

Aus dem  
CharitéCentrum für Innere Medizin mit  
Gastroenterologie und Nephrologie

Medizinische Klinik m.S. Nephrologie und Internistische Intensivmedizin  
Direktor: Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt

## **Habilitationsschrift**

# **Stärkung endogener Regenerationsmechanismen durch Modulation des mTOR-Signalnetzwerks**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Björn Hegner**

**Eingereicht: Mai/2023**

**Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Spranger**

**1. Gutachter/in: .....**

**2. Gutachter/in: .....**

## Inhalt

<b>Abkürzungen</b>	<b>3</b>
<b>Die Sache Makropulos</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Altern	7
1.2 mTOR – mechanistic target of Rapamycin	8
1.3 Krankheitslast im Alter	11
1.4 Mesenchymale Stromazellen	12
1.5 MSC als Gefäßvorläuferzellen	15
1.6 Zielsetzung und Fragestellungen	16
<b>2. Eigene Arbeiten</b>	<b>18</b>
2.1 Differenzielle Regulation glattmuskulärer Marker in humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark	18
2.2 mTOR reguliert die glatte Gefäßmuskeldifferenzierung humaner mesenchymaler Vorläuferzellen aus dem Knochenmark	32
2.3 mTORC1 und mTORC2 regulieren Zellschicksalsprogramme unterschiedlich und koordinieren so die osteoblastäre Differenzierung mesenchymaler Stromazellen	41
2.4 Niedrig dosiertes Rapamycin beeinträchtigt nicht die vaskuläre Integrität und tubuläre Regeneration nach Nierentransplantation in Ratten	63
2.5 Der mTOR-Inhibitor Rapamycin schützt vor vorzeitiger zellulärer Seneszenz frühzeitig nach experimenteller Nierentransplantation	76
<b>3. Diskussion</b>	<b>94</b>
3.1 Protektive Aktivierungsmuster des mTOR-Netzwerks	94
3.2 Steuerung der MSC-Plastizität durch mTOR in Bezug auf vaskuläre Homöostase und pathologische Gefäßumbauprozesse	95
3.3 Autophagie als mTOR-abhängiger Modulator der MSC-Kalzifizierung	98
3.4 Die protektive Wirkung der mTORC2-Aktivierung	99
3.5 Ableitung klinischer Perspektiven	101
3.5.1 Geschlechtsaspekte	101
3.5.2 Alternative pharmakologische Interventionen zu Rapamycin	103
3.5.3 Nicht-pharmakologische Beeinflussung des mTOR-Netzwerks	104
3.5.4 mTOR und Diabetes mellitus Typ 2	106
3.5.5 Mögliche Nachteile einer mTORC1-Inhibition	106
3.6 Seneszenz und senolytische Therapieansätze	108
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>5. Literaturangaben</b>	<b>112</b>
<b>Danksagung</b>	<b>120</b>
<b>Erklärung</b>	<b>121</b>

## Abkürzungen

4E-BPs	Initiationsfaktor 4E-bindende Proteine
Akt	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat abhängige Kinase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CD	cluster of differentiation
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DALY	disability-adjusted life-years; krankheitskorrigierte Lebensjahre
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid; Deoxyribonucleinsäure
DOCA	Deoxykortikosteronazetat
E2	estradiol; Östradiol
Erk	extracellular-signal regulated kinase
ER $\beta$	estrogen receptor $\beta$ ; Östrogenrezeptor $\beta$
ER $\beta$ <sup>-/-</sup>	Östrogenrezeptor $\beta$ defizient
FCS	fetal calf serum; fötales Kälberserum
FoxO1/3a	forkhead box protein O1/3a
GLP-1	glucagon-like Peptide 1
HALE	healthy life expectancy; Gesundheitserwartung
HLA	humanes Leukozytenantigen
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
MAP	mitogen-activated protein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
miRNA	Mikro-RNA
MLCK	myosin light chain kinase; Myosin-Leichtketten-Kinase
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal stem cell/mesenchymal stromal cell; mesenchymale Stammzelle/mesenchymale Stromazelle
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
mTORC1	mTOR Komplex 1
mTORC2	mTOR Komplex 2
NaCl	Natriumchlorid
p70S6K1	p70S6 Kinase 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRAS40	proline rich Akt substrate of 40 kDa

RPTC	renal proximal tubular cells; renale proximale Tubuluszellen
SASP	senescence associated secretory phenotype; Seneszenz assoziierter sekretorischer Phänotyp
SCAP	senescent cell antiapoptotic pathway
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase; Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SGK1	Serum- und Glukokortikoid induzierte Proteinkinase 1
SGLT2	sodium-glucose linked transporter 2; Natrium-Glukose-Kotransporter Typ 2
SM22 $\alpha$	SM Protein 22-alpha
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor beta 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TOR	target of Rapamycin
TSC2	tuberous sclerosis complex 2; Tuberöse Sklerose Komplex 2
UKPDS	United Kingdom prospective diabetes study
ULK1	Unc-51-like kinase
UPR	unfolded protein response; Antwort auf ungefaltete Proteine
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A
VEGF-R1	VEGF-Rezeptor 1
VSMC	vascular smooth muscle cell; glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	World Health Organization

## Die Sache Makropulos

Der Traum von der Unsterblichkeit ist wahrscheinlich so alt wie die Erkenntnis des Menschen, dass sein Leben endlich ist. Zahlreiche Künstlerinnen und Künstler haben diese Vision in ihren Werken aufgegriffen und ihre anscheinende Unerreichbarkeit darin verarbeitet.

Ein Beispiel für ein solches „Was wäre, wenn“-Spiel ist die Oper „Die Sache Makropulos“ von Leoš Janáček: Eine Frau, Elina Makropulos, hat durch ein Elixier, welches ihr Vater Anfang des 17. Jahrhunderts als Leibarzt des habsburgischen Kaisers Rudolfs II auf dessen Auftrag hin entwickelt hatte, eine zusätzliche Lebenszeit von 300 Jahren gewonnen. Jetzt sind diese 300 Jahre abgelaufen und es entwickelt sich eine Art Kriminalgeschichte, da die Frau unbedingt die Formel des Elixiers, die ‚Sache Makropulos‘, in ihren Besitz bringen möchte, um weitere 300 Jahre leben zu können. Die Oper endet mit dem Verzicht der Hauptfigur auf eine weitere Verlängerung des Lebens, da sie zu der Erkenntnis kommt, dass ein Leben ohne Grenzen seinen einmaligen Wert verliert.

„Langweilig wird die Erde, langweilig wird der Himmel! Und man erkennt, dass daran die Seele gestorben ist.“

### 3. Akt, Die Sache Makropulos

So erstrebenswert ein unendliches Leben aus der Sicht des Sterblichen auch scheinen mag, so wenig wäre uns tatsächlich damit gedient. Stattdessen sollten die Anstrengungen darauf gerichtet sein, die begrenzte Lebenszeit so gut wie möglich zu nutzen. Hierzu gehört nicht zuletzt eine Verlängerung des Anteils der Lebenszeit *in Gesundheit*. Die ‚Global Burden of Disease Study 2017‘ hat gezeigt, dass die Lebenserwartung in den meisten Ländern zwischen 1990 und 2017 zwar gestiegen ist, aber die zusätzlichen Jahre in Gesundheit weniger stark zugenommen haben (für Männer +6,1 versus +4,8 Jahre, für Frauen +4,4 versus +3,4 Jahre) [GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators, Lancet 2018]. Wir leben also immer länger, sind aber auch immer länger krank! Dies ist auch angesichts der begrenzten Ressourcen zur

Versorgung von kranken und pflegebedürftigen Menschen sowohl auf finanzieller aber zunehmend auch auf personeller Ebene von großer Bedeutung.

Die Stärkung des endogenen Regenerationspotenzials könnte hier einen entscheidenden Vorteil bringen, weil sich dadurch gerade chronische Krankheiten mit einem langen Verlauf und zunehmender körperlicher Beeinträchtigung positiv beeinflussen lassen könnten. Daher habe ich meine Habilitationsschrift diesem Thema gewidmet.

# 1. Einleitung

## 1.1 Altern

Alle Menschen altern – aber jeder Mensch altert anders! So gibt es 90jährige, die deutlich weniger strukturelle Schäden und funktionelle Einschränkungen aufweisen und somit insgesamt gesünder und sowohl geistig als auch körperlich fitter sind als mancher 70jährige. Das chronologische Alter und das sogenannte biologische Alter können also sehr weit auseinander liegen. Der individuelle funktionelle Status wird von der Leistungsfähigkeit der Organsysteme bestimmt, die sich wiederum von der physiologischen Funktionstüchtigkeit jeder einzelnen Zelle ableitet. Die molekularen Vorgänge auf zellulärer Ebene, die zu Einbußen in dieser Funktionstüchtigkeit führen, sind daher die entscheidenden Faktoren, die bestimmen, wie schnell und wie umfänglich wir altern.

Als wichtige Einflussfaktoren hierfür gelten genetische Determinanten und epigenetische Prägungen. Aber auch zahlreiche Umwelteinflüsse, der individuelle Lebensstil und verschiedene durchgemachte Krankheiten sind beispielsweise von großer Bedeutung [Khan SS et al., Aging Cell 2017]. Auf zellulärer und molekularer Ebene wurden neun charakteristische Veränderungen beschrieben, die mit dem Altern verbunden sind [Lopez-Otin et al., Cell 2013]. Es sind dies:

- genomische Instabilität
- Telomerverkürzung
- epigenetische Veränderungen
- Verlust des Proteomgleichgewichts (Proteostase)
- gestörte Nährstoffwahrnehmung
- mitochondriale Dysfunktion
- zelluläre Seneszenz
- Erschöpfung des Stammzellenpools
- beeinträchtigte interzelluläre Kommunikation

Das Ausmaß dieser Veränderungen fällt durch die genannten Einflussfaktoren bei jedem Individuum unterschiedlich aus und bestimmt den zeitlichen Verlauf und die qualitative Ausprägung der strukturellen und funktionellen Einbußen und damit das individuelle Altern.

Ein bemerkenswertes Molekül und in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist mTOR, das ‚mechanistic target of Rapamycin‘ (ehemals ‚mammalian target of Rapamycin‘).

## 1.2 mTOR – mechanistic target of Rapamycin

Die nachfolgenden Ausführungen über mTOR basieren im Wesentlichen auf den ausführlichen Reviews von G. Liu, R. Saxton und D. Sabatini [Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020; Saxton RA et al., Cell 2017]. Es werden nur die im Zusammenhang mit dem Thema dieser Habilitationsschrift besonders wichtigen Aspekte aus dem sehr umfangreichen Wissen über das um mTOR herum existierende Signaltransduktionsnetzwerk herausgegriffen.

Das Protein mTOR wurde 1994 als das molekulare Ziel von Rapamycin in Säugetierzellen entdeckt [Brown EJ et al., Nature 1994; Sabatini DM et al., Cell 1994; Sabers CJ et al., J Biol Chem 1995]. Rapamycin ist ein vom Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiertes Makrolid mit fungiziden [Sehgal SN et al., J Antibiot (Tokyo) 1975] aber auch immunsuppressiven [Martel RR et al., Can J Physiol Pharmacol 1977] und tumorhemmenden Eigenschaften [Eng CP, J Antibiot (Tokyo) 1984], das bei der Suche nach neuen antimikrobiellen Substanzen aus Erdproben von der Osterinsel („Rapa Nui“) isoliert wurde. mTOR-ähnliche Proteine finden sich in praktisch allen Eukaryoten von Pilzen über Invertebraten hin zu den Wirbeltieren.

Dass die Inaktivierung von mTOR-Homologen und assoziierten Elementen zur Lebensverlängerung führt, wurde zuerst in der Nematode *Caenorhabditis elegans* beobachtet [Vellai T et al., Nature 2003] und später auch in zahlreichen anderen Organismen wie *Drosophila* [Kapahi P et al., Current Biology 2004], Hefen [Kaeberlein M et al., Science 2005] und Mäusen [Lamming DW et al., Science 2012] nachgewiesen. Ähnliche Effekte konnten außerdem für Rapamycin, den ersten bekannten pharmakologischen Inhibitor von TOR-Proteinen, gezeigt werden [Bjedov I et al., Cell Metab 2010; Powers RW 3rd et al., Genes & Development 2006; Harrison DE et al., Nature 2009; Robida-Stubbs S et al., Cell Metab 2012]. Bedeutsam ist außerdem, dass Rapamycin in Mäusen insbesondere auch die gesunde Lebensspanne verlängern konnte [Bitto A et al., eLife 2016]. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen waren Inhalt zahlreicher Forschungsprojekte der letzten



Jahre, die wichtige Beiträge zur Aufklärung der Funktionsweise von mTOR und seiner zentralen Stellung in der Steuerung einer Vielzahl zellulärer Prozesse lieferten.

mTOR ist eine Serin/Threoninkinase aus der Gruppe der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-ähnlichen Proteinkinasen [Keith CT et al., Science 1995], die als katalytische Untereinheit in zwei Multiproteinkomplexen, mTOR Komplex 1 (mTORC1) und 2 (mTORC2), vorkommt. Diese unterscheiden sich in ihren akzessorischen Proteinen, der Empfindlichkeit gegenüber Rapamycin sowie ihrer Stellung im Signaltransduktionsnetzwerk und den daraus resultierenden Funktionen [Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020]. Aufbau und Funktion von mTORC1 werden maßgeblich durch das definierende Protein Raptor bestimmt, während mTORC2 durch das Gerüstprotein Rictor charakterisiert ist [Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020]. Rapamycin hemmt die katalytische Aktivität von mTORC1 aber nicht von mTORC2, kann jedoch die Neubildung von mTORC2 bei längerem Einwirken verhindern [Sarbasov DD et al., Mol Cell 2006].

Die Hauptaufgabe des mTOR-Signalnetzwerkes besteht darin, Wachstum und Proliferation der Zellen an die jeweiligen Anforderungen und Gegebenheiten anzupassen. Die Anforderungen werden dabei durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren vermittelt, die jedoch nicht unmittelbar umgesetzt werden, sondern am zentralen Knotenpunkt mTOR auf die Verfügbarkeit von Energie und makromolekularen Bausteinen abgestimmt werden. Somit ist mTOR der zentrale Regulator von Anabolismus und Katabolismus [Saxton RA et al., Cell 2017].

mTORC1 aktiviert die Synthese von Proteinen vor allem über Initiationsfaktor 4E-bindende Proteine (4E-BPs) und die p70S6 Kinase 1 (p70S6K1) [Holz MK et al., Cell 2005], die die Translationsinitiation von messenger RNA (mRNA) kontrollieren. Außerdem wird auch die Synthese von Lipiden für neue Zellmembranen und von Nukleotiden für die DNA-Replikation positiv reguliert [Saxton RA et al., Cell 2017]. Auf der anderen Seite unterdrückt mTORC1 die Hauptabbauwege für Proteine, nämlich Autophagie über die Phosphorylierung von Unc-51-like kinase (ULK1) [Kim J et al., Nat Cell Biol 2011] sowie das Ubiquitin-Proteasom-System [Rousseau A et al., Nature 2016]. Die Glykolyse wird zur Bereitstellung von für das Zellwachstum benötigten Metaboliten ebenfalls aktiviert [Düvel K et al., Mol Cell 2010]. Somit ist mTORC1 von zentraler Bedeutung für die Steuerung des Zellwachstums.

Die Funktion von mTORC2 liegt vorwiegend in der Regulation von Proliferation und Zellüberleben [Saxton RA et al., Cell 2017] über die Stimulierung der Proteinkinase B (Akt), einem zentralen Bestandteil des PI3K-Signalweges [Sarbasov DD et al., Science 2005]. Die Aktivierung einiger down-stream Ziele von Akt ist dabei zwingend auf mTORC2 angewiesen wie die forkhead box protein O1/3a (FoxO1/3a)-Transkriptionsfaktoren [Guertin DA et al., Dev Cell 2006], die unter anderem in die Regulation von Apoptose und exogener Stressresistenz eingebunden sind. Außerdem besteht über den Tuberöse Sklerose Komplex 2 (TSC2) eine positive Regulation von mTORC1, da TSC2 die Aktivität von mTORC1 hemmt und von Akt deaktiviert wird. Weitere Ziele von mTORC2 sind die Serum- und Glukokortikoid induzierte Proteinkinase 1 (SGK1) [Garcia-Matinez JM et al., Biochem J 2008] und verschiedene Vertreter der Proteinkinase C [Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020]. Hierüber nimmt mTORC2 Einfluss auf den Glukosemetabolismus, Ionentransportvorgänge und das Zytoskelett sowie Zellmigration.

Die Aktivierung von mTORC1 über verschiedene Wachstumsfaktoren und andere mitogene Signale erfolgt über die Hemmung von TSC [Dibble CC et al., Mol Cell 2012]. Als prototypisch ist hier der Insulin/Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)/PI3K/Akt-Signalweg zu nennen, aber auch Rezeptortyrosinkinasen aktivieren über die mitogen-activated protein (MAP)-Kinase Erk (extracellular-signal regulated kinase) mTORC1 [Saxton RA et al., Cell 2017]. Weiterhin setzen hier proinflammatorische Zytokine wie der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) an. Die Mechanismen, durch die die Verfügbarkeit von Aminosäuren und anderen Nährstoffen sowie von Energie und Sauerstoff registriert und in die Aktivierung von mTORC1 integriert wird, sind hoch komplex und weiterhin Gegenstand der Forschung [Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020].

mTORC2 wird dagegen hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren über PI3K und Akt aktiviert. Wichtig ist zudem ein negativer Feedbackmechanismus von mTORC1 auf das PI3K/Akt-Signaling, da hierdurch auch ein negativer Crosstalk zu mTORC2 vorliegt [Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020].

Insgesamt besteht somit ein umfassendes Signalnetzwerk mit Beteiligung von mTOR, welches insbesondere durch die beiden unterschiedlichen Kinasekomplexe mTORC1 und mTORC2 entscheidend in die Regulation der wichtigsten Zellfunktionen wie der Synthese und dem Abbau von Makromolekülen und der Steuerung des Energiehaushaltes eingreift. Zellschicksalsprogramme wie Proliferation und Apoptose werden

ebenso durch mTOR kontrolliert. Vor diesem Hintergrund erscheint es nicht verwunderlich, dass mTOR bei der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen einschließlich Entwicklungsstörungen, Tumoren, metabolischer Syndrome und degenerativer Zustände maßgeblich beteiligt ist.

### 1.3 Krankheitslast im Alter

Gemäß der regelmäßigen Erhebung der World Health Organization (WHO) stellen Herz-Kreislaufkrankungen seit Jahren die häufigsten Todesursachen weltweit dar. In 2019 waren 16% aller Todesfälle auf eine ischämische Herzerkrankung und 11% auf einen Schlaganfall zurückzuführen. Beide Krankheitsentitäten zeigten zudem einen deutlichen Anstieg gegenüber der Erhebung aus dem Jahr 2000 [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>; abgerufen 19.03.2022]. Auch die hierauf zurückzuführende Krankheitslast wurde weltweit von 1990 bis 2017 immer größer, wie eine Studie zu krankheitskorrigierten Lebensjahren (disability-adjusted life-years; DALY) und zur Gesundheitserwartung (healthy life expectancy; HALE) ergab: Ischämische Herzkrankheit und Schlaganfall standen demzufolge 2017 nach neonatalen Krankheiten auf Platz 2 und 3 der häufigsten Gründe für DALYs bei Frauen und auf Platz 1 und 3 bei Männern [GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators, Lancet 2018]. Mit steigender Lebenserwartung vor allem durch den Rückgang zunehmend besser behandelbarer Akuterkrankungen wie Geburtskomplikationen oder Infektionen treten somit degenerative chronische Schäden in den Vordergrund, die sich erst im höheren Lebensalter manifestieren.

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben ein besonders hohes Risiko, an den genannten Herz-Kreislaufkrankungen zu sterben, und das bereits in einem deutlich jüngeren Lebensalter als die übrige Bevölkerung [Wanner C et al., Lancet 2016]. Auch metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus sowie inflammatorische Zustände begünstigen die Entwicklung von Arteriosklerose [Demer LL et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014] und tragen so zu erhöhter und verfrühter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität bei. Die molekularen Mechanismen zeigen hierbei eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit den natürlichen Alterungsprozessen, nur dass sie deutlich früher eintreten und schneller ablaufen [White WE et al., World J Nephrol 2015]. Eine zentrale Stellung kommt hierbei Zellschicksalsprogrammen wie Apoptose, zellulärer Seneszenz und Autophagie zu, da diese in der Pathoge-

nese der Arteriosklerose von entscheidender Bedeutung sind und auch die altersbedingte Abnahme der Adaptationsfähigkeit und Stressresistenz mitbedingen.

Zweifellos haben auch die modernen Therapieoptionen bei Tumorerkrankungen und die immer bessere medikamentöse Kontrolle der Hauptrisikofaktoren für Herz-Kreislauf-erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und Fettstoffwechselstörungen sowie Fortschritte in der Herzinsuffizienztherapie zu einer Verlängerung der Lebenserwartung beigetragen. Innovative Therapiekonzepte beschränken sich jedoch nicht auf die Behandlung von Manifestationen einzelner Erkrankungen oder Risikofaktoren, die man in einem Konzept nachlassender Adaptations- und Regenerationsfähigkeit als Spitze des Eisbergs betrachten kann. Sie zielen vielmehr auf die unter 1.1 genannten grundlegenden (patho-)physiologischen Alterungsprozesse zur Prävention und Therapie einer Vielzahl altersassoziierter Krankheitszustände ab. Ein Ansatzpunkt ist hierbei die Erschöpfung des Stammzellpools, die zu einer Abnahme der Geweberegenerationsfähigkeit und -plastizität führt und so die funktionelle Reserve lebenswichtiger Organe zunehmend einschränkt, so dass ihre Reaktionsfähigkeit auf akute Stressoren abnimmt und sie diese nicht mehr ausreichend abfangen können [Khan SS et al., *Aging Cell* 2017].

#### 1.4 Mesenchymale Stromazellen

In den 1980er Jahren erkannte man, dass seltene fibroblastenartige Zellen in Zellpräparationen aus dem Knochenmark, die bereits fast 20 Jahre zuvor erstmals beschrieben worden waren [Friedenstein A et al., *Cell Tissue Kinet* 1970], ein hohes Vermehrungspotenzial aufweisen und sich wie Stammzellen von Osteoblasten verhalten [Owen M et al., *Ciba Found Symp* 1988]. Außerdem stellte man fest, dass diese Zellen auch in andere mesenchymale Linien wie Adipozyten und Chondroblasten differenzieren können [Pittenger M et al., *Science* 1999], so dass man sie ‚Mesenchymale Stammzellen‘ bzw. ‚Mesenchymale Stromazellen‘ (MSC) nannte. In den folgenden Jahren kamen weitere Berichte hinzu, dass MSC auch in Zellen aus den anderen beiden Keimblättern wie Epithelzellen oder Neurone transdifferenzieren können [Jiang Y et al., *Nature* 2002]. Zudem wurden auch aus anderen, leichter erhältlichen Geweben wie Plazenta, Nabelschnur oder Fettgewebe Zellen mit den gleichen Eigenschaften isoliert [Pittenger MF et al., *NPJ Regen Med* 2019]. Um die zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten mit den neu entdeckten Stammzellen zu

vereinheitlichen, legte die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie zur Definition dieser Zellen drei Minimalkriterien fest [Dominici M et al., Cytotherapy 2006]:

1. Adhärentes Wachstum an den Plastikgefäßen, die in der Zellkultur üblich sind
2. Ein charakteristisches Expressionsmuster von Oberflächenantigenen (positiv für CD105, CD73 und CD90; negativ für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD 19 und HLA-DR)
3. Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten unter bestimmten Zellkulturbedingungen

Anfang der 2000er Jahre, als auch wir die Arbeit mit MSC begannen, entwickelte sich eine große Euphorie um MSC mit starkem wissenschaftlichem und klinischem Interesse, da MSC zahlreiche vielversprechende Eigenschaften aufzuweisen schienen. So bestehen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen keine bedeutenden ethischen Hürden für einen breiten Einsatz bei Patienten. Die Zellen sind zudem verhältnismäßig leicht zu gewinnen und in der Zellkultur zu expandieren. Sowohl eine autologe als auch eine allogene Anwendung ist möglich, da MSC insbesondere die alloreaktive T-Zellantwort des Empfängers eher unterdrücken als stimulieren [Beggs KJ et al., Cell Transplant 2006]. Daher könnten MSC von verschiedenen Spendern für eine zukünftige Anwendung nach der Expansion gelagert und schnell bei Bedarf eingesetzt werden. Diese Charakteristika machten MSC zu den idealen Kandidaten als Ausgangsmaterial für Gewebeersatz bei chronischen degenerativen Veränderungen des muskuloskelettalen Systems aber auch z.B. von Herzklappen [Hoerstrup SP et al., Circulation 2002].

Große Hoffnungen wurden damals in MSC hinsichtlich exogener Zelltherapien von Krankheiten gelegt, bei denen Gewebe zu Grunde geht, welches vom Körper nicht oder nur sehr eingeschränkt ersetzt werden kann. Hierzu gehörten vor allem Myokardinfarkt, Schlaganfall und neurodegenerative Erkrankungen. Es wurden Konzepte entwickelt, die die Differenzierung von MSC in funktionsfähige Zellen des geschädigten Gewebes und die Integration am Ort des Schadens zum Ziel hatten. So wurde zum Beispiel in Tierexperimenten gezeigt, dass die exogene Zufuhr von MSC entweder als direkte intrakardiale Injektion oder als intravenöse Infusion zu einer Ansammlung dieser Zellen im geschädigten Gewebe führt. Außerdem wurde nicht nur eine Differenzierung zu Kardiomyozyten sondern auch eine funktionelle Verbesserung vor allem der diastolischen Funktion beobachtet [Pittenger MF et al., Circ Res 2004].

Allerdings lieferten diese Studien uneinheitliche Ergebnisse hinsichtlich des Ausmaßes der Differenzierung der injizierten Zellen in Kardiomyozyten und hinsichtlich der Frage, inwieweit sie tatsächlich untergegangenes Gewebe ersetzen konnten. Einiges sprach dafür, dass nur eine sehr geringe Anzahl der zugeführten Zellen dauerhaft in das Zielgewebe integriert wurde [Pittenger MF et al., Circ Res 2004]. Auch wurden Fusionsereignisse von MSC mit bereits vorhandenen Kardiomyozyten beobachtet, die ebenfalls quantitativ wenig bedeutsam erschienen [Noiseux N et al., Mol Ther 2006]. Schnell zog man daher auch in Betracht, dass vielleicht in erster Linie von den MSC sezernierte Faktoren für die beobachteten funktionellen Verbesserungen verantwortlich waren, die unter anderem das Remodeling positiv beeinflussen und die Bildung neuer Blutgefäße stimulieren könnten [Pittenger MF et al., Circ Res 2004].

Tatsächlich sind MSC in der Lage, eine große Zahl an unterschiedlichen Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Mikro-RNAs (miRNA) und anderen Substanzen zu produzieren und diese entweder direkt in ihre Umgebung abzugeben oder über Exosomen und extrazelluläre Vesikel auch auf entferntere Zellen Einfluss zu nehmen [Pittenger MF et al., NPJ Reg Med 2019]. Auch Zell-Zell-Kontakte können für die Funktion von MSC bedeutsam sein, was zum Beispiel für ihre Rolle bei der Bereitstellung der Nische für hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark von Bedeutung ist [Friedenstein AJ et al., Transplantation 1974]. Insgesamt kam es zu einem „Paradigmenwechsel“ weg von der Vorstellung eines Zellersatzes durch differenzierende MSC hin zu dem Konzept einer parakrinen Unterstützung lokaler Reparaturmechanismen einschließlich Hemmung von Inflammation und Fibrose sowie Stimulation lokaler Stamm- und Vorläuferzellen und der Neubildung von Gefäßen [Pittenger MF et al., NPJ Reg Med 2019].

Im Gegensatz zur Applikation *ex vivo* expandierter und eventuell modifizierter autologer oder allogener MSC steht die Einflussnahme auf die im Körper *in situ* befindlichen MSC. Dies kann einerseits im Sinne einer endogenen Stammzelltherapie erfolgen mit der Zielsetzung, die körpereigenen MSC zu mobilisieren und zum Ort einer Schädigung zu lenken, damit sie dort entweder durch spezifische Differenzierung verlorengegangene Zellen ersetzen oder durch parakrine Wirkung zum Schutz der vorhandenen Strukturen oder zur Gewebsneubildung beitragen. Andererseits können Interventionen auf die Wiederherstellung oder zumindest den Erhalt der natürlichen Funktionalität der MSC abzielen, die altersbedingt oder durch exogene Einflüsse wie unter 1.1 genannt abnimmt [Wu SH et al., Tissue Eng Regen Med 2022]. So könnte

der altersbedingten Erschöpfung des MSC Stammzellkompartiments entgegengewirkt und das endogene Regenerationspotenzial der MSC gestärkt werden.

