (n=9) zur Kontrolle überprüft. Im Nachfolgenden wird die mit der *scrambled* siRNA AllStars und normoglykämischem Nährmedium behandelte Kontrolle stets als Negativkontrolle bezeichnet. Für *Foxo1* zeigte sich, dass auf mRNA-Ebene ein Knockdown von ca. 80 % ($p < 0,001$) für die NG-Behandlung und von 81 % ($p < 0,001$) für die HG+HI-Behandlung in Relation zur Negativkontrolle erzielt werden konnte (siehe Abb. 4A).

Auf Proteinebene sahen die Effekte für den *Foxo1*-*Knockdown* ähnlich aus: Bei der NG-Behandlung wurde die FOXO1-Expression um 69 % ($p < 0,01$) reduziert und bei der HG+HI-Behandlung um 75 % ($p < 0,001$) (siehe Abb. 4B). Aus diesen beiden Untersuchungen konnte

geschlussfolgert werden, dass der *Knockdown* für die folgenden Versuche hinreichend effektiv war.

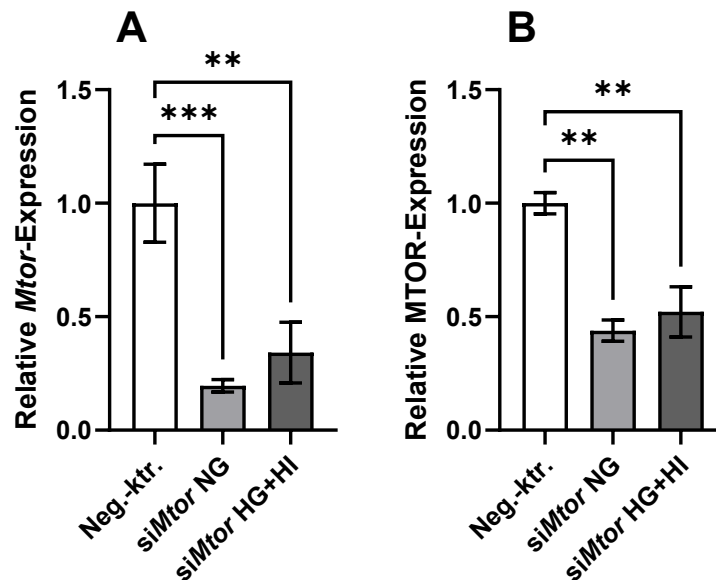


Abb. 5: Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Mtor* nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen

Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Mtor* nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *Mtor* = Mechanistic target of Rapamycin; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Die Kontrolle des *Mtor*-*Knockdowns* ergab auf mRNA-Ebene eine Reduktion der Expression um 80 % ($p < 0,001$) in Relation zur Negativkontrolle bei der NG-Behandlung. Bei der HG+HI-Behandlung betrug sie 66 % ($p < 0,01$) (siehe Abb. 5A).

Auf Proteinebene fiel der *Knockdown*-Effekt für die *Mtor*-Expression weniger stark aus und betrug nur 56 % ($p < 0,01$) für die NG-Behandlung und 48 % ($p < 0,01$) für die HG+HI-Behandlung (siehe Abb. 5B). Insgesamt war der *Knockdown* aber auch hier hinreichend effektiv für die Folgeversuche.

3.2.2 Einfluss der Behandlungen auf die Zellvitalität

Der Einfluss der Transfektion und des *Knockdowns* auf die Zellvitalität wurde einerseits lichtmikroskopisch und andererseits mittels LDH-Assay überprüft.

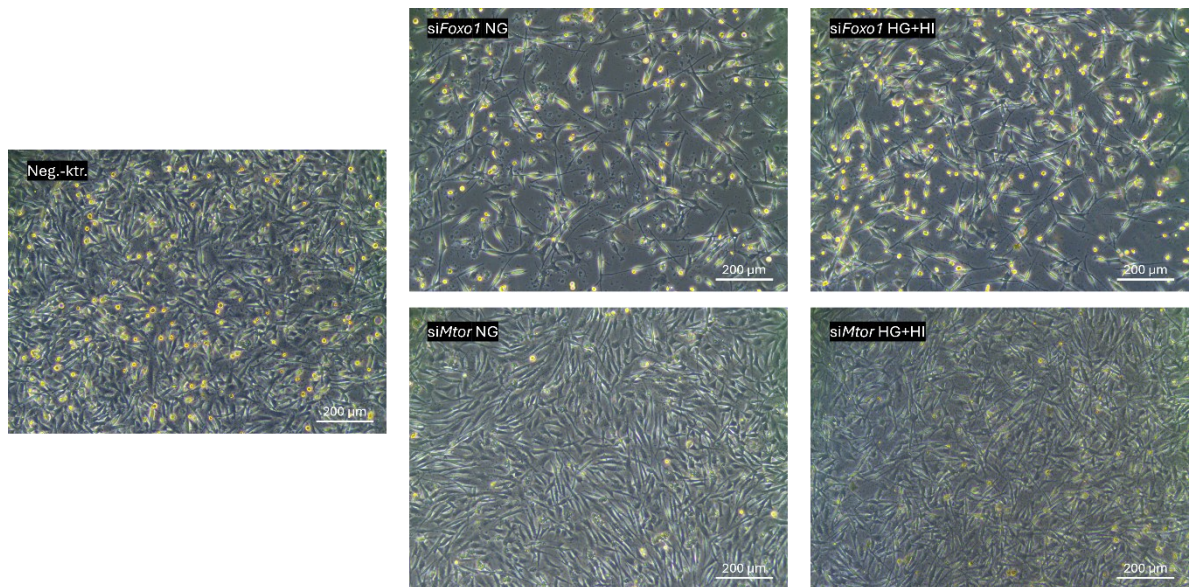


Abb. 6: Lichtmikroskopische Darstellung oviner VICs nach Transfektion mit siRNA

Die ovinen VICs wurden nach der Transfektion mit ihrer jeweiligen siRNA kurz vor der Zellernte in 10-facher Vergrößerung im Maßstab 200 µm lichtmikroskopisch dargestellt. Für *siFoxo1* zeigten sich sowohl für die NG- als auch HG+HI-Behandlung deutlich reduzierte Zellzahlen im Vergleich zur Negativkontrolle. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; *siFoxo1* = siRNA gegen *Foxo1*; *siMtor* = siRNA gegen *Mtor*; NG = Normoglykämie.

Lichtmikroskopisch zeichnete sich nach der Transfektion in den mit siRNA gegen *Foxo1* behandelten Zellen eine deutliche Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle ab. Dieser Effekt war sowohl bei der NG- als auch bei der HG+HI-Behandlung kurz vor der Zellernte zu beobachten (siehe Abb. 6). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde sich für die späteren Versuche dazu entschlossen, die gemessenen Absorptionswerte oder Konzentrationen untersuchter Proteine auf die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe zu normieren. Dies hatte das Ziel, nicht fälschlicherweise durch die unterschiedlichen Zellzahlen eine scheinbar veränderte Expression der Proteine entstehen zu lassen.

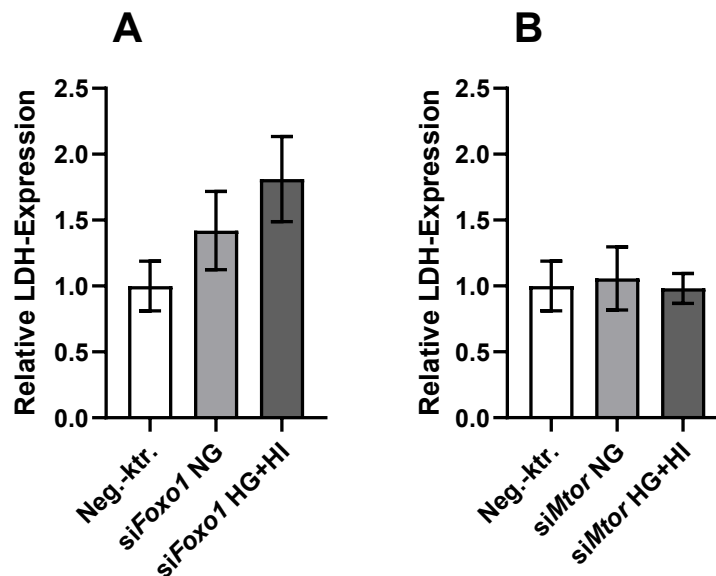


Abb. 7: Relative LDH-Proteinexpression nach Behandlung mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Bedingungen

Relative LDH-Proteinexpression in Zellüberständen nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; LDH = Lactatdehydrogenase; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; si*Foxo1* = siRNA gegen *Foxo1*; si*Mtor* = siRNA gegen *Mtor*.

Der lichtmikroskopisch beobachtete Effekt des *Foxo1-Knockdowns* auf die Zellvitalität konnte sich in den LDH-Assays nicht eindeutig bestätigen, wenngleich auch ein Trend der LDH-Freisetzung in den Überständen zu beobachten war: Bei der NG-Behandlung gab es einen Anstieg um 41 % und bei der HG+HI-Behandlung gab es einen stärkeren Anstieg um 76 %. In beiden Fällen war dieser Effekt jedoch nicht signifikant (siehe Abb. 7A).

Für die Freisetzung von LDH waren keine signifikanten Unterschiede bei einem *Mtor-Knockdown* zwischen den einzelnen Behandlungen zu erkennen (siehe Abb. 7B).

3.2.3 Einfluss des Gen-Knockdowns auf Differenzierungs- und Degenerationsmarker

Um zu untersuchen, wie der Gen-Knockdown sich auf Differenzierungs- und Degenerationsmarker auswirkt, wurden folgende molekulare Marker betrachtet: Das Gen *actin alpha 2* (*Acta2*) bzw. dessen Protein *alpha smooth muscle actin* (α SMA) als Differenzierungsmarker, ALP als früher und *Opn* als später Degenerationsmarker.

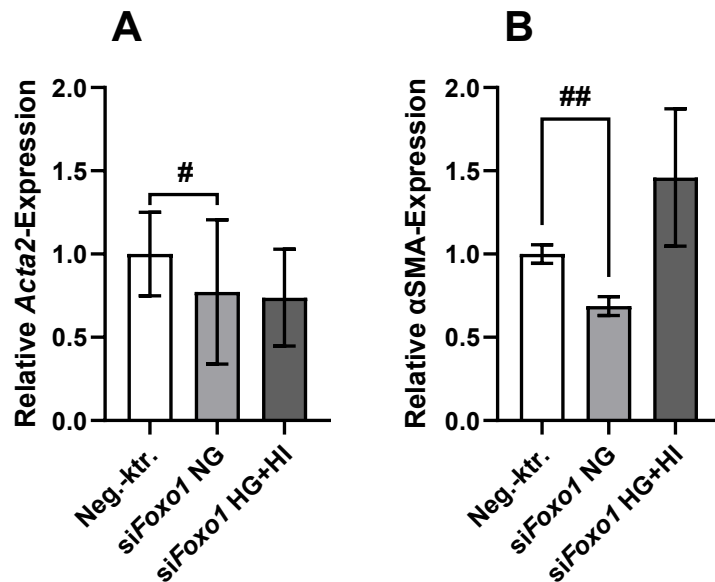


Abb. 8: Relative Expression des *Acta2*-Gens auf mRNA-Ebene (A) und des Genproduktes α SMA auf Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative *Acta2*-mRNA-Expression (A) und Proteinexpression dessen Genproduktes α SMA (B) nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: *Acta2* = *actin alpha 2*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*; α SMA = *alpha smooth muscle actin*.

Beim *Foxo1*-Knockdown zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der *Acta2*-mRNA um etwa 23 % ($p < 0,05$) unter NG-Bedingungen. Unter HG+HI-Bedingungen war dieser Effekt nicht signifikant (siehe Abb. 8A). Passend dazu zeigte sich für das Protein α SMA eine signifikante Herunterregulation um 31 % ($p < 0,01$) unter NG-Bedingungen (siehe Abb. 8B).

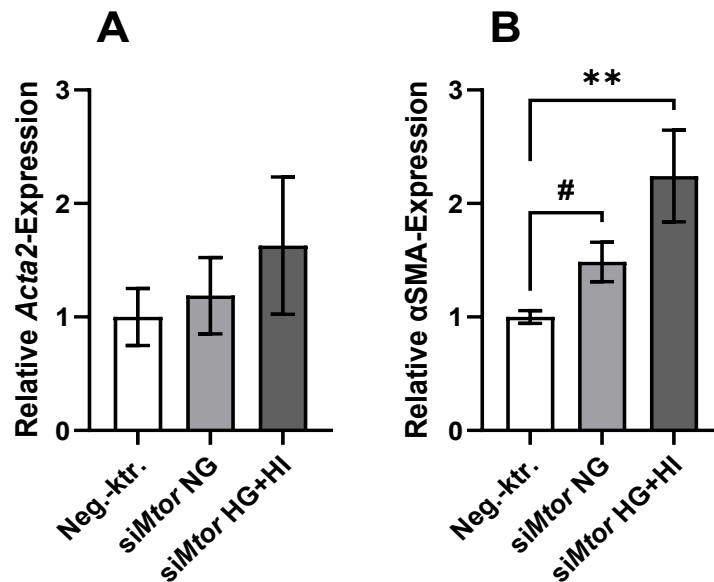


Abb. 9: Relative Expression des *Acta2*-Gens auf mRNA-Ebene (A) und des Genproduktes α SMA auf Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative *Acta2*-mRNA-Expression (A) und Proteinexpression dessen Genproduktes α SMA (B) nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis-Test; # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: *Acta2* = *actin alpha 2*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; si*Mtor* = siRNA gegen *Mtor*; α SMA = *alpha smooth muscle actin*.