### 1.5 MSC als Gefäßvorläuferzellen

Bei dem Bestreben, MSC *in vivo* zu charakterisieren und Differenzierungsprozesse im physiologischen Umfeld im Gegensatz zu den artefiziellen Zellkulturbedingungen zu untersuchen, wurde festgestellt, dass Zellen in der Umgebung von Kapillaren und in der Adventitia auch von größeren Arterien und Venen eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit MSC aufweisen [Pittenger MF et al., NPJ Reg Med 2019]. Kultivierte Perizyten aus verschiedenen Organen waren letztlich von MSC aus dem Knochenmark nicht zu unterscheiden, da sie die gleichen Oberflächenantigene exprimierten und auch das geforderte Differenzierungspotenzial aufwiesen [Crisan M et al., Cell Stem Cell 2008]. Die typischen Oberflächenmarker wurden auf den Perizyten auch *in situ* nachgewiesen [Crisan M et al., Cell Stem Cell 2008]. Die Lokalisation in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen würde gut zu der vermuteten Rolle von MSC bei der Gewebsregeneration in vaskularisierten Geweben passen, da so eine schnelle Antwort auf einen lokalen Schaden möglich wäre [Pittenger MF et al., NPJ Reg Med 2019]. Weitere Befunde führten zu der Vorstellung, dass MSC und Perizyten einander entsprechen und als Vorläuferzellen glatter Gefäßmuskelzellen dienen [Bautch VL, Nat Med 2011]. Während Perizyten der Regeneration von Blutgefäßen dienen [Hirschi KK et al., Cardiovasc Res 1996; Edelman DA et al., J Surg Res 2006], können MSC auch aus anderen Körperregionen über die Blutbahn zirkulieren und den Perizytenpool bei Bedarf verstärken oder wiederherstellen [de Souza LE et al., Stem Cells Dev 2016]. Allerdings sind diese Zellen offenbar nicht nur an der physiologischen Regeneration und Reparatur von Gefäßschäden beteiligt, sondern können auch einen entscheidenden Anteil an der Ausbildung pathologischer Gefäßveränderungen haben. Dies wurde insbesondere für die typischerweise im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen auftretende Arteriosklerose gezeigt [Kramann R et al., Cell Stem Cell 2016].

## 1.6 Zielsetzung und Fragestellungen

Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war es, MSC für die Verbesserung der kardiovaskulären Prognose bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko, wie man es beispielsweise bei chronischer Niereninsuffizienz findet, nutzbar zu machen.

In einem ersten Schritt wurde hierzu die **phänotypische Modulierbarkeit von humanen MSC aus dem Knochenmark in Hinblick auf vaskuläre Zellen** untersucht.

Die erhobenen Befunde wiesen uns auf den mTOR-Signalweg als Regulator nicht nur von glattmuskulärer Differenzierung von MSC sondern auch im Zusammenhang mit der Umwandlung von MSC zu osteoblastenartigen Zellen, die zentral für Kalzifizierungsprozesse im Rahmen des arteriosklerotischen Gefäßumbaus im Alter sowie bei metabolischen Erkrankungen sind.

Eine Schlüsselstellung nehmen daher die Untersuchungen zur **Steuerung der osteoblastären Differenzierung und Kalzifizierung von MSC über die Kontrolle von Zellschicksalsprogrammen durch die beiden Knotenpunkte des mTOR-Signalnetzwerkes, mTORC1 und mTORC2**, ein.

Mit den Erfahrungen aus den Untersuchungen an MSC aber auch aus anderen Krankheitsmodellen vor allem zur kardioresalen Interaktionen in uninephrektomierten Mäusen mit künstlichem Mineralokortikoidexzess rückte der mTOR-Signalweg als grundlegendes Prinzip zur Steigerung der zellulären Resistenz gegenüber pathologischen Stimuli und somit auch zur Stärkung des endogenen Regenerationspotenzials in den Vordergrund.

In einem weiteren thematischen Block wurden daher die bisherigen Ergebnisse auf ein Nierentransplantationsmodell in der Ratte übertragen und geprüft, **ob eine mTOR-Modulation vorzeitiger zellulärer Seneszenz im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens schützt und wie sie die vaskuläre und tubuläre Regeneration beeinflusst**.

Insgesamt verlagerte sich über die Jahre der Fokus der Arbeiten auch vor dem Hintergrund der unter 1.5 geschilderten Entwicklungen auf dem Gebiet der MSC-Forschung weg von der exogenen Zelltherapie mit MSC hin zu einer Beeinflussung der *in situ* befindlichen Vorläuferzellen und auch von differenzierten organspezifischen Zellen. Schließlich ging es um die **Erforschung des Prinzips der mTOR-Modulation**



insbesondere mit Rapamycin als aktuell verfügbarer Modellsubstanz ***mit dem Ziel einer generellen Reduktion altersbedingter Einbußen der Stressresistenz auf zellulärer und molekularer Ebene.***

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1 Differenzielle Regulation glattmuskulärer Marker in humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

Ausgangspunkt der Untersuchungen zur Stärkung des endogenen Regenerationspotenzials in Hinblick auf renale Erkrankungen und die damit verbundene kardiovaskuläre Morbidität waren Untersuchungen an humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark. Ein Screening verschiedener Substanzen, die bekanntermaßen die Differenzierung von Zellen beeinflussen können, zeigte starke Effekte von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die Morphologie der MSC, die in der ersten der hier aufgeführten Studien näher untersucht wurden.

Der folgende Text entspricht in deutscher Übersetzung aus dem Englischen dem Abstrakt der Arbeit:

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

#### **“Zielsetzung**

Die glattmuskuläre Differenzierung und Dedifferenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark zu untersuchen, von denen gezeigt wurde, dass sie in den Blutkreislauf eintreten und zu Gefäßreparatur und Atherosklerose beitragen.

#### **Versuchsplan**

Humane MSCs aus dem Knochenmark wurden entweder mit 20% fötalem Kälberserum (FCS) oder mit 10% FCS und verschiedenen Konzentrationen von Dimethylsulfoxid (DMSO) kultiviert. Die Expression glattmuskulärer Marker wurde mittels Western Blot und Immunfluoreszenz bestimmt. Im Rahmen von 18

Signaltransduktionsstudien wurde die Beteiligung des mammalian target of rapamycin (mTOR) durch Behandlung mit Rapamycin getestet.

### ***Ergebnisse***

Mit 20% FCS kultivierte MSCs nahmen ein glattmuskel-artiges Aussehen an und exprimierten die glattmuskulären Marker  $\alpha$ -Glattmuskelaktin, Desmin, Glattmuskel-Calponin und Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK). DMSO induzierte eine spindelförmige Morphologie mit deutlicher Reduktion von Stressfasern. Mit Western Blot wurde gesehen, dass die Behandlung mit 2,5% DMSO die Expression von Glattmuskel-Calponin (-85%), kurzer MLCK (-98%) und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (-51%) deutlich herunterregelte. Eine reduzierte Calponinexpression wurde ab Tag 2 der Behandlung mit 0,5-2,5% DMSO festgestellt. Nachdem DMSO entfernt wurde, erlangten die MSCs eine hohe Expression von Glattmuskel-Calponin zurück. Eine Behandlung mit 6 nmol/l Rapamycin antagonisierte teilweise die Effekte von DMSO, was eine Beteiligung von mTOR an der Regulation des glattmuskulären Phänotyps von MSCs anzeigt.

### ***Schlussfolgerungen***

DMSO reguliert die glattmuskulären Marker Glattmuskel-Calponin, kurze MLCK und  $\alpha$ -Glattmuskelaktin in humanen MSCs stark herunter, was den Übergang von einem glattmuskelartigen Phänotyp zu einem undifferenzierten Zustand durch einen mTOR-abhängigen Mechanismus anzeigt. Den Phänotyp humaner MSCs zu regulieren, kann für neue therapeutische Ansätze der Atherosklerose und Intimahyperplasie nach Gefäßschädigung von Bedeutung sein.“

Übersetzung durch den Autor.

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)



**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

**Hegner B**, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E.

Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

*Journal of Hypertension*, 2005, 23:1191-202.

DOI: [10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000170382.31085.5d)

## 2.2 mTOR reguliert die glatte Gefäßmuskelzellendifferenzierung humaner mesenchymaler Vorläuferzellen aus dem Knochenmark

Die Entdeckung, dass mTOR an der Kontrolle des phänotypischen Übergangs von glattmuskulärer Differenzierung zu einem undifferenzierten Zustand in MSC beteiligt war, erschien uns von großer Bedeutung. Zum einen war dieser Signalweg bereits mit ähnlicher Funktion in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) beschrieben worden. Zum anderen bot sich hier die konkrete Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflussung, die bei an der Pathogenese von Gefäßläsionen beteiligten Vorläuferzellen ansetzte. Dies versprach einen möglicherweise größeren Effekt als die therapeutische Beeinflussung bereits differenzierter ortsständiger Zellen.

Eine weitere Arbeit widmete sich daher detaillierter der Bedeutung von mTOR für die Differenzierung humaner MSC in Zellen mit einem Phänotyp, der glatten Gefäßmuskelzellen ähnelte. Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine mTOR-Modulation mit Rapamycin in das Homing zirkulierender Vorläuferzellen zu Orten einer vaskulären Schädigung eingreifen kann. Wichtig war uns bei allen Untersuchungen, dass relevante Effekte bei realistischerweise in Patienten erreichbaren Rapamycin-konzentrationen auftraten.

Der folgende Text entspricht in deutscher Übersetzung aus dem Englischen dem Abstrakt der Arbeit:

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)

### “Zielsetzung

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und zirkulierende mesenchymale Vorläuferzellen (MSCs) mit einem VSMC-Phänotyp tragen zu Neointimabildung und Lumenverlust nach Angioplastie und bei Transplantat-Arteriosklerose bei. Wir stellten die Hypothese



auf, dass eine Aktivierung des Phosphoinositol-Akt-mammalian target of rapamycin-p70S6 Kinase (PI3K/Akt/mTOR/p70S6K) Signalweges die VSMC-Differenzierung von MSCs reguliert.

### ***Methoden und Ergebnisse***

Wir untersuchten die Effekte von PI3K/Akt/mTOR/p70S6K-Signalen auf die phänotypische Modulation von MSC und die Expression von VSMC-Markern einschließlich von L-Typ Ca(2+)-Kanälen. Eine Phosphorylierung von Akt und p70S6K brachte eine Herabregulation von VSMC-Markern in dedifferenzierten MSCs. Die Hemmung von mTOR mit Rapamycin in Konzentrationen unterhalb des pharmakologisch Üblichen blockierte die Phosphorylierung von p70S6K und induzierte einen differenzierten kontraktile Phänotyp mit Expression von Glattmuskel-Calponin, Glattmuskel- $\alpha$ -Aktin und SM Protein 22-alpha (SM22 $\alpha$ ). Der PI3K-Inhibitor Ly294002 hob die Phosphorylierung von Akt und p70S6K auf und kehrte den dedifferenzierten Phänotyp durch Induktion von Glattmuskel-Calponin, Glattmuskel- $\alpha$ -Aktin, SM22 $\alpha$  und Myosin-Leichtketten-Kinase um. Rapamycin wirkte antiproliferativ, ohne die Viabilität der MSC zu beeinträchtigen. In VSMCs steigerte Rapamycin ein Homing-Chemokin für MSCs, den stromal cell-derived factor-1-alpha, auf mRNA- und Proteinebene. Die CXCR4-vermittelte Migration von MSCs auf konditioniertes Medium von mit Rapamycin behandelten VSMCs war verstärkt.

### ***Schlussfolgerungen***

Wir beschreiben neuartige pleiotrope Effekte von Rapamycin in sehr niedrigen Konzentrationen, die differenzierte kontraktile VSMCs aus MSCs stabilisierten und außerdem antiproliferative und das Homing verstärkende Wirkungen hatten.“

Übersetzung durch den Autor.

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)

**Hegner B**, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D.

mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors.

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009, 29:232-8.

DOI: [10.1161/ATVBAHA.108.179457](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457)



### **2.3 mTORC1 und mTORC2 regulieren Zellschicksalsprogramme unterschiedlich und koordinieren so die osteoblastäre Differenzierung mesenchymaler Stromazellen**

In weiteren Studien untersuchten wir Differenzierungsvorgänge in humanen MSC, die in pathophysiologischen Kontexten mit hohem vaskulärem Risiko von Bedeutung sind. Hierzu gehörten Patienten mit systemischer Sklerose, bei denen wir eine intrinsisch deregulierte Differenzierung von MSC in glatte Gefäßmuskelzellen und Myofibroblasten fanden [Hegner B et al., PLoS One 2016], ebenso wie das urämische Milieu, das die Entwicklung eines osteoblastenähnlichen kalzifizierenden Phänotyps förderte. Entscheidend waren hierbei proinflammatorische Zytokine und andere Urämietoxine, deren Einfluss unter anderem durch spezielle Dialyseverfahren vermindert werden konnte [Hegner B et al., Sci Rep 2018; Schaub T et al., Sci Rep 2021].

Neben Veränderungen des Gefäßsystems sind auch kardiale Erkrankungen entscheidend für Morbidität und Mortalität mit zunehmendem Alter und bei nephrologischen Krankheitsbildern. Wir führten daher mehrere Untersuchungen zu kardialen Adaptationsprozessen in einem Mausmodell für eine renal induzierte Myokardhypertrophie unter normotensiven Bedingungen durch. Hier fanden sich geschlechtsspezifische Unterschiede mit Ausbildung einer Myokardhypertrophie nur in männlichen Mäusen [Karatas A et al., Hypertension 2008]. Der Schutz weiblicher Individuen wurde über den Östrogenrezeptor  $\beta$  vermittelt, dessen genetische Ablation in einer dilatativen Kardiomyopathie mit hohem Fibrosegrad resultierte [Gürgen D et al., Hypertension 2011]. Interessanterweise führte eine mTOR-Modulation durch Rapamycin nur in männlichen Mäusen zu einem Schutz vor Myokardhypertrophie, während bei weiblichen Tieren ähnliche Veränderungen wie beim Östrogenrezeptor  $\beta$ -Knock out beobachtet wurden. Diese Unterschiede waren auf ein differenzielles mTOR-Signaling mit unterschiedlichen Aktivierungsmustern von mTORC1 und mTORC2 zurückzuführen [Gürgen D et al., Hypertension 2013].

Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchten wir die Auswirkungen von Rapamycin auf kalzifizierende MSC. Hierbei erfolgte eine genaue Analyse der einzelnen Komponenten des mTOR-Netzwerkes und der dadurch regulierten Zellschicksale. Auf diese Weise konnten wir ein protektives mTOR-Signalmuster identifizieren, welches über die spezifische Aktivierung bzw. Hemmung bestimmter

Zellschicksalsprogramme der Umwandlung von MSC in kalzifizierende Osteoblasten-artige Zellen entgegenwirkte.

Der folgende Text entspricht in deutscher Übersetzung aus dem Englischen dem Abstrakt der Arbeit:

Schaub T, Gürgen D, Maus D, Lange C, Tarabykin V, Dragun D, **Hegner B.**

mTORC1 and mTORC2 differentially regulate cell fate programs to coordinate osteoblastic differentiation in vascular progenitor cells.

*Scientific Reports*, 2019, 9:20071.

DOI: [10.1038/s41598-019-56237-w](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56237-w)

“Vaskuläre Regeneration beruht auf der intakten Funktion von Vorläuferzellen von glatten Gefäßmuskelzellen wie den Perizyten und ihren zirkulierenden Gegenstücken, den mesenchymalen Stromazellen (MSC). Eine fehlregulierte Differenzierung von MSC und maladaptive Zellschicksalsprogramme, die mit Alter und metabolischen Erkrankungen verbunden sind, könnten Arteriosklerose durch eine exzessive Umwandlung in Osteoblasten-ähnliche kalzifizierende Zellen verstärken. Die Adressierung von mTOR, einem zentralen Kontrollpunkt von Differenzierung und Zellschicksalen, könnte neue therapeutische Perspektiven bieten. In einem Zellkulturmodell für die osteoblastäre Differenzierung von pluripotenten humanen MSC fanden wir unterschiedliche Rollen für mTORC1 und mTORC2 bei der Regulation der Differenzierung zu kalzifizierenden Osteoblasten über Zellschicksalsprogramme in einer zeitlich kontrollierten Abfolge. Die Aktivierung von mTORC1 mit der Induktion von zellulärer Seneszenz und Apoptose war das Kennzeichen des Übergangs zu einem kalzifizierenden Phänotyp. Die Hemmung von mTORC1 mit Rapamycin rief eine reziproke Aktivierung von mTORC2 hervor, verstärkte die Autophagie und rekrutierte antiapoptotische Signale, um so vor Kalzifizierung zu schützen. Pharmakologische und genetische negative Interferenz entweder mit der Funktion von mTORC2 oder Autophagie verhinderten jeweils regenerative Programme und induzierten stattdessen zelluläre Seneszenz, Apoptose und Kalzifizierung. Eine Überexpression der mTORC2-Komponente Rictor zeigte, dass ein verstärktes mTORC2-Signaling ohne veränderte mTORC1-Funktion ausreichte um Kalzifizierung zu hemmen. Studien in Mäusen reproduzierten die *in vitro* Effekte der mTOR-Modulation mit Rapamycin auf

42

Zellschicksale in vaskulären Zellen *in vivo*. Eine Verstärkung des mTORC2-Signaling fördert protektive Zellschicksale einschließlich Autophagie und wirkt so osteoblastärer Differenzierung und Kalzifizierung von MSC entgegen, was eine neuartige mTORC2-Funktion darstellt. Regenerative Ansätze, die auf eine Modulation der Aktivierungsmuster des mTOR-Netzwerks gerichtet sind, versprechen eine Verzögerung altersbezogener Gefäßerkrankungen und eine Behandlungsoption der beschleunigten Arteriosklerose bei chronischen metabolischen Erkrankungen.“

Übersetzung durch den Autor.

OPEN

# mTORC1 and mTORC2 Differentially Regulate Cell Fate Programs to Coordinate Osteoblastic Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells

Theres Schaub<sup>1,2,3</sup>, Dennis Gürgen<sup>1,4,5</sup>, Deborah Maus<sup>1,6</sup>, Claudia Lange<sup>7</sup>, Victor Tarabykin<sup>3</sup>, Duska Dragun<sup>1,4,8</sup> & Björn Hegner<sup>1,4,8,9\*</sup>

Vascular regeneration depends on intact function of progenitors of vascular smooth muscle cells such as pericytes and their circulating counterparts, mesenchymal stromal cells (MSC). Deregulated MSC differentiation and maladaptive cell fate programs associated with age and metabolic diseases may exacerbate arteriosclerosis due to excessive transformation to osteoblast-like calcifying cells. Targeting mTOR, a central controller of differentiation and cell fates, could offer novel therapeutic perspectives. In a cell culture model for osteoblastic differentiation of pluripotent human MSC we found distinct roles for mTORC1 and mTORC2 in the regulation of differentiation towards calcifying osteoblasts via cell fate programs in a temporally-controlled sequence. Activation of mTORC1 with induction of cellular senescence and apoptosis were hallmarks of transition to a calcifying phenotype. Inhibition of mTORC1 with Rapamycin elicited reciprocal activation of mTORC2, enhanced autophagy and recruited anti-apoptotic signals, conferring protection from calcification. Pharmacologic and genetic negative interference with mTORC2 function or autophagy both abolished regenerative programs but induced cellular senescence, apoptosis, and calcification. Overexpression of the mTORC2 constituent rictor revealed that enhanced mTORC2 signaling without altered mTORC1 function was sufficient to inhibit calcification. Studies in mice reproduced the *in vitro* effects of mTOR modulation with Rapamycin on cell fates in vascular cells *in vivo*. Amplification of mTORC2 signaling promotes protective cell fates including autophagy to counteract osteoblast differentiation and calcification of MSC, representing a novel mTORC2 function. Regenerative approaches aimed at modulating mTOR network activation patterns hold promise for delaying age-related vascular diseases and treatment of accelerated arteriosclerosis in chronic metabolic conditions.

Vascular regeneration depends on local vascular smooth muscle cell (VSMC) precursor cells, or pericytes<sup>1-3</sup>, that are replenished by mesenchymal stromal cells (MSC)<sup>4</sup>. MSC are progenitor cells featuring multi-lineage differentiation potential including VSMC<sup>5,6</sup> and osteoblast phenotypes in combination with high regenerative capacity for the vasculature<sup>7</sup> and other organs. In bone, MSC can top up the osteoblast pool, thereby increasing bone density

<sup>1</sup>Clinic for Nephrology and Intensive Care Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>2</sup>Institute for Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany. <sup>3</sup>Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>4</sup>Center for Cardiovascular Research (CCR), Charité University Hospital, Berlin, Germany. <sup>5</sup>Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH, Berlin, Germany. <sup>6</sup>Junior Research Group 2: Metabolism of Microbial Pathogens, Robert Koch Institute, Berlin, Germany. <sup>7</sup>Clinic for Stem Cell Transplantation, Department of Cell and Gene Therapy, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>8</sup>Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies (BSRT), Berlin, Germany. <sup>9</sup>Vivantes Ida Wolff Hospital for Geriatric Medicine, Berlin, Germany. \*email: bjoern.hegner@gmx.de

and fracture resistance<sup>8</sup>. Both compartments, bone and vasculature, are in close interaction, reciprocally regulated via cellular, endocrine, and metabolic signals<sup>9</sup>. During aging, they progressively lose their adaptability and regenerative capacity on cellular and systemic levels<sup>10,11</sup>. Consequently, deregulated cellular differentiation processes lead to calcium loss from bones and increased calcium deposition in blood vessels. Clinical correlates are osteoporosis and arteriosclerosis<sup>12,13</sup>. Chronic metabolic disease conditions such as diabetes mellitus or chronic kidney disease with uremia accelerate both detrimental clinical phenotypes<sup>14</sup>. This involves mechanisms usually associated with age, such as premature cellular senescence and other cell fates<sup>15</sup> adversely affecting viability, adaptability, and resistance to stress<sup>10,11,16</sup>.

Arterial calcification has been attributed to active transformation of VSMC to osteoblast-like cells reminiscent of intramembranous and endochondral bone formation<sup>17,18</sup>. However, cells with an MSC phenotype found in the arterial adventitia have been shown to be a major source of osteoblast-like cells in intimal and medial calcification in a mouse model of chronic kidney disease<sup>19</sup>. The uremic milieu triggers osteoblastic differentiation of MSC and calcification<sup>20</sup>, implying loss of vascular progenitor properties. Hence, preservation and restoration of physiologic MSC function for endogenous regeneration can be considered more effective than targeting terminally differentiated cells such as VSMC and osteoblast-like cells to counteract or even reverse accelerated vascular calcification in patients with pro-arteriosclerotic conditions.

The atypical serine/threonine kinase mechanistic target of Rapamycin (mTOR) orchestrates cellular functions in response to metabolic cues and growth factors<sup>21</sup>. It is contained in two structurally and functionally distinct multi-protein complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). Activation of both complexes facilitates cell growth and survival<sup>21,22</sup>. The major function of the mTORC1 down-stream targets p70-S6 kinase, 4E-BP1 and others is promotion of cellular growth and proliferation via increased protein and lipid synthesis<sup>23</sup> and inhibition of autophagy<sup>24</sup> at the cost of premature cellular senescence<sup>25</sup>. Functions of mTORC2 are less well studied and include organization of the actin cytoskeleton<sup>26</sup>, control of ion transport<sup>27</sup>, and anti-apoptotic properties via stimulation of the AKT-FOXO pathway<sup>28</sup>. Direct involvement of specific branches of the mTOR signaling network in regulation of mammalian life-span<sup>29</sup>, cellular senescence<sup>25,30</sup>, and vascular smooth muscle and osteoblast differentiation<sup>5,6,31,32</sup> opens a perspective for therapeutic mTOR targeting in aging-related pathologies of the bone-vascular axis. The macrolide Rapamycin (Rapa) is a complex modulator of mTOR signaling since it effectively blocks most but not all mTORC1 functions<sup>21</sup> without inhibitory effects on mTORC2, aside from a few exceptions<sup>33</sup>. Rapa and its derivatives, the "rapalogs", are increasingly used in clinical applications ranging from local release in vessels from drug-eluting stents to systemic therapy of cancer, immunologic and genetic diseases as well as immunosuppression after organ transplantation. In animal models, Rapa has been shown to counteract degenerative and age-related pathologies in heart and brain<sup>34,35</sup>, making it a prototypic candidate to stimulate endogenous regenerative processes.

We tested the hypothesis that during osteoblastic transformation of MSC, mTORC1 and mTORC2 orchestrate cell-fate programs in a chronologically coordinated manner resulting in osteoblast differentiation and calcification. In addition, we provide evidence from *in vitro* and *in vivo* studies that enhanced mTORC2 function was both indispensable and sufficient to establish a regenerative cell fate pattern conferring protection from calcification to MSC *in vitro*. Selective induction of protective cell fate programs via therapeutic manipulation of mTOR network components holds promise to preserve and restore a regenerative MSC phenotype capable of rejuvenating the bone-vascular axis in age-related pathologies and to protect from accelerated vascular calcification caused by metabolic diseases.

## Materials and Methods

All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. The isolation of MSC was approved by the Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (#2572) and the Ethikkommission Ethikausschuss 4, CBF, Charité (#EA4/114/11). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by local ethic authorities. All subjects provided written informed consent. The experiments were conducted according to institutional guidelines ("Gute Wissenschaftliche Praxis", Charité University Hospital). All animal experiments were approved by local authorities (LaGeSo G0028/11, Berlin, Germany) and were conducted according to institutional animal care guidelines (Charité University Hospital).

**Isolation and culture of MSC.** MSC were isolated from bone marrow aspirates obtained from 20 healthy bone marrow donors (7 female, 13 male), median age 31 years (range 0.5–42) following a previously described protocol<sup>36</sup>. In brief, bone marrow mononuclear cells were purified by Ficoll density gradient centrifugation. Plastic adherent cells were expanded in  $\alpha$ -MEM (#E15-862, PAA) supplemented with penicillin/streptomycin (Gibco), 2 IU/ml heparin (Ratiopharm), and 5% platelet lysate at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were used up to passage 5.

**Characterization of MSC.** All preparations were assessed for surface marker expression, chondroblastic, adipocytic and osteoblastic differentiation capacity as well as expression of VSMC marker proteins. Three cell preparations were exemplarily studied for functional L-type calcium channels as described below.

50,000 cells were labeled with 3  $\mu$ l antibody or corresponding isotype control and analyzed using a Beckton Dickinson FACS Calibur. CD73 (BD, #561254), CD90 (Miltenyi, #130-095-403), CD105 (BD, #561443), CD11b (Miltenyi, #130-081-201), CD14 (BD, #557153), CD19 (Miltenyi, #130-091-328), CD34 (Miltenyi, #130-092-213), CD45 (BD, #555492), HLA-DR (BD, #559866), with the corresponding isotype controls IgG2a (BD, #553456), isotype IgG2a $\kappa$  (BD #555573), and isotype IgG1 (Miltenyi, #130-081-002), were used.

Chondroblastic differentiation was tested in pellet cultures with  $1 \times 10^6$  cells in 4 ml DMEM containing 1 mM sodium pyruvate (Applichem), 20 mM HEPES (Roth) pH 7.3, 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 0.1 mM

2-phospho-L-ascorbic acid, and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (R&D). After 4 weeks, protein extraction and western blot analysis were performed.

To induce adipogenesis, confluent monolayers were treated with DMEM containing 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.01 mg/ml insulin (Berlin-Chemie), 0.2 mM indomethacin (Cayman Chemical Company), and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (Serva) for 4 weeks. After fixation with 4% paraformaldehyde, staining was performed with 6 ml of 0.5% Oil red O (Sigma) in isopropanol added to 4 ml deionized water.

For osteoblastic differentiation, 13,000 MSC/cm<sup>2</sup> were incubated with osteoblast induction medium (OM) consisting of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA) supplemented with 2 mM glutamine (Lonza), penicillin/streptomycin (Gibco), 1% FCS (Lonza), 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Applichem), 500  $\mu$ M ascorbic acid, and 100 nM dexamethasone (both from Sigma) for 3 weeks. After fixation with ice-cold methanol, cells were stained with filtered 5% Alizarin (1,2-dihydroxyanthraquinone, Sigma) pH 4. After several wash steps with PBS pH 6.0, wells were dried.

Photomicrographs were taken on a Zeiss Axiovert 40 CFL using a Canon PowerShot A649.