Beim *Mtor-Knockdown* verhielt es sich anders: Hier war bei der *Acta2*-Expression eher ein statistisch nicht signifikanter Aufwärtstrend für die HG+HI-Behandlung zu erkennen (siehe Abb. 9A). Für die HG+HI-Behandlung wurde dieser Effekt für die α SMA-Expression noch deutlicher, da im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante und um 124 % höhere ($p < 0,01$) Expression vorlag. Gleichzeitig war hier auch eine um 48 % höhere α SMA-Expression unter NG-Bedingungen zu verzeichnen ($p < 0,05$) (siehe Abb. 9B).

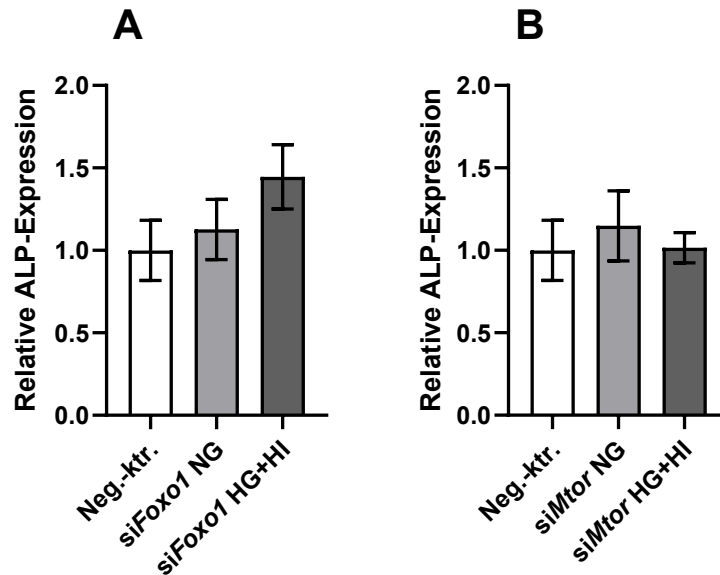


Abb. 10: Relative ALP-Expression nach Behandlung mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative ALP-Proteinexpression in Zellüberständen nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). Abkürzungen: ALP = Alkalische Phosphatase; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; si*Foxo1* = siRNA gegen *Foxo1*; si*Mtor* = siRNA gegen *Mtor*.

Bei der Untersuchung der ALP-Expression mittels ALP-Assay ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Negativkontrollen und den NG- und HG+HI-Behandlungen sowohl beim *Foxo1*- als auch beim *Mtor*-Knockdown (siehe Abb. 10A+B). Einzig bei der HG+HI-Behandlung zeichnete sich beim *Foxo1*-Knockdown ein statistisch nicht signifikanter Aufwärtstrend der ALP-Expression von ca. 44 % ab (siehe Abb. 10A). Aus der semi-quantitativen RT-PCR zur mRNA-Expression ließen sich keine Ergebnisse ableiten, da die gemessenen C_T -Werte zumeist über dem Cut-off des Gerätes lagen.

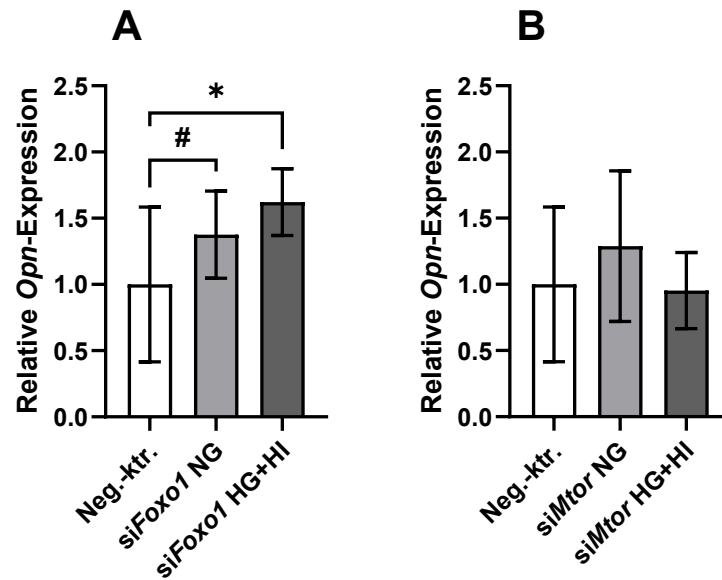


Abb. 11: Relative mRNA-Expression von *Opn* nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative mRNA-Expression von *Opn* nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* (A) und *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test; # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; *Opn* = Osteopontin; si*Foxo1* = siRNA gegen *Foxo1*; si*Mtor* = siRNA gegen *Mtor*.

Bezüglich der mRNA-Expression von *Opn* ließ sich Folgendes beobachten: Beim *Foxo1*-*Knockdown* zeigte sich unter NG-Behandlung eine ca. 37 % ($p < 0,05$) und unter HG+HI-Behandlung eine ca. 62 % ($p < 0,05$) höhere Expression als in der Negativkontrolle (siehe Abb. 11A). Der *Mtor*-*Knockdown* hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von *Opn* (siehe Abb. 11B).

3.2.4 Einfluss des Gen-*Knockdowns* auf Kollagen-assoziierte Gene

Der Einfluss des Gen-*Knockdowns* auf Kollagen-assoziierte Gene wurde anhand der mRNA-Expression des Gens *Colla1*, der Expression der Einfach- und Dreifachhelices von Kollagen Typ 1 und der mRNA- und Proteinexpression der MMP2 und MMP9 untersucht.

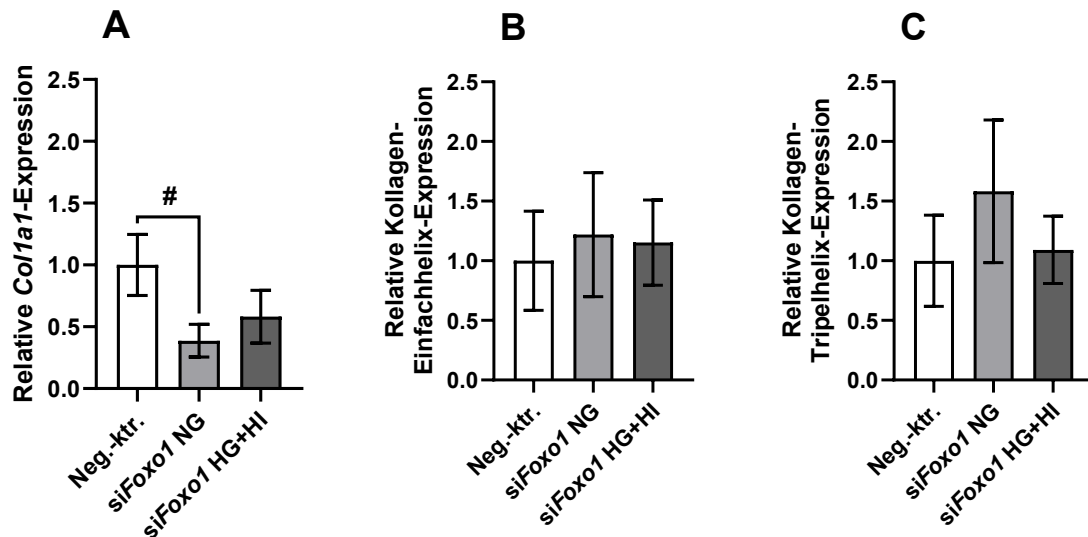


Abb. 12: Relative Expression des *Col1a1*-Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Kollagen-Einfach- (B) und -Tripelhelices (C) nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative *Col1a1*-mRNA-Expression (A) sowie Expression der Kollagen-Einfach- (B) und -Tripelhelices (C) nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: *Col1a1* = collagen 1 type 1; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*.

Für *Col1a1* zeichnete sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression beim *Foxo1*-Knockdown um 61 % ($p < 0,05$) unter NG-Bedingungen ab (siehe Abb. 12A). Die Expression der Einfach- und Tripelhelices schien nicht signifikant durch den *Foxo1*-Knockdown beeinflusst zu werden (siehe Abb. 12B+C).

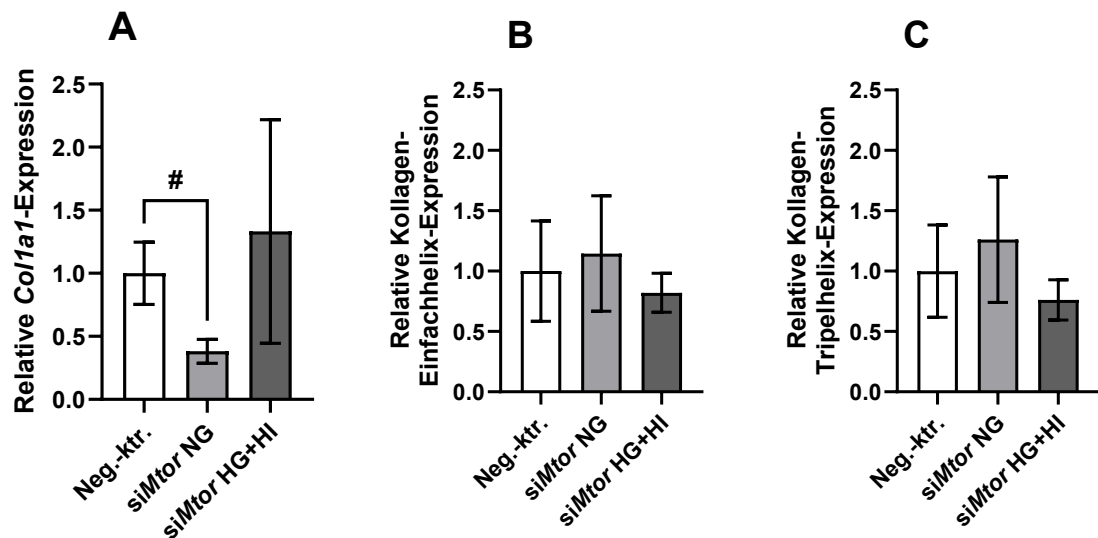


Abb. 13: Relative Expression des *Col1a1*-Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Kollagen-Einfach- (B) und -Tripelhelices (C) nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative *Col1a1*-mRNA-Expression (A) sowie Expression der Kollagen-Einfach- (B) und -Tripelhelices (C) nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: *Col1a1* = collagen 1 type 1; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Der *Mtor-Knockdown* schien zwar eine statistisch signifikante Herunterregulation der *Col1a1*-mRNA um 62 % ($p < 0,05$) unter NG-Bedingungen zu bewirken (siehe Abb. 13A), hatte dabei jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die relative Proteinexpression der Einfach- und Tripelhelices (siehe Abb. 13B+C).

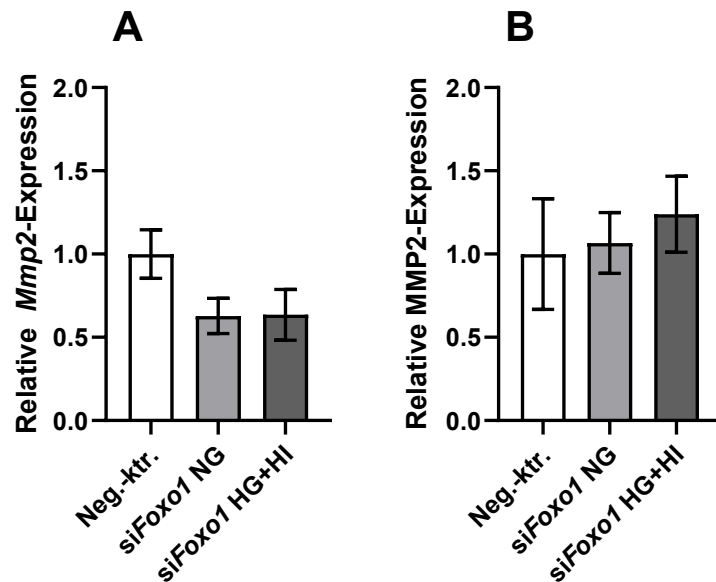


Abb. 14: Relative Expression des *Mmp2*-Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Mmp2* nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *Mmp2* = Matrix-Metalloproteinase 2; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; si*Foxo1* = siRNA gegen *Foxo1*.

Bezüglich der *Mmp2*-Expression wurden unter Einfluss des *Foxo1*-Knockdowns folgende Beobachtungen gemacht: Die mRNA-Expression war bei der NG-Behandlung ca. 37 % und bei der HG+HI-Behandlung ca. 36 % niedriger als bei der Negativkontrolle. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (siehe Abb. 14A). Für die Proteinexpression gab es eher einen gegenteiligen, wenn auch nicht signifikanten Trend (siehe Abb. 14B).

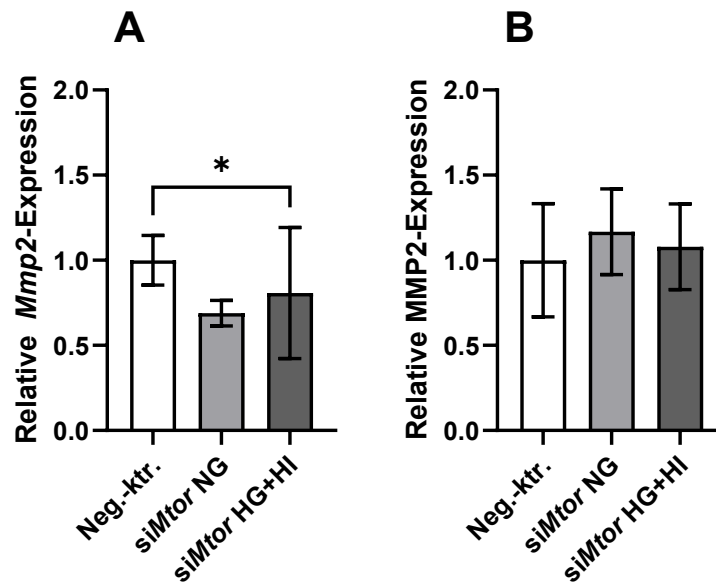


Abb. 15: Relative Expression des *Mmp2*-Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Mmp2* nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *Mmp2* = Matrix-Metalloproteinase 2; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Im Gegensatz zum *Foxo1-Knockdown* hatte der *Mtor-Knockdown* einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der *Mmp2*: Unter HG+HI-Bedingungen zeichnete sich eine signifikante, um 19 % ($p < 0,05$) niedrigere Expression ab als in der Negativkontrolle. Bei der NG-Behandlung ließ sich dieser Effekt nicht beobachten (siehe Abb. 15A). Der für die HG+HI-Behandlung beobachtete Effekt ließ sich bei der Untersuchung der MMP2-Proteinexpression nicht bestätigen (siehe Abb. 15B).

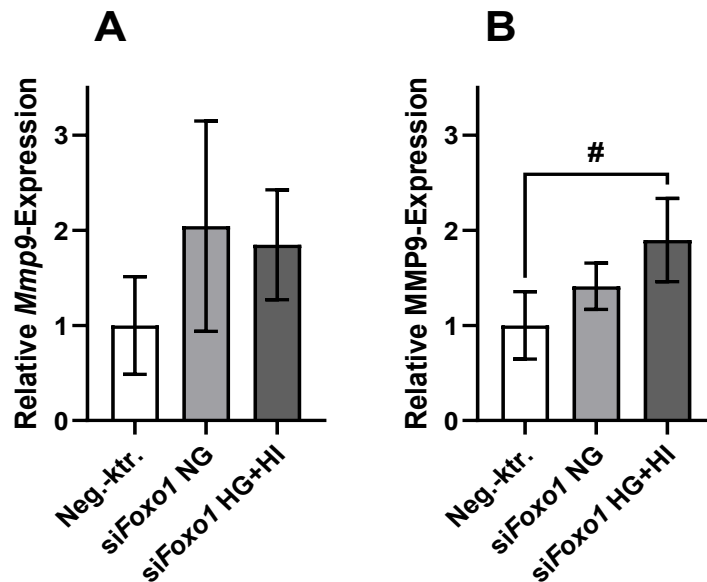


Abb. 16: Relative Expression des *Mmp9*-Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Mmp9* nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *Mmp9* = Matrix-Metalloproteinase 9; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*.

Bei der Untersuchung der *Mmp9*-Expression war unter Einfluss des FoxO1-Knockdowns zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen und der Negativkontrolle in Bezug auf die mRNA-Expression zu sehen (siehe Abb. 16A). Bei der Proteinexpression hingegen zeigte sich unter HG+HI-Behandlung ein signifikanter Aufwärtstrend um ca. 90 % ($p < 0,05$) (siehe Abb. 16B).

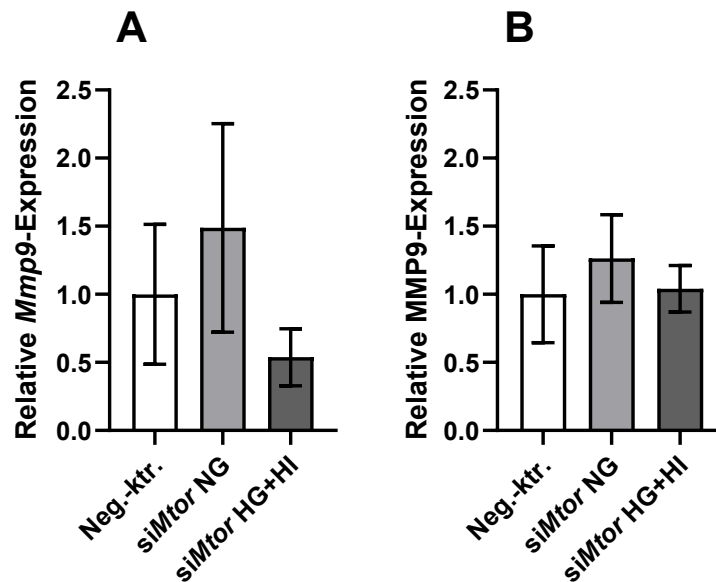


Abb. 17: Relative Expression des *Mmp9*-Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von *Mmp9* nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Bedingungen im Vergleich zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; *Mmp9* = Matrix-Metalloproteinase 9; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; si*Mtor* = siRNA gegen *Mtor*.

Weder die Expression der *Mmp9*-mRNA (siehe Abb. 17A), noch die des MMP9-Proteins (siehe Abb. 17B) wurde signifikant durch den *Mtor*-Knockdown beeinflusst.

3.2.5 Einfluss des Gen-Knockdowns auf GAG und PG

Um den Einfluss des Gen-Knockdowns auf GAG und PG zu untersuchen, wurden die Gesamt-GAG, die mRNA-Expression des Gens *hyaluronan synthase 2* (*Has2*), die Expression der Hyaluronsäure sowie die mRNA-Expression von *Dcn* und *Bgn* untersucht.

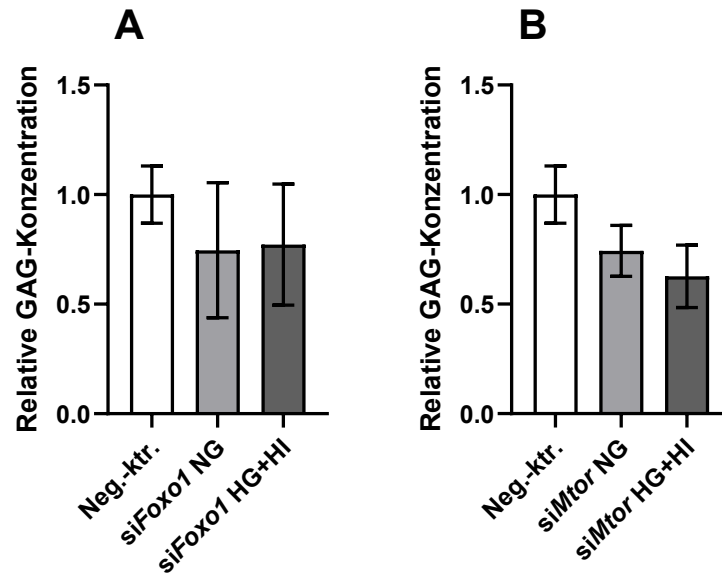


Abb. 18: Relative GAG-Konzentrationen nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative GAG-Konzentrationen aus Zelllysaten oviner VICs nach Behandlung mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) und NG- oder HG+HI-Behandlung in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=6). Abkürzungen: GAG = Glykosaminoglykane; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Bei der Auswertung der GAG-Konzentration in Relation zur Negativkontrolle zeigte sich beim *Foxo1*-Knockdown für die NG- und HG+HI-Behandlung lediglich ein leichter Abwärtstrend, der allerdings nicht signifikant war (siehe Abb. 18A). Beim *Mtor*-Knockdown sah es ähnlich aus, hier war der Abwärtstrend in der Expression bei der HG+HI-Behandlung noch deutlicher, aber weiterhin nicht signifikant (siehe Abb. 18B).

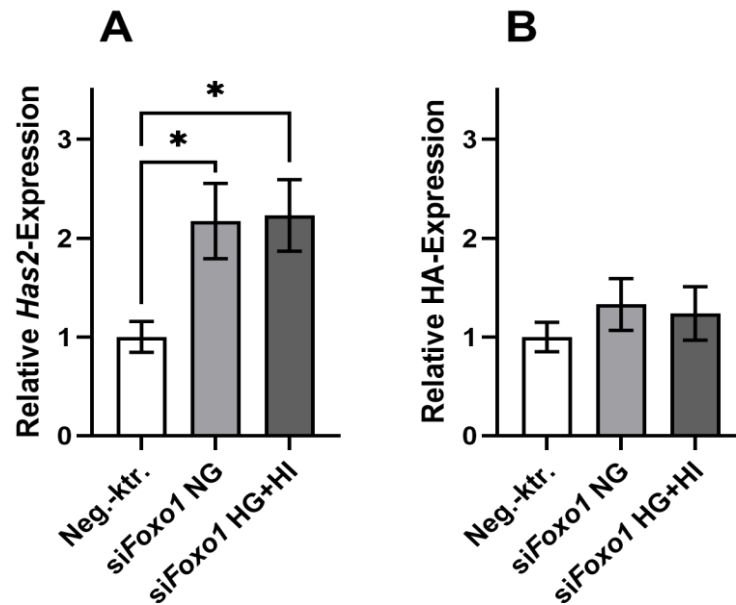


Abb. 19: Relative Expression des *Has2*-Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Hyaluronsäure (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative Expression der *Has2* auf mRNA-Ebene (A) und der von HAS2 produzierten Hyaluronsäure (B) in ovinen VICs nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Behandlung jeweils in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: HA = Hyaluronsäure (engl. *hyaluronic acid*); *Has2* = *hyaluronan synthase 2*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*.

Der *Knockdown* von *Foxo1* führte in den Proben zu einem signifikanten Anstieg der *Has2*-mRNA um ca. 117 % ($p < 0,05$) bei der NG-Behandlung und ca. 123 % ($p < 0,05$) bei der HG+HI-Behandlung (siehe Abb. 19A). Im Gegensatz dazu war in den Proben kein signifikanter Anstieg der durch die HAS2 gebildeten Hyaluronsäure zu verzeichnen. Dies betraf sowohl NG- als auch HG+HI-Behandlung (siehe Abb. 19B).

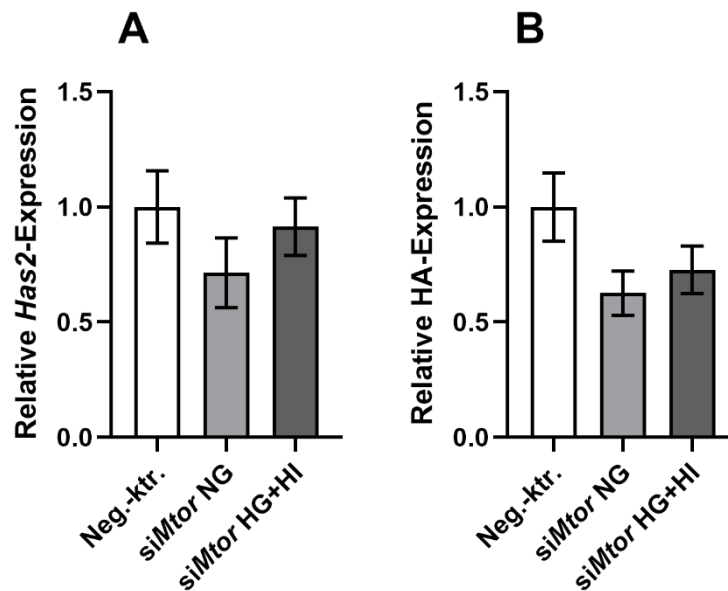


Abb. 20: Relative Expression des *Has2*-Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Hylauronsäure (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative Expression der *Has2* auf mRNA-Ebene (A) und der von HAS2 produzierten Hyaluronsäure (B) in ovinen VICs nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Behandlung jeweils in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). Abkürzungen: HA = Hyaluronsäure (engl. *hyaluronic acid*); *Has2* = *hyaluronan synthase 2*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Im Vergleich zum *Foxo1-Knockdown* schien der *Mtor-Knockdown* die Expression der *Has2*-mRNA nicht signifikant zu beeinflussen (siehe Abb. 20A). Ebenso blieben auch die Hyaluronsäure-Spiegel unbeeinflusst (siehe Abb. 20B).

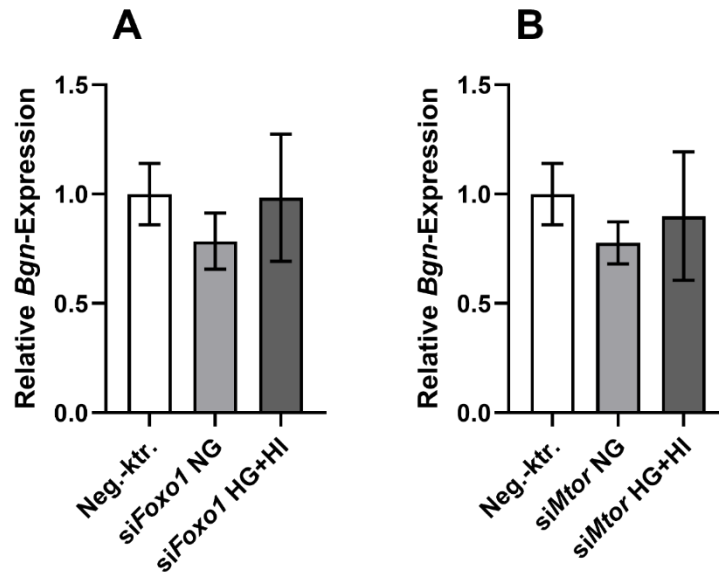


Abb. 21: Relative mRNA-Expression von *Bgn* nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative mRNA-Expression von *Bgn* nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). Abkürzungen: *Bgn* = Biglykan; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Die mRNA-Expression des Proteoglykans *Bgn* schien weder durch einen *Foxo1*-, noch durch einen *Mtor*-*Knockdown* signifikant beeinflusst zu werden (siehe Abb. 21A+B).