**L-Type Ca<sup>2+</sup> channel imaging.** In six-well-plates, 75,000 cells per well were seeded onto glass coverslips in complete  $\alpha$ -MEM and allowed to adhere overnight. Medium was switched to phenol red free DMEM without FCS or platelet lysate for 24 h. Cells were loaded with the Ca<sup>2+</sup> indicator fluo-4-AM (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) (10  $\mu$ M) and pluronic acid (Merck, Darmstadt, Germany) (0.01%; w/v) for 30 min at room temperature in PSS (NaCl 134 mM, KCl 6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, glucose 10 mM, pH 7.4 with NaOH). Before taking records, the cells were washed with PSS and further incubated for 20 min to allow de-esterification of the dye.

Pretreatment with 1  $\mu$ M/L nimodipine (Sigma-Aldrich) was carried out for 5 minutes before adding KCl. Fluo-4 loaded cells were imaged using a BioRad MRC 1024 laser scanning confocal microscope attached to a Nikon Diaphot 300 inverted microscope. Excitation was performed at 488 nm and the emission wavelength was 500 nm. Images were collected at a rate of 1/second. Image processing was done using imageJ 1.41i (National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Background fluorescence was subtracted and changes in intracellular calcium were expressed as relative fluorescence changes, i.e. F/Fo (with Fo indicating the fluorescence before stimulation and F the time-dependent fluorescence signal after stimulation). Peak amplitudes of Ca<sup>2+</sup> transients were calculated as (F<sub>peak</sub>-Fo)/Fo. Stock solutions of fluo-4 AM (2.5 mM) and of nimodipine (1 mM) were made using DMSO as solvent. High external potassium solutions were made by iso-osmotic substitution of NaCl with KCl in the PSS.

**Drug treatments.** According to the manufacturer's instructions, the following stock solutions were prepared with DMSO: Rapa (LC Laboratories) 20  $\mu$ M, Bafilomycin A1 (Selleck) 10  $\mu$ M, MK-2206 (Selleck) 100  $\mu$ M. Aliquots were stored at -80 °C. Controls were treated with the equivalent volume of DMSO.

**Immunocytochemistry.** 13,000 MSC/cm<sup>2</sup> were seeded on Thermanox Plastic Coverslips (Nunc) in indicated medium for 3 weeks. After fixation with methanol and blocking with 3% BSA/PBS, primary antibodies (Osteopontin, abcam, ab8448; Collagen I, abcam, ab34710; both 1:500 in blocking solution) were incubated for 2 hours at 37 °C in a humid chamber. After washing with PBS, secondary antibody incubation (HRPO-conjugated IgG, Dianova) followed. Signal was developed with AEC High Sensitivity Substrate Chromogen (Dako) before extensive washing.

**Western blot analysis.** Western blot was performed following standard protocols. Blocking was done with 10% BSA/TBS-T for 2 hours at room temperature. All antibodies were diluted in blocking solution as follows: SM22alpha (abcam, ab10135, 1:10 000), Calponin (Sigma, 1:10 000, C2687), MLCK (Sigma, 1:500, M7905), SMA (Sigma, 1:5000, M7905), Collagen IIA1 (Santa Cruz, sc-52658, 1:400), Osteopontin (abcam, ab8448, 1:1,000), Cbfa1/Runx2 (MBL, D130-3, 1:500), Osterix (abcam, ab22552, 1:500), Collagen III (abcam, ab6310, 1:500), pp70S6K<sup>Thr389</sup> (R&D, AF8963, 1:500), pp70S6K<sup>Thr421;Ser424</sup> (CST, #9204, 1:1,000), pAKT<sup>Ser473</sup> (CST, #4080, 1:1,000), pAKT<sup>Thr308</sup> (CST, #2965, 1:1,000), ERK1/2<sup>Thr202/Tyr204</sup> (CST, #9106, 1:1,000), LC3B (Novus, NB100-2220, 1:1,000), p16<sup>INK4a</sup> (Santa Cruz, sc-468, 1:500), SQSTM1/p62 (#5114, CST, 1:1000), cleaved caspase 3 (CST, #9661, 1:500), Bcl-2 (Santa Cruz, sc-492, 1:500), Rictor (CST, #9476, 1:1,000), mTOR (CST, #2972, 1:1000), Raptor (CST, #2280, 1:1000), AKT (CST, #9272 1:2000), p70-S6 (CST, #9202, 1:1000), ERK1/2 (CST, #9102, 1:1000),  $\alpha$ -Tubulin (Sigma, T9026, 1:6000), GAPDH (hytest, 5G4, 1:100,000). After incubation with secondary antibodies (Dianova), SuperSignal West Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher) was used for visualization in a G:BOX F3 device (Syngene).

**Alkaline phosphatase activity.** Activity of alkaline phosphatase (ALP) was determined at day 7 after induction of osteoblast differentiation. Cells were lysed with 250  $\mu$ l ALP lysis buffer (150 mM Tris pH 10.0 (Roth), 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X100 (all from Applichem)) at room temperature under constant agitation for 30 minutes. Supernatants were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm and 4 °C. Each sample was measured in 4 replicates in a 96-well-plate with 50  $\mu$ l per well mixed with 200  $\mu$ l substrate solution (ALP buffer with freshly dissolved p-Nitrophenyl phosphate (Fluka) at 2.7 mM). Optical density (OD) at 405 nm was measured at baseline and every 5 min during the incubation time of 1 hour at 37 °C.  $\Delta$ OD values to baseline ODs at one chosen time point during the linear phase were divided by the protein concentration of the sample determined with the DC Protein Assay (Bio-Rad).

**Calcium deposition.** Extracellular calcium deposition of differentiating MSC was assessed after 3 weeks of incubation with OM. Calcium was solubilized by shaking cells overnight in 200  $\mu$ l 0.6 M HCl at 4 °C. Samples were centrifuged for 60 min at 20,000  $\times$  g and 4 °C. 10  $\mu$ l of either calcium standards or sample supernatant were

mixed with 150  $\mu$ L 0.1 mg/mL ortho-cresolphthalein complexone, 1 mg/mL 8-hydroxy-quinoline, 0.7 M HCl, and 150  $\mu$ L 15% 2-amino-2-methyl-1-propanol in H<sub>2</sub>O, pH 10.7. OD was measured at 540 nm in duplicates. Blank absorption was subtracted and calcium concentrations were calculated using a standard curve. To analyze the protein content for normalization, 230  $\mu$ L 0.1 M NaOH/0.1% SDS solution was added to the remainder of the sample and mixed for about 10 minutes. After centrifugation at 20,000  $\times$  g for 10 min, 20  $\mu$ L were used for protein quantification with the DC protein assay (Bio-Rad) in duplicates.

**X-Gal staining.** Senescence was visualized via hydrolysis of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside by cellular  $\beta$ -galactosidase. MSC were seeded on glass slides in 12-well plates at 50,000 cells per well and incubated with indicated medium for 3 weeks. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde/0.25% glutaraldehyde in PBS with 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.0. Staining was performed for 12 hours at 37 °C using 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  $\times$  3H<sub>2</sub>O in PBS with 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.0 freshly supplemented with 40 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside/ml and N,N-Dimethylformamide to a final concentration of 1 mM. Coverslips were washed and mounted on glass slides with AquaPolymount (Polyscience Inc) before micrographs were taken.

**Apoptosis ELISA.** Quantification of apoptosis was performed by measuring fragmented DNA with the Cell Death Detection ELISA PLUS Kit (Roche) following the manufacturer's instructions. To normalize for protein content, total protein of lysates was quantified with the DC protein assay (Bio-Rad).

**LDH activity.** LDH analysis was performed with the Cytotoxicity Detection Kit (Roche) following the manufacturer's instructions. To normalize for protein content, 500  $\mu$ L cell culture supernatant were mixed with 250  $\mu$ L 20% trichloric acid, incubated on ice for 30 min, and centrifuged for 30 min at 4 °C with 20,000  $\times$  g. The pellet was washed twice with ice-cold acetone. After drying, the pellet was resolved in protein lysis buffer (100 mM Tris pH 8.0; 0.2% SDS; 1% Triton X-100), and total protein was quantified with the DC protein assay (Bio-Rad).

**Cloning and lentivirus production.** For rictor knockdown, pSuperRetroPuroshRNA-Rictor and pLVTH were digested with EcoRI/Clal and the shRNA-fragment was ligated into the pLVTH-backbone. For flag-rictor over-expression, the pLJM1 vector-backbone was used. After confirmation of plasmid accuracy, lentiviral particles were produced with a second generation packaging system in 293T cells via calcium phosphate-transfection. Virus-production medium containing 10% FCS and 1.2% BSA was collected 24 and 48 hours later. After straining through 0.45  $\mu$ m filters and concentrating via ultracentrifugation (2 hours at 100,000  $\times$  g), virus was supplemented with protamine sulfate (final concentration 10  $\mu$ g/ml) before MSC were transduced at low cell density. Efficiency was confirmed by GFP expression.

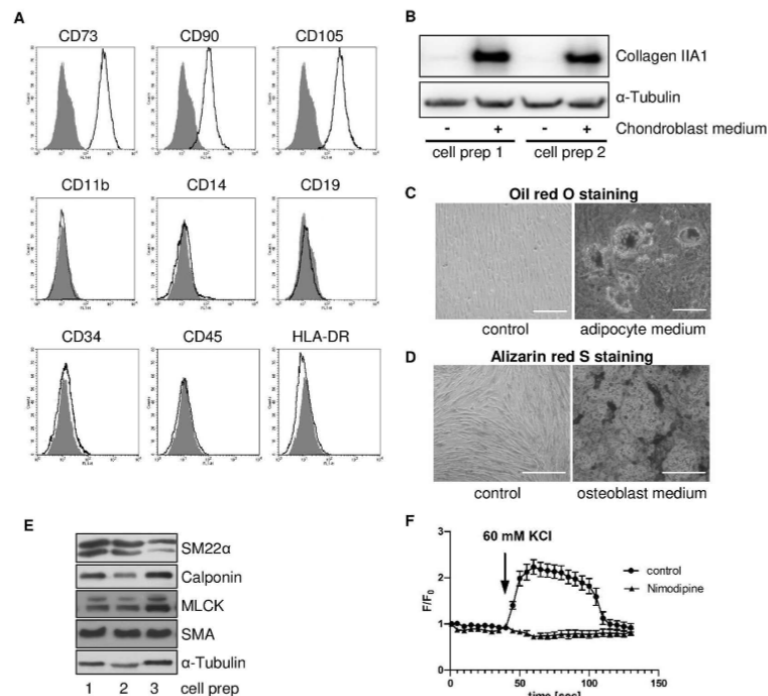
**Animals.** All experiments were approved by local authorities (LaGeSo G0028/11, Berlin, Germany) and were conducted according to institutional animal care guidelines (Charité University Hospital). As previously described<sup>37</sup>, male ten-week-old mice (C57BL/6J) were exposed to Rapa (1.5 mg/kg) or vehicle, both administered intraperitoneally every third day over a period of 37 days. Rapa was dissolved in DMSO and diluted 1:1000 in a mixture of medium chain triglycerides (MCT; Miglyol 812, Caesar & Lorentz). Vehicle consisted of DMSO diluted 1:1000 in MCT. The administered volume was 5 mL/kg resulting in 0.1–0.15 mL per injection depending on the individual body weight of the mice. Aortas were excised, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until analysis. 4 mice per group were studied.

**Immunofluorescence histology.** Cryosections of 6  $\mu$ m were prepared using Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T.<sup>™</sup> Compound (Sakura) and a CM1900 Leica Cryostat. After fixation, slides were blocked for 4 hours with 5% rabbit serum (Invitrogen). Primary antibodies were incubated for 12 hours as follows: pAKT<sup>Ser473</sup> (CST, #4080, 1:200), and pp70-S6<sup>Thr389</sup> (Santa Cruz, sc-11759, 1:100) in 3% rabbit serum-PBS. Bcl-2 (Santa Cruz, sc-492, 1:250), p16<sup>INK4a</sup> (Santa Cruz, sc-468, 1:250), caspase 3 (Santa Cruz, sc-7148, 1:250), and LC3B (Novus, NB100-2220, 1:250) in 3% rabbit serum-TBS-T with 0.1% Triton-X100 (Applichem). Anti-rabbit and anti-goat Alexa Fluor 586 secondary antibodies (Invitrogen, 1:2000) were applied in TBS-T with 1% goat serum for 2 hours at room temperature. Micrographs were taken using an Axiacam HR camera device on an Axio Imager A1 immunofluorescence microscope (Zeiss). For quantification, 100 DAPI stained nuclei were counted and the proportion of antibody positive cells was determined.

**Statistics.** All data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed with 1-way or 2-way ANOVA followed by post-testing with Bonferroni's test for multiple comparisons as appropriate. All analyses were performed with GraphPad Prism version 5.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Significance was considered at a value of  $p < 0.05$ .

## Results

**Cell culture model for osteoblastic differentiation of MSC.** To study mTOR-dependent cell fate programs during osteoblastic differentiation in progenitor cells, a cell culture model using human bone marrow-derived MSC with characteristic cell surface marker profile and multilineage differentiation capacity as defined by the International Society for Cellular Therapy<sup>38</sup> was established (Fig. 1A–D). In addition, MSC displayed features of vascular smooth muscle cells (VSMC) as previously reported<sup>5,6,39</sup>. MSC expressed the smooth muscle marker proteins SM22 $\alpha$ , smooth muscle calponin (sm-Calponin), myosin light chain kinase (MLCK) and smooth muscle- $\alpha$ -actin (SMA) (Fig. 1E). Moreover, they featured functional voltage-dependent dihydropyridine-sensitive (Cav1.2) L-type calcium channels characteristic for VSMC (Fig. 1F).

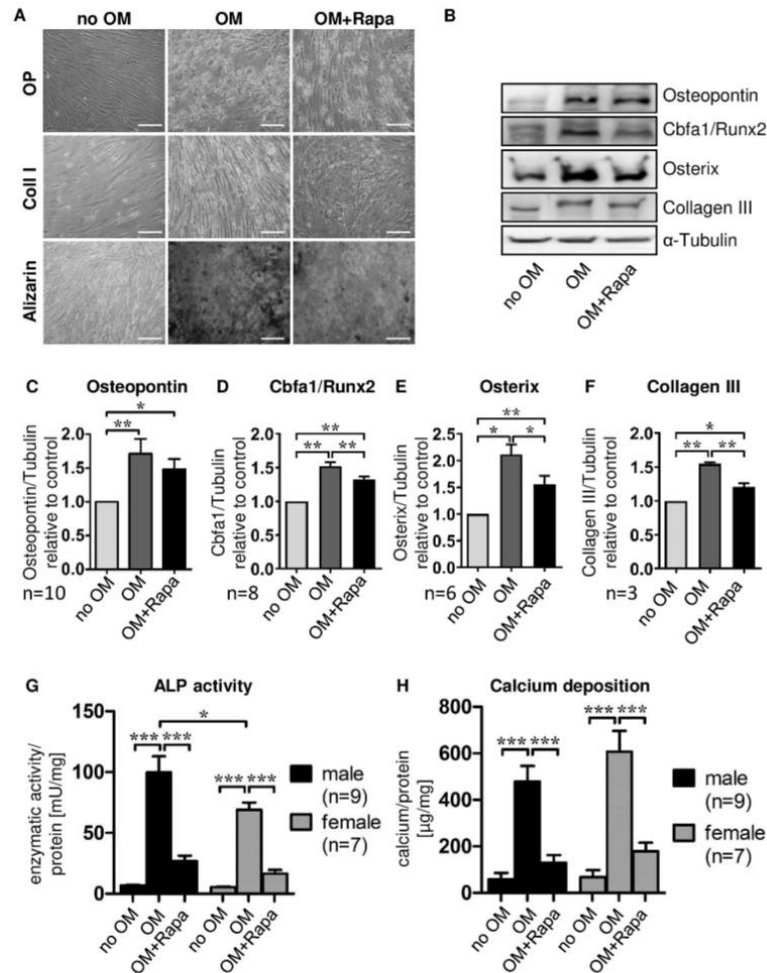


**Figure 1.** Cell culture model for osteoblastic differentiation of pluripotent human bone marrow-derived MSC. **(A)** Representative FACS analysis out of 20 of an MSC defining surface marker panel confirming homogeneity of isolated cells. More than 98% of cells are positive for CD73, CD90 and CD105 and negative for CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR compared to isotype control (grey). **(B)** Chondroblastic differentiation of MSC after incubation for 32 days with chondroblast induction medium demonstrated by western blot analysis for chondrocyte-specific type II collagen. Two representative cell preparations out of 20 are shown.  $\alpha$ -Tubulin served as loading control. **(C)** Adipocytic differentiation of MSC after incubation for 21 days with adipocyte induction medium demonstrated by staining of intracellular lipid droplets with Oil red O. Representative experiment out of 20, phase contrast microscopy, original magnification  $\times 200$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . **(D)** Osteoblastic differentiation of MSC after incubation for 21 days with osteoblast induction medium demonstrated by staining of extracellular hydroxyapatite deposits with Alizarin red S. Representative experiment out of 20, phase contrast microscopy, original magnification  $\times 100$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . **(E)** Baseline expression of vascular smooth muscle marker proteins in MSC: SM22 $\alpha$ , smooth muscle calponin (sm-Calponin), myosin light chain kinase (MLCK), smooth muscle- $\alpha$ -actin (SMA). Western blot analyses of three representative cell preparations out of 20 are shown.  $\alpha$ -Tubulin served as loading control. **(F)** Calcium transients without (control) and after pretreatment with nimodipine (Nimodipine) in MSC at base line showing expression of functional voltage-dependent dihydropyridine-sensitive (Ca<sub>v</sub>1.2) L-type Ca<sup>2+</sup> channels. Representative experiment out of three; 20–30 individual cells were studied for each tracing.

Phenotype conversion was induced by incubation with osteoblast induction medium (OM) containing high phosphate concentrations for 21 days. MSC derived osteoblast-like cells expressed the osteoblast marker proteins osteopontin, collagen I, Cbfa1, osterix, and collagen III (Fig. 2A–F) and displayed high levels of alkaline phosphatase (ALP) activity (Fig. 2G). On a functional level, differentiated cells extensively produced calcified extracellular matrix (Fig. 2A,H). MSC from male donors developed slightly higher ALP activity than MSC from female donors after osteoblastic differentiation (Fig. 2G) while calcium deposition did not differ significantly (Fig. 2H).

**The mTOR network controls osteoblastic differentiation of MSC.** The involvement of mTOR signaling in osteoblastic phenotype conversion was tested with the mTOR inhibitor Rapa. Cells co-incubated with Rapa throughout the whole differentiation period of 21 days expressed lower levels of osteoblast marker proteins (Fig. 2A–F), and displayed strongly reduced ALP activity after 7 days (Fig. 2G) and calcium deposition after 21





**Figure 2.** Modulation of MSC osteoblastic differentiation by Rapa. MSC were cultured under control conditions (no OM) or with osteoblast induction medium in presence of vehicle (OM) or 20 nM Rapa (OM+Rapa). (A) Immunocytochemistry for osteoblast marker proteins and Alizarin red S staining of calcium deposits after 21 days. Osteopontin (OP), collagen I (Coll I). Representative experiment out of 20, phase contrast microscopy, original magnification  $\times 200$ , scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . (B–F) Western blot analysis of osteoblast marker proteins. MSC were cultured for 21 days under control conditions (no OM) or with osteoblast induction medium in the presence of vehicle (OM) or 20 nM Rapa (OM+Rapa). Representative western blots (B) and densitometric quantifications (C–F) are shown. Numbers of independent experiments are indicated at the bottom of each graph. Band intensities were normalized to  $\alpha$ -tubulin as a loading control. Control (no OM) was set to 1. Bars represent mean + SEM, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (G) Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured after 7 days of incubation and normalized to total protein concentrations of lysates. Cells from 9 male and 7 female individuals were analyzed. (H) Calcium deposition was quantified after incubation for 21 days and normalized to total protein concentrations. Cells from 9 male and 7 female individuals were analyzed.

days (Fig. 2H), indicating a central role for mTOR in osteoblastic differentiation of MSC. There was no interaction between sex and the response to treatment (Fig. 2G,H).

As part of a detailed analysis of the mTOR network, activation of the two distinct signaling branches, mTORC1 and mTORC2, was analyzed in osteoblasts derived from MSC in comparison to undifferentiated MSC. MSC-osteoblasts differentiated for 21 days displayed about 50% higher phosphorylation levels of p70-S6 kinase at threonine 389 (p70-S6K; Fig. 3A), a direct downstream target of mTORC1 (Fig. 3I,J). Phosphorylation of AKT at serine 473, downstream of mTORC2 (Fig. 3I,J), was increased 3-fold (Fig. 3B). Interestingly, Rapa intervention potently reduced mTORC1-dependent p70-S6K phosphorylation in MSC-osteoblasts (Fig. 3A), while mTORC2 activity was tremendously upregulated (Fig. 3B). Expression levels of raptor and rictor, the two key proteins forming mTORC1 (raptor) and mTORC2 (rictor) in association with mTOR were not changed upon treatment with OM alone or with OM and Rapa (Fig. 3C,D). Levels of mTOR increased slightly when MSC were treated with OM and Rapa (Fig. 3E). Investigation of upstream modulators and feedback loops of mTOR complexes revealed activation of phosphatidylinositol-3 phosphate kinase (PI3K) signaling in MSC-derived osteoblasts as evidenced by phosphorylation of AKT at threonine 308 (Fig. 3F). Rapa treatment further enhanced PI3K activity (Fig. 3F). Extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and the ERK-dependent phosphorylation site of p70-S6K (pp70-S6K<sup>Thr421/Ser424</sup>) did not show altered phosphorylation after 3 weeks of OM stimulation without or with Rapa (Fig. 3G,H). These findings indicate that the osteoblastic phenotype of MSC is associated with signaling via PI3K and its downstream targets mTORC1 and mTORC2 (Fig. 3I). Rapa-mediated prevention of osteoblastic transformation and calcification is related to inhibition of mTORC1 with simultaneous mTORC2 activation (Fig. 3J). The stimulation of mTORC2 by Rapa can be explained by release of direct inhibitory signals from mTORC1 on mTORC2 and on PI3K (Fig. 3I,J)<sup>40</sup>.

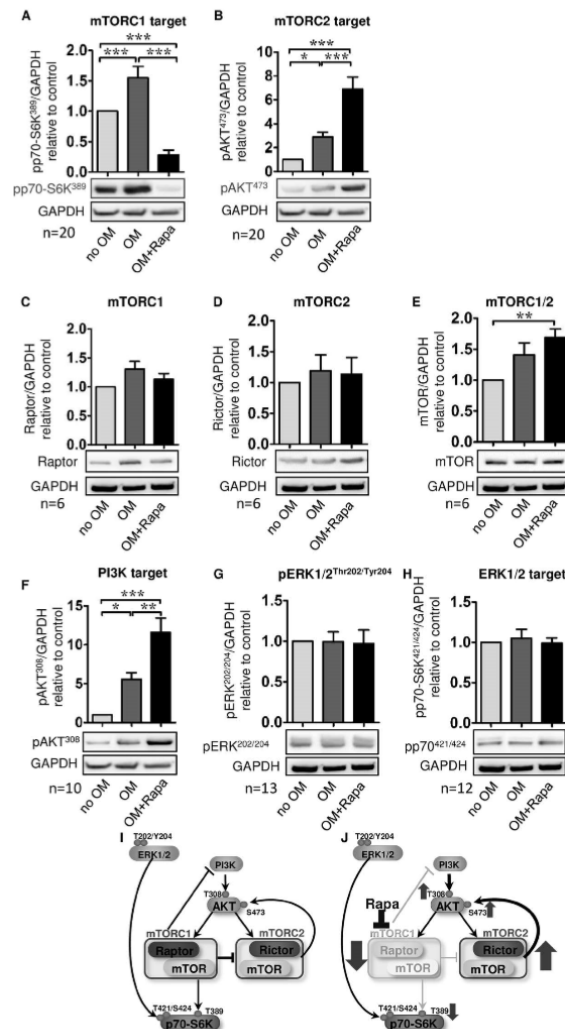
**Degenerative cell fates are activated during osteoblastic differentiation of MSC in a temporally coordinated manner.** To establish a mechanistic link between signal and phenotype, cell fate programs related to mTORC1 (autophagy, cellular senescence) and mTORC2 (apoptosis) were studied. The autophagosome constituent LC3B II was more abundant in MSC differentiated into osteoblasts by exposure to OM over 3 weeks (Fig. 4A). In addition, p62, a substrate of autophagosomal degradation, accumulated simultaneously (Fig. 4B). This suggests reduced autophagic flux with less degradation of autophagosomal proteins due to inhibition of autophagy. Osteoblasts also featured high expression levels of p16<sup>INK4a</sup> (Fig. 4C) and  $\beta$ -galactosidase (Fig. 4D), both indicators of cellular senescence. Increased levels of cleaved caspase 3, fragmented DNA, and LDH released into the supernatant (Fig. 4E–G) in parallel with unaffected levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Fig. 4H) indicated apoptotic cell death. MSC that were treated with Rapa during exposure to OM differed markedly in their cell fate responses: Autophagic flux appeared to be enhanced, as amounts of LC3B II and p62 decreased as compared to OM treatment (Fig. 4A,B). Rapa conferred resistance to induction of cellular senescence as indicated by reduced p16<sup>INK4a</sup> and  $\beta$ -galactosidase (Fig. 4C,D), and apoptosis was prevented as shown by reduced cleaved caspase 3, less fragmented DNA, lower LDH activity in supernatants, and increased Bcl-2 (Fig. 4E–H).

Temporal relations of signaling events, cell fates, and phenotypic changes were deciphered by following MSC undergoing osteoblastic differentiation over a time course of 3 weeks. The earliest events were activation of mTORC1 and mTORC2 detectable on day 3 continuing until the end of the study (Fig. 5A). LC3B II and p62 increased from day 3 onward as an indication of reduced autophagic flux (Fig. 5A). Induction of cellular senescence detected by p16<sup>INK4a</sup> was first evident on day 9 (Fig. 5A). At the same time, LDH activity in the supernatant started to rise as a sign of cell death (Fig. 5D). Phenotypically, ALP activity, an early marker of osteoblastic cell specificity, rose from day 3 to day 15 and declined thereafter (Fig. 5E). Calcium deposition was first noted on day 6 and further accumulated from day 9 until the end of the study (Fig. 5F). This sequence suggests that signaling via mTORC1 and mTORC2 initiates osteoblastic differentiation indicated by ALP expression. Reduced autophagy precedes cellular senescence and cell death with calcification being the ultimate consequence of these events. ALP activity declines as cells progressively calcify or die.

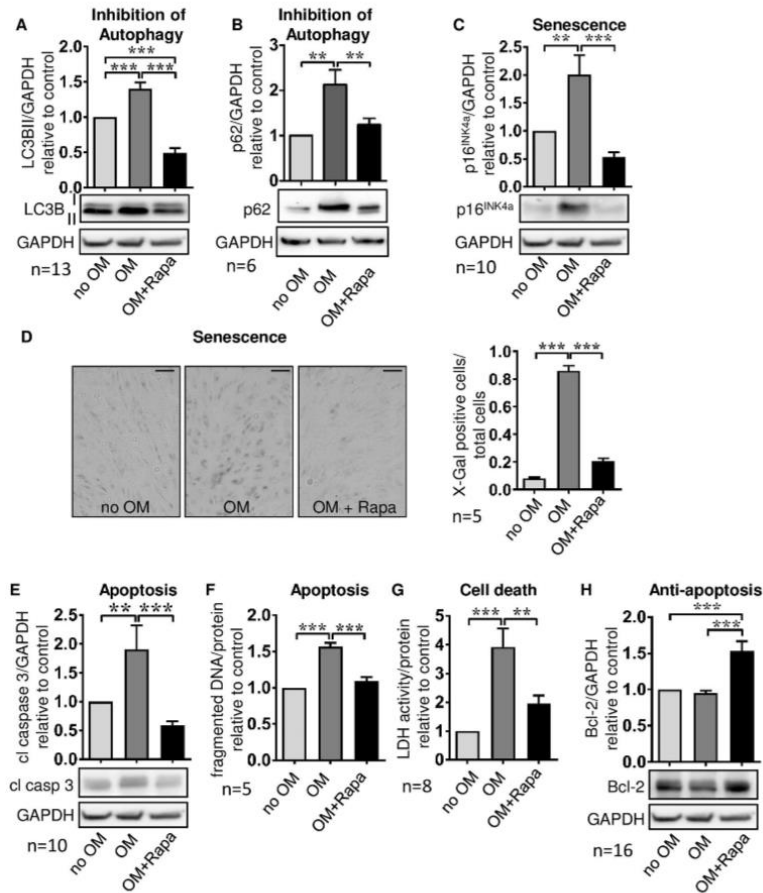
When Rapa was added, activity of mTORC1 was suppressed far below baseline levels (Fig. 5B) while activation of mTORC2 was prominently increased (Fig. 5B). Accumulation of LC3B II and p62 as well as expression of p16<sup>INK4a</sup> were almost completely prevented (Fig. 5B). LDH activity showed a delayed (between days 12 and 15) and weak increase (Fig. 5D). ALP activity levels were lower overall (Fig. 5E) while calcium deposition started later (day 12) and was less pronounced (Fig. 5F). This indicates that intervention with Rapa modifies mTOR signaling and potently prevents induction of degenerative cell fates and calcification.