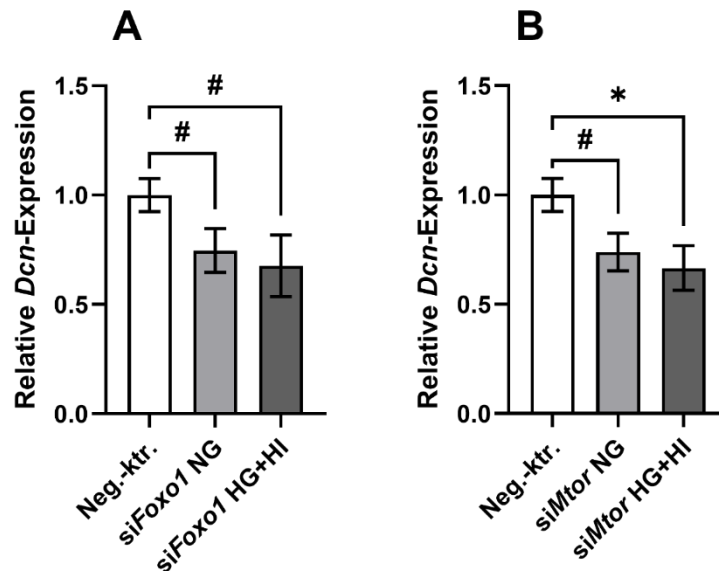


Abb. 22: Relative mRNA-Expression von *Dcn* nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative mRNA-Expression von *Dcn* nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test; # $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test. Abkürzungen: *Dcn* = Decorin; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Anders als bei *Bgn* schien der Gen-Knockdown von *Foxo1* und *Mtor* einen Einfluss auf die mRNA-Spiegel von *Dcn* zu haben, bei dem es sich ebenfalls um ein Proteoglykan handelt: Der *Foxo1*-*Knockdown* bewirkte bei der NG-Behandlung einen signifikanten Abfall der *Dcn*-mRNA um ca. 25 % ($p < 0,05$) und um ca. 32 % ($p < 0,05$) unter der HG+HI-Behandlung (siehe Abbildung 22A). Beim *Mtor*-*Knockdown* war der gleiche Effekt zu sehen. Unter der NG-Behandlung kam es zu einem Abfall der *Dcn*-mRNA um ca. 26 % ($p < 0,05$), während es bei der HG+HI-Behandlung ca. 33 % ($p < 0,05$) waren (siehe Abb. 22B).

3.2.6 Interaktionen des Gen-Knockdowns mit mitogenen Signalwegen

Im Rahmen der beschriebenen Versuche wurde untersucht, ob der *Knockdown* von *Foxo1* und *Mtor* eine Auswirkung auf die mitogenen Ziele des Insulinrezeptorsignalwegs hat. Hierbei wurden Interaktionen zwischen *Foxo1* und *Mtor*, mit ihrem *upstream*-Regulator AKT sowie mit ERK1 (engl. *extracellular signal regulated kinase 1*) und ERK2 (engl.

extracellular signal regulated kinase 2) untersucht. Hierbei wurde sich auf die Regulation auf posttranslationaler Proteinebene fokussiert.

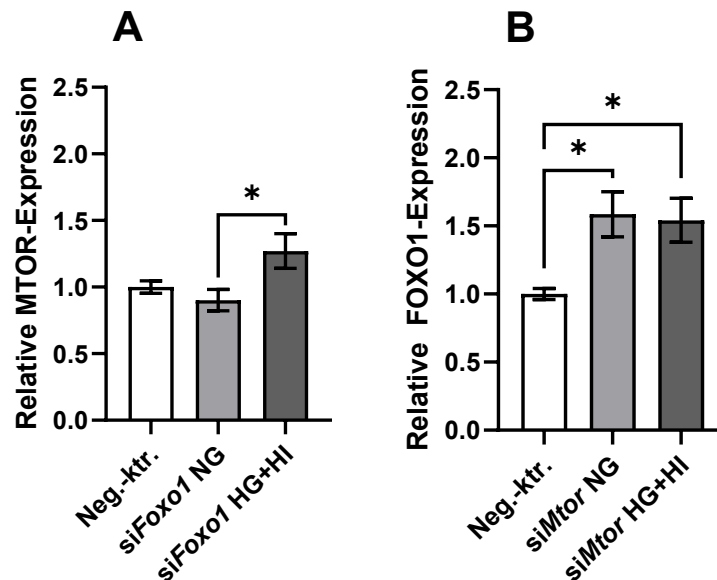


Abb. 23: Relative MTOR-Proteinexpression in ovinen VICs nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* (A) und relative FOXO1-Proteinexpression nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative MTOR-Proteinexpression nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* (A) und relative FOXO1-Proteinexpression nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* (B) in ovinen VICs jeweils unter NG- oder HG+HI-Behandlung und in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: FOXO1 = *forkhead box protein O1*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; MTOR = *mechanistic target of Rapamycin*; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Es konnte gezeigt werden, dass ein *Foxo1-Knockdown* nur im Vergleich zur NG-Behandlung bei der HG+HI-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der MTOR-Proteinexpression führte. Dieser Anstieg betrug ca. 27 % ($p < 0,05$) (siehe Abb. 23A).

Dem gegenübergestellt führte ein *Mtor-Knockdown* zu einem signifikanten Anstieg der FOXO1-Proteinexpression um ca. 59 % ($p < 0,05$) bei der NG- und um ca. 54 % ($p < 0,05$) bei der HG+HI-Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Abb. 23B).

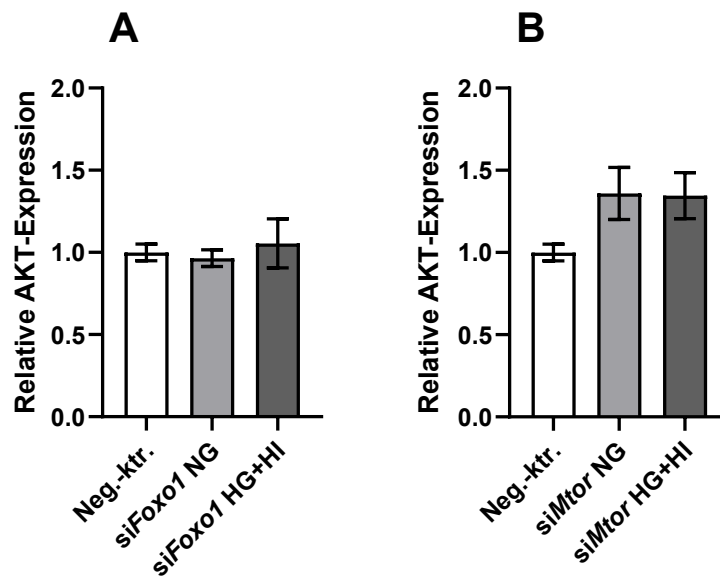


Abb. 24: Relative AKT-Proteinexpression nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative AKT-Proteinexpression nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* (A) oder *Mtor* (B) jeweils unter NG- oder HG+HI-Behandlung in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). Abkürzungen: HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Bei der Untersuchung von AKT, bei dem es sich um den *upstream*-Regulator von sowohl *Foxo1* als auch *Mtor* handelt, zeigte sich, dass ein *Foxo1-Knockdown* keine signifikanten Auswirkungen auf die AKT-Proteinexpression zu haben scheint (siehe Abb. 24A). Beim *Mtor-Knockdown* zeigte sich hingegen, dass dieser im Trend einen Anstieg der AKT-Expression zur Folge zu haben scheint. Dieser betrug bei der NG-Behandlung ca. 36 % und bei der HG+HI-Behandlung ca. 35 %, war allerdings bei beiden nicht signifikant (siehe Abb. 24B).

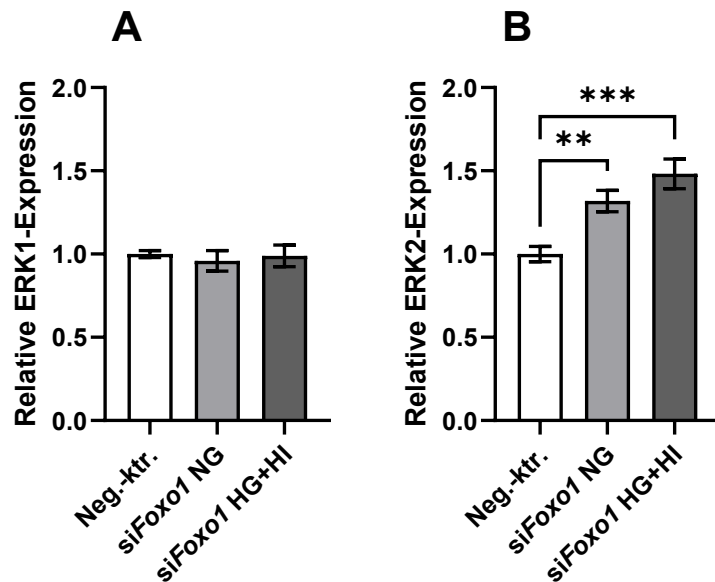


Abb. 25: Relative ERK1- (A) und ERK2-Proteinexpression (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Foxo1* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative ERK1- (A) und ERK2-Proteinexpression (B) nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Foxo1* jeweils unter NG- oder HG+HI-Behandlung und in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: ERK1/2 = *extracellular signal regulated kinase 1/2*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siFoxo1 = siRNA gegen *Foxo1*.

Da ERK1 und ERK2 auch mitogene Ziele des Insulinrezeptorsignalweges sind, wurden die Auswirkungen des *Knockdowns* auf diese Ziele ebenfalls untersucht. Der *Foxo1-Knockdown* schien keine signifikanten Auswirkungen auf die ERK1-Proteinexpression zu haben (siehe Abb. 25A). Für ERK2 zeigte sich allerdings, dass der *Foxo1-Knockdown* in der NG-Behandlung zu einem Anstieg der Proteinexpression um ca. 32 % ($p < 0,01$) führte. Bei der HG+HI-Behandlung war dieser Effekt sogar noch deutlicher und betrug 48 % ($p < 0,001$) mehr als bei der Negativkontrolle (siehe Abb. 25B).

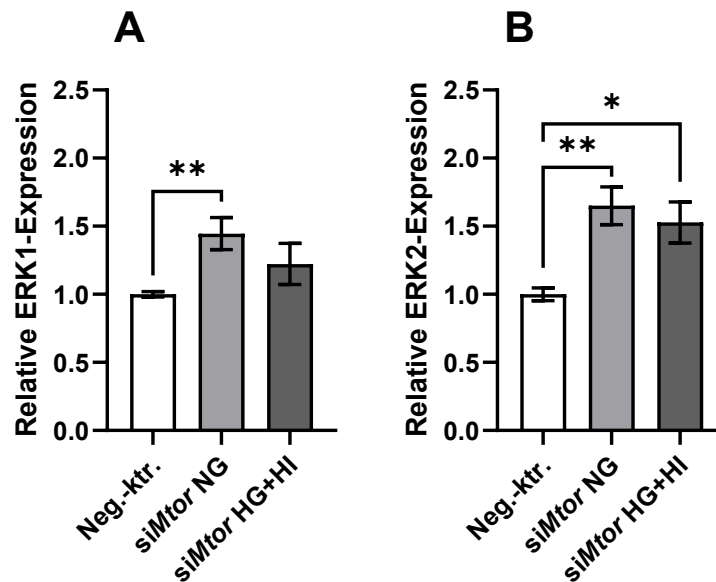


Abb. 26: Relative ERK1- (A) und ERK2-Proteinexpression (B) nach Transfektion mit siRNA gegen *Mtor* unter NG- oder HG+HI-Behandlung

Relative ERK1 - (A) und ERK2-Proteinexpression (B) nach Transfektion oviner VICs mit siRNA gegen *Mtor* jeweils unter NG- oder HG+HI-Behandlung und in Relation zur mit AllStars behandelten Negativkontrolle (n=9). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: ERK1/2 = *extracellular signal regulated kinase 1/2*; HG = Hyperglykämie; HI = Hyperinsulinämie; Neg.-ktr. = Mit AllStars behandelte Negativkontrolle; NG = Normoglykämie; siMtor = siRNA gegen *Mtor*.

Auch der *Mtor-Knockdown* zeigte Interaktionen: Die ERK1-Proteinexpression nahm bei der NG-Behandlung um ca. 28 % ($p < 0,01$) zu. Bei HG+HI-Behandlung gab es hingegen keinen signifikanten Anstieg (siehe Abb. 26A). Bei der ERK2-Proteinexpression war ebenfalls ein signifikanter Anstieg bei der NG-Behandlung zu sehen, welcher ca. 65 % ($p < 0,01$) betrug. Bei der HG+HI-Behandlung war der Anstieg etwas schwächer und betrug ca. 53 % ($p < 0,05$) (siehe Abb. 26B).

4. Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse

4.1.1 Differenzierungs- und Degenerationsmarker

Die Differenzierungs- und Degenerationsmarker der VICs geben wichtige Hinweise über den aktuellen Zustand und den Fortschritt möglicher degenerativer Veränderungen in den VICs wieder. Dazu gehören unter anderem das Gen *Acta2* und dessen translatiertes Korrelat α SMA, außerdem noch ALP und *OPN*.