**Blockade of autophagy exacerbates calcification of differentiated MSC.** A pharmacologic inhibitor of autophagosomal acidification and degradation, bafilomycin A1, was continuously applied at a low dose (1 nM) to MSC undergoing osteoblastic differentiation in the presence of Rapa to exclude that lower levels of LC3B II in Rapa-treated MSC were due to reduced formation of autophagosomes instead of enhanced autophagic flux. With bafilomycin A1, LC3B II accumulated over time starting as early as day 3 (Fig. 5C), confirming persistent formation of autophagosomes. Levels of p62 increased in parallel as an indication of reduced autophagosomal activity (Fig. 5C). Inhibition of autophagy with bafilomycin A1 profoundly influenced cell fates while mTOR signaling was unaffected (Fig. 5C). Cellular senescence (p16<sup>INK4a</sup>) was greatly induced, even at the earliest time points (Fig. 5C). LDH activity indicating cell death increased with a steeper slope from day 3 until the end of the study (Fig. 5D). With regard to osteoblastic differentiation, ALP enzymatic activity was elevated throughout the whole time course (Fig. 5E). More calcium was deposited from day 3 to day 9 and a remarkably sharp increase started on day 12 resulting in excessive calcium deposition on day 21 (Fig. 5F).

**Inhibition of AKT signaling or genetic depletion of mTORC2 abrogate the protective effect of Rapa on MSC calcification.** We hypothesized that, in addition to activation of autophagy, prevention of

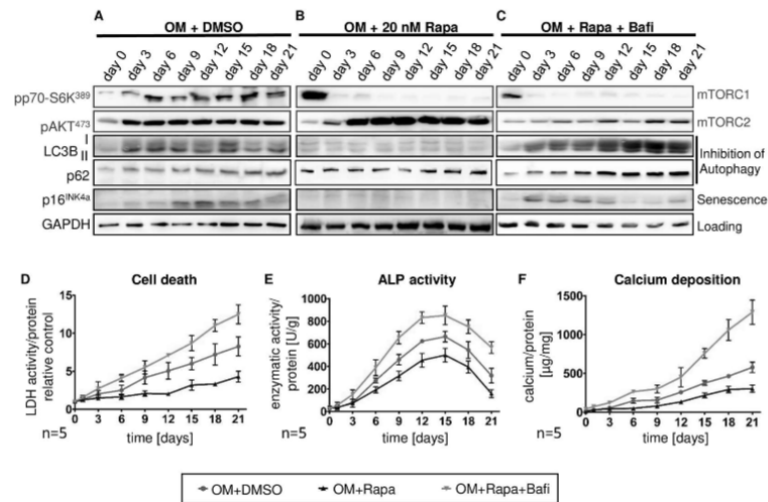


**Figure 3.** Western blot analysis of the mTOR network during osteoblastic differentiation of MSC. Cells were cultured for 21 days under control conditions (no OM) or with osteoblast induction medium in presence of vehicle (OM) or 20 nM Rapa (OM+Rapa). (A) Phosphorylation of p70-S6 kinase at threonine 389 (pp70-S6K<sup>389</sup>) for activation of mTORC1. (B) Phosphorylation of AKT at serine 473 (pAKT<sup>473</sup>) for activation of mTORC2. (C) Raptor as the key subunit of mTORC1. (D) Rictor as the key subunit of mTORC2. (E) mTOR as the serine/threonine kinase component of mTORC1 and mTORC2. (F) Phosphorylation of AKT at threonine 308 (pAKT<sup>308</sup>) as an upstream modulator and part of a feedback loop involving phosphatidylinositol-3 phosphate kinase (PI3K). (G) Phosphorylation of ERK1/2 at threonine 202/tyrosine 204 (pERK<sup>202/204</sup>), and (H) its downstream target p70-S6 kinase at threonine 421/serine 424 (pp70-S6K<sup>421/424</sup>) as a side branch of p70-S6K activation. Densitometric quantifications and representative western blots are shown. Numbers of independent experiments are indicated at the bottom of each graph. Band intensities were normalized to GAPDH as a loading control. Control (no OM) was set to 1. Bars represent mean ± SEM, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. (I) Scheme of the mTOR network without, and (J) with modulation by Rapa.



**Figure 4.** Degenerative cell fates are activated during osteoblast differentiation of MSC. Cells were cultured for 21 days under control conditions (no OM) or with osteoblast induction medium in presence of vehicle (OM) or 20 nM Rapa (OM+Rapa). (A) Western blot analysis of LC3B II and (B) of p62 for autophagic flux with higher levels indicating less degradation due to reduced autophagic flux. (C) Western blot analysis of p16<sup>INK4a</sup> indicating cellular senescence. (D) X-Gal staining for assessment of  $\beta$ -galactosidase a marker of cellular senescence. Representative experiment out of five, phase contrast microscopy, original magnification  $\times 400$ , scale bar = 100  $\mu$ m. (E) Western blot analysis of cleaved caspase 3 to test for apoptosis. (F) ELISA measuring fragmented DNA normalized to total protein concentrations to quantify apoptosis. (G) Lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants normalized to total protein concentrations for quantification of cell death. (H) Western blot analysis of the anti-apoptotic protein Bcl-2. Numbers of independent experiments are indicated at the bottom of each graph. For all western blot analyses representative blots are shown. For densitometric quantification, band intensities were normalized to GAPDH as a loading control. Control (no OM) was set to 1. Bars represent mean  $\pm$  SEM, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

apoptosis is a major mechanism by which Rapa exerts its anti-calcifying effects, since apoptotic bodies have been shown to function as a nidus for incipient calcification processes in VSMC<sup>41</sup>. We employed the pharmacologic AKT inhibitor MK-2206 to block Rapa-enhanced anti-apoptotic signaling via mTORC2/AKT in MSC undergoing osteoblast differentiation. Addition of MK-2206 neutralized amplification of mTORC2-dependent AKT<sup>Ser473</sup> phosphorylation when mTOR signaling was modulated by Rapa (Fig. 6A). As in the previous experiments, Rapa stimulated autophagic flux as indicated by reduced LC3B II and p62 (Fig. 6A), prevented the induction of cellular

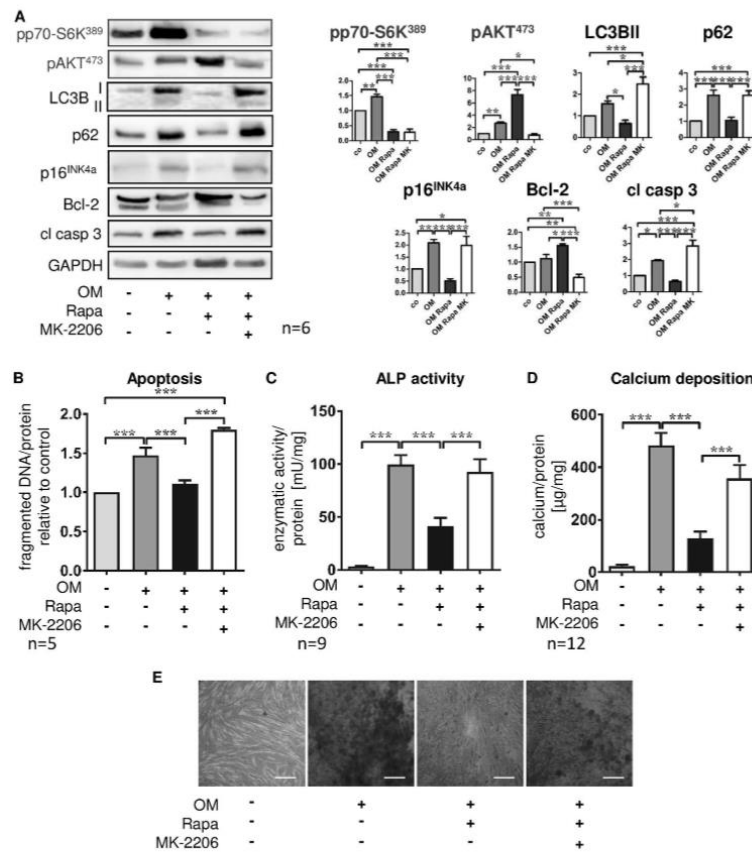


**Figure 5.** Temporal relations of mTORC1 and mTORC2 signaling, cell fates, and phenotypic changes during osteoblast differentiation. MSC were cultured for 21 days with osteoblast induction medium and vehicle (OM+DMSO), OM and 20 nM Rapa (OM+20 nM Rapa), or OM with 20 nM Rapa and 1 nM bafilomycin A1 (OM+Rapa+Bafi). (A–C) Representative western blot analyses out of three independent experiments assessing activation of downstream targets of the two mTOR complexes (mTORC1: pp70-S6K<sup>Ser389</sup>; mTORC2: pAKT<sup>Ser473</sup>) and cell fates (Inhibition of autophagy: LC3B II and p62 with higher levels indicating less degradation due to reduced autophagic flux; cellular senescence: p16<sup>INK4a</sup>) at indicated time points. GAPDH serves as loading control. (D) Lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants normalized to total protein concentrations was determined to quantify cell death. Day 0 was set to 1. (E) Alkaline phosphatase (ALP) activity was normalized to total protein concentrations of MSC lysates. (F) Calcium deposition was quantified with the ortho-cresolphthalein method and normalized to total protein concentrations. All graphs show mean ± SEM, n = 5.

senescence (p16<sup>INK4a</sup>, Fig. 6A), enhanced anti-apoptotic mechanisms (Bcl-2, Fig. 6A), and decreased apoptosis as shown by reduced cleaved caspase 3 (Fig. 6A) and fragmented DNA (Fig. 6B). This prevented MSC from osteoblastic transformation and calcium deposition (Fig. 6C–E). When MK-2206 was added in parallel, the protective effects of Rapa were abolished (Fig. 6A–E).

To test the hypothesis that mTORC2 was the decisive upstream regulator of AKT-dependent anti-calcifying cell fate programs induced by Rapa, we performed lentivirus-mediated shRNA knock-down of the mTORC2-constituting protein rictor. Lentiviral transfection of MSC with targeted or scrambled shRNA was successful as shown by expression of GFP that was also part of the constructs in infected cells (data not shown). Rictor protein expression was reduced by 75% after shRNA transfer (Fig. 7A). While mTORC1 signaling was not influenced by rictor knock-down (pp70S6K<sup>Thr389</sup>, Fig. 7A), Rapa could no longer induce mTORC2 activation when rictor was depleted (pAKT<sup>Ser473</sup>, Fig. 7A). As a result, Rapa-induced reduction of cellular senescence and apoptotic cell death was not detectable when mTORC2 signaling was restricted (Fig. 7A,B). Furthermore, autophagic flux could not be stimulated by Rapa when mTORC2 was deactivated (Fig. 7A). In Rapa-treated MSC undergoing osteoblastic differentiation, knock-down of rictor completely antagonized the reduction of ALP activity (Fig. 7C) and calcium deposition (Fig. 7D,E) observed in MSC with intact rictor expression.

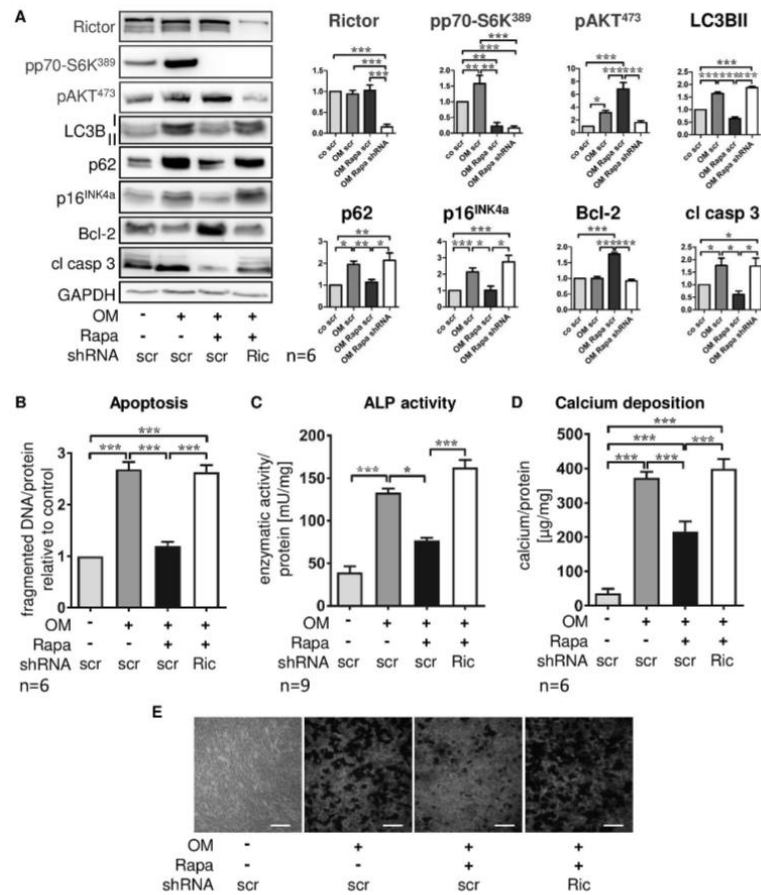
**Enhanced mTORC2 signaling is sufficient to protect MSC from calcification.** To assess whether or not activation of mTORC2 without inhibition of mTORC1 is sufficient to protect MSC from osteoblastic transformation and calcification, we employed lentiviral flag-rictor overexpression during osteoblast differentiation. Rictor protein expression was increased 3.5 times after lentiviral transduction (Fig. 8A). Successful infection of MSC was also confirmed by detection of flag (Fig. 8A) and GFP (data not shown) that were also part of the plasmid. Similar to Rapa, overexpression of rictor resulted in mTORC2 activation as demonstrated by increased phosphorylation of AKT<sup>Ser473</sup> (Fig. 8A). However, in contrast to Rapa-treated cells, mTORC1 signaling was not suppressed by rictor overexpression since levels of pp70S6K<sup>Ser389</sup> were unchanged (Fig. 8A). In comparison to Rapa, rictor overexpression had similar effects on cell fates and phenotype: autophagic flux was stimulated (Fig. 8A), cellular senescence was prevented (Fig. 8A), anti-apoptotic signaling was increased (Fig. 8A) and cell death was reduced (Fig. 8B). Differentiation to calcifying osteoblast-like cells was inhibited as shown by reduced



**Figure 6.** Pharmacologic inhibition of AKT signaling abrogates the protective Rapa effect on MSC calcification. Cells were cultured for 21 days under control conditions, with osteoblast induction medium (OM) and vehicle, OM and 20 nM Rapa, or OM with 20 nM Rapa and the total AKT inhibitor MK-2206 (100 nM) as indicated. (A) Western blot analyses assessing activation of downstream targets of the two mTOR complexes (mTORC1: pp70-S6K<sup>389</sup>; mTORC2: pAKT<sup>473</sup>), inhibition of autophagy (LC3B II, p62), cellular senescence (p16<sup>INK4a</sup>), and apoptosis-related proteins (Bcl-2: negative regulator of apoptosis; cleaved caspase 3 (cl casp 3): executioner caspase). Representative western blots from six independent experiments are shown. For densitometric quantification, band intensities were normalized to GAPDH as a loading control. Control (no OM) was set to 1. (B) ELISA for fragmented DNA normalized to total protein concentrations to quantify apoptosis. Control was set to 1. (C) Alkaline phosphatase (ALP) activity normalized to total protein concentrations was measured after 7 days of incubation. (D) Calcium deposition was quantified with the ortho-cresolphthalein method and normalized to total protein concentrations. Bars represent mean + SEM, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Numbers of independent experiments are indicated at the bottom of each graph. (E) Alizarin red S staining of calcium deposits. Representative experiment out of six, phase contrast microscopy, original magnification x200, scale bar = 100 μm.

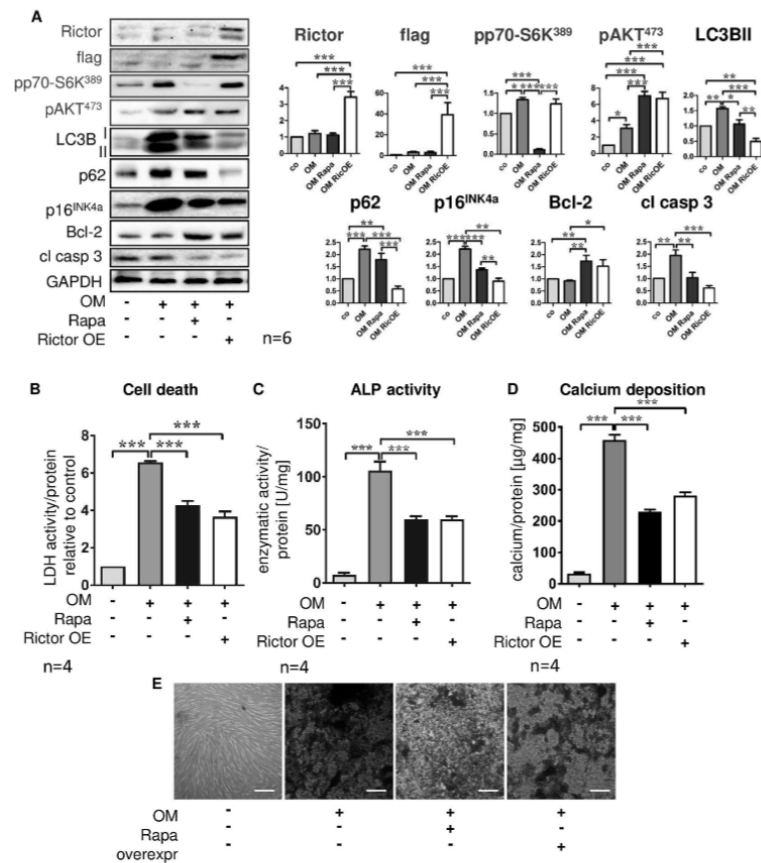
ALP activity (Fig. 8C) and less calcium deposition (Fig. 8D,E). These results suggest that protection from calcific transformation of MSC does not critically rely on mTORC1 inhibition but can be achieved with enhanced mTORC2 signaling alone.

**Rapa modulates mTOR signaling and activates protective cell fate patterns in vascular cells *in vivo*.** As a proof-of-concept, we injected mice with vehicle or low doses of Rapa (1.5 mg/kg) for 37 days



**Figure 7.** Knock-down of the mTORC2 constituent rictor abrogates the protective Rapa effect on MSC calcification. Unspecific control-shRNA (scramble, scr) or shRNA targeting rictor (Ric) were introduced into MSC by lentiviral transfer. Cells were cultured for 21 days under control conditions, with osteoblast induction medium (OM) and vehicle, or OM and 20 nM Rapa as indicated. (A) Western blot analyses of rictor confirming effective knock-down by shRNA, downstream targets of the two mTOR complexes (mTORC1: pp70-S6K<sup>Ser389</sup>, mTORC2: pAKT<sup>Ser473</sup>), inhibition of autophagy (LC3B II, p62), cellular senescence (p16<sup>INK4a</sup>), and apoptosis-related proteins (Bcl-2: negative regulator of apoptosis; cleaved caspase 3 (cl casp 3): executioner caspase). Representative western blots from six independent experiments are shown. For densitometric quantification, band intensities were normalized to GAPDH as a loading control. Control (no OM) was set to 1. (B) ELISA for fragmented DNA normalized to total protein concentrations to quantify apoptosis. Control was set to 1. (C) Alkaline phosphatase (ALP) activity normalized to total protein concentrations was measured after 7 days of incubation. (D) Calcium deposition was quantified with the ortho-cresolphthalein method and normalized to total protein concentrations. Bars represent mean + SEM, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Numbers of independent experiments are indicated at the bottom of each graph. (E) Alizarin red S staining of calcium deposits. Representative experiment out of six, phase contrast microscopy, original magnification x200, scale bar = 100 µm.

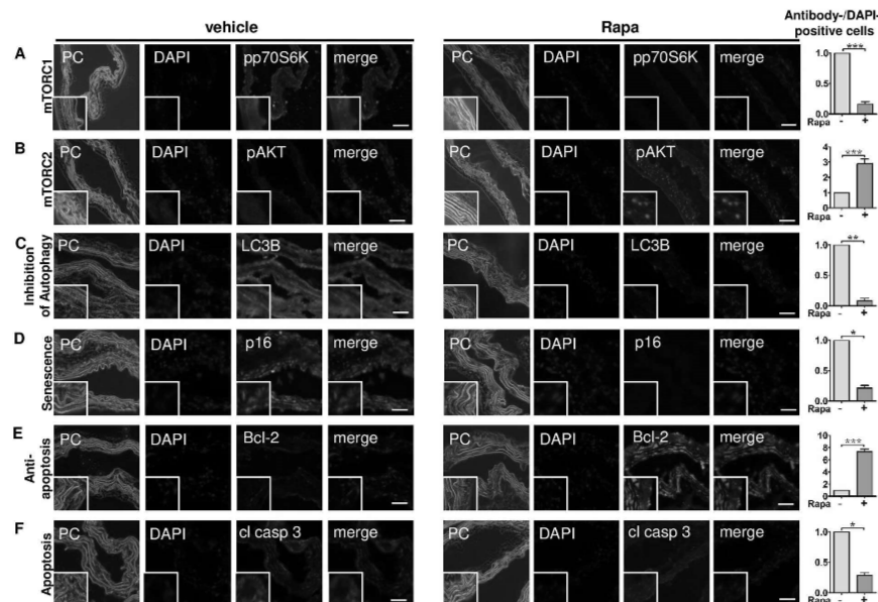
and examined local activation levels of mTORC1 and mTORC2 in cells of the aortic wall. By immunofluorescence, we found reduced levels of pp70S6K (Fig. 9A) and increased phosphorylation of AKT at Ser473 (Fig. 9B) in Rapa-treated animals compared to vehicle-treated controls. pAKT<sup>Ser473</sup> was detected predominantly in the



**Figure 8.** Enhanced mTORC2 signaling is sufficient to protect MSC from calcification. Flag-tagged rictor or green fluorescent protein (GFP) as a control were introduced into MSC by lentiviral transfer. Cells were cultured for 21 days under control conditions, with osteoblast induction medium (OM) and vehicle, or OM and 20 nM Rapa as indicated. (A) Western blot analyses of rictor and flag confirming overexpression of rictor due to gene transfer, downstream targets of the two mTOR complexes (mTORC1: pp70-S6K<sup>389</sup>; mTORC2: pAKT<sup>ser473</sup>), inhibition of autophagy (LC3B II, p62), cellular senescence (p16<sup>INK4a</sup>), and apoptosis-related proteins (Bcl-2; negative regulator of apoptosis; cleaved caspase 3 (cl casp 3): executioner caspase). Representative western blots from six independent experiments are shown. For densitometric quantification, band intensities were normalized to GAPDH as a loading control. Control (no OM) was set to 1. (B) Lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants normalized to total protein concentrations was determined to quantify cell death. Control was set to 1. (C) Alkaline phosphatase (ALP) activity normalized to total protein concentrations was measured after 7 days of incubation. (D) Calcium deposition was quantified with the ortho-cresolphthalein method and normalized to total protein concentrations. Bars represent mean + SEM, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Numbers of independent experiments are indicated at the bottom of each graph. (E) Alizarin red S staining of calcium deposits. Representative experiment out of six, phase contrast microscopy, original magnification x200, scale bar = 100 µm.

nucleus where it most potently counteracts apoptosis. LC3B II was suppressed showing increased autophagic flux (Fig. 9C). Expression of p16<sup>INK4a</sup> was hardly detectable with Rapa indicating prevention of cellular senescence (Fig. 9D). Rapa strongly upregulated anti-apoptotic Bcl-2 (Fig. 9E) and blocked formation of cleaved caspase 3





**Figure 9.** Rapa modulates mTOR signaling and activates protective cell fate patterns in vascular cells *in vivo*. Ten-week-old mice were exposed to Rapa (1.5 mg/kg) or vehicle for 37 days. 4 mice per group were studied. Sections from aortas were stained by immunofluorescence for (A) the mTORC1 downstream target pp70-S6KThr389, (B) the mTORC2 downstream target pAKTSer473, (C) LC3B with lower levels indicating increased degradation due to enhanced autophagic flux, (D) p16INK4a as a marker for cellular senescence, (E) Bcl-2, a negative regulator of apoptosis, (F) caspase 3, involved in apoptosis as an executioner caspase. Nuclei were counterstained with DAPI. Each panel shows a phase contrast micrograph (PC), DAPI staining alone (DAPI, blue fluorescence), the specific antibody staining alone (red fluorescence), and the merged image of a representative animal. Original magnification  $\times 400$ , inserts  $5\times$  zoom, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . The graphs show the proportion of antibody-positive cells out of 100 counted cells identified by DAPI stained nuclei. The vehicle group was set to 1. Bars represent mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

(Fig. 9F) as a sign of suppressed apoptosis. Thus, Rapa induced the same mTOR signaling pattern and protective cell fate profile in murine vascular cells *in vivo* as observed in the cell culture model of calcifying human MSC.

### Discussion

We identified the major integrator of nutrient status and growth factor signaling, mTOR, as a decisive factor governing differentiation of human MSC to cells with osteoblast-like functionality. The central role of both mTOR complexes, mTORC1 and mTORC2, in the regulation of cell fate programs accounted for their fundamental influence on MSC osteoblastic differentiation. Activation of mTORC1 and mTORC2 was observed during osteoblastic differentiation and progressive calcification of MSC. This phenotype conversion was linked to blockade of autophagy, induction of cellular senescence, and initiation of apoptotic cell death. Pharmacologic intervention with Rapa potentially prevented osteoblast differentiation and calcification by inhibition of mTORC1 and reciprocal activation of mTORC2 associated with alternative cell fate programs: early stimulation of autophagy was evident before phenotypic changes occurred followed by reduced cellular senescence and apoptosis. Mechanistically, preservation of an undifferentiated state critically depended on enhanced mTORC2 signaling via AKT and maintenance of autophagic flux as revealed by pharmacologic and genetic studies. *In vivo* experiments in mice confirmed that protective mTOR signaling and cell fate patterns antagonizing osteoblastic differentiation and calcification *in vitro* can be induced in artery walls by systemic administration of Rapa. We provide a rationale for therapeutic mTOR modulation to prevent exhaustion of the regenerating MSC pool and to protect from vascular calcification due to age and metabolic diseases. Furthermore, mTOR can be targeted to enhance osteoblastic differentiation of MSC in cell therapeutic approaches for degenerative bone diseases and osseous defects.

**Degeneration and regeneration depend on cell fate patterns controlled by mTOR.** Loss of regenerative capacity to maintain the functional reserve of vital organs is a physiologic, age-related phenomenon

leading to impaired stress resistance<sup>16</sup>. Individual internal and external risk factors such as genetic background, chronic metabolic conditions, and environmental circumstances as well as acute insults can accelerate this process<sup>16,42,43</sup> and increase risk for diseases and premature death. Modulation of mTOR signaling has been shown to increase lifespan both on the single cell and organism level in yeast<sup>44</sup>, helminths<sup>45</sup>, flies<sup>46</sup> and mammals<sup>29,47</sup>. As a potential mechanism, interference with cell fates controlled by mTOR in response to stress and metabolic cues has been discussed<sup>48</sup>. Autophagy, regulated chiefly by mTORC1, is accorded a central role in the preservation of juvenile cell adaptability<sup>48,49</sup> since it exercises a double function as a survival mechanism in cellular stress conditions: during starvation, when mTORC1 is physiologically inhibited, autophagy regenerates basal metabolic precursors by “self-cannibalism” of cellular structures<sup>50</sup>. On the other hand, cellular debris such as misfolded proteins and dysfunctional organelles that can induce senescence and apoptosis is cleared by autophagy<sup>50</sup>. In our cell culture model of osteoblastic differentiation of MSC, reduced autophagy was the first detectable cell fate change in response to calcifying conditions. Modulation of mTOR signaling with Rapa potently maintained autophagic flux as indicated by lower levels of LC3B II and p62 due to lysosomal degradation and effectively ameliorated calcification. Conversely, blockade of autophagy with continuous, low-dose administration of bafilomycin A1 resulting in accumulation of autophagosomal LC3B II and p62, demonstrating reduced autophagic flux precipitated osteoblastic differentiation and calcium deposition. This argues that autophagy can be ascribed a central position in the transition from undifferentiated MSC to osteoblast-like calcifying cells.