Zunächst scheint sich ein enger Zusammenhang zwischen *Mtor* und α SMA in dieser Arbeit anzudeuten. Bei α SMA handelt es sich um eine Isoform des Glattmuskel-Aktins. Dieses wird von aktivierten VICs des myofibroblastischen Phänotyps gebildet und kommt in ruhenden VICs kaum vor [38]. In frühen Stadien der CAVD wird nur wenig α SMA gebildet [39]. Speziell unter diabetischen Stoffwechselbedingungen konnte im *in vitro*-Modell *oviner* VICs zuvor gezeigt werden, dass die Genexpression von *Acta2* deutlich reduziert ist [21], wohingegen in kardialen Fibroblasten aus einem diabetischen Mausmodell unter diabetischen Bedingungen vermehrt α SMA gebildet wurde [40]. Das Fehlen inflammatorischer und immunologischer Prozesse des T2DM, welche im *in vitro*-Modell nicht abgebildet wurden, könnte diese Diskrepanz erklären [21]. In der hier vorliegenden Arbeit scheint *Mtor* entscheidend in die oben genannten Prozesse einzugreifen, da unter dessen Herunterregulation genau das Gegenteil eintritt und speziell unter den diabetischen Bedingungen vermehrt α SMA gebildet wird. Auch unter NG-Bedingungen wurde mehr α SMA gebildet, wobei jedoch der Einfluss des *Mtor*-Knockdowns Einfluss schwächer ausfiel. Interessanterweise kommt dieser Effekt auf der mRNA-Ebene nicht zu tragen. Hier sollten die Ergebnisse in einem möglichst holistischen Modell bezüglich der Facetten des T2DM überprüft werden.

Der für *Mtor* beobachtete Effekt zeigte sich allerdings bei *Foxo1* nicht. Hier schien es eher gegenteilig zu sein, da der *Knockdown* zu einem signifikanten Abfall der *Acta2*-mRNA und analog auch der α SMA-Expression unter NG-Bedingungen führte. Hier wären weitere Untersuchungen nötig, da für kardiale Fibroblasten bereits gezeigt werden konnte, dass durch einen *Foxo1*-*Knockdown* mit siRNA eine TGF β 1- (engl. *tumor growth factor β 1*) vermittelte myofibroblastische Differenzierung und ein damit einhergehender α SMA-Anstieg verhindert werden konnten. FOXO1 wird hier bereits als wichtiges pharmakologisches Ziel fibrotischer Prozesse gesehen [41]. In der Pathogenese der CAVD konnte für das Zytokin TGF β 1 ebenfalls eine profibrotische Funktion nachgewiesen werden

[42]. Eine medikamentöse FOXO1-Hemmung könnte also auch in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau protektiv wirken, es deutet sich jedoch an, dass dieser Effekt unter diabetischen Stoffwechselbedingungen nicht zu tragen kommt.

Ein weiterer wichtiger Marker in der CAVD-Entstehung bzw. der Progression stellt der Degenerationsmarker OPN dar. Unter physiologischen Bedingungen reguliert OPN Biomineralisierungs- und Kalzifizierungsprozesse [43]. Es ist in der EZM zu finden, wobei es allerdings kein Teil der Struktur ist, sondern als matrizelluläres Protein agiert: Es wird im Rahmen von Umbau- und Reparaturmechanismen sowie Krankheitsprozessen aktiv und reguliert die Interaktionen zwischen Zellen und der EZM [44]. OPN ist bei asymptomatischen CAVD-Patienten erhöht [45] und beeinflusst nachweislich das CAVD-Outcome [45, 46]. Auch bei Diabetes-Patienten sind die OPN-Spiegel chronisch erhöht [47] und in einem *in vitro*-Modell der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine signifikant höhere *Opn*-mRNA-Expression in VICs unter Hyperglykämie und pro-degenerativen Medium gezeigt werden [23]. Zum heutigen Stand ist sich die Literatur uneinig darüber, ob OPN eher schützend oder schädigend wirkt. Einerseits scheint es ektope Kalzifizierungsprozesse zu hemmen [48], andererseits ist aber auch die fördernde Wirkung auf die Bildung atherosklerotischer Plaques in Blutgefäßen beschrieben [49]. In den hier gewonnenen Daten deutet sich ein enger Zusammenhang zwischen *Opn* und *Foxo1* an, da der *Knockdown* sowohl unter NG- als auch HG+HI-Bedingungen zu einem signifikanten Abfall der *Opn*-mRNA-Spiegel führte. In Skelettmuskelzellen fördert OPN die Phosphorylierung von FOXO1 und hemmt dadurch dessen Funktion als Transkriptionsfaktor [50]. Ein negativer Feedback-Mechanismus zwischen einer hohen *Opn* und *Foxo1*-Expression ist also zusammen mit der Literatur und den Ergebnissen dieser Arbeit anzunehmen. Ob sich FOXO1 allerdings als medikamentöses Ziel anbietet, muss die genauere Einordnung von OPN in der Pathogenese der CAVD zeigen.

In der vorliegenden Arbeit scheint *Mtor* nicht entscheidend an der Regulation von *Opn* in ovinen VICs beteiligt zu sein. Für retinale Ganglienzellen und verschiedene Tumorzelltypen liegen bisher Ergebnisse vor, in denen OPN Einfluss auf die Aktivität von AKT und nachgeschaltet auch MTOR nimmt [51-53]. Hinweise auf eine rückwirkende Feedbackschleife von MTOR auf OPN finden sich in der aktuellen Fachliteratur nicht und auch in ovinen VICs ist anhand der hier vorliegenden Daten kein solcher Einfluss anzunehmen.

In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von *Foxo1* und *Mtor* auf die ALP-Expression untersucht. Die ALP ist ein Enzym, welches in vielen Geweben vorkommt und entscheidend

zu Mineralisierungsprozessen, insbesondere im Knochen, beiträgt [54]. In der CAVD ist die ALP hinweisend auf eine Differenzierung hin zu einem osteoblastischen Phänotyp der VICs und vermehrt in der EZM kalzifizierter Aortenklappen zu finden [18]. Weder *Foxo1* noch *Mtor* schienen in den hier durchgeführten Versuchen Einfluss auf die ALP-Expression zu nehmen. Im Kontext der CAVD konnte gezeigt werden, dass die ALP-Expression vor allem durch eine Aktivierung des TLR3 (engl. *toll-like receptor 3*) auf VICs begünstigt und diesem nachgeschaltet über NF- κ B (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und ERK1 und ERK 2 gesteuert wird [55]. Die fehlende Veränderung in der ALP-Expression kann allerdings auch am Zeitfenster und dem Versuchsaufbau des in dieser Arbeit angewandten Protokolls liegen, da die ALP-Expression zeitabhängige und modellabhängige Schwankungen zeigt [56].

4.1.2 Kollagen-assoziierte Gene

Bezüglich einiger Kollagen-assoziiierter Gene konnten mehrere Zusammenhänge mit *Foxo1* und *Mtor* nachgewiesen werden. Untersucht wurde unter anderem die mRNA-Expression des Gens *Colla1*, welches für die Hauptkomponente des Kollagen Typ I codiert. Da Kollagen Typ I aus zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette besteht, wurde zudem die Proteinexpression der daraus gebildeten Tripelhelix, aber auch der Einzelketten untersucht. Kollagen Typ I bildet mit etwa 70 % den Hauptteil der in der EZM von Aortenklappen vorhandenen Kollagene [57]. Im Rahmen der Umbauprozesse in der CAVD zeigt sich eine deutliche Zunahme der Kollagen Typ I-Synthese, was die Fibrosierung und Verdickung der Aortenklappen begünstigten [58]. Die immunvermittelte Aktivierung der Signalkaskade von Runx-2 (engl. *Runt-related transcription factor 2*), welchem ERK1 und ERK2 nachgeschaltet sind, führt in VICs zu einer vermehrten Ausschüttung von Kollagen Typ I [59]. In dieser Arbeit konnte unter einem *Foxo1-Knockdown* unter NG-Bedingungen eine signifikante Abnahme der *Colla1*-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Auf der Ebene der Proteinexpression war dieser Effekt jedoch nicht sichtbar. Möglicherweise lag dies an der Behandlungsdauer der Zellen. Ob eine längere Exposition der Zellen gegenüber der siRNA gegen *Foxo1* zu einem Abfall der Proteinexpression führt, bleibt offen. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob *Foxo1* in VICs direkt Einfluss auf die *Colla1*-Expression nimmt, oder ob dies indirekt über den Runx-2-Signalweg passiert. In Osteoblasten konnte zumindest eine stimulierende Wirkung von FOXO1 auf Runx2, aber auch auf die *Colla1*-Expression nachgewiesen werden [60]. Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit unter HG+HI-Behandlung beim *Foxo1-Knockdown* kein signifikanter Unterschied in der *Colla1*-

Expression im Vergleich zur Negativkontrolle. Für kardiale Fibroblasten konnte bislang eine deutlich verstärkte *Coll1a1*-Expression bei Typ 2-Diabetikern nachgewiesen werden [61]. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte zudem eine signifikante Hochregulation der *Coll1a1*-Expression unter HG+HI Behandlung in VICs *in vitro* gezeigt werden [21]. Eine Normalisierung der Expression unter einem *Foxo1-Knockdown* wäre hier also denkbar und deutet einen protektiven Effekt an.

Auch unter dem *Mtor-Knockdown* zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der *Coll1a1*-mRNA unter NG-Bedingungen. Dies lässt sich mit bisherigen Forschungsergebnissen vereinbaren, die MTOR eher eine profibrotische Rolle durch die Überexpression von Kollagen Typ I in anderen Zelltypen zuschreiben [62]. Speziell in VICs bewirkte eine direkte Inhibition von MTOR durch Rapamycin eine reduzierte Kollagen Typ I-Expression, sowohl unter NG-, als auch HG+HI-Behandlung [31]. Somit stellt ein *Mtor-Knockdown* mittels siRNA in diesem Zusammenhang zumindest unter NG-Bedingungen eine effektive Alternative dar.

Zu den Kollagen-assoziierten Genen werden hier auch die MMP2 und MMP9 gezählt. Diese gehören zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen, welche aus über 20 bekannten Enzymen besteht und unter anderem die Degradation der EZM-Komponenten steuert [63]. Dadurch nehmen die MMPs entscheidend Einfluss auf Umbau- und Reparaturprozesse bei vielen Krankheitsbildern [64]. In der CAVD ist die Genexpression der MMPs deutlich erhöht [65] und die MMPs sind besonders in frühen Phasen der Klappenverdickung und der Kalzifizierung nachweisbar [66]. In dieser Arbeit wurden speziell die MMP2 und MMP9 untersucht, da diese unter diabetischen Stoffwechselbedingungen in arteriellen Blutgefäßen überexprimiert werden [67].

Unter dem *Foxo1-Knockdown* zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die MMP2-Expression, wohingegen unter einem *Mtor-Knockdown* die *Mmp2*-mRNA-Expression speziell unter HG+HI-Bedingungen signifikant abnahm. Dies deckt sich mit bisher vorliegenden Ergebnissen zur positiven Regulation der MMP2-Expression über die IGF1R/AKT/mTOR-Signalkaskade [68]. Somit sollte die Bedeutung von MTOR als mögliches therapeutisches Angriffsziel im Kontext der Umbauprozesse der Aortenklappe unter diabetischen Stoffwechselbedingungen weiter evaluiert werden. Es sollte zudem untersucht werden, ob eine längere Behandlungsdauer der VICs sich auch auf die MMP2-Proteinexpression auswirkt und nicht nur auf mRNA-Expression.

Für die MMP9-Expression zeigte sich in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied durch einen *Mtor-Knockdown*. Dem widersprechend konnte für eine Inhibition von MTOR auf Proteinebene mittels Rapamycin eine reduzierte MMP9-Expression in bovinen Epithelzellen nachgewiesen werden [69]. Eine Übertragbarkeit auf ovine VICs bleibt jedoch fraglich und müsste in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

Unter dem Einfluss des *Foxo1-Knockdowns* zeigte sich in der vorliegenden Arbeit für die HG+HI-Behandlung auf Proteinebene ein signifikanter Anstieg der MMP9-Expression, was für das aktive FOXO1 somit eine mögliche protektive Rolle unter diabetischen Stoffwechselbedingungen suggeriert. Dem widerspricht jedoch die Beobachtung, dass FOXO1 direkt an den *Promoter* des *Mmp9*-Gens in murinen Keratinozyten zu binden und darüber die Wundheilung bei diabetischen Stoffwechselbedingungen durch vermehrte MMP9-Expression zu verschlechtern scheint [70]. Somit sollte der Zusammenhang zwischen FOXO1 und MMP9 in der CAVD weiter untersucht werden.

4.1.3 Glykosaminoglykane und Proteoglykane

Auch bezüglich der Expression von GAG und PG, die einen wichtigen Anteil der EZM darstellen, konnte ein Zusammenhang mit *Mtor* und *Foxo1* in den kultivierten VICs nachgewiesen werden. Bei GAG handelt es sich um Polysaccharide, die aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebaut sind. Ein Makromolekül aus einem Protein, an welches kovalent GAG gebunden sind, wird PG genannt [71]. GAG und PG bilden den Hauptteil der *Spongiosa*, also der mittleren Schicht der Aortenklappe und tragen zur Flexibilität und Reduktion von Vibrationen bei, während sie zudem auch die Ablösung von Zellschichten hemmen [72]. Im Rahmen der CAVD wird eine wichtige Rolle der beiden Molekülgruppen angenommen, da ihr Verteilungsmuster in der kalzifizierten Aortenklappe verändert ist und sie vermehrt in der Umgebung kalzifizierter Knoten zu finden sind. Dort tragen sie vermutlich zur Lipidretention, den Umbauprozessen und der Zellproliferation bei [73].

Interessanterweise konnte aus den Ergebnissen dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss des *Foxo1*- und *Mtor-Knockdowns* auf die Gesamt-GAG-Expression abgeleitet werden. Da jedoch in anderen Arbeiten eine Überexpression einzelner GAG und auch PG in der CAVD unter anderem auch unter diabetischen Stoffwechselbedingungen nachgewiesen werden konnte [23, 73, 74], ist anzunehmen, dass *Foxo1* und *Mtor* verschieden auf einzelne GAG Einfluss nehmen und so das Gesamt-Expressionsmuster unverändert bleibt. Dafür sprechen

auch die hier erzielten Ergebnisse zur Expression einzelner GAG und PG, welche in diesem Kapitel noch diskutiert werden. Darüber hinaus fehlen in diesem Modell auch weitere Einflüsse, die zu einer GAG-Überexpression beitragen können, wie z.B. im Blut zirkulierendes oxLDL oder das Zytokin TGF β 1 [75, 76]. Letzteres kann von Immunzellen gebildet werden [77].

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der *Has2*-Genexpression durch den *Foxo1*-*Knockdown* unter NG-, aber auch HG+HI-Bedingungen nachgewiesen werden. Die produzierte Menge an durch HAS2 gebildeter Hyaluronsäure blieb jedoch unverändert. Für diesen Zusammenhang spricht auch, dass FOXO1 bereits in Brustkrebszellen als Repressor des *Has2*-Gens identifiziert werden konnte [78]. Ob *Foxo1* dadurch eher eine protektive oder schädigende Rolle einnimmt, bleibt jedoch offen, da die Hyaluronsäure selbst verschiedene Einflüsse in der Aortenklappe hat. Einerseits begünstigt sie pathologische Prozesse der CAVD wie die endothelial-mesenchymale Transition von Endothelzellen [79], andererseits scheint sie aber auch durch Interaktion mit VICs die Mineralisierungsprozesse der CAVD zu unterbinden und zum Erhalt eines physiologischen Phänotyps der VICs beizutragen [80].

Im Gegensatz zu *Foxo1* konnte für *Mtor* in diesem Versuchsaufbau kein Zusammenhang mit der *Has2*-Genexpression und der Hyaluronsäure-Expression gefunden werden. Dem widerspricht eine Studie, bei der durch Inhibition mit Rapamycin eine durch das Gangliosid GT1b gesteigerte Expression von *Has2* in Fibroblasten der *Orbita* unterbunden werden konnte. Dort gab es jedoch keinen Unterschied in der *Has2*-Expression unter einer Inhibition mit Rapamycin, wenn GT1b als Stimulator fehlte [81].

Das Proteoglykan BGN schien auf mRNA-Ebene weder durch einen *Foxo1*-, noch durch einen *Mtor*-*Knockdown* in seiner Expression beeinflusst zu werden. BGN scheint das Voranschreiten der CAVD zu begünstigen, da es vermehrt um frühe fibrotische Läsionen der Aortenklappe zu finden ist [73]. Des Weiteren wird es als eine wichtige Verbindung im Zusammenhang zwischen CAVD und T2DM gesehen, da *in vivo* in späten Stadien der CAVD mehr *Bgn* in den Aortenklappen nachgewiesen werden kann, wenn zeitgleich ein T2DM vorliegt [23]. Außerdem löst eine kombinierte Behandlung mit hyperglykämem Nährmedium und beta-Glycerolphosphat mit Calciumchlorid als pro-degenerativer Stimulus bei VICs *in vitro* eine vermehrte *Bgn*-Expression aus [23]. Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Foxo1* und *Mtor* keine Rolle in der *Bgn*-Expression in der CAVD spielen. Dafür spricht auch, dass durch BGN ausgelöste Kalzifizierungsprozesse und die Differenzierung von VICs hin zu einem osteoblastischen Phänotyp primär über die Bindung an TLR und eine nachgeschaltete Aktivierung von ERK1/2, NF- κ B und Smad1/3 stattfindet

[82, 83]. Ob diese Signalwege auch für die Einwirkung des T2DM auf die *Bgn*-Expression in der CAVD entscheidend sind, bleibt offen.

In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der *Dcn*-Genexpression durch den *Foxo1*-Knockdown speziell unter NG- und noch einmal verstärkt unter HG+HI-Bedingungen. *Dcn* codiert für das Proteoglykan DCN, welches ebenso wie BGN in Aortenklappen gefunden werden kann [84]. Aufgrund seiner Überexpression um frühe Läsionen der Aortenklappe herum und seiner Fähigkeit, Lipide zu akkumulieren, wird DCN als wichtiges Molekül speziell in frühen Phasen der CAVD gesehen [73, 85]. Im Gegensatz zu *Bgn* konnte jedoch keine vermehrte Expression von *Dcn* in kalzifizierten Aorteklappen von Typ 2-Diabetikern nachgewiesen werden. [23]. Die vorliegende Arbeit impliziert jedoch, dass sich der *Foxo1*-Knockdown protektiv durch die Herunterregulation von *Dcn*-mRNA auswirken könnte, insbesondere wenn diabetische Stoffwechselbedingungen vorliegen. Weiterführende Untersuchungen zur DCN-Expression in frühen Phasen der CAVD bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern könnten hier weitere Erkenntnisse erbringen. Außerdem sollte der generelle Zusammenhang zwischen FOXO1 und der DCN-Expression weiter untersucht werden, da hier bislang keine unterstützenden Daten vorliegen.

Ähnliche Ergebnisse wie beim *Foxo1*-Knockdown zeigten sich auch für den *Mtor*-Knockdown: Die Herunterregulation der *Dcn*-mRNA-Expression war sowohl unter NG- als auch HG+HI-Bedingungen signifikant, wobei sie bei letztgenannter stärker ausfiel. Somit könnte auch der *Mtor*-Knockdown eine protektive Wirkung erzielen, speziell bei Diabetikern. Allerdings bleiben auch diese Ergebnisse kritisch zu betrachten, da bisher an Herzgewebe von Mäusen eine hemmende Wirkung von MTOR auf die *Dcn*-Expression beobachtet wurde [86]. Somit sollte auch dieser Zusammenhang in Aortenklappen genauer untersucht werden.

4.1.4 Mitogene Signalwege

Neben den bisher beschriebenen zellulären Markern, die in der Pathogenese der CAVD eine Rolle spielen, wurden *Foxo1* und *Mtor* auch auf einen Feedbackmechanismus zu ihrem vorgeschalteten Regulator AKT hin untersucht. Sowohl für den *Foxo1*-, als auch für den *Mtor*-Knockdown fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der AKT-Expression auf Proteinebene. Für den *Mtor*-Knockdown deutete sich lediglich ein Aufwärtstrend sowohl unter NG, als auch HG+HI-Bedingungen an. Bisherige Untersuchungen wiesen einen positiven Feedback-Mechanismus in der Phosphorylierung von AKT über den MTORC2-

Komplex und einen negativen Feedback-Mechanismus über den MTORC1-Komplex nach [87, 88]. Somit deutet sich an, dass das Feedback von MTOR auf AKT auf verschiedenen Ebenen stattzufinden scheint. Hier müssen jedoch weitere Untersuchungen erfolgen, um die Ergebnisse zu verifizieren. Auch für FOXO1 existieren Belege für dessen Wirkung auf AKT, wobei diese indirekt über die Transkription von Untereinheiten von MTORC1 und MTORC2 stattzufinden scheint. Insgesamt scheint FOXO1 dadurch die Aktivität von AKT zu fördern [89, 90]. Anhand der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse deutet sich jedoch kein zusätzlicher Effekt von *Foxo1* auf die Proteinexpression von AKT an.

Wie oben beschrieben finden scheinbar auch Interaktionen zwischen *Foxo1* und *Mtor* selbst statt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *Foxo1-Knockdown* zu einem signifikanten Anstieg von MTOR auf Proteinebene unter HG+HI-Bedingungen im Vergleich zu NG-Behandlung führt. Somit scheint FOXO1 neben der Wirkung als Transkriptionsfaktor für Untereinheiten der MTOR-Komplexe auch auf die Expression von MTOR selbst Einfluss zu nehmen [89]. Bisher gibt es jedoch Hinweise, dass dies nicht über die Transkription von MTOR passiert, sondern über eine Proteasomen-abhängige Degradation des MTOR-Proteins. Hier ist jedoch bislang unklar, über welche Zwischenschritte dies erfolgt [91]. Diese Annahme ließe sich mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen in Einklang bringen. Warum allerdings dieser Effekt unter NG-Bedingungen nicht zum Tragen kommt, bleibt offen und sollte weiter eruiert werden.

Umgekehrt scheint es ein negatives Feedback von *Mtor* auf die FOXO1-Proteinexpression zu geben, da es unter dem *Mtor-Knockdown* zu einem signifikanten Anstieg dieser kam; Sowohl unter NG- als auch HG+HI-Bedingungen. Dies deckt sich mit bisherigen Ergebnissen, die zeigen konnten, dass die MTOR-Komplexe Einfluss auf FOXO1 nehmen können: Dies kann durch die Phosphorylierung und Inaktivierung von FOXO1 durch MTORC2-bedingte Aktivierung von AKT geschehen, aber auch über die Interaktion von MTORC1 mit MTORC2 [87, 92, 93]. Somit zeigt sich, dass *Foxo1* und *Mtor* auch in VICs in ihrer Aktivität eng miteinander verknüpft sind und somit in ihren jeweiligen Einflüssen auf die Schlüsselmoleküle der CAVD nicht unbedingt voneinander getrennt betrachtet werden sollten.

Des Weiteren befasst sich diese Arbeit auch mit der Interaktion von *Foxo1* und *Mtor* mit ERK1 und ERK2, welche dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg entstammen und ebenfalls Einfluss auf die Entstehung der CAVD zu haben scheinen [55, 59, 82, 94]. Bei ERK1 und ERK2 handelt es sich um Serin/Threoninkinasen, welche Teil der Familie der *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) sind. Sie nehmen über ihre zahlreichen Substrate Einfluss

auf Zellproliferation, -überleben, -wachstum, -metabolismus, -migration und -differenzierung [94, 95]. Funktionell sind ERK1 und ERK2 redundante Isoformen, sodass vor allem ihre Gesamtmenge Einfluss auf die Funktion hat [96]. Im Kontext der CAVD wird für ERK1 und ERK2 eine wichtige Rolle angenommen, da sie mehreren Quellen zufolge die osteoblastische Differenzierung der VICs und Kalzifizierungsprozesse begünstigen, wobei es jedoch auch eine Quelle gibt, die vom Gegenteil ausgeht [55, 97, 98]. Obwohl ERK1 und ERK2 prinzipiell durch einen Insulinstimulus mittels Phosphorylierung aktiviert werden können, konnte dieser Effekt speziell in VICs bislang nicht sicher beobachtet werden [22, 31, 99]. Somit bleibt ihre Rolle im Zusammenhang zwischen CAVD und T2DM offen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein *Foxo1-Knockdown* zu einem signifikanten Anstieg der ERK2-Proteinexpression unter NG-, aber auch HG+HI-Bedingungen führt. Die ERK1-Proteinexpression blieb unbeeinflusst. Bislang liegen keine Daten zum Einfluss von *Foxo1* auf die Proteinexpression von ERK1 oder ERK2 vor. Stattdessen ist ein Mechanismus der Inhibition auf Ebene der Phosphorylierung beschrieben: Phosphoryliertes FoxO1 bindet an IQGAP1 im MAPK-Signalweg und hemmt dadurch die Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK2 [100]. Möglicherweise gibt es also verschiedene Regulationsmechanismen von *Foxo1* gegenüber ERK2. Somit deutet sich hier für *Foxo1* eine protektive Funktion in VICs durch die Inhibition von ERK2 auf der Ebene der Proteinexpression an, da dadurch dessen zuvor beschriebenen Einflüsse in der Entstehung der CAVD reduziert werden könnten. Dieser Effekt scheint unabhängig von diabetischen Stoffwechselbedingungen zu sein.

Unter dem *Mtor-Knockdown* kam es zu einem signifikanten Anstieg der Proteinexpression von ERK1 und ERK2 unter NG-Bedingungen. Unter HG+HI-Bedingungen war er bei ERK2 auch vorhanden, aber weniger ausgeprägt. Für ERK1 deutete sich auch ein schwächerer Anstieg in der Proteinexpression unter HG+HI-Bedingungen an, jedoch war dieser nicht signifikant. Auch für *Mtor* liegen bislang keine Daten zum Einfluss auf die Proteinexpression von ERK1 und ERK2 vor, ähnlich wie bei *Foxo1*. Allerdings scheint es auch hier Inhibitionsmechanismen durch MTOR auf Ebene der Phosphorylierung von ERK2 und zusätzlich ERK1 zu geben [101]. Auf Basis der hier vorliegenden Ergebnisse stellt sich schlussendlich die Frage, ob ERK1 und ERK2 in VICs – anders als bisher angenommen – zumindest in ihrer Proteinexpression tatsächlich auf diabetische Stimuli reagieren können. Hier sollten weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit dem MTOR-Signalweg erfolgen.

4.2 Limitationen der Arbeit

Obwohl sich aus dieser Arbeit einige Erkenntnisse zur Rolle von *Foxo1* und *Mtor* im Zusammenhang zwischen T2DM und CAVD gewinnen ließen, gibt es auch diverse methodische Limitationen, welche die Übertragbarkeit auf die physiologischen und auch pathologischen Prozesse im menschlichen Körper erschweren. Diese sollen im Folgenden erläutert werden.

Eine wesentliche Einschränkung stellt die zweidimensionale Reinkultur der VICs dar. Durch den Prozess der Isolation der VICs und der Zerkleinerung der Herzklappe geht ihre typische Schichtung verloren. Die Interaktion zwischen VICs und den valvulären Endothelzellen (VECs), die die Barriere zwischen Blut und Herzklappe bilden, kann dementsprechend nicht stattfinden. Darüber hinaus gehen mechanische und biochemische Einflussfaktoren auf die CAVD verloren sowie Immunzellen, die ebenfalls mit den VICs interagieren. Die Rolle der VECs soll hier genauer erörtert werden.