Cellular senescence and apoptotic cell death followed reduced autophagy later in the time course of MSC differentiation to osteoblasts, suggesting that these cell fate changes might be secondary. However, Rapa indirectly activated mTORC2 whose downstream target AKT provides anti-apoptotic effects via inhibition of FOXO<sup>28</sup>. The importance of apoptosis for vascular calcification is supported by studies in VSMC demonstrating that apoptotic bodies from dying VSMC form a nidus to nucleate apatite<sup>41</sup>. Furthermore, apoptotic cells are specifically found in calcifying areas of arteries from patients with arteriosclerosis<sup>51</sup>. Thus, resistance to apoptosis by activation of survival mechanisms via mTORC2/AKT appears to be another important mechanism contributing to protection from calcific transformation of MSC besides enhanced autophagy.

It was reported that Rapa treatment preserved undifferentiated stem cell function and osteogenic differentiation potential during prolonged culture and expansion of MSC *in vitro* while senescence and DNA damage were reduced<sup>52</sup>. Interestingly both maintenance of fully functional MSC in their stem cell niche and resistance to calcifying stimuli rely on cellular functions that are associated with youth and longevity, progressively decrease during aging, and can be enhanced by mTOR modulation with Rapa. We propose that age-related arterial calcification and accelerated arteriosclerosis in chronic metabolic diseases share inappropriate function of vascular progenitors due to a preponderance of adverse cell fates over regenerative ones. Enabling protective cell fate patterns in the MSC-pericyte-VSMC-continuum could be a novel approach for prevention and treatment of vascular diseases.

**Harnessing the mTOR network for endogenous and exogenous regenerative approaches.** The most striking finding of our study is that Rapa-mediated blockade of osteoblastic differentiation and calcification was not solely due to inhibition of mTORC1 but crucially depended on enhanced mTORC2 signaling. Rapa is an inhibitor of mTORC1 without direct effects on mTORC2. However, depending on cell type, tissue, and duration of exposure, Rapa can either indirectly activate or inhibit signaling via mTORC2<sup>33,40</sup>. During osteoblastic differentiation of MSC, Rapa was a potent activator of mTORC2 throughout the whole time course of three weeks. Genetic ablation of mTORC2 by targeting its obligatory constituent rictor with shRNA completely abolished the differentiation blockade induced by Rapa and pharmacologic inhibition of the mTORC2 downstream target AKT had the same effect. Conversely, isolated activation of mTORC2 by rictor overexpression without mTORC1 inhibition was sufficient to confer protection from calcification. Thus, mTORC2-dependent cell functions are essential and appear to be even more important for Rapa-mediated antagonism of differentiation than the counteraction of processes classically controlled by mTORC1 such as ribosomal biogenesis and protein synthesis. Our results suggest an as-yet-unknown role for mTORC2 in the preservation of pluripotency in stem and progenitor cells.

Activated mTORC1 signaling, as found in MSC in transition to calcifying osteoblasts, is the signature status of the mTOR network in conditions with prominent cardiovascular pathologies such as chronic nutrient overload, obesity, and diabetes mellitus type 2<sup>31</sup>. Inhibition of mTORC1 with reciprocal activation of mTORC2 has been reported to confer protection in cardiovascular diseases. When mTORC2 signaling was induced as a consequence of mTORC1 inhibition by either Rapa<sup>37</sup> or overexpression of PRAS40<sup>53,54</sup>, hearts were protected from maladaptive hypertrophy and pathologic remodeling as well as from cardiomyocyte apoptosis. Rapa attenuated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice<sup>55</sup> and vascular calcification in rats with chronic renal failure<sup>56</sup>. In a recent study, Rapa reduced aortic calcium load and prolonged survival in a mouse model for uremic vascular media calcification<sup>57</sup>. Notably, Rapa mediated protection was associated with induction of autophagy in aortic walls<sup>57</sup>. Our findings provide a mechanistic explanation for these observations, since we demonstrated that systemic administration of Rapa shifts mTOR signaling in favor of mTORC2 while suppressing mTORC1 in vascular cells *in vivo*. Similar to Rapa-treated MSC undergoing osteoblastic differentiation *in vitro*, autophagy was stimulated while senescence and apoptosis were reduced in vascular cells of Rapa-treated mice, implicating protection against arterial calcification through enhanced mTORC2 signaling.

Nevertheless, therapeutic interventions in patients aimed at reducing mTORC1 activity and increasing mTORC2 activity are hampered by several considerations. Rapa and similar mTORC1 inhibitors already approved for clinical use can also block instead of activate mTORC2 in some cells and settings with detrimental effects. As an example, transplanted patients receiving Rapa as an immunosuppressant can develop focal segmental glomerulosclerosis due to podocyte injury associated with reduced mTORC2 function<sup>58</sup>. In addition, the reciprocal activation of mTORC2 upon mTORC1 blockade by Rapa might be different in women and men since

mouse hearts challenged by mineralocorticoid excess showed a sexual dimorphism in this regard<sup>37</sup> and the positive effect of Rapa on lifespan in mice was greater in females than in males<sup>47</sup>. However, we included MSC from women and men in our study and did not observe any significant interaction between sex and the response to Rapa. Finally, activation of mTORC2 may have adverse effects such as facilitation of tumor growth due to reduced susceptibility to physiologic apoptotic stimuli. Alternatively, exogenous regenerative strategies might be advantageous because they offer the opportunity for selective intervention in a specific cell type *ex vivo*.

Autologous and allogenic MSC hold great potential for cell therapeutic treatment of hard-to-heal osseous lesions either due to developmental defects in pediatric patients or to osteoporotic fractures in the elderly. In accordance to our study, a biphasic approach could yield optimal results: During culture and expansion of MSC previous to implantation, activation of mTORC2 might preserve stemness and their functionality as progenitors, whereas activation of mTORC1 and simultaneous inhibition of mTORC2 in the differentiation phase might enhance osteoblastic output and improve calcification. During the expansion phase, selective activation of mTORC2 with novel pharmacologic or genetic methods seems advantageous over mTOR modulation with conventional mTORC1 inhibitors such as Rapa since mTORC1 blockade has profound anti-proliferative effects.

**Limitations.** The use of bone marrow-derived cells to study vascular calcification could be questioned. Our aim was to specifically address progenitor cells to enhance endogenous regeneration as a more promising approach as compared to targeting terminally differentiated cells. Pericytes, the local progenitors to vascular smooth muscle cells, are very hard to isolate in sufficient numbers. Thus, we chose to study bone marrow-derived MSC that circulate and replenish pericytes in the vasculature<sup>2,59,60</sup>. This relationship and the reported similarities of pericytes and MSC<sup>59</sup> give confidence that the same mechanisms are operative in both, pericytes located in the vessel wall and bone marrow derived MSC as their systemically circulating counterparts. Furthermore, MSC can easily be isolated from bone marrow aspirates, allowing for standardized experiments with MSC from multiple donors to account for inter-individual variation.

Although protein levels of the key subunits of mTORC1 and mTORC2, raptor and rictor, were not affected in osteoblast differentiation or by Rapa treatment, formation of one or both complexes might have changed. For example, recruitment of rictor to mTOR might be enhanced by Rapa resulting in increased formation of mTORC2 and phosphorylation of AKT at serine 473 despite unchanged protein levels. However, prolonged treatment with Rapa has been reported to inhibit formation of mTORC2 under certain conditions<sup>53</sup>. Investigations of protein-protein-interactions were beyond the scope of the present study.

Bafilomycin A1 blocks autophagy by inhibition of the V-ATPase preventing acidification of lysosomes and by blockade of autophagosome-lysosome fusion. Furthermore, bafilomycin A1 can act as a potassium ionophore<sup>61</sup>. Although various cell types may have different sensitivities to ionophoric activities and bafilomycin A1 has a rather low affinity for potassium ions<sup>62</sup> we cannot verify that the effects of bafilomycin A1 in our study were solely related to inhibition of autophagy and not to its ionophoric action.

We did not validate our findings in an *in vivo* model for vascular calcification. However, Rapa induced exactly the same signaling patterns and effects on cell fates in vascular cells *in vivo* as we observed in our *in vitro* model. These findings confirm the concept of induction of regenerative cell fate patterns in vascular cells by activation of mTORC2. This novel therapeutic intervention could be beneficial in several vascular pathologies beyond vascular calcification and should therefore be tested in various *in vivo* models of vascular damage in the future.

## Conclusion

The bone-vascular axis is controlled by endocrine and metabolic signals impinging on the mTOR network and is progressively dysfunctional with aging and in chronic diseases, leading to loss of bone mass while vascular calcification progresses. MSC, capable of osteoblastic differentiation and calcification, have a dual role as progenitors to osteoblasts and as pericytes to VSMC. We found that degenerative cell fates associated with both, aging and metabolic diseases such as cellular senescence and apoptosis were activated during osteoblast differentiation of MSC while autophagy as a protective mechanism was reduced. Concomitant treatment with Rapa "rejuvenated" MSC by inducing autophagy and reducing cellular senescence and apoptosis via inhibition of mTORC1 and simultaneous activation of mTORC2 resulting in potent reduction of osteoblastic differentiation and calcification. We propose that therapeutic interventions aimed at the preservation of the regenerative capacity of vascular progenitor cells is most promising for the prevention of chronically progressing conditions such as arteriosclerosis as well as for the treatment of already established vascular lesions by enabling endogenous regeneration. Our study identified mTORC2, a thus far scarcely studied part of the mTOR network, as a powerful molecular target for maintenance of an undifferentiated state in MSC. Targeted interventions, particularly in the elderly and in patients with chronic metabolic diseases, may help restore a functional bone-vascular axis to reduce ectopic osteoblastic differentiation of MSC leading to prevention of osteoporotic fractures and improved vascular health.

Received: 12 July 2019; Accepted: 4 December 2019;

Published online: 27 December 2019

## References

- Hirschi, K. K. & D'Amore, P. A. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* **32**, 687–698, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915187> (1996).
- Edelman, D. A., Jiang, Y., Tyburski, J., Wilson, R. F. & Steffes, C. Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. *J Surg Res* **135**, 305–311, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930620> (2006).
- Bautch, V. L. Stem cells and the vasculature. *Nat Med* **17**, 1437–1443, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22064433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22064433) (2011).
- de Souza, L. E., Malta, T. M., Kashima Haddad, S. & Covas, D. T. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related? *Stem Cells Dev.*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27702398> (2016).

5. Hegner, B., Weber, M., Dragun, D. & Schulze-Lohoff, E. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Hypertens* **23**, 1191–1202, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894895> (2005).
6. Hegner, B. *et al.* mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 232–238, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074484> (2009).
7. Gu, W., Hong, X., Potter, C., Qu, A. & Xu, Q. Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation* **24**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27681821> (2017).
8. Wang, X. *et al.* Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *International orthopaedics* **37**, 2491–2498, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948983> (2013).
9. Thompson, B. & Towler, D. A. Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 529–543, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473330> (2012).
10. Kovacic, J. C., Moreno, P., Hachinski, V., Nabel, E. G. & Fuster, V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 1 of a 2-part review. *Circulation* **123**, 1650–1660, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502583> (2011).
11. Kovacic, J. C., Moreno, P., Nabel, E. G., Hachinski, V. & Fuster, V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation* **123**, 1900–1910, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537006> (2011).
12. Pennisi, P. *et al.* Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **15**, 389–395, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661073> (2004).
13. Hamerman, D. Osteoporosis and atherosclerosis: biological linkages and the emergence of dual-purpose therapies. *QJM* **98**, 467–484, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955801> (2005).
14. Demer, L. L. & Tintut, Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 715–723, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665125> (2014).
15. White, W. E., Yaqoob, M. M. & Harwood, S. M. Aging and uremia: Is there cellular and molecular crossover? *World journal of nephrology* **4**, 19–30, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25664244> (2015).
16. Khan, S. S., Singer, B. D. & Vaughan, D. E. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell* **16**, 624–633, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28544158> (2017).
17. London, G. M., Marchais, S. J., Guerin, A. P. & Metivier, F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**, 525–531, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16205470> (2005).
18. Neven, E., De Schutter, T. M., De Broe, M. E. & D'Haese, P. C. Cell biological and physicochemical aspects of arterial calcification. *Kidney Int* **79**, 1166–1177, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list\\_uids=21412217](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=21412217) (2011).
19. Kramann, R. *et al.* Adventitial MSC-like Cells Are Progenitors of Vascular Smooth Muscle Cells and Drive Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Cell Stem Cell* **19**, 628–642, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27618218> (2016).
20. Hegner, B. *et al.* Targeting proinflammatory cytokines ameliorates calcifying phenotype conversion of vascular progenitors under uremic conditions *in vitro*. *Scientific reports* **8**, 12087, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30108259> (2018).
21. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500797> (2012).
22. Dibble, C. C., Asara, J. M. & Manning, B. D. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol* **29**, 5657–5670, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720745> (2009).
23. Kim, D. H. *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163–175, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150925> (2002).
24. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Eat or be eaten: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* **12**, 814–822, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list\\_uids=20811353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=20811353) (2010).
25. Tan, P. *et al.* The PI3K/Akt/mTOR pathway regulates the replicative senescence of human VSMCs. *Molecular and cellular biochemistry* **422**, 1–10, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27619662> (2016).
26. Jacinto, E. *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6**, 1122–1128, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15467718> (2004).
27. Lu, M. *et al.* mTOR complex-2 activates ENaC by phosphorylating SGK1. *J Am Soc Nephrol* **21**, 811–818, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338997> (2010).
28. Feehan, R. P. & Shantz, L. M. Negative regulation of the FOXO3a transcription factor by mTORC2 induces a pro-survival response following exposure to ultraviolet-B irradiation. *Cell Signal* **28**, 798–809, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27058291> (2016).
29. Selman, C. *et al.* Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* **326**, 140–144, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list\\_uids=19797661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=19797661) (2009).
30. Kolesnichenko, M., Hong, L., Liao, R., Vogt, P. K. & Sun, P. Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic RAS-induced senescence. *Cell Cycle* **11**, 2391–2401, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627671> (2012).
31. Zhan, J. K. *et al.* The mammalian target of rapamycin signalling pathway is involved in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Can J Cardiol* **30**, 568–575, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518659> (2014).
32. Shen, G. *et al.* Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in osteoporosis. *J Cell Physiol* **233**, 3929–3944, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28834576> (2018).
33. Sarbassov, D. D. *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* **22**, 159–168, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list\\_uids=16603397](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=16603397) (2006).
34. Inuzuka, Y. *et al.* Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice. *Circulation* **120**, 1695–1703, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822807> (2009).
35. Spilman, P. *et al.* Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one* **5**, e9979, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376313> (2010).
36. Lange, C. *et al.* Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol* **213**, 18–26, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17458897> (2007).
37. Gurgun, D. *et al.* Sex-specific mTOR signaling determines sexual dimorphism in myocardial adaptation in normotensive DOCA-salt model. *Hypertension* **61**, 730–736, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list\\_uids=23339165](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=23339165) (2013).
38. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> (2006).
39. Hegner, B. *et al.* Intrinsic Deregulation of Vascular Smooth Muscle and Myofibroblast Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Systemic Sclerosis. *PLoS one* **11**, e0153101, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27054717> (2016).
40. Xie, J. & Proud, C. G. Signaling crosstalk between the mTOR complexes. *Translation (Austin)* **2**, e28174, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779402> (2014).
41. Proudfoot, D. *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification *in vitro*: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* **87**, 1055–1062, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list\\_uids=11090552](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=11090552) (2000).
42. Yun, M. H. Changes in Regenerative Capacity through Lifespan. *Int J Mol Sci* **16**, 25392–25432, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26512653> (2015).

43. Mayfield, A. E. *et al.* The impact of patient co-morbidities on the regenerative capacity of cardiac explant-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther* **7**, 60, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225482> (2016).
44. Medvedik, O., Lamming, D. W., Kim, K. D. & Sinclair, D. A. MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirutin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* **5**, e261, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914901> (2007).
45. Vellai, T. *et al.* Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426**, 620, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668850> (2003).
46. Kapahi, P. *et al.* Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* **14**, 885–890, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186743> (2004).
47. Swindell, W. R. Meta-Analysis of 29 Experiments Evaluating the Effects of Rapamycin on Life Span in the Laboratory Mouse. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27519886> (2016).
48. Walters, H. E. & Cox, L. S. mTORC Inhibitors as Broad-Spectrum Therapeutics for Age-Related Diseases. *Int J Mol Sci* **19**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30096787> (2018).
49. Wilhelm, T. & RIchly, H. Autophagy during ageing - from Dr Jekyll to Mr Hyde. *The FEBS journal* **285**, 2367–2376, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29630766> (2018).
50. Almanza, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30027602> (2018).
51. Shroff, R. C. *et al.* Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* **118**, 1748–1757, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18838561](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18838561) (2008).
52. Gharibi, B., Farzadi, S., Ghuman, M. & Hughes, F. J. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659476> (2014).
53. Volkmer, M. *et al.* Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. *Circulation* **128**, 2132–2144, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008870> (2013).
54. Volkmer, M. *et al.* Pathological hypertrophy amelioration by PRAS40-mediated inhibition of mTORC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 12661–12666, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842089> (2013).
55. Gadioli, A. L. *et al.* Oral rapamycin attenuates atherosclerosis without affecting the arterial responsiveness of resistance vessels in apolipoprotein E-deficient mice. *Braz J Med Biol Res* **42**, 1191–1195, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893993> (2009).
56. Zhao, Y. *et al.* Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation. *Kidney Int* **88**, 711–721, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061549> (2015).
57. Frauscher, B. *et al.* Autophagy Protects From Uremic Vascular Media Calcification. *Front Immunol* **9**, 1866, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30154792> (2018).
58. Vollenbroeker, B. *et al.* mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F418–426, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19019920](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19019920) (2009).
59. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786417> (2008).
60. Lindskog, H. *et al.* New insights to vascular smooth muscle cell and pericyte differentiation of mouse embryonic stem cells *in vitro*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1457–1464, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627807> (2006).
61. Teplova, V. V., Tonshin, A. A., Grigoriev, P. A., Saris, N. E. & Salkinoja-Salonen, M. S. Bafilomycin A1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 321–329, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917797> (2007).
62. Saris, N. E. *et al.* Microbial toxins effect on mitochondrial survival by increasing K<sup>+</sup> uptake. *Toxicol Ind Health* **25**, 441–446, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736254> (2009).

#### Acknowledgements

The authors thank Stephen Horan for proofreading, Zhu Ye for expert technical support and Hans Will for 293T cells. DNA-Plasmids for Rictor knock-down were kindly provided by Markus Gödel and Tobias Huber. Plasmids for Rictor over-expression were a generous contribution from Roberto Zoncu. European Union Seventh Framework Program: HEALTH-F2-2009-241544. Deutsche Forschungsgemeinschaft: FOR1054, DR498/1–2.

#### Author contributions

Theres Schaub: Conception and design, Collection and assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript. Dennis Bernd Gürgen: Provision of study material, Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript. Deborah Maus: Preparation and Collection of data, final approval of manuscript. Claudia Lange: Provision of study material, Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript. Victor Tarabykin: Financial support, Administrative support, Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript. Duska Dragun: Conception and design, Financial support, Administrative support, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript. Björn Hegner: Conception and design, Administrative support, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript.

#### Competing interests


The authors declare no competing interests.

#### Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.H.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## 2.4 Niedrig dosiertes Rapamycin beeinträchtigt nicht die vaskuläre Integrität und tubuläre Regeneration nach Nierentransplantation in Ratten

Rapamycin wird seit vielen Jahren als Immunsuppressivum nach Nierentransplantationen eingesetzt. Trotz vieler Vorteile bestehen Vorbehalte gegenüber mTOR-Inhibitoren vor allem wegen antiproliferativer Eigenschaften. Vor dem Hintergrund des großen Potenzials der mTOR-Modulation in Hinblick auf kardiovaskuläre Protektion, das wir in den vorgenannten Studien gesehen hatten, interessierten uns die Effekte auf die renale Regeneration in der besonderen Situation des Konservierungs-/ Reperfusionsschadens, zumal mTOR bei der zellulären Antwort auf Hypoxie eine zentrale Rolle zukommt.

Der folgende Text entspricht in deutscher Übersetzung aus dem Englischen dem Abstrakt der Arbeit:

Hoff U, Markmann D, Nieminen-Kelhä M, Budde K, **Hegner B.**

Low-dose rapamycin does not impair vascular integrity and tubular regeneration after kidney transplantation in rats.

Scientific Reports, 2021, 11:16270.

DOI: [10.1038/s41598-021-95790-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-95790-1)

“mTOR-Inhibitoren bieten nach Nierentransplantation Vorteile einschließlich antiviraler und Antitumoraktivität neben der Möglichkeit einer niedrigen Calcineurininhibitor-exposition zur Reduktion von Nephrotoxizität. Bedenken hinsichtlich negativer Effekte auf Grund von antiproliferativen und antiangiogenetischen Eigenschaften haben ihren klinischen Einsatz begrenzt, insbesondere frühzeitig nach Transplantation. Eine Beeinträchtigung des vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, der wichtig für die physiologische Funktion renaler Endothelzellen und des Tubulusepithels ist, wurde mit schädlichen renalen Effekten von mTOR-Inhibitoren in Verbindung gebracht. Niedrige Dosen von Rapamycin (Ladungsdosis 3 mg/kg Körpergewicht, Tagesdosen 1,5 mg/kg Körpergewicht) wurden in einem allogenen Nierentransplantationsmodell in Ratten verabreicht, was zu einer durchschnittlichen Talkonzentration von 4,30 ng/mL führte. Glomeruläre und peritubuläre Kapillaren, die Proliferation von Tubuluszellen oder die

funktionelle Erholung vom Konservierungs-/Reperfusionsschaden waren im Vergleich zu Vehikel behandelten Tieren nicht beeinträchtigt. VEGF-A, VEGF-Rezeptor 2 und der Korezeptor Neuropilin-1 wurden durch Rapamycin innerhalb von sieben Tagen hochreguliert. Proximale Tubuluszellen von Ratten (RPTC) reagierten in vitro auf Hypoxie mit einer verstärkten Expression von VEGF-A und VEGF-R1, die durch Rapamycin in therapeutischen Konzentrationen nicht supprimiert wurde. Rapamycin führte zu keiner Beeinträchtigung der Proliferation von RPTC unter hypoxischen Bedingungen. Niedrig dosiertes Rapamycin frühzeitig nach der Transplantation hat keine negativen Auswirkungen auf das VEGF-Netzwerk, welches wichtig für die Erholung vom Konservierungs-/Reperfusionsschaden ist. Eine Verstärkung des VEGF-Signalings um die Transplantation herum hat das Potenzial, die Ergebnisse weiter zu verbessern.“

Übersetzung durch den Autor.





OPEN

# Low-dose rapamycin does not impair vascular integrity and tubular regeneration after kidney transplantation in rats

Uwe Hoff<sup>1</sup>, Denise Markmann<sup>2</sup>, Melina Nieminen-Kelhä<sup>3</sup>, Klemens Budde<sup>1</sup> & Björn Hegner<sup>1,4</sup>✉

mTOR inhibitors offer advantages after kidney transplantation including antiviral and antitumor activity besides facilitating low calcineurin inhibitor exposure to reduce nephrotoxicity. Concerns about adverse effects due to antiproliferative and antiangiogenic properties have limited their clinical use particularly early after transplantation. Interference with vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, important for physiologic functioning of renal endothelial cells and tubular epithelium, has been implicated in detrimental renal effects of mTOR inhibitors. Low doses of Rapamycin (loading dose 3 mg/kg bodyweight, daily doses 1.5 mg/kg bodyweight) were administered in an allogeneic rat kidney transplantation model resulting in a mean trough concentration of 4.30 ng/mL. Glomerular and peritubular capillaries, tubular cell proliferation, or functional recovery from preservation/perfusion injury were not compromised in comparison to vehicle treated animals. VEGF-A, VEGF receptor 2, and the co-receptor Neuropilin-1 were upregulated by Rapamycin within 7 days. Rat proximal tubular cells (RPTC) responded in vitro to hypoxia with increased VEGF-A and VEGF-R1 expression that was not suppressed by Rapamycin at therapeutic concentrations. Rapamycin did not impair proliferation of RPTC under hypoxic conditions. Low-dose Rapamycin early posttransplant does not negatively influence the VEGF network crucial for recovery from preservation/perfusion injury. Enhancement of VEGF signaling peritransplant holds potential to further improve outcomes.

Although rapamycin (Rapa), the first-in-class inhibitor of the mechanistic target of rapamycin (mTOR), had been approved for immunosuppression after kidney transplantation more than 20 years ago the debate on the most appropriate use of mTOR inhibitors (mTORi) is still ongoing<sup>1,2</sup>. During the last decades it became clear that beyond immunosuppression mTORi exert not only specific anti-viral activity resulting in reduced incidents of cytomegalovirus<sup>3-5</sup> and BK virus<sup>6</sup> infections but also provide some defense against malignant tumors<sup>5</sup>. Moreover, it had been speculated that mTORi could protect from cardiovascular events and chronic allograft dysfunction through intrinsic mechanisms and by enabling avoidance or at least reduction of nephrotoxic calcineurin inhibitors (CNI) with the final goal of improved long-term graft and patient survival.

Despite these important advantages, mTORi are frequently withheld or withdrawn since they are perceived as being associated with an unfavorable safety profile limiting their use in many transplant recipients. In particular, delayed wound healing, formation of lymphoceles, increased proteinuria, higher rejection rates, cytopenias, an adverse metabolic profile and increased mortality have been of concern<sup>6,7</sup>. Studies yielded heterogeneous results depending on timing of mTORi administration (de novo transplants, early conversion, late conversion) and choice of concomitant immunosuppression (mycophenolate, CNI at standard or reduced doses, steroids). Of note, recent trials and meta-analyses clearly demonstrate non-inferiority of mTORi based regimes that acknowledge drug-drug interactions and combine mTORi and CNI at reduced doses<sup>8-10</sup> indicating a learning curve that may not have reached its climax yet.

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Critical Care Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>2</sup>Nieren- und Dialysezentrum Schöneberg-Tempelhof, Berlin, Germany. <sup>3</sup>Department of Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>4</sup>Vitanas Hospital for Geriatric Medicine, Berlin, Germany. ✉email: bjoern.hegner@gmx.de

mTOR, by integrating nutrient availability and growth factor signaling, functions as a ubiquitous central regulator of proliferation, protein synthesis and other important cell functions such as autophagy<sup>11</sup>. Many of the advantageous but also of the adverse non-immune effects of mTORi have been attributed to their inherent antiproliferative properties and their complex context dependent impact on cellular growth, differentiation, and metabolism<sup>11</sup>. One example is the antitumor effect of mTORi that has been ascribed not only to general inhibition of proliferation but also to a specific antiangiogenic activity due to reduced production of and response to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A resulting in limited blood supply to the tumor<sup>12,13</sup>.

Importantly, expression of VEGF-A and its receptors is also found with distinctive patterns at multiple sites in healthy kidneys such as endothelial cells of glomeruli and peritubular capillaries, podocytes, mesangial cells and tubular epithelial cells<sup>14</sup>. The VEGF network is involved in maintaining physiologic functioning of glomeruli and peritubular capillaries<sup>14,15</sup> and has been found to be dysregulated in a large variety of kidney diseases including diabetic nephropathy, glomerulonephritis, thrombotic microangiopathies and chronic allograft nephropathy (CAN) after kidney transplantation<sup>14,15</sup>. Remarkably, also tubular epithelial cells feature a functional VEGF network<sup>14,16</sup> connecting them to vascular maintenance under stable conditions and initiation of angiogenesis when oxygen supply does not meet the demand<sup>15</sup>. Moreover, VEGF-A has been implicated in proliferation and protection of tubular cells from apoptosis rendering it a survival factor for tubular epithelium<sup>16</sup> that might act in an autocrine or paracrine manner.

To further improve mTORi containing immunosuppressive regimes for de novo kidney transplants, we aimed to study the impact of mTOR inhibition with Rapa on vascular integrity and tubular regeneration in correlation to the VEGF network during the immediate posttransplant period in a life-supporting rat kidney transplantation model. We found intact vascular structures, adequate tubular cell proliferation, and rapid functional recovery from preservation/reperfusion injury until day 2 in the face of Rapa treatment. VEGF-A, VEGF receptor 2 (VEGF-R2) and the VEGF co-receptor Neuropilin-1 were upregulated by Rapa within 7 days. In addition, rat proximal tubular cells (RPTC) responded to hypoxia in vitro with increased VEGF-A and VEGF-R1 expression that was not suppressed by Rapa at therapeutic concentrations. These findings support the introduction of mTORi immediately after transplantation and provide insight into the early dynamics of the VEGF network opening a perspective for targeted interventions to further improve outcomes.

## Results

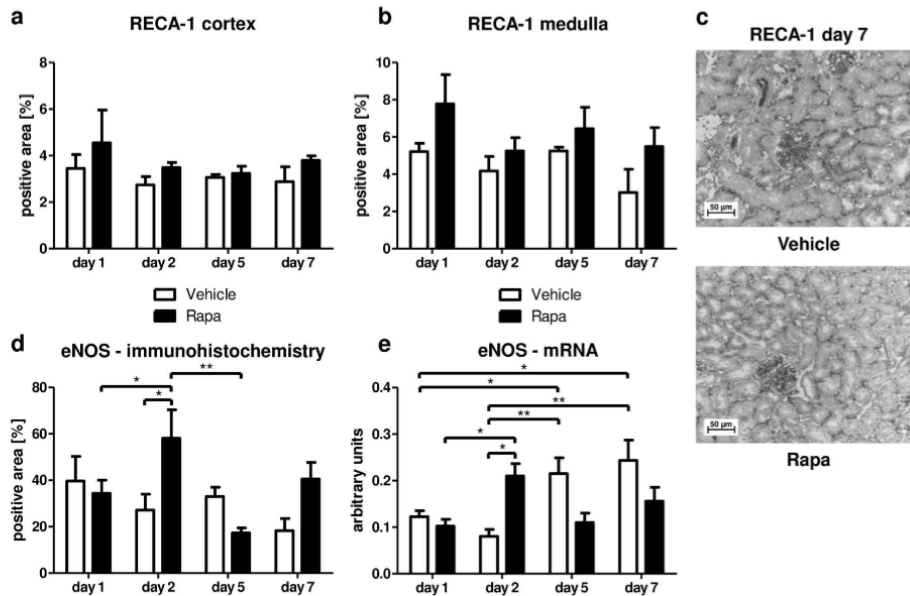
We took advantage of our rat kidney transplantation model with a low-responder strain combination (Fischer to Lewis)<sup>20</sup> to study the effect of mTOR inhibition with Rapa on vascular integrity as well as tubular and functional recovery during the immediate posttransplantation phase.

**Rapa does not interfere with vascular integrity during recovery from posttransplantation preservation injury.** As shown by immunostaining of endothelial cells, mTOR inhibition did not compromise the integrity of glomerular or peritubular capillaries neither in cortex (Fig. 1a, c) nor in outer medulla (Fig. 1b) that is particularly susceptible to hypoxic injury. Furthermore, expression of eNOS was even increased on day 2 in Rapa treated animals compared to vehicle on protein (Fig. 1d) and mRNA levels (Fig. 1e) indicating endothelial protection in the post-immediate period. On days 5 and 7, representing the late regeneration phase, eNOS mRNA but not protein was upregulated in vehicle treated animals in comparison to the early phase. However, no significant difference was detected between both treatment groups (Fig. 1d, e).

On a physiologic level, kidney function was mildly impaired in Rapa treated animals on day 1 but completely recovered as early as on day 2 as reflected by plasma creatinine (Fig. 2a) and urea measurements (Fig. 2b). There was moderate albuminuria on day 1 that completely resolved until day 5 independently of treatment (Fig. 2c). Control rats merely developed slight albuminuria on day 7 not significantly different from rats on Rapa (Fig. 2c). These findings suggest rapid resolution of functional changes induced by preservation/reperfusion injury in recipient rats despite mTOR blockade with Rapa.

**The intrarenal VEGF network is activated by Rapa early posttransplant.** Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is stabilized under hypoxic conditions as found during transplantation associated ischemia and has been shown to be activated by mTOR<sup>21</sup>. As a transcription factor, HIF-1 $\alpha$  promotes expression of VEGF-A, the decisive mediator of vascular homeostasis and driver of angiogenesis. Thus, we analyzed the VEGF network to decipher autocrine and paracrine cues with the ability to maintain peritransplant vascular integrity found in our model. VEGF-A mRNA transcripts were 2.3 times more abundant in Rapa treated rats compared to vehicle controls on day 7 and were already increased by trend on days 1 and 2 (Fig. 3a). Remarkably, VEGF-A transcripts in vehicle treated rats increased significantly from day 2 to day 5 to equal those of Rapa treated rats only on day 5 (Fig. 3a). VEGF expression was predominantly found in epithelial cells of distal tubules as demonstrated by immunohistology (Fig. 3b). VEGF-R1 mRNA was neither altered by treatment nor time (Fig. 3c). Of note, expression of VEGF-R2 paralleled that of VEGF-A (Fig. 3d): Rapa was associated with nonsignificant higher levels on days 1 and 2 and 2.7-fold more transcripts on day 7 in comparison to vehicle. On day 5, there were significantly more VEGF-R2 transcripts in vehicle treated animals than at the other time points reaching the same level as found with Rapa. A similar pattern was observed for neuropilin-1, a co-receptor for VEGF-A (Fig. 3e). Rapa in comparison to vehicle resulted in significantly increased transcription of neuropilin-1 on days 1 and 7 and by trend on day 2 while expression of neuropilin-1 was upregulated on day 5 in the vehicle group (Fig. 3e).

**Stimulation of VEGF expression by hypoxia overrides inhibitory Rapa mediated effects at therapeutic concentrations.** To analyze the relative contribution of hypoxia and mTOR inhibition – both



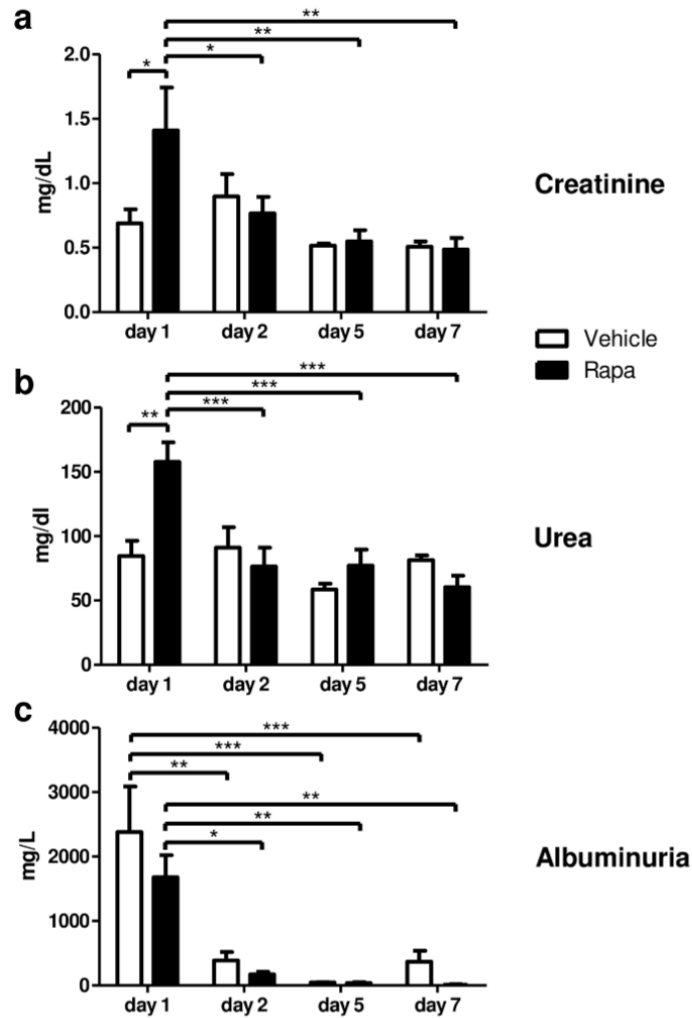
**Figure 1.** Effect of Rapa on vascular integrity early after kidney transplantation. (a, b) Positive area in the cortex (a) and medulla (b) of transplanted kidneys from vehicle or Rapa treated rats stained by immunohistochemistry for rat endothelial cell antigen (RECA)-1.  $n = 4$ . (c) Representative photomicrographs for RECA-1 immunohistochemistry 7 days posttransplant with vehicle or Rapa treatment. (d) Total positive area in kidney transplants from vehicle or Rapa treated rats stained by immunohistochemistry for endothelial nitric oxide synthase (eNOS).  $n = 4-5$ . (e) Quantification of eNOS mRNA in whole transplanted kidneys by real-time PCR after treatment with vehicle or Rapa.  $n = 4-5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

operative in our transplant model—on the VEGF network, proliferation, and metabolism in renal tubular epithelial cells, we performed a series of in vitro experiments with RPTC. VEGF-A mRNA was strongly upregulated 4 h after induction of hypoxia (Fig. 4a). Rapa slightly reduced VEGF-A only at the suprapharmacological dose of 100 nM (Fig. 4a). Relative expression waned after 8 h but was still highly significantly amplified under hypoxic conditions compared to normoxia (Fig. 4b). Elevated mRNA levels translated into increased secretion of VEGF-A into the supernatant as determined after 24 h by ELISA (Fig. 4c). Again, the amount of VEGF-A protein was reduced only at 20 nM and 100 nM (Fig. 4c), concentrations exceeding those found in patient plasma. There was no detectable effect of mTOR inhibition by Rapa on VEGF-A expression under normoxic conditions both on mRNA and protein levels (Fig. 4a-c). VEGF-R1 mRNA was markedly upregulated by hypoxia (Fig. 4d). Rapa did not influence mRNA levels independently of oxygen saturation (Fig. 4d). In accordance with reports on animal studies<sup>14</sup>, we did not detect VEGF-R2 mRNA transcripts in RPTC (not shown).

**Proliferation of tubular epithelial cells is preserved despite mTOR inhibition by Rapa during posttransplant repair and under hypoxia.** More than 30% of tubular cells in cortex and medulla exhibited proliferative activity as determined by immunostaining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) on day 1 after transplantation independently of mTOR inhibition (Fig. 5a-c). On day 2, proliferation remained high in the cortex in both groups (Fig. 5a, b). However, Rapa diminished proliferation of tubular epithelial cells located in the medulla (Fig. 5b). At later time points, proliferation was largely decreased in cortex and medulla in both treatment groups (Fig. 5a-c). Cell culture experiments revealed that proliferation of RPTC as measured by BrdU incorporation was decreased by Rapa only under normoxic conditions whereas mTOR inhibition had no effect when cells were exposed to hypoxia (Fig. 6a). Similarly, overall metabolic activity of RPTC when determined with the MTT assay declined with increasing doses of Rapa at normoxia, but not hypoxia (Fig. 6b).

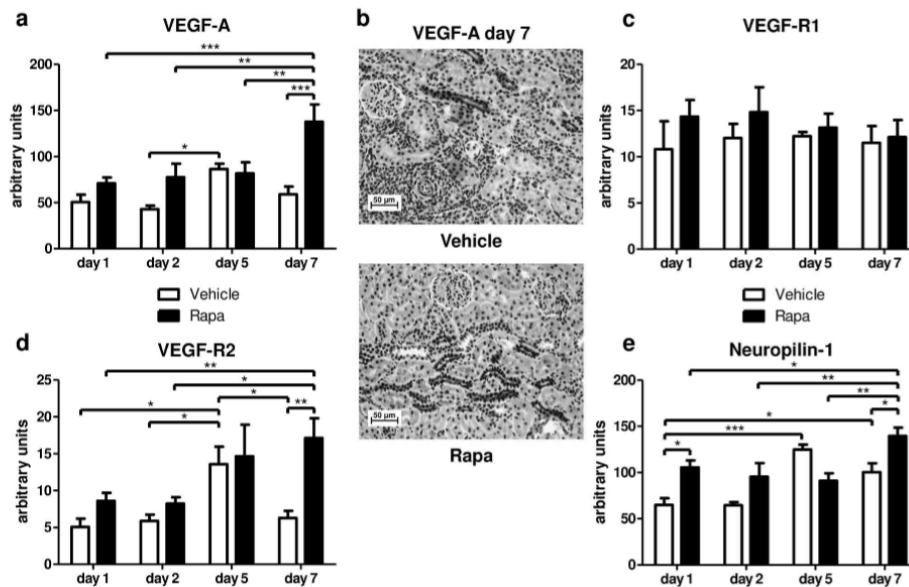
## Discussion

In our low-responder life-supporting rat renal transplantation model, the mTORi Rapa did not exert adverse effects in the early posttransplant period up to day 7. This is in contrast to early reports that linked induction immunosuppression with Rapa to increased rates of delayed graft function (DGF)<sup>22</sup> and prolonged recovery from



**Figure 2.** Renal function and albuminuria during the first week after kidney transplantation. Plasma creatinine (a) and urea (b) concentrations in transplanted rats receiving vehicle or Rapa.  $n=5-7$ . (c) Albumin concentrations measured in urine samples collected over 24 h in metabolic cages.  $n=4-5$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

this important complication<sup>23,24</sup>. Since DGF is associated with unfavorable short- and long-term outcomes<sup>25</sup>, it was concluded that Rapa might not be the best choice for transplants at risk for DGF<sup>23</sup> although 1-year graft function was not compromised<sup>24</sup>. More recent studies did not find an association of mTORi use with DGF<sup>25,26</sup>. The most important differences to earlier protocols are reduced target trough levels for mTORi, e.g. for Rapa instead of 10–15 ng/mL<sup>23</sup> only 4–8 ng/mL as established in the ELITE-Symphony study<sup>27</sup>, no combination with mycophenolate as an additional anti-proliferative agent<sup>9</sup>, and reduced CNI exposure<sup>28</sup>. Hence, we aimed



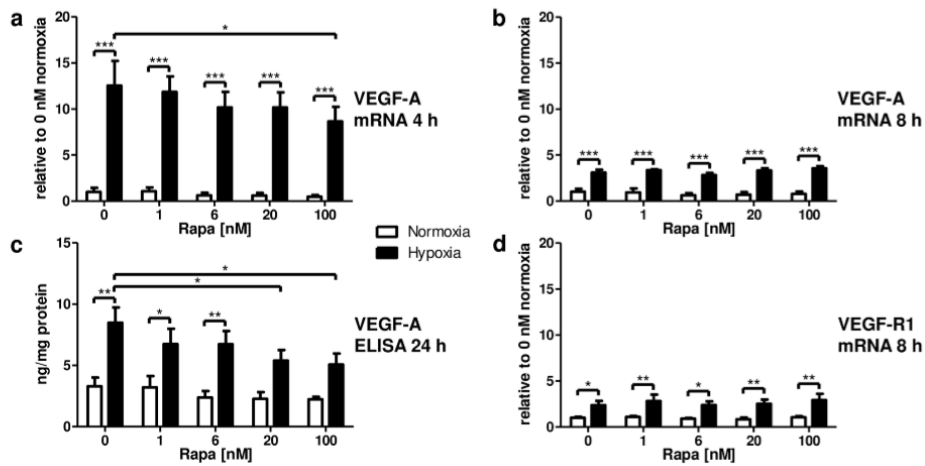
**Figure 3.** The vascular endothelial growth factor (VEGF) network in kidney grafts from rats receiving vehicle or Rapa. Quantitative real-time PCR on days 1–7 (a) and immunohistochemistry on day 7 (b) for VEGF-A. Representative photomicrographs are shown. mRNA expression of the VEGF receptors 1 (VEGF-R1; c) and 2 (VEGF-R2; d) and the VEGF co-receptor neuropilin-1 (e) as assessed with quantitative real-time PCR.  $n = 4-6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

to elucidate the effect of low-dose Rapa on regenerative mechanisms operative early after transplantation that might be involved in protection from DGF.

A major objection put forward against the use of mTORi in the immediate posttransplant period is a possible negative impact of their well-known antiproliferative potential on graft regeneration from preservation injury resulting in DGF. However, we did not find reduced proliferation with Rapa in tubular epithelial cells in cortex and medulla with the exception of a 30% reduction on day 2 in the medulla at low Rapa concentrations. In addition, inhibition of the VEGF axis by Rapa<sup>12,13</sup> might be particularly harmful for transplanted kidneys with preservation/reperfusion damage since VEGF-A is not only required for maintaining integrity and functionality of glomerular structures<sup>14,29</sup> but has also been established as a growth supporter for tubular epithelium<sup>16</sup>, the renal compartment with the highest susceptibility to hypoxic damage. Rapa and other mTORi have been studied in various models relevant for kidney transplantation. However, to our knowledge, none of the previously published works examined the effect of mTOR inhibition on allograft regeneration and the VEGF network in the early posttransplant period.

As an example, Ko et al. used the same low-responder Fischer-to-Lewis kidney transplantation model as us to study the impact of Rapa on chronic allograft dysfunction<sup>30</sup>. After 24 weeks, they did not observe reduced expression of VEGF-A and VEGF-R1 in whole kidney grafts with Rapa in comparison to Cyclosporine A (CsA) while VEGF-R2 mRNA was almost doubled in CsA treated rats<sup>30</sup>. Tubuli were not evaluated separately, but mRNA and protein levels of the VEGF axis components were strikingly reduced in glomerular structures and intrarenal arteries with Rapa treatment<sup>30</sup>. Glomerular and vascular impairment of the VEGF system was associated with increased proteinuria on one hand and protection from vasculopathy on the other<sup>30</sup>, illustrating both sides of the coin with potential detrimental and beneficial consequences of mTORi use after transplantation.

In our study, glomerular and peritubular capillaries were not structurally altered with intact eNOS expression indicating endothelial functioning during the first week after transplantation. Correspondingly, albuminuria resolved as quickly in Rapa treated animals as in those receiving vehicle. Thus, there was no evidence for adverse effects of mTOR inhibition on restoration of glomerular function and vascular integrity immediately after transplantation. Moreover, our in vitro experiments with RPTC demonstrate neutralization of any inhibiting effect of Rapa at clinically relevant concentrations on proliferation and metabolism when cells were exposed to hypoxic conditions. Remarkably, these findings on structural and functional levels were related to preservation or even amplification of the VEGF network in vivo and in vitro despite the presence of Rapa. A possible explanation is



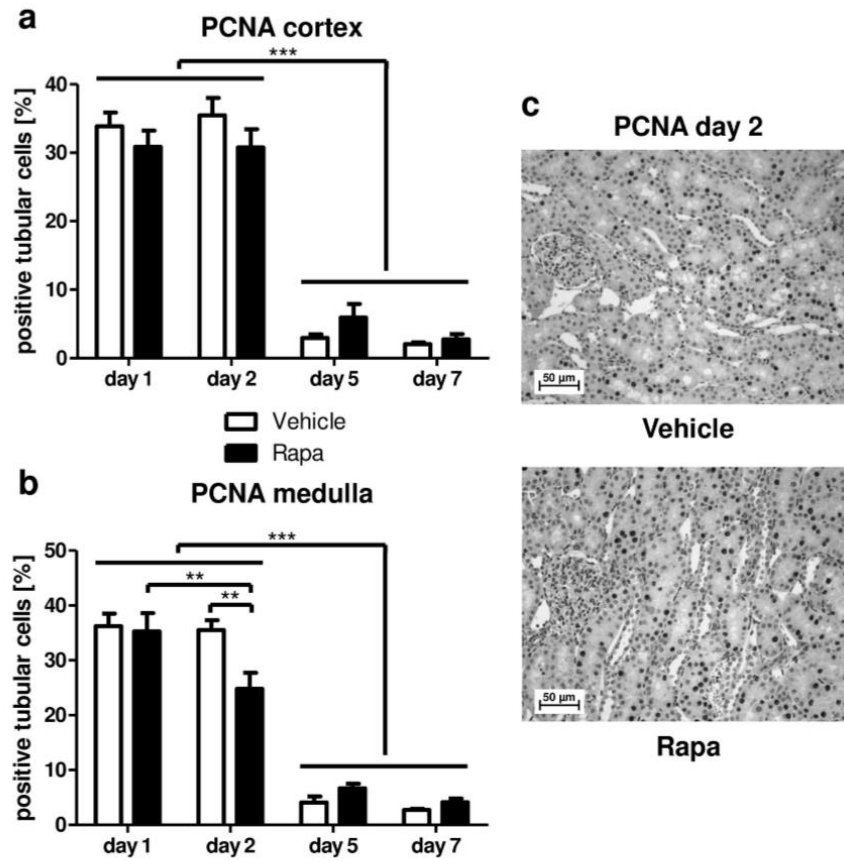
**Figure 4.** Influence of hypoxia and mTOR inhibition by Rapa on the vascular endothelial growth factor (VEGF) network in rat renal proximal tubular cells (RPTC). RPTC were incubated with Rapa under normoxic or hypoxic conditions. Expression of VEGF-A mRNA was analyzed by quantitative real-time PCR after 4 h (a) and after 8 h (b). Results were normalized to vehicle control (0 nM Rapa) at normoxia (set to 1.00). Normoxia  $n = 7-8$ , hypoxia  $n = 4$ . (c) VEGF-A protein measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in cell culture supernatants after 24 h normalized to total protein content.  $n = 9$ . (d) Expression of VEGF receptor 1 (VEGF-R1) mRNA quantified by real-time PCR after 8 h normalized to vehicle control (0 nM Rapa) at normoxia (set to 1.00). Normoxia  $n = 6$ , hypoxia  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

the activation of some defense mechanism during cold ischemia overriding potentially negative influences of mTOR inhibition on VEGF production and function as described in other contexts<sup>12,13,50</sup>.

The hypoxia inducible factors (HIF) 1 and 2 have been identified as central players in the protection of tubular epithelial cells during ischemia–reperfusion injury (IRI)<sup>31</sup>. As oxygen-sensitive transcription factors, they promote the expression of proteins related to the adoptive response to hypoxia such as erythropoietin (EPO) and VEGF-A<sup>21</sup>. In rat kidneys, activation of the cellular master switch for adaptation to low oxygen tension, HIF-1 $\alpha$ , has been observed not only during ischemia but also on days 3, 5 and 7 of reperfusion without evidence of persistent tissue hypoxia<sup>32</sup>. The HIF-1 $\alpha$  target genes EPO and VEGF-A were upregulated 3 days after ischemia and negative genetic interference with HIF-1 $\alpha$  directed siRNA exacerbated tubular injury and dramatically worsened renal function on day 3<sup>32</sup>. Thus, induction of HIF-1 $\alpha$  and its target genes including VEGF-A appears to be necessary in the immediate and early posttransplant period to ensure timely recovery from preservation/reperfusion injury. Besides hypoxia, oxygen-independent pathways such as growth factor signaling, heat shock protein 90, and others can activate HIF-1 $\alpha$  dependent transcription<sup>21</sup>. In proximal tubular cells, such pathways have been shown to be induced independently of oxygen levels by nutrient depletion and replenishment mimicking transplantation associated ischemia<sup>32</sup>. Together with our findings, this evidence suggests that hypoxia in addition to hypoxia independent mechanisms operative in preservation/reperfusion injury act as powerful inducers of the VEGF network that is not suppressed by Rapa at low concentrations.

Following evidence from animal studies, HIF-1 $\alpha$  targets have been evaluated as therapeutic options to reduce DGF. Disappointingly, EPO failed to improve recovery from preservation/reperfusion injury and to protect from DGF in transplant patients<sup>33,34</sup>. Different means of HIF-1 $\alpha$  induction other than hypoxia such as peritransplant recipient treatment with carbon monoxide<sup>35</sup> or donor pretreatment with a prolyl-hydroxylase inhibitor<sup>36</sup> are still experimental. Amplification of VEGF signaling during the vulnerable peritransplant period could be an alternative approach. Application of highly specific VEGF-R2 activating aptamers<sup>37</sup> directly to the allograft during cold storage or immediately prior to graft implantation would be a reasonable approach. This strategy holds promise to be particularly beneficial since it would specifically target intrarenal vascular, glomerular, and tubular structures at risk for preservation/reperfusion injury with good responsiveness to VEGF within a short window of opportunity while avoiding off-target effects in other tissues.

In human kidney transplant recipients, introduction of mTORi bears a risk for detrimental consequences predominantly in already structurally altered grafts with low glomerular filtration rate and preexisting proteinuria as a consequence of severely damaged glomerula in CAN<sup>38</sup>. Thus, early use of mTORi might be prudent to avoid the development of calcineurin inhibitor toxicity and CAN and to derive the maximum benefit with regard to viral infections, cardiovascular events, and malignant tumors<sup>9</sup>, although we did not evaluate the effect of Rapa in combination with a CNI on the VEGF network. There is a growing body of evidence that combining mTORi with



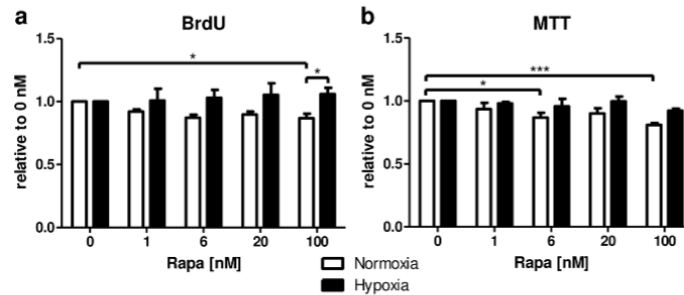
**Figure 5.** Effect of Rapa on proliferation of tubular cells after kidney transplantation. Percentage of tubular cells positive for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cortex (a) and medulla (b) during the first week after kidney transplantation as seen with immunohistochemistry.  $n = 3$ . (c) Representative photomicrographs for PCNA immunohistochemistry 2 days posttransplant with vehicle or Rapa treatment.

reduced CNI exposure in de novo kidney transplants has an acceptable side effect profile and is immunologically safe<sup>4,8–10,39</sup>. Particularly, there was no indication to increased rates of DGF associated with early use of mTORi<sup>5,26</sup>.

Taken together, our study does not raise a safety signal that mTOR inhibition with Rapa at doses used in modern immunosuppressive protocols after kidney transplantation negatively interferes with the VEGF network that is crucial for successful recovery from preservation/reperfusion injury. Moreover, we provide a rationale to evaluate a possible role for therapeutic enhancement of VEGF signaling peritransplant to further improve outcomes. In the light of recent clinical trials, mTORi may be considered in all transplant recipients with low to moderate immunologic risk.

#### Methods

**Animals and transplantation surgery.** All surgical and experimental procedures were approved by local authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales, LaGeSo, Berlin, Germany) and were in accordance with the guidelines of the American Physiological Society. The ARRIVE guidelines were met. 10-weeks old inbred male Fischer (F344) and Lewis (Lew, RT1) rats (Harlan-Winkelmann, Sulzbach, Germany) weighing 150–200 g were kept at 24 °C with regular lighting conditions (lights on 6:00–18:00) with free access to tap water and standard rat diet (C-1000, Altromin, Lage, Germany). Fischer rats served as kidney donors and were prepared as described previously<sup>17</sup>. After in situ perfusion with 5 mL pre-cooled University of Wisconsin (UW) solution



**Figure 6.** Effect of Rapa on proliferation and metabolic activity of rat renal tubular cells in vitro under normoxic and hypoxic conditions. Rat renal proximal tubular cells (RPTC) were incubated with Rapa under normoxic or hypoxic conditions for 24 h. (a) Proliferation was assessed as incorporation of BrdU. Results are normalized to vehicle control (0 nM Rapa) for each experiment. Normoxia  $n = 6$ , hypoxia  $n = 4$ . (b) Metabolic activity was measured as conversion of MTT to formazan. Results are normalized to vehicle control (0 nM Rapa) for each experiment. Normoxia  $n = 4$ , hypoxia  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

through the cannulated aorta, the explanted kidney was placed in cold UW (4 °C) for 2 h. The Lewis recipients were anesthetized with isoflurane and underwent bilateral nephrectomy followed by orthotopic implantation of the left donor kidney. Anastomoses of the artery, vein and ureter were done end-to-end with 10–0 polypropylene (Prolene, Ethicon, Norderstedt, Germany) sutures within 30 min<sup>18</sup>.

Rapa (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) was administered by gavage from a 1 mg/mL stock solution. A loading dose of 3 mg/kg was applied followed by daily maintenance doses of 1.5 mg/kg. Rapa trough levels of  $4.30 \pm 0.64$  ng/mL were achieved.

As previously described<sup>19</sup>, rats were placed in metabolic cages for collection of 24-h urine samples. When animals were killed at the indicated time points venous blood was collected for automated measurements of creatinine and urea in the university's central laboratory facility and kidney grafts were harvested.

**Histology, immunohistochemistry, and morphometric quantification.** Histological and immunohistochemistry techniques followed previously described protocols<sup>18</sup>. We used the alkaline phosphatase/anti-alkaline phosphatase (APAAP) complex method (DakoCytomation, Hamburg, Germany) for immunostaining. Acetone-fixed cryosections (6  $\mu$ m) were used for analysis with antibodies directed against rat endothelial cell antigen (RECA; Abcam, Cambridge, UK), endothelial NO-synthase (eNOS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and VEGF-A (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) using the neofuchsin-naphtol-As-Bi-phosphate substrate (Merck, Darmstadt, Germany). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) was detected in paraffin Sects. (4  $\mu$ m) of formalin fixed tissue with amino ethyl carbazole (AEC) as the chromogen (DakoCytomation). Negative control staining was performed by incubation with corresponding isotype controls instead of primary antibody. Hematoxylin counterstain was applied to all sections after development of the antibody signal.