Die endotheliale Dysfunktion gilt – analog zur Atherosklerose arterieller Blutgefäße - als früher Schlüsselfaktor in der Pathogenese der CAVD. Häodynamische Belastungen, arterielle Hypertonie, zirkulierendes LDL, Hyperglykämie und Komponenten des Zigarettenrauches begünstigen Endothelschäden, wodurch Immunzellen und kleine Moleküle in das Klappengewebe eindringen und inflammatorische Prozesse sowie Lipidakkumulation gefördert werden [39, 102-104]. Zudem besitzen VECs die Fähigkeit zur endothelial-mesenchymalen Transition, wobei sie einen mesenchymalen Phänotyp annehmen können und wobei es im Kontext der CAVD zu verstärkten Umbau- und Kalzifizierungsprozessen kommt [105, 106]. Auslöser für die endothelial-mesenchymale Transition können unter anderem diabetische Stoffwechselbedingungen sein, während VICs die Fähigkeit besitzen, die Transition zu inhibieren [107, 108]. Somit stellt die Interaktion von VECs mit VICs auch unter diabetischen Stoffwechselbedingungen einen spannenden Aspekt dar, der im Hinblick auf die Bedeutung mitogener Signalwege weiter untersucht werden sollte.

Die Immunzellen, die durch die endotheliale Dysfunktion in die Aortenklappe einwandern, schütten proinflammatorische und profibrotische Zytokine aus [109]. Diese Zytokine, sowie auch oxLDL, aktivieren in VICs den NF- κ B-Signalweg und fördern so die osteogene Differenzierung und Kalzifizierung [110, 111]. Zwar konnte in dieser Arbeit kein Einfluss von *Foxo1* oder *Mtor* auf *Bgn* oder die AP gefunden werden, welche im Zusammenhang mit dem NF κ B-Signalweg stehen, jedoch interagieren sie mit ERK1 und ERK2, welche mit

diesem assoziiert sind [55, 82]. Ob *Foxo1* und *Mtor* somit einen Einfluss auf die immunmodulatorischen Prozesse nehmen könnten, bleibt offen.

Bezüglich der Simulation diabetischer Stoffwechselbedingungen sei angemerkt, dass diese in den hier durchgeführten Versuchen nur teilweise dargestellt wurden. Zum einen nehmen diabetische Stoffwechselbedingungen Einfluss auf das Immunsystem, indem sie die immunmodulatorische Wirkung von T-Zellen, welche in kalzifizierten Aortenklappen gefunden werden können, verändern [112, 113]. Zum anderen finden sich bei Diabetikern auch höhere Spiegel an ROS und sdLDL (*small dense low density lipoproteine*), welche atherogen wirken [114]. Einen weiteren limitierenden Aspekt stellt die kombinierte Betrachtung der Hyperglykämie und der Hyperinsulinämie dar. Somit kann nicht differenziert werden, ob die beobachteten Effekte auf die VICs nicht möglicherweise nur durch einen der beiden Stimuli verursacht wird. Dazu sei allerdings angemerkt, dass diese beiden Faktoren speziell in der frühen Phase des Diabetes mellitus bzw. bei Prädiabetes ohnehin kombiniert vorkommen, während erst in der späten Phase die Insulinsekretion abnimmt [115].

Des Weiteren stellt die Verwendung von ovinen VICs eine weitere wichtige Limitation dar. Beim Menschen und dem Schaf handelt es sich zwar in beiden Fällen um Säugetiere, aber nichtsdestotrotz sollten die genomischen Unterschiede nicht vernachlässigt werden. Dadurch sind die hier gewonnenen Ergebnisse in eher eingeschränktem Maße auf den Menschen übertragbar.

Zuletzt sollte bedacht werden, dass die pathologischen Prozesse in der CAVD geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen. Das Geschlecht der Schafe, aus denen die VICs gewonnen wurden, ist in dieser Arbeit nicht berücksichtigt worden. Während die Läsionen der Aortenklappe bei Frauen weniger Calciumablagerungen zeigen, sind die Läsionen von Männern kompakter und weisen weniger Bindegewebsfasern auf [116]. Inwiefern mitogene Signalwege auf diese Unterschiede Einfluss nehmen und ob diabetische Stoffwechselbedingungen sich geschlechterspezifisch anders auswirken können, bleibt Gegenstand weiterer Forschungen.

4.3 Ausblick

Aus den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit lassen sich diverse Voraussetzungen und Hürden für zukünftige Forschungen ableiten. Gleichzeitig kommen auch mögliche Ideen zur Behandlung von Patienten auf.

Zunächst könnten die Erkenntnisse in ein möglichst physiologisches Modell übertragen werden. Da den mitogenen Zielen *Foxo1* und *Mtor* in dieser Arbeit ein regulatorischer Einfluss auf wichtige Marker der CAVD im Zusammenhang mit T2DM nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob sich dieser Zusammenhang auch in einem dreidimensionalen Modell humaner Aortenklappen oder im Bioreaktor bestätigen lässt. Dieses System wurde in der eigenen Arbeitsgruppe etabliert und bereits im Kontext von CAVD und diabetischen Stoffwechselbedingungen erprobt [22]. Dadurch ließen sich die Effekte diabetischer Stoffwechselbedingungen und der Transfektion mit siRNA auf die Aortenklappen unter dynamischen Blutflussbedingungen beobachten.

Des Weiteren sollte das System der lipidbasierten Transfektion mit siRNA weiter optimiert werden. Auch wenn es über die letzten Jahre zunehmend verbessert wurde und die Auswahl der vorhandenen Produkte gestiegen ist, stellt diese Art der Transfektion immer noch einen proapoptotischen Stimulus dar. Nun gehören VICs zwar eher zu den weniger empfindlichen Zelltypen und zeigen ein recht stabiles Wachstumsverhalten, wenn aber nun ein dreidimensionales System vollständig erhaltener Aortenklappen verwendet wird, welches auch VECs enthält, könnte ein Untergang dieser VECs durch die Transfektion einen starken Reiz für die CAVD-Entwicklung darstellen. Um dies also zu umgehen und auch die Arbeit in Zellkulturen zu vereinfachen, müssen weniger zellschädigende Ansätze gefunden werden, um die siRNA in die Zellen zu schleusen.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass mitogenen Zielen wie *Foxo1* und *Mtor* eine wichtige Rolle im Zusammenhang zwischen T2DM und CAVD zukommt. Sie nehmen nicht nur auf verschiedene Weise Einfluss auf bereits erforschte Schlüsselmoleküle der CAVD, sondern interagieren auch auf komplexe Weise miteinander und mit anderen mitogenen Signalwegen wie dem ERK1/2-Signalweg, welche ihrerseits Einfluss auf die degenerativen Prozesse nehmen können. Es sollte also intensiv weiter an ihnen geforscht werden, um die zugrundeliegenden Mechanismen der Pathogenese besser zu verstehen. *Foxo1* und *Mtor* lässt sich bislang zwar keine klare protektive oder schädigende Rolle zuschreiben, allerdings könnte die Untersuchung im dreidimensionalen humanen Aortenklappenmodell dazu führen, dass sich diese besser in die eine, oder andere Richtung einordnen lassen und damit neue therapeutische Angriffspunkte eröffnen. Dadurch könnte

die CAVD-Entstehung bei diabetischen Patienten vielleicht verlangsamt, oder möglicherweise verhindert werden. Ob sich solche Ansätze aber als effektiv erweisen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Aikawa, E. and F.J. Schoen, *Calcific and Degenerative Heart Valve Disease. Cellular and molecular pathobiology of cardiovascular disease*, 2014: p. 161-180.
2. Lerman, D.A., S. Prasad, and N. Alotti, *Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Eur Cardiol, 2015. **10**(2): p. 108-112.
3. Tsao, C.W., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2022. **145**(8): p. e153-e639.
4. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 630-4.
5. Duncan, B.B., D.J. Magliano, and E.J. Boyko, *IDF Diabetes Atlas 11th edition 2025: global prevalence and projections for 2050*. Nephrol Dial Transplant, 2025. **41**(1): p. 7-9.
6. Nishimura, R.A., et al., *2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(22): p. e57-185.
7. Wu, Y., et al., *Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention*. Int J Med Sci, 2014. **11**(11): p. 1185-200.
8. Bellou, V., et al., *Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses*. PLoS One, 2018. **13**(3): p. e0194127.
9. Chandrasekaran, P. and R. Weiskirchen, *The Role of Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus-An Overview*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(3).
10. Cai, X., et al., *Association between prediabetes and risk of all cause mortality and cardiovascular disease: updated meta-analysis*. Bmj, 2020. **370**: p. m2297.
11. Kirwan, J.P., J. Sacks, and S. Nieuwoudt, *The essential role of exercise in the management of type 2 diabetes*. Cleve Clin J Med, 2017. **84**(7 Suppl 1): p. S15-S21.
12. Larsson, S.C., et al., *Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases*. Int J Cardiol, 2018. **262**: p. 66-70.
13. Mosch, J., et al., *Histopathological assessment of calcification and inflammation of calcific aortic valves from patients with and without diabetes mellitus*. Histol Histopathol, 2017. **32**(3): p. 293-306.
14. Rajamannan, N.M., et al., *Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update*. Circulation, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
15. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, *The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1407-18.
16. Freeman, R.V. and C.M. Otto, *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. Circulation, 2005. **111**(24): p. 3316-26.
17. Buttner, P., et al., *Dissecting Calcific Aortic Valve Disease-The Role, Etiology, and Drivers of Valvular Fibrosis*. Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 660797.
18. Rajamannan, N.M., et al., *Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype*. Circulation, 2003. **107**(17): p. 2181-4.
19. Mohler, E.R., 3rd, et al., *Bone formation and inflammation in cardiac valves*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1522-8.
20. Selig, J.I., *Die Rolle der extrazellulären Matrix in der degenerativen Aortenklappenerkrankung unter dem Einfluss von Diabetes*. 2019, Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

21. Selig, J.I., et al., *Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells – A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2019. **1865**(9): p. 2526-2537.
22. Selig, J.I., et al., *Crosstalk of Diabetic Conditions with Static Versus Dynamic Flow Environment-Impact on Aortic Valve Remodeling*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(13).
23. Barth, M., et al., *Degenerative aortic valve disease and diabetes: Implications for a link between proteoglycans and diabetic disorders in the aortic valve*. Diab Vasc Dis Res, 2019. **16**(3): p. 254-269.
24. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
25. Meloche, S. and J. Pouyssegur, *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3227-3239.
26. Haeusler, R.A., T.E. McGraw, and D. Accili, *Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(1): p. 31-44.
27. Nagao, H., et al., *Distinct signaling by insulin and IGF-1 receptors and their extra- and intracellular domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(17).
28. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
29. Matsuzaki, H., et al., *Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11285-90.
30. Xing, Y.Q., et al., *The regulation of FOXO1 and its role in disease progression*. Life Sci, 2018. **193**: p. 124-131.
31. Krug, H.V., *Die Regulation der Insulinsignalkaskade in aortalen valvulären Interstitialzellen unter diabetischer Stoffwechselleage* 2023, Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
32. Jiang, C., et al., *FOXO1 regulates RUNX2 ubiquitination through SMURF2 in calcific aortic valve disease*. Redox Biol, 2024. **73**: p. 103215.
33. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
34. *Gene*. National Center for Biotechnology Information.
35. *Basic Local Alignment Search Tool*. [cited 2020; Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].
36. Untergasser, A., et al. *Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3*. 2007 [cited 2020; Available from: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>].
37. *Primer-BLAST*. [cited 2020; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>].
38. Rabkin-Aikawa, E., et al., *Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves*. J Heart Valve Dis, 2004. **13**(5): p. 841-7.
39. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. Circulation, 1994. **90**(2): p. 844-53.
40. Gorski, D.J., et al., *Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 1827.
41. Vivar, R., et al., *FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(1): p. 128-38.

42. Jenke, A., et al., *Transforming growth factor- β 1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020. **319**(5): p. H1123-h1141.
43. Scatena, M., L. Liaw, and C.M. Giachelli, *Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2302-9.
44. Bornstein, P., *Matricellular proteins: an overview*. J Cell Commun Signal, 2009. **3**(3-4): p. 163-5.
45. Grau, J.B., et al., *Analysis of osteopontin levels for the identification of asymptomatic patients with calcific aortic valve disease*. Ann Thorac Surg, 2012. **93**(1): p. 79-86.
46. Sainger, R., et al., *Dephosphorylation of circulating human osteopontin correlates with severe valvular calcification in patients with calcific aortic valve disease*. Biomarkers, 2012. **17**(2): p. 111-8.
47. Barchetta, I., et al., *Impaired bone matrix glycoprotein pattern is associated with increased cardio-metabolic risk profile in patients with type 2 diabetes mellitus*. J Endocrinol Invest, 2019. **42**(5): p. 513-520.
48. Steitz, S.A., et al., *Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification*. Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 2035-46.
49. Wolak, T., *Osteopontin - a multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease*. Atherosclerosis, 2014. **236**(2): p. 327-37.
50. Nghiem, P.P., et al., *Osteopontin is linked with AKT, FoxO1, and myostatin in skeletal muscle cells*. Muscle Nerve, 2017. **56**(6): p. 1119-1127.
51. Duan, X., et al., *Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin and mTOR signaling*. Neuron, 2015. **85**(6): p. 1244-56.
52. Lamour, V., et al., *Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo*. Int J Cancer, 2015. **137**(5): p. 1047-57.
53. Mohammadi, S., et al., *Acquired expression of osteopontin selectively promotes enrichment of leukemia stem cells through AKT/mTOR/PTEN/beta-catenin pathways in AML cells*. Life Sci, 2016. **152**: p. 190-8.
54. Vimalraj, S., *Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization*. Gene, 2020. **754**: p. 144855.
55. Zhan, Q., et al., *Activation of TLR3 induces osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells through the NF-kappaB and ERK1/2 pathways*. Int J Biol Sci, 2015. **11**(4): p. 482-93.
56. Payr, S., et al., *Direct comparison of 3D and 2D cultivation reveals higher osteogenic capacity of elderly osteoblasts in 3D*. J Orthop Surg Res, 2021. **16**(1): p. 13.
57. Schoen, F.J., *Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination*. J Heart Valve Dis, 1997. **6**(1): p. 1-6.
58. Eriksen, H.A., et al., *Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis*. Atherosclerosis, 2006. **189**(1): p. 91-8.
59. Deng, X.S., et al., *Complement Upregulates Runx-2 to Induce Profibrogenic Change in Aortic Valve Interstitial Cells*. Ann Thorac Surg, 2021. **112**(6): p. 1962-1972.
60. Zhou, F., et al., *The role of forkhead box class O1 during implant osseointegration*. Eur J Oral Sci, 2021. **129**(6): p. e12822.
61. Sedgwick, B., et al., *Investigating inherent functional differences between human cardiac fibroblasts cultured from nondiabetic and Type 2 diabetic donors*. Cardiovasc Pathol, 2014. **23**(4): p. 204-10.