For all parameters, 10 randomly chosen fields of view (FOV) at 400 $\times$  magnification were evaluated and summarized to obtain a single mean value for each individual rat. The area stained by RECA and eNOS antibodies was measured using a computer-assisted morphometry unit (axiocam HR with axiovision 4.4 software, Zeiss/Kontron, Göttingen, Germany) and expressed as the percentage of the total area. PCNA positive tubular cells were assessed as percentage of all tubular cells.

**Cell culture.** Immortalized rat renal proximal tubular cells (RPTC) were generously provided by Julie Ingel-finger (Pediatric Nephrology Laboratory, Harvard Medical School, Boston, MA, USA). RPTC were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and 2 mmol/L glutamine at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. Cells were passaged before reaching confluence.

RPTC were seeded at a density of 250,000 cells per well in 6-well plates for RNA extraction or 10,000 cells per well in 96-well plates for BrdU and MTT assays in complete DMEM and were allowed to adhere overnight. After cells were exposed to serum-free medium for 24 h they were treated with Rapa at the indicated concentrations or with ethanol as a vehicle control for 4, 8, or 24 h at normoxia and hypoxia in parallel.

To create hypoxic conditions, culture dishes were placed in an air-tight hypoxia chamber with constant 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere at 37 °C.

Rapa (LC Laboratories) was dissolved in ethanol and stock solutions with concentrations of 2  $\mu$ mol/L, 12  $\mu$ mol/L, and 100  $\mu$ mol/L were prepared.



**Quantitative real-time PCR.** Total RNA was extracted from deep frozen graft tissue samples or cultured cells with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and purified following standard procedures. Isolated RNA was checked for integrity by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining and spectrometrically quantified. Complementary DNA (cDNA) was obtained from 1 µg of RNA using the PCR Core Kit and random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following to the manufacturer's protocol.

The Light Cycler PCR and detection system (Roche, Mannheim, Germany) was used for amplification and online quantification. Specific primer pairs (TIB Molbiol, Berlin, Germany) were designed to detect the following target transcripts: eNOS, forward 5'-TGA CCC TCA CCG ATA CAA CA, reverse 5'-CTG GCC TTC TGC TCA TTT TC; VEGF-A, forward 5'-TGC ACC CAC GAC AGA AGG GGA, reverse 5'-TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA T; VEGF-R1, forward 5'-CAA GGG ACT CTA CAC TTG TC, reverse 5'-CCG AAT AGC GAG CAG ATT TC; VEGF-R2, forward 5'-GCC AAT GAA GGG GAA CTG AAG AC, reverse 5'-TCT GAC TGC TGG TGA TGC TGT C; neuropilin-1, forward 5'-GAT TCC CTG AAG TTG GCC CT, reverse 5'-TCT CCT GGT GTC CAC CCG TT. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal standard (forward 5'-CCA TCT TCC AGG AGC GAG AT, reverse 5'-GAT GAC CTT GCC CAC AGC CT). The PCR mixture consisted of H<sub>2</sub>O, *Taq* polymerase, 3 mM magnesium chloride, Master Sybr Green Mix\* (Roche), and specific primers. cDNA corresponding to 0.1 µg RNA was analyzed per reaction. Melting curve analyses were performed to verify the specificity of the reactions. Run data were analyzed with the quantification program Quant V3.0 using the delta-CT method.

**VEGF-A enzyme immunoassay (EIA).** Cell culture supernatants were cleared by centrifugation for 3 min at 100xg. Concentration of VEGF-A was determined with a commercial human VEGF EIA that crossreacts with rat VEGF-A (PromoKine C-64407; PromoCell, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's protocol.

**BrdU incorporation for assessment of cell proliferation.** RPTC in 96-well were exposed to the indicated Rapa concentrations or ethanol as vehicle control in serum-free DMEM for 24 h. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was added 1:1,000 for the last 2 h. BrdU incorporation into newly synthesized DNA was measured as a surrogate for proliferation using the BrdU cell proliferation kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Each measurement consisted of three replicates.

**MTT assay for metabolic activity.** RPTC in 96-well plates cells were exposed to the indicated concentrations of Rapa or ethanol as the vehicle control for 24 h. 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT; Merck) at a concentration of 5 g/L in sterile 0.9% NaCl solution was added to a final concentration of 1.5 mmol/L for the last 60 min. After washing with PBS, formazan crystals formed by metabolically active cells were solubilized in 100 µl isopropanol/4 mol/L HCl. Absorbance was measured in a microplate reader at 570 nm. Background absorbance was subtracted and means of five replicates were calculated.

**Statistical analysis.** Quantitative results are expressed as means ± SEM. Numbers of animals or independent replicates are given in each figure legend. Treatment groups and different time points or normoxic versus hypoxic conditions and different rapa concentrations were compared with the two-way analysis of variance (ANOVA). Bonferroni's multiple comparisons test was used for post-testing. Statistical significance was considered at a two-sided *P* value of < 0.05. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) for Windows was used for all analyses.

#### Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 7 April 2021; Accepted: 16 July 2021  
Published online: 11 August 2021

#### References

- Flechner, S. M. mTOR inhibition and clinical transplantation: kidney. *Transplantation* **102**, S17–S18. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001692> (2018).
- Pascual, J. *et al.* Evidence-based practice: Guidance for using everolimus in combination with low-exposure calcineurin inhibitors as initial immunosuppression in kidney transplant patients. *Transplant. Rev. (Orlando)* **33**, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2019.07.001> (2019).
- Mallat, S. G. *et al.* CMV and BKPyV infections in renal transplant recipients receiving an mTOR inhibitor-based regimen versus a CNI-based regimen: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1321–1336. <https://doi.org/10.2215/CJN.13221216> (2017).
- Sommerer, C. *et al.* An open-label, randomized trial indicates that everolimus with tacrolimus or cyclosporine is comparable to standard immunosuppression in de novo kidney transplant patients. *Kidney Int* **96**, 231–244. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.01.041> (2019).
- Montero, N. *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibitors combined with calcineurin inhibitors as initial immunosuppression in renal transplantation: a meta-analysis. *Transplantation* **103**, 2031–2056. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002769> (2019).
- Ponticelli, C. The pros and the cons of mTOR inhibitors in kidney transplantation. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 295–305. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.872562> (2014).
- Ventura-Aguilar, P., Campistol, J. M. & Diekmann, F. Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. *Expert Opin. Drug Saf.* **15**, 303–319. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1132698> (2016).
- Andrade, L. G. & Tedesco-Silva, H. Critical analysis of graft loss and death in kidney transplant recipients treated with mTOR inhibitors. *J. Bras. Nefrol.* **39**, 70–78. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170012> (2017).

9. Tedesco Silva, H., Rosso Felipe, C. & Medina Pestana, J. O. Reviewing 15 years of experience with sirolimus. *Transplant. Res.* **4**, 6. <https://doi.org/10.1186/s13737-015-0028-6> (2015).
10. Berger, S. P. *et al.* Two-year outcomes in de novo renal transplant recipients receiving everolimus-facilitated calcineurin inhibitor reduction regimen from the TRANSFORM study. *Am. J. Transplant.* **19**, 3018–3034. <https://doi.org/10.1111/ajt.15480> (2019).
11. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* **169**, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.035> (2017).
12. Guba, M. *et al.* Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* **8**, 128–135. <https://doi.org/10.1038/nm0202-128> (2002).
13. Faes, S., Santoro, T., Demartines, N. & Dormond, O. Evolving significance and future relevance of anti-angiogenic activity of mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancers (Basel)* <https://doi.org/10.3390/cancers9110152> (2017).
14. Schrijvers, B. F., Flyvbjerg, A. & De Zeeuw, D. L. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* **65**, 2003–2017. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00621.x> (2004).
15. Tanaka, S., Tanaka, T. & Nangaku, M. Hypoxia and dysregulated angiogenesis in kidney disease. *Kidney Dis. (Basel)* **1**, 80–89. <https://doi.org/10.1159/000381515> (2015).
16. Kanellis, J., Fraser, S., Katerelos, M. & Power, D. A. Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **278**, F905–915. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.6.F905> (2000).
17. Dragun, D. *et al.* Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int.* **58**, 2166–2177. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00390.x> (2000).
18. Fuller, T. F. *et al.* Cytoprotective actions of FTY720 modulate severe preservation reperfusion injury in rat renal transplants. *Transplantation* **89**, 402–408. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181caa499> (2010).
19. Brasen, J. H. *et al.* Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor (LOX-1)-mediated pathway and vascular oxidative injury in older-age rat renal transplants. *Kidney Int.* **67**, 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00240.x> (2005).
20. White, E., Hildemann, W. H. & Mullen, Y. Chronic kidney allograft reactions in rats. *Transplantation* **8**, 602–617. <https://doi.org/10.1097/00007890-196911000-00007> (1969).
21. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007> (2015).
22. Simon, J. F. *et al.* Induction sirolimus and delayed graft function after deceased donor kidney transplantation in the United States. *Am. J. Nephrol.* **24**, 393–401. <https://doi.org/10.1159/000079734> (2004).
23. McTaggart, R. A. *et al.* Sirolimus prolongs recovery from delayed graft function after cadaveric renal transplantation. *Am. J. Transplant.* **3**, 416–423. <https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.00078.x> (2003).
24. Stallone, G. *et al.* Addition of sirolimus to cyclosporine delays the recovery from delayed graft function but does not affect 1-year graft function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 228–233. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000102469.32182.8c> (2004).
25. Mannon, R. B. Delayed graft function: the AKI of kidney transplantation. *Nephron* **140**, 94–98. <https://doi.org/10.1159/000491558> (2018).
26. Albano, L. *et al.* Incidence of delayed graft function and wound healing complications after deceased-donor kidney transplantation is not affected by de novo everolimus. *Transplantation* **88**, 69–76. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181aa7d87> (2009).
27. Ekberg, H. *et al.* Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2562–2575. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067411> (2007).
28. Dantal, J. *et al.* Efficacy and safety of de novo or early everolimus with low cyclosporine in deceased-donor kidney transplant recipients at specified risk of delayed graft function: 12-month results of a randomized, multicenter trial. *Transpl. Int.* **23**, 1084–1093. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01094.x> (2010).
29. Shye, M. *et al.* Worsening proteinuria and renal function after intravitreal vascular endothelial growth factor blockade for diabetic proliferative retinopathy. *Clin. Kidney J.* **13**, 969–980. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa049> (2020).
30. Ko, H. T. *et al.* Sirolimus reduces vasculopathy but exacerbates proteinuria in association with inhibition of VEGF and VEGFR in a rat kidney model of chronic allograft dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**, 327–336. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs453> (2013).
31. Smith, S. F., Hosgood, S. A. & Nicholson, M. L. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation: 3 key signaling pathways in tubular epithelial cells. *Kidney Int.* **95**, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.10.009> (2019).
32. Conde, E. *et al.* Hypoxia inducible factor 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS ONE* **7**, e33258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033258> (2012).
33. Pallet, N., Rabant, M., Legendre, C., Martinez, F. & Choukroun, G. The nephroprotective properties of recombinant human erythropoietin in kidney transplantation: experimental facts and clinical proofs. *Am. J. Transplant.* **12**, 3184–3190. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04287.x> (2012).
34. Zhou, J., Lu, J. & Cai, D. Recombinant human erythropoietin for kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Urol. J.* **17**, 217–223. <https://doi.org/10.22037/uj.v0i0.5399> (2020).
35. Faleo, G. *et al.* Carbon monoxide ameliorates renal cold ischemia-reperfusion injury with an upregulation of vascular endothelial growth factor by activation of hypoxia-inducible factor. *Transplantation* **85**, 1833–1840. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31817c6f63> (2008).
36. Bernhardt, W. M. *et al.* Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogeneic kidney transplant model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21276–21281. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903978106> (2009).
37. Ramaswamy, V. *et al.* DNA aptamer assembly as a vascular endothelial growth factor receptor agonist. *Nucleic Acid Ther.* **25**, 227–234. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0519> (2015).
38. Boratynska, M. *et al.* Conversion to sirolimus from cyclosporine may induce nephrotic proteinuria and progressive deterioration of renal function in chronic allograft nephropathy patients. *Transplant. Proc.* **38**, 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.12.023> (2006).
39. Pascual, J. *et al.* Everolimus with reduced calcineurin inhibitor exposure in renal transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 1979–1991. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018010009> (2018).

### Acknowledgements

We dedicate this paper to the commemoration of Prof. Duska Dragun who deceased in December 2020. She initiated this study and contributed with the wealth of her ideas and analytic thoughts substantially to its successful completion.

### Author contributions

U.H., M.N.-K., K.B., and B.H. designed the research. U.H., D.M., M.N.-K., and B.H. performed the experiments. U.H., D.M., K.B., and B.H. analyzed the data. B.H. wrote the paper.

### Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by Wyeth Pharma.

### Competing interests

Klemens Budde has received research funds and/or honoraria from Abbvie, Alexion, Astellas, Bristol-Myers Squibb, Chiesi, CSL Behring, Fresenius, Hexal, Hookipa Biotech, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Otsuka, Pfizer, Roche, Shire, Siemens, Takeda, Veloxis and Vitaeris. All other authors declare no competing interests.

### Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.H.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

## 2.5 Der mTOR-Inhibitor Rapamycin schützt vor vorzeitiger zellulärer Seneszenz frühzeitig nach experimenteller Nierentransplantation

Eine weitere wichtige Frage war der Einfluss der mTOR-Modulation durch Rapamycin in der Frühphase nach Nierentransplantation auf die zelluläre Seneszenz, die mit der Entwicklung von interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie, einer Hauptursache für ein späteres Transplantatversagen, in Verbindung gebracht wurde. Seneszenz gehörte zu den Zellschicksalen, die in unserer unter 2.3 aufgeführten Studie durch Rapamycin verhindert wurden. Daher war es naheliegend, diesen Aspekt auch in unserem Nierentransplantationsmodell in Ratten zu untersuchen.

Der folgende Text entspricht in deutscher Übersetzung aus dem Englischen dem Abstrakt der Arbeit:

Hoff U, Markmann D, Thurn-Valassina D, Nieminen-Kelhä M, Erlangga Z, Schmitz J, Bräsen JH, Budde K, Melk A\*, **Hegner B\***.

The mTOR inhibitor rapamycin protects from premature cellular senescence early after experimental kidney transplantation.

PLoS One, 2022, 17(4):e0266319

DOI: [10.1371/journal.pone.0266319](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319)

\*geteilte Letztautorschaft

“Die interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie, ein Hauptgrund der Nierentransplantatdysfunktion, wurde mit vorzeitiger zellulärer Seneszenz in Verbindung gebracht. Der mTOR-Inhibitor Rapamycin schützt in experimentellen Modellen vor Seneszenz, aber seine antiproliferativen Eigenschaften führten zu Bedenken in der Frühphase nach der Transplantation, insbesondere bei hohen Dosen. Sein Effekt auf Seneszenz wurde bei Nierentransplantationen bisher nicht untersucht.

Rapamycin wurde in einem Nierentransplantationsmodell in Ratten über sieben Tage eingesetzt (3 mg/kg Körpergewicht Ladungsdosis, 1,5 mg/kg Körpergewicht Tagesdosis). Niedrige Rapamycintalspiegel (2,1-6,8 ng/mL) verhinderten die Akkumulation von p16<sup>INK4a</sup> positiven Zellen in Tubuli, dem Interstitium und Glomerula. Die Expression der Zytokine MCP-1, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , die den proinflammatorischen Seneszenz-

assoziierten sekretorischen Phänotyp definieren, war aufgehoben. Die Infiltration mit Monozyten/Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten war vermindert und die Tubulusfunktion war durch Rapamycin erhalten. Die Hemmung von mTOR war nicht mit einer Beeinträchtigung der strukturellen Erholung, höheren Glukosespiegeln oder Gewichtsverlust verbunden.

Die mTOR-Hemmung mit niedrig dosiertem Rapamycin in der unmittelbaren Posttransplantationsphase schützte vor vorzeitiger zellulärer Seneszenz ohne negative Effekte auf die strukturelle und funktionelle Erholung vom Konservierungs-/ Reperfusionsschaden, die Glukosehomöostase und Wachstum in einem Nierentransplantationsmodell in Ratten. Eine verminderte Seneszenz könnte die renale regenerative Kapazität aufrechterhalten und so eine Widerstandsfähigkeit gegenüber zukünftigen Schäden verleihen, die vor interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie schützt.“

Übersetzung durch den Autor.

## RESEARCH ARTICLE

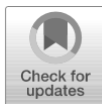
# The mTOR inhibitor Rapamycin protects from premature cellular senescence early after experimental kidney transplantation

Uwe Hoff<sup>1</sup>, Denise Markmann<sup>2</sup>, Daniela Thurn-Valassina<sup>3</sup>, Melina Nieminen-Kelhä<sup>4</sup>, Zulrahman Erlangga<sup>3</sup>, Jessica Schmitz<sup>5</sup>, Jan Hinrich Bräsen<sup>5</sup>, Klemens Budde<sup>1</sup>, Anette Melk<sup>3\*</sup>, Björn Hegner<sup>1,6\*\*</sup>

**1** Department of Nephrology and Critical Care Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, **2** Nieren- und Dialysezentrum Schöneberg-Tempelhof, Berlin, Germany, **3** Children's Hospital, Hannover Medical School, Hannover, Germany, **4** Departement of Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, **5** Nephropathology Unit, Institute of Pathology, Hannover Medical School, Hannover, Germany, **6** Vitanas Hospital for Geriatric Medicine, Berlin, Germany

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [bioern.hegner@gmx.de](mailto:bioern.hegner@gmx.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Hoff U, Markmann D, Thurn-Valassina D, Nieminen-Kelhä M, Erlangga Z, Schmitz J, et al. (2022) The mTOR inhibitor Rapamycin protects from premature cellular senescence early after experimental kidney transplantation. *PLoS ONE* 17(4): e0266319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319>

**Editor:** Niels Olsen Saraiva Câmara, Universidade de Sao Paulo, BRAZIL

**Received:** May 24, 2021

**Accepted:** March 18, 2022

**Published:** April 21, 2022

**Copyright:** © 2022 Hoff et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** Duska Dragun received funding for this study from Wyeth Pharma, now Pfizer (<https://www.pfizer.com/>). Since Duska Dragun passed away in December 2020, she is not listed as an author. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Interstitial fibrosis and tubular atrophy, a major cause of kidney allograft dysfunction, has been linked to premature cellular senescence. The mTOR inhibitor Rapamycin protects from senescence in experimental models, but its antiproliferative properties have raised concern early after transplantation particularly at higher doses. Its effect on senescence has not been studied in kidney transplantation, yet. Rapamycin was applied to a rat kidney transplantation model (3 mg/kg bodyweight loading dose, 1.5 mg/kg bodyweight daily dose) for 7 days. Low Rapamycin trough levels (2.1–6.8 ng/mL) prevented the accumulation of p16<sup>INK4a</sup> positive cells in tubules, interstitium, and glomerula. Expression of the cytokines MCP-1, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , defining the proinflammatory senescence-associated secretory phenotype, was abrogated. Infiltration with monocytes/macrophages and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes was reduced and tubular function was preserved by Rapamycin. Inhibition of mTOR was not associated with impaired structural recovery, higher glucose levels, or weight loss. mTOR inhibition with low-dose Rapamycin in the immediate posttransplant period protected from premature cellular senescence without negative effects on structural and functional recovery from preservation/reperfusion damage, glucose homeostasis, and growth in a rat kidney transplantation model. Reduced senescence might maintain the renal regenerative capacity rendering resilience to future injuries resulting in protection from interstitial fibrosis and tubular atrophy.

**Competing interests:** I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: Klemens Budde has received research funds and/or honoraria from Abbvie, Alexion, Astellas, Bristol-Myers Squibb, Chiesi, CSL Behring, Fresenius, Hexal, Hookipa Biotech, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Otsuka, Pfizer, Roche, Shire, Siemens, Takeda, Veloxis and Vitaeris. All other authors declare no competing interests.

## Introduction

Despite improvements in short-term outcomes after kidney transplantation due to lower rates of acute rejection little progress has been made with regard to allograft half-life beyond the first year after transplantation [1]. Interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) as well as glomerulosclerosis, the key histological features of 'chronic allograft nephropathy', represent a final common pathway of multiple immunological and non-immunological injury mechanisms with the consequence of deteriorating graft function culminating in transplant failure [2]. Several layers of evidence have linked IF/TA and allograft failure to accumulation of renal cells that had acquired a specific cell fate called premature cellular senescence [3,4].

Senescent cells are characterized by an irreversible cell cycle arrest that correlates with high expression levels of cell cycle inhibitors such as p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup>, and p27 [5]. Moreover, they remain metabolically active, are resistant to apoptosis, and can secrete a plethora of proinflammatory cytokines, chemokines, and growth factors constituting the senescence-associated secretory phenotype (SASP) acting in an autocrine and paracrine manner [3,5]. The SASP implicates senescent cells not only as supporters of inflammation by secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and others but also as important mediators of tissue remodeling via matrix metalloproteinases, platelet-derived growth factor AA, and transforming growth factor- $\beta$  [3–5]. Increased expression of senescence markers, particularly of p16<sup>INK4a</sup>, is correlated with age and IF/TA due to both native chronic kidney disease or allograft damage [3,6,7]. Furthermore, the amount of p16<sup>INK4a</sup> expression in implantation biopsies can predict the outcome of kidney transplantation [8,9]. Many well-established risk factors for the development of IF/TA in transplanted kidneys and graft failure have also been linked to the induction of premature cellular senescence. Non-immunological determinants include higher donor age [10], hypertension [11], diabetes mellitus [12], and ischemia/reperfusion injury (IRI) [4]. But also calcineurin inhibitor (CNI) toxicity [13,14] and immunological insults such as acute and chronic cellular and antibody mediated rejection can be involved [15–17]. Important mechanisms operative in the aforementioned situations that accelerate the transition to a senescent phenotype apart from physiologic aging are DNA damage, inflammation, the unfolded protein response, and oxidative stress [5,17].

On the contrary, reduced signaling via the mechanistic target of Rapamycin (mTOR) by means of caloric restriction or pharmacological agents such as the macrolide Rapamycin (Rapa) has been shown to interfere with the development of cellular senescence [18–21] and can even increase life span consistently in all model organisms studied so far [22,23]. Moreover, Rapa can counteract SASP expression via downregulation of interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) [24] and SASP mediated effects since many of its constituents rely on mTOR signaling [5].

Rapa also features potent immunosuppressive properties derived from its influence on a large set of immune cells [25] and has been approved as an immunosuppressant after organ transplantation in 1999. Since then, Rapa and the subsequently developed mTOR inhibitor (mTORi) everolimus have been associated with the hope to effectively reduce IF/TA and improve long-term function of renal allografts by reduction, elimination, or avoidance of CNI and their inherent toxicity and additional unique intrinsic properties [26]. Extended cellular damage may ultimately lead to nephron loss and the histologic picture of IF/TA. It is important to note that the basis for development of IF/TA appears to be established early in the course after transplantation or even before implantation since donor age, the extent of graft damage related to brain death, preservation, and reperfusion is an important determinant of IF/TA [27]. Thus, timely strategies targeting the initiation of deleterious processes early on are most promising to substantially reduce nephron loss and improve long-term graft survival.

Here, we tested the hypothesis that mTOR inhibition with Rapa immediately after experimental allogeneic kidney transplantation in a life-supporting rat model with a low-responder strain combination can reduce cellular senescence in the graft. Rapa very potently protected all kidney compartments from accumulation of senescent cells in the peritransplant phase, inhibited the SASP-type inflammatory response, and improved functional recovery without a negative impact on glucose homeostasis and growth. Thus, early mTOR inhibition in renal transplantation holds the potential to prevent excessive conversion of kidney cells to a senescent phenotype during the vulnerable preservation/reperfusion period. This might fundamentally improve graft resilience against later injuries by safeguarding regenerative capacity leading to protection from IF/TA and functional deterioration.

## Materials and methods

### Animals and surgical procedures

Local authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales, LaGeSo, Berlin, Germany) approved all procedures and we followed the guidelines of the American Physiological Society as well as the ARRIVE guidelines. Male inbred Fischer (F344) and Lewis (Lew, RT1) rats (Harlan-Winkelmann, Sulzbach, Germany) 10-weeks of age and weighing 190–300 g were kept at a constant temperature of 24°C under regular lighting conditions (lights on 6:00, lights off 18:00) with free accessible tap water and food (C-1000, Altromin, Lage, Germany). For surgery and organ harvesting, all rats were anesthetized with isoflurane (2% for induction, 1.5% thereafter; Abbott, Wiesbaden, Germany). Kidney grafts were prepared from Fischer rats as described previously [28]. Briefly, the vessels and the ureter were separated from fibrotic tissue. Collateral branches of the vessels were dissected by electrocauterization and the distal ureter was cut next to the bladder. Prior to ablation of the artery and the vein with microaneurysm clips and iris microscissors, kidneys were perfused in situ with 5 mL cold University of Wisconsin (UW) solution via the aorta. Kidneys were placed in UW at 4°C for 2 hours after explantation. After removing both native kidneys, the donor kidney was grafted orthotopically. The vessels and the ureter were anastomosed end-to-end with 10–0 polypropylene (Prolene, Ethicon, Norderstedt, Germany) within 30 minutes. Postoperative analgesia was achieved with 0.5 mg/mL tramadol (Grünenthal, Stolberg, Germany) in drinking water for 3 days. Animals were monitored at least once daily for clinical and behavioral signs of pain and suffering. There were no postoperative complications. Survival until the planned endpoint was 100%.

In total, 40 animals were used as experimental units. They were randomly allocated to the treatment groups without any specific randomization protocol. 19 rats were assigned to the vehicle group and 21 to receive Rapa. In the vehicle group, 5 animals were sacrificed on days 1, 2, and 5, respectively, and 4 animals on day 7. In the Rapa group, 6 rats were sacrificed on days 1 and 2, respectively, 4 rats on day 5 and 5 rats on day 7. The order of treatments, duration of observation periods, and cage location was evenly distributed across the whole study. The sample size was estimated from previous studies with the same and similar models by our group [28–33]. For Rapa treatment, the commercially available 1 mg/mL Rapa solution for oral application in patients was used (Wyeth, Madison, NJ). Rats received a loading dose of 3 mg/kg bodyweight on day 0 and daily maintenance doses of 1.5 mg/kg bodyweight thereafter by gavage. Rats in the vehicle group received an equivalent amount of water by gavage every day.

For measurement of creatinine clearance, proteinuria, and fractional excretion of sodium ( $FE_{Na}$ ), urine was collected over 24 h using metabolic cages.

Animals were sacrificed at the indicated time points for harvesting of the kidney grafts and collection of venous blood. All clinical chemical analyses were performed with automated measurements at the university's core laboratory facility.



All technically valid data points were included in the analyses. No animals were excluded from the study. The following analyses were performed in a blinded manner after organ harvesting.

### Histology, immunohistochemistry, and morphometric quantification

For histology and immunohistochemistry, formalin fixed paraffin sections (4  $\mu\text{m}$ ) were processed following previously described protocols [32].

Immunoperoxidase staining for p16<sup>INK4a</sup> and IL-1 $\beta$  were performed as described previously [34]. Briefly, sections were deparaffinized and hydrated. The sections were immersed in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol to inactivate endogenous peroxidase. Slides were blocked with 20% normal goat serum overnight. Tissue sections were then incubated for 1 h at room temperature or overnight at 4°C with the primary antibodies (p16: mouse monoclonal antibody, Clone F-12, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany, dilution 1:100; IL-1 $\beta$ : mouse monoclonal antibody, clone E7, Santa Cruz Biotechnologies, dilution 1:300) or the corresponding isotype control and then rinsed with PBS. Following 30 min of incubation with the Envision monoclonal system (DakoCytomation) sections were washed again in PBS. Visualization was performed using the diaminobenzidine (DAB) substrate kit (DakoCytomation). The slides were counterstained with hematoxylin and mounted. Analysis was done by counting 10 randomly chosen fields of vision (FOV; 200x magnification) by a blinded observer. The percentage of positive nuclei in comparison to total nuclei number was assessed separately for tubuli, interstitium, and glomerula in each FOV and then summarized as a mean per animal and compartment.