62. Shegogue, D. and M. Trojanowska, *Mammalian target of rapamycin positively regulates collagen type I production via a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23166-75.
63. Kapoor, C., et al., *Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs)*. J Cancer Res Ther, 2016. **12**(1): p. 28-35.
64. Cabral-Pacheco, G.A., et al., *The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
65. Bosse, Y., et al., *Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves*. Circ Cardiovasc Genet, 2009. **2**(5): p. 489-98.
66. Jung, J.J., et al., *Multimodality and molecular imaging of matrix metalloproteinase activation in calcific aortic valve disease*. J Nucl Med, 2015. **56**(6): p. 933-8.
67. Chung, A.W., et al., *Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(3): p. 494-504.
68. Zhang, D., et al., *Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19683-90.
69. Mao, Y., et al., *PI3K/AKT/mTORC1 signalling pathway regulates MMP9 gene activation via transcription factor NF-kappaB in mammary epithelial cells of dairy cows*. Anim Biotechnol, 2024. **35**(1): p. 2314100.
70. Zhang, C., et al., *FOXO1 deletion in keratinocytes improves diabetic wound healing through MMP9 regulation*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10565.
71. Ricard-Blum, S., et al., *A biological guide to glycosaminoglycans: current perspectives and pending questions*. FEBS J, 2024. **291**(15): p. 3331-3366.
72. El-Nashar, H., et al., *Multiscale structure and function of the aortic valve apparatus*. Physiol Rev, 2024. **104**(4): p. 1487-1532.
73. Stephens, E.H., et al., *Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(6): p. 334-42.
74. Artiach, G., et al., *Proteoglycan 4 is Increased in Human Calcified Aortic Valves and Enhances Valvular Interstitial Cell Calcification*. Cells, 2020. **9**(3).
75. Porras, A.M., et al., *Creation of disease-inspired biomaterial environments to mimic pathological events in early calcific aortic valve disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(3): p. E363-E371.
76. Osman, N., et al., *Smad2-dependent glycosaminoglycan elongation in aortic valve interstitial cells enhances binding of LDL to proteoglycans*. Cardiovasc Pathol, 2013. **22**(2): p. 146-55.
77. Steinsvoll, S., T.S. Halstensen, and K. Schenck, *Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue*. J Clin Periodontol, 1999. **26**(6): p. 366-73.
78. Liu, S. and C. Cheng, *Akt Signaling Is Sustained by a CD44 Splice Isoform-Mediated Positive Feedback Loop*. Cancer Res, 2017. **77**(14): p. 3791-3801.
79. Mirzaalikhani, Y., et al., *A disease-inspired in vitro model of aortic valve stenosis to investigate the drivers of endothelial-mesenchymal transition*. Lab Chip, 2025. **25**(18): p. 4635-4649.
80. Rodriguez, K.J., L.M. Piechura, and K.S. Masters, *Regulation of valvular interstitial cell phenotype and function by hyaluronic acid in 2-D and 3-D culture environments*. Matrix Biol, 2011. **30**(1): p. 70-82.
81. Yoo, H.K., et al., *Ganglioside GT1b increases hyaluronic acid synthase 2 via PI3K activation with TLR2 dependence in orbital fibroblasts from thyroid eye disease patients*. BMB Rep, 2021. **54**(2): p. 136-141.

82. Song, R., et al., *Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(11): p. 2711-20.
83. Song, R., et al., *BMP-2 and TGF-beta1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells*. *J Mol Med (Berl)*, 2015. **93**(4): p. 403-12.
84. Stephens, E.H., C.K. Chu, and K.J. Grande-Allen, *Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: Relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve*. *Acta Biomater*, 2008. **4**(5): p. 1148-60.
85. Neufeld, E.B., et al., *Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix*. *Atherosclerosis*, 2014. **233**(1): p. 113-21.
86. Gubbiotti, M.A., et al., *Decorin is an autophagy-inducible proteoglycan and is required for proper in vivo autophagy*. *Matrix Biol*, 2015. **48**: p. 14-25.
87. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
88. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. *Cancer Res*, 2006. **66**(3): p. 1500-8.
89. Chen, C.C., et al., *FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor*. *Dev Cell*, 2010. **18**(4): p. 592-604.
90. Ondrisova, L., et al., *FoxO1/Rictor axis induces a nongenetic adaptation to ibrutinib via Akt activation in chronic lymphocytic leukemia*. *J Clin Invest*, 2024. **134**(23).
91. Wu, A.L., et al., *Forkhead box protein O1 negatively regulates skeletal myocyte differentiation through degradation of mammalian target of rapamycin pathway components*. *Endocrinology*, 2008. **149**(3): p. 1407-14.
92. Zhao, W., et al., *The endothelial mTORC2-Foxo1 axis serves as an iron-responsive sensor governing systemic iron homeostasis*. *Blood*, 2025. **146**(14): p. 1722-1736.
93. Rao, R.R., et al., *Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation*. *Immunity*, 2012. **36**(3): p. 374-87.
94. Lavoie, H., J. Gagnon, and M. Therrien, *ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020. **21**(10): p. 607-632.
95. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011. **75**(1): p. 50-83.
96. Busca, R., J. Pouyssegur, and P. Lenormand, *ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy?* *Front Cell Dev Biol*, 2016. **4**: p. 53.
97. Guo, C., et al., *AMBP protects against aortic valve calcification by inhibiting ERK1/2 and JNK pathways mediated by FHL3*. *Theranostics*, 2025. **15**(10): p. 4398-4415.
98. Yuan, G., et al., *BFGF attenuates aortic valvular interstitial cell calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis*. *Exp Cell Res*, 2024. **434**(2): p. 113889.
99. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. *Cell*, 1991. **65**(4): p. 663-75.
100. Pan, C.W., et al., *AKT-phosphorylated FOXO1 suppresses ERK activation and chemoresistance by disrupting IQGAP1-MAPK interaction*. *EMBO J*, 2017. **36**(8): p. 995-1010.
101. Li, G., et al., *mTOR and Erk1/2 Signaling in the Cerebrospinal Fluid-Contacting Nucleus is Involved in Neuropathic Pain*. *Neurochem Res*, 2015. **40**(5): p. 1053-62.

102. Gimbrone, M.A., Jr. and G. Garcia-Cardena, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 620-36.
103. Gould, S.T., et al., *Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease*. Circ Res, 2013. **113**(2): p. 186-97.
104. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
105. Xu, K., et al., *Cell-Type Transcriptome Atlas of Human Aortic Valves Reveal Cell Heterogeneity and Endothelial to Mesenchymal Transition Involved in Calcific Aortic Valve Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(12): p. 2910-2921.
106. Gee, T.W., et al., *Valve endothelial-interstitial interactions drive emergent complex calcific lesion formation in vitro*. Biomaterials, 2021. **269**: p. 120669.
107. Voicu, G., et al., *VCAM-1 targeted nanocarriers of shRNA-Smad3 mitigate endothelial-to-mesenchymal transition triggered by high glucose concentrations and osteogenic factors in valvular endothelial cells*. Int J Biol Macromol, 2024. **281**(Pt 1): p. 136355.
108. Hjortnaes, J., et al., *Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells*. Atherosclerosis, 2015. **242**(1): p. 251-260.
109. Mathieu, P. and M.C. Boulanger, *Basic mechanisms of calcific aortic valve disease*. Can J Cardiol, 2014. **30**(9): p. 982-93.
110. Mathieu, P., R. Bouchareb, and M.C. Boulanger, *Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 851945.
111. Parra Izquierdo, I., *Effects of interferons and their interactions with other ligands in human aortic valve cells*. 2019, Universidad de Valladolid.
112. Liang, Y., et al., *Metabolic hallmarks of type 2 diabetes compromise T cell function*. Trends Endocrinol Metab, 2025.
113. Villa-Roel, N., et al., *Side- and Disease-Dependent Changes in Human Aortic Valve Cell Population and Transcriptomic Heterogeneity Determined by Single-Cell RNA Sequencing*. Genes (Basel), 2024. **15**(12).
114. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
115. Bar-Tana, J., *Insulin Resistance, Secretion and Clearance -Taming the Three Effector Encounter of Type 2 Diabetes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 741114.
116. Allgayer, R., et al., *A collagen-based laboratory model to mimic sex-specific features of calcific aortic valve disease*. Acta Biomater, 2025. **194**: p. 204-218.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Relative mRNA-Expression von <i>Lmna</i> 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Lmna</i>	36
Abb. 2: Relative mRNA-Expression von <i>Foxo1</i> 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i>	37
Abb. 3: Relative mRNA-Expression von <i>Mtor</i> 72 (A) und 120 Stunden (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i>	38
Abb. 4: Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von <i>Foxo1</i> nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> unter NG- oder HG+HI-Bedingungen.....	39
Abb. 5: Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von <i>Mtor</i> nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> unter NG- oder HG+HI-Bedingungen.....	40
Abb. 6: Lichtmikroskopische Darstellung oviner VICs nach Transfektion mit siRNA	41
Abb. 7: Relative LDH-Proteinexpression nach Behandlung mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) oder <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Bedingungen.....	42
Abb. 8: Relative Expression des <i>Acta2</i> -Gens auf mRNA-Ebene (A) und des Genprodukts α SMA auf Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	43
Abb. 9: Relative Expression des <i>Acta2</i> -Gens auf mRNA-Ebene (A) und des Genprodukts α SMA auf Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	44
Abb. 10: Relative ALP-Expression nach Behandlung mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) oder <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	45
Abb. 11: Relative mRNA-Expression von <i>Opn</i> nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) oder <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung	46
Abb. 12: Relative Expression des <i>Colla1</i> -Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Kollagen-Einfach- (B) und -Tripelhelices (C) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	47
Abb. 13: Relative Expression des <i>Colla1</i> -Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Kollagen-Einfach- (B) und -Tripelhelices (C) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	48
Abb. 14: Relative Expression des <i>Mmp2</i> -Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	49

Abb. 15: Relative Expression des <i>Mmp2</i> -Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung	50
Abb. 16: Relative Expression des <i>Mmp9</i> -Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	51
Abb. 17: Relative Expression des <i>Mmp9</i> -Gens auf mRNA- (A) und Proteinebene (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung	52
Abb. 18: Relative GAG-Konzentrationen nach Behandlung oviner VICs mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) oder <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung	53
Abb. 19: Relative Expression des <i>Has2</i> -Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Hyaluronsäure (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung	54
Abb. 20: Relative Expression des <i>Has2</i> -Gens auf mRNA-Ebene (A) und der Hylauronsäure (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung	55
Abb. 21: Relative mRNA-Expression von <i>Bgn</i> nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) oder <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung	56
Abb. 22: Relative mRNA-Expression von <i>Dcn</i> nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) oder <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung	57
Abb. 23: Relative MTOR-Proteinexpression in ovinen VICs nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) und relative FOXO1-Proteinexpression nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung	58
Abb. 24: Relative AKT-Proteinexpression nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> (A) oder <i>Mtor</i> (B) unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	59
Abb. 25: Relative ERK1- (A) und ERK2-Proteinexpression (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Foxo1</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung	60
Abb. 26: Relative ERK1- (A) und ERK2-Proteinexpression (B) nach Transfektion mit siRNA gegen <i>Mtor</i> unter NG- oder HG+HI-Behandlung.....	61

7. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich sehr herzlich bei allen, die mir auf die eine oder andere Weise geholfen haben, dieses Projekt zu verwirklichen: Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Payam Akhyari für die Schirmherrschaft und die Leitung des Projektes; Bei meinen beiden Betreuerinnen vor Ort, Frau Dr. rer. nat. Mareike Barth und Frau Dr. rer. nat. Jessica I. Selig, für die engagierte Hilfestellung auf allen Ebenen dieser Dissertation, die stets offenen Ohren und das eine oder andere erheiternde Gespräch in der Kaffeepause; Bei Frau Dr. rer. nat. Vera Schmidt für die Einarbeitung im Labor; Bei Elena Adler für ihre stets positive Art und die stützende Schulter auf demselben beschwerlichen Weg; Beim treuen Radio, das mich auch an den längsten Labortagen nicht im Stich ließ; Bei meiner Familie und Freunden, die sich geduldig meiner Sorgen angenommen haben und Mia Schrage, die mir immer wieder die Kraft gegeben hat, diese Herausforderung zu Ende zu führen.