The alkaline phosphatase/anti-alkaline phosphatase (APAAP) complex method (DakoCytomation, Hamburg, Germany) was applied for staining with antibodies directed against ED1 (CD68; Serotec, Oxford, UK, dilution 1:1000) and CD8 (Serotec, dilution 1:100). Amino ethyl carbazole (AEC; DakoCytomation) was used as the chromogen. For staining of ED2, tissue sections were pretreated with Fast Enzyme (Zytomed Systems, Berlin, Germany) and then incubated with a mouse anti-CD163 antibody (Serotec, dilution 1:50) overnight at 4°C followed by ZytoChem Fast AP One-Step Polymer anti-mouse/rabbit (Zytomed Systems) and Permanent AP-Red-Kit (Zytomed Systems). Corresponding isotype antibodies instead of specific antibodies served as controls.

Hematoxylin counterstaining was applied to all slides after immunostaining. For quantification, 10 FOV at 400x magnification were randomly chosen. The percentage of positively stained interstitial, glomerular, or tubular cells was first separately calculated for each FOV and then summarized as a mean per animal and examined compartment.

The acute kidney injury (AKI) score was obtained from hematoxylin and eosin (H&E) stained sections. The score comprised tubular dilatation, basal membrane denudation, loss of the brush border, tubular cell flattening, tubular cell vacuolization, and tubular casts. The percentage of affected tubular cross sections was first acquired for the individual score components and finally combined by calculating the mean percentage of all components separately for each animal.

### Quantitative real-time PCR

As previously described [35], after extraction from deep frozen graft tissue samples with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) total RNA was purified and spectrometrically quantified. Reverse transcription of 1  $\mu\text{g}$  RNA per sample into complementary DNA (cDNA) was done with the PCR Core Kit and random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a total volume of 20  $\mu\text{l}$  according to the manufacturer's instructions.

Amplification and real-time quantification was achieved with the Light Cycler PCR and detection system (Roche, Mannheim, Germany) using specific primer pairs (TIB Molbiol, Berlin, Germany) with the following sequences: Inducible NO synthetase (iNOS), forward 5'-CTG TGT CCA ACA TGC TGC TAG AAA TTG, reverse 5'-TAA AGG TCT TCT TCC TGG TGA TGC C; MCP-1, forward 5'-AGG TCT CTG TCA CGC TTC TG, reverse 5'-TGT CAT ACT GGT CAC TTC TA; pro-IL-1 $\beta$ , forward 5'-CAA GCA ACG ACA AAA TCC C, reverse 5'-GAA CTG TGC AGA CTC AAA CTC C; TNF- $\alpha$ , forward 5'-ATG GGC TCC CTC TCA TCA GT, reverse 5'-ACT CCA GCT GCT CCT CTG CT; IL-10, forward 5'-ACT GCT ATG TTG CCT GCT CTT ACT, reverse 5'-GAA TTC AAA TGC TCT TGA TTT CT. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), forward 5'-CCA TCT TCC AGG AGC GAG AT, reverse 5'-GAT GAC CTT GCC CAC AGC CT served as the internal standard. cDNA obtained from 0.1  $\mu$ g RNA was applied to each reaction together with Taq polymerase, magnesium chloride (3 mM), Master Sybr Green Mix<sup>®</sup> (Roche, Mannheim, Germany), and primers in a total volume of 20  $\mu$ l. Specificity of the reactions was confirmed by melting curve analyses. Semi-quantitative calculation of transcripts was performed with the delta-CT method using the program Quant V3.0. Arbitrary units (AU) were calculated with the formula  $AU = \frac{1}{2^{(CT_{Target}-CT_{Reference})}} \times 1000$ . Thus, AU represent a semi-quantitative measure of the target gene normalized to the reference gene GAPDH.

### Statistical analysis

All results are expressed as means  $\pm$  SEM. Numbers of animals are given in the legend of each figure. Two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparisons test was used for comparison of the treatment groups and time points as well as the macrophage phenotype on day 7. A two-sided P value of <0.05 was considered statistically significant. All tests were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) for Windows.

### Results

To test our hypothesis that mTOR inhibition with Rapa might protect from cellular senescence in the context of preservation/reperfusion injury in kidney transplants we applied low doses of Rapa to our life-supporting low-responder Fischer-to-Lewis rat kidney transplantation model [36]. Treatment was initiated on day 0. Rapa trough levels were 2.1–2.3 ng/mL on days 1 and 2 and increased to 6.5–6.8 ng/mL on days 5 and 7 (Table 1) reaching the target range of modern immunosuppressive regimens [37].

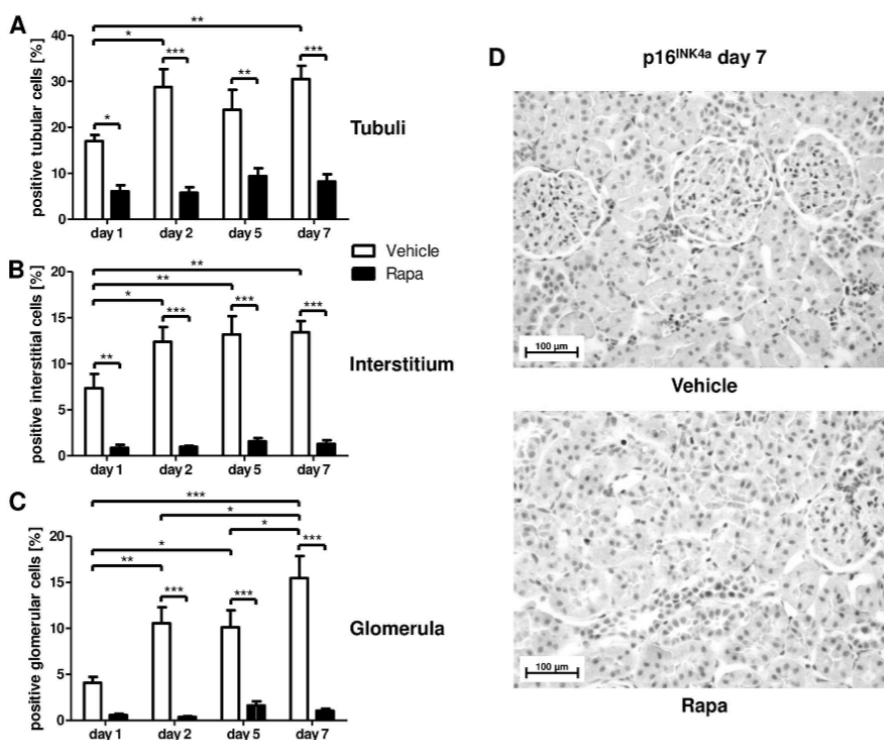
#### Rapa reduces cellular senescence and dampens the SASP-type inflammatory response

Cellular senescence as measured by expression of p16<sup>INK4a</sup> and SASP-type proinflammatory cytokines were significantly reduced by Rapa treatment. p16<sup>INK4a</sup> expression was diminished in tubular and interstitial cells as early as on day 1 (Fig 1A and 1B) and in glomerula starting on day 2 (Fig 1C), while senescence increased in all compartments in vehicle treated animals

Table 1. Rapa trough levels.

	day 1	day 2	day 5	day 7
Rapa trough level [ng/mL]	2.14 $\pm$ 0.17	2.32 $\pm$ 0.40	6.83 $\pm$ 1.28	6.48 $\pm$ 0.88

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319.t001>

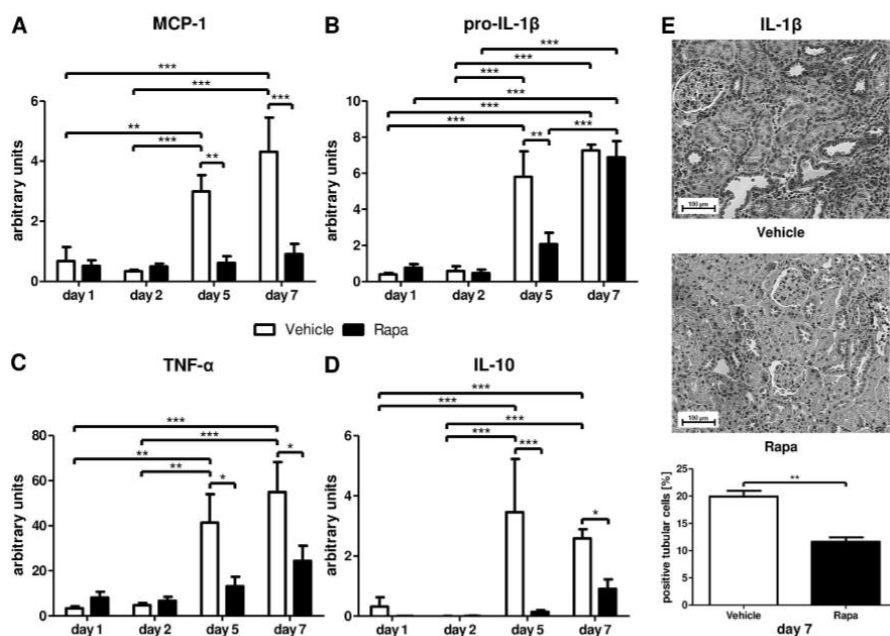


**Fig 1. Cellular senescence in different renal compartments early after kidney transplantation in rats treated with Rapa.** Immunohistochemistry for the cell cycle inhibitor p16<sup>INK4a</sup> as an indicator of replicative senescence. Quantitative assessment of positive cells in tubuli (A), the interstitium (B), and glomerula (C). n = 3–6. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. (D) Representative photomicrographs from vehicle and Rapa treated animals on day 7 after transplantation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319.g001>

on day 2 and displayed an additional increment in glomerula on day 7 low levels persisted in rats receiving Rapa (Fig 1A–1D).

Along with the reduction in p16<sup>INK4a</sup>, we found significant differences in signature cytokines belonging to the SASP. On days 1 and 2, only low basal levels of mRNA transcripts for the proinflammatory cytokines MCP-1, pro-IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  as well as for the anti-inflammatory cytokine IL-10 were detected (Fig 2). MCP-1 was markedly upregulated only in the vehicle group on day 5 and thereafter (Fig 2A). Pro-IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were also considerably upregulated in rats receiving vehicle on days 5 and 7 (Fig 2B and 2C). However, pro-IL-1 $\beta$  mRNA transcripts reached the same level in Rapa treated animals on day 7 (Fig 2B). IL-10, an anti-inflammatory cytokine balancing the inflammatory response, followed the same expression pattern as MCP-1 and TNF- $\alpha$  with increased transcription on days 5 and 7 in vehicle animals only (Fig 2D). To verify that Rapa reduces SASP cytokine production in kidney cells, we

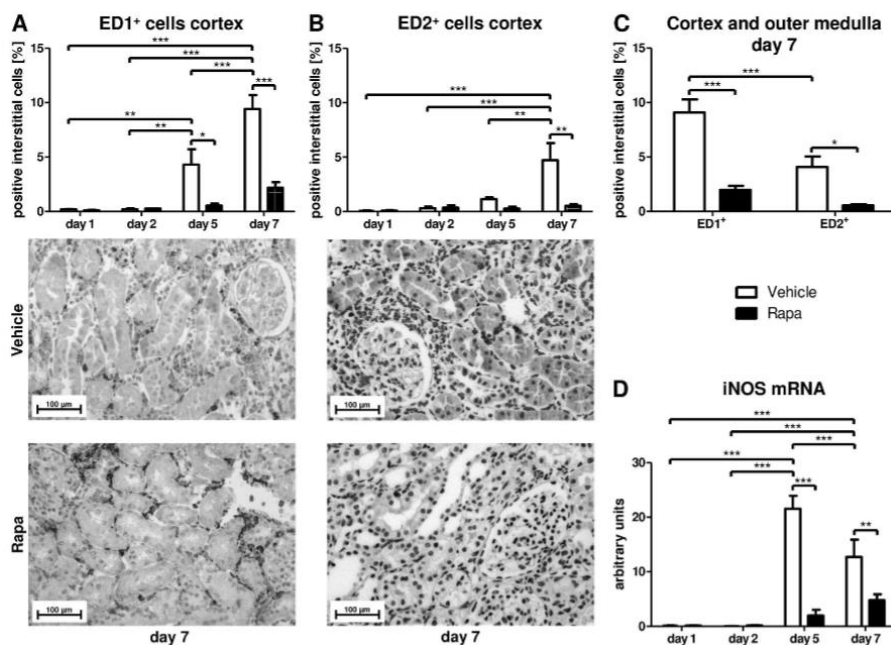


**Fig 2. Senescence-associated secretory phenotype (SASP) related cytokines after kidney transplantation in vehicle and Rapa treated rats.** Whole tissue lysates from allografts were analyzed with semi-quantitative real-time PCR for mRNA expression of the proinflammatory cytokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; A), pro-interleukin-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ; B), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; C) as well as of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10; D). (E) Immunohistochemistry for IL-1 $\beta$  on day 7. Representative photomicrographs and quantification as percentage of positive tubular cells are shown.  $n = 3-6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319.g002>

performed immunohistochemistry for IL-1 $\beta$ . On day 7, 20% of tubular cells in control animals expressed IL-1 $\beta$  in contrast to only 11.6% in Rapa treated rats (Fig 2E).

While senescent cells promote inflammatory processes via the SASP, inflammation is in turn an important driver of cellular senescence by itself [5]. In addition to the SASP elements, we examined the impact of Rapa on inflammatory cell infiltration of the allografts. ED1-positive monocytes/macrophages were found in the cortex of vehicle treated rats on day 5 with a further increase on day 7 (Fig 3A) and in the outer medulla on day 7 (S1A Fig) while there was no significant increase in the Rapa group (Fig 3A and S1A Fig). ED2-positive cells representing a subset of alternatively activated macrophages with anti-inflammatory [38] and profibrotic [39] properties were detected in cortex (Fig 3B) and outer medulla (S1B Fig) on day 7 in rats receiving vehicle but not in those receiving Rapa (Fig 3B and S1B Fig). Overall, less than half of the infiltrating macrophages had M2 polarity in vehicle treated animals on day 7 (Fig 3C). To further assess polarization of macrophages, we measured iNOS mRNA expression with quantitative RT-PCR in whole tissue lysates. Only vehicle treated animals featured markedly increased mRNA levels of iNOS, a signature gene of proinflammatory macrophages, on days 5 and 7 (Fig 3C). CD8 positive T-cells infiltrated cortex and medulla of transplanted kidneys in



**Fig 3. Infiltrating macrophages after kidney transplantation in vehicle and Rapa treated rats.** (A) ED1 and (B) ED2 positive macrophages in the cortex calculated as percentage of positive interstitial cells by immunohistochemistry. Representative photomicrographs are shown.  $n = 3$ . (C) Comparison of ED1 and ED2 positive infiltrating cells on day 7 in vehicle and Rapa treated rats. Cortex and outer medulla were analyzed together.  $n = 6-8$ . (D) Semi-quantitative real-time PCR for mRNA transcripts of inducible NO synthase (iNOS) in whole tissue extracts from kidney allografts.  $n = 4-6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319.g003>

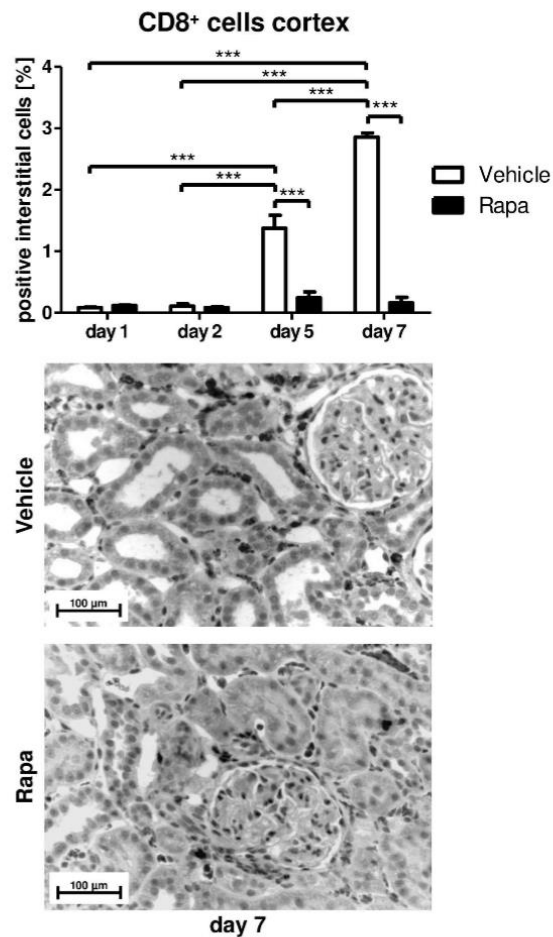
vehicle but not in Rapa treated rats on day 5 and even more on day 7 (Fig 4 and S1C Fig) accompanying the macrophage infiltrate.

#### Rapa permits recovery from preservation/reperfusion injury

On a functional level, proteinuria was lower with Rapa treatment on day 1 and decreased in both groups through day 7 (Fig 5A). Fractional excretion of sodium ( $FE_{Na}$ ) increased only in vehicle treated animals on day 2 (Fig 5B) whereas creatinine clearance was similar in both groups (Fig 5C). These findings suggest less impaired glomerular and tubular function in animals receiving the mTORi Rapa in the early posttransplant period. However, the AKI score did not differ according to treatment (Fig 5D and 5E).

#### Influence of Rapa on glucose homeostasis and growth

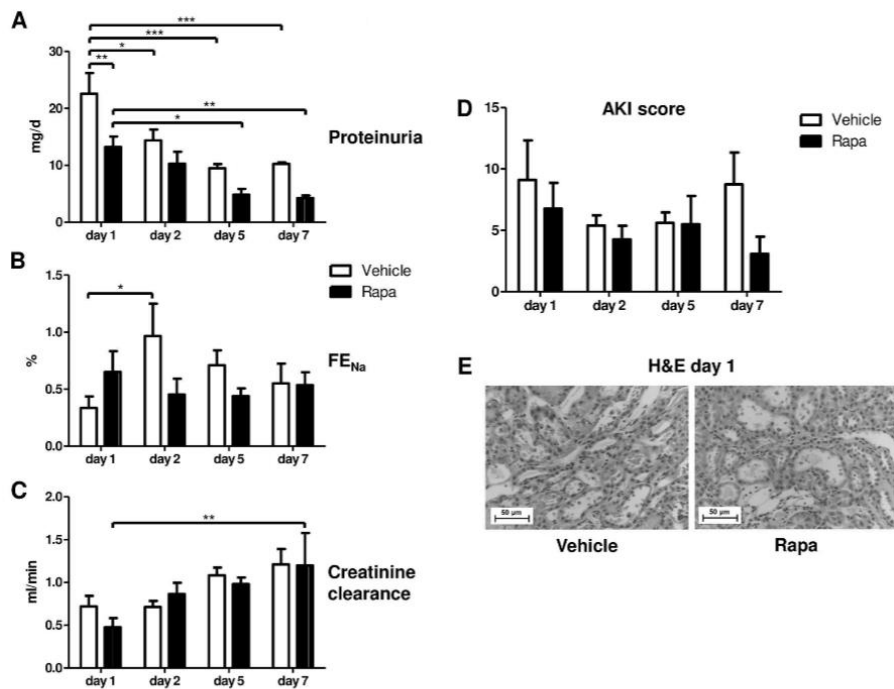
Impaired glucose tolerance and induction of diabetes mellitus is a known adverse effect of mTORi such as Rapa [40]. As hyperglycemia has been linked to premature cellular senescence [12], we measured blood glucose levels after transplantation. Rapa treated animals did not



**Fig 4. Infiltrating cytotoxic T-cells after kidney transplantation in vehicle and Rapa treated rats.** CD8 positive T-cells in the cortex calculated as percentage of positive interstitial cells by immunohistochemistry. Representative photomicrographs are shown.  $n = 3$ . \*\*\* $P < 0.001$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319.g004>

show increased glucose concentrations throughout the observation period of one week (Fig 6A). Nevertheless, there was some increase in blood glucose levels in the vehicle group on day 7 without statistical significance in comparison to the Rapa group (Fig 6A). Furthermore, we assessed the bodyweight to monitor adverse effects of mTOR inhibition on overall growth.



**Fig 5. Functional and structural recovery during the first 7 days after kidney transplantation in vehicle and Rapa treated rats.** (A) Proteinuria measured over 24 h. n = 4–5. (B) Fractional excretion of sodium (FE<sub>Na</sub>) given in %. n = 4–6. (C) Creatinine clearance calculated from a 24-h urine collection. n = 3–5. (D) Acute kidney injury (AKI) score representing the mean percentage of tubular cross sections affected with tubular dilatation, basal membrane denudation, loss of the brush border, tubular cell flattening, tubular cell vacuolization, and tubular casts. n = 3–6. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. (E) Representative photomicrographs from hematoxylin and eosin (H&E) stained kidney sections from vehicle and Rapa treated animals on day 1 after transplantation.

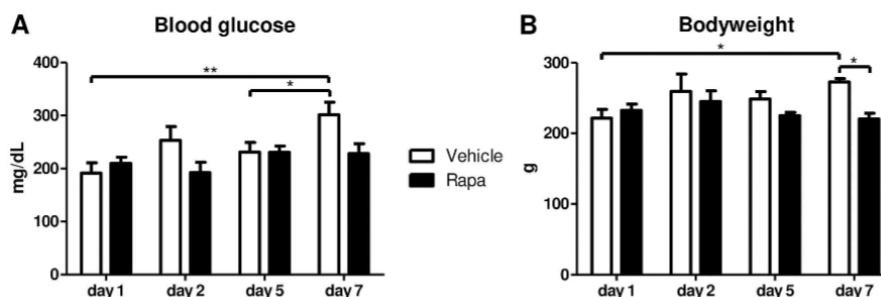
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319.g005>

Bodyweight remained stable in Rapa treated rats whereas it increased by 23% until day 7 in rats allocated to vehicle (Fig 6B).

## Discussion

The most outstanding finding of our study was that mTOR inhibition with Rapa potently protected renal allografts from premature cellular senescence associated with preservation/reperfusion injury in a life-supporting kidney transplantation model in rats. Reduced senescence was accompanied by a blunted SASP-type inflammatory response, milder tubular dysfunction, and unimpeded structural and functional recovery. No adverse metabolic effects were detected.

Importantly, the immunosuppressive properties of Rapa interfere with the SASP produced by senescent cells [3,4,24,41] both upstream and downstream. In contrast to vehicle treated animals, Rapa very effectively reduced the amount of senescent cells as indicated by



**Fig 6. Metabolic parameters of rats treated with vehicle or Rapa after kidney transplantation.** Measurements were performed at the end of the observation period on the indicated time points after transplantation. (A) Blood glucose levels.  $n = 3-5$ . (B) Body weight.  $n = 3-5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266319.g006>

considerably lower numbers of p16<sup>INK4a</sup> positive cells already on day 1 and throughout the whole observation period. The prevention of p16<sup>INK4a</sup> expression, one of the most important senescence markers, was paralleled by markedly reduced levels of SASP-related proinflammatory cytokines resulting in almost absent inflammatory infiltrates. Of note, macrophages with profibrotic M2 polarization were equally suppressed by Rapa. On the contrary, we documented an increase in senescent cells in the vehicle group that preceded the expression of proinflammatory cytokines and graft infiltration with inflammatory cells. Moreover, p16<sup>INK4a</sup> positive cells further accumulated from day 5 to day 7 at least in glomerula consistent with spreading of the senescent phenotype in response to SASP mediated inflammation [5]. Although we cannot clearly distinguish the inflammatory response provoked by reperfusion injury and alloimmunity from that induced by senescent cells, our findings indicate that Rapa efficiently breaks the vicious cycle of senescence and inflammation. Remarkably, this capability is apparently not only due to suppression of inflammation but can also be attributed to direct antisenescent properties.

A downside of all immunosuppressant agents is an inhibitory effect on the physiologically occurring clearance of senescent cells by natural killer cells, monocytes/macrophages, and T cells orchestrated by the SASP in immunocompetent individuals [4,42]. However, our data extends existing knowledge that immunosuppressants differ in their ability to induce senescence. While CNI related IF/TA has been linked to premature cellular senescence [3,13], early conversion to mTORi decreased IF/TA [43]. Interestingly, of the two CNI in clinical use, only Cyclosporin A, but not Tacrolimus, triggered senescence in cultured human renal tubular cells [14]. Thus, by combining several properties that can limit premature cellular senescence, mTORi such as Rapa occupy a unique position in the immunosuppressive armamentarium after organ transplantation.

Mechanistically, there are multiple links between mTOR and cellular senescence. mTOR is a serin/threonine protein kinase that is contained in two different multi-protein complexes called mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) with distinct upstream modulators and downstream effectors [22]. While mTORC1 controls cell growth by integrating energy availability, oxygen supply, and growth factor stimulation, mTORC2 is involved in the regulation of survival and proliferation in response to growth factors [22]. Rapa allosterically inhibits phosphorylation of several but not all mTORC1 targets resulting in, amongst others, reduced protein synthesis via p70S6 kinase 1 (p70S6K) and increased autophagy via Unc-51 like



autophagy activating kinase 1 (ULK1) [22]. It has been suggested that reduced mRNA translation as a consequence of mTORC1 inhibition can limit oxidative stress [22], a major contributor to the development of premature cellular senescence [5] related to preservation/reperfusion injury in kidney transplantation [4,44]. Furthermore, induction of autophagy promoting clearance of damaged proteins and organelles in addition to restriction of protein synthesis can prevent proteotoxic stress and the unfolded protein response leading to reduced cellular senescence [17]. Rapa does not directly inhibit mTORC2 but rather stimulates mTORC2 activity through release of a negative feedback loop [22]. Rapa mediated blockade of mTORC1 with reciprocal activation of mTORC2 can not only activate autophagy and reduce cellular senescence but also recruit prosurvival pathways resulting in reduced apoptosis [20]. Although we did not assess apoptosis in our model, this mechanism might also have contributed to rapid recovery of tubular function. Besides its effect on cell fates, Rapa also favors an undifferentiated state of progenitor cells [20,45] and could promote 'stemness' and stem cell function [22,23] thereby preserving organ plasticity and regeneration potential beyond the peritransplant period conferring resistance to future injuries that could accelerate IF/TA and compromise long-term graft function.

Our data suggests that the use of mTORi in *de novo* transplants does not impair regeneration after preservation/reperfusion injury despite the central role of mTORC1 for synthesis of proteins, lipids, and nucleotides needed for cell growth and division [22] when trough levels are kept in the lower range comparable to those established in the ELITE-Symphony Study [37]. Low-dose mTORi in combination with reduced CNI exposure has evolved as an immunologically safe but less nephrotoxic alternative to standard exposure CNI based regimens [46,47]. As presented here, Rapa treated animals showed less tubular dysfunction and creatinine clearance did not differ between both groups within the first week after transplantation. It can be expected that early protection from senescence by Rapa as observed in our short-term model will pay off with better graft function in the long run since senescence is a determinant of IF/TA<sup>3</sup> that in turn is a major cause of kidney allograft failure [2].

Additional treatment strategies targeted at reducing cellular senescence early in the time course of transplantation and long-term are desirable. As a basis, a healthy life-style with regular physical exercise and dietary interventions should be promoted since this has been shown to improve metabolic parameters such as insulin sensitivity and lipid profile and to reduce DNA damage as well as oxidative stress as potential mechanisms to delay age related senescence [4,48]. Recently, a novel strategy to reduce the senescent burden by therapeutic elimination of senescent cells is emerging. Senolytic drugs clear senescent cells by overcoming apoptosis resistance conferred by senescent cell antiapoptotic pathway (SCAP) networks [49]. So far, hypothesis-driven approaches and drug screenings have identified several compounds with senolytic activity such as Navitoclax, Quercetin, Dasatinib, Curcumin, FOXO4-related peptide, and others [4,49]. Some of these drugs have been shown to improve renal outcomes in pre-clinical studies [4,49] with the greatest body of evidence being available for Quercetin and Dasatinib but lack of specificity for senescent cells and serious adverse effects associated with these compounds have obviated comparable studies in humans, yet. Transplantation, however, offers the unique opportunity to selectively treat an organ at risk for injury-induced premature cellular senescence without systemic effects during the preservation period or immediately prior to implantation. This approach could also reset the already advanced senescent phenotype of kidneys from older donors that are more susceptible to preservation/reperfusion injury resulting in graft dysfunction and decreased graft survival [3,6,8,9,16,50]. Combination with interventions aimed at slowing down recurrent accumulation of senescent cells after transplantation such as life-style modifications and use of mTORi for rejection

prophylaxis might be most effective to protect from IF/TA and optimize graft survival though cellular senescence is not the only mechanism of renal allograft damage [1].

Taken together, our findings imply that even low doses of the mTOR inhibitor Rapa started in the immediate posttransplant period effectively prevent the development of premature cellular senescence originating from transplantation related stress in all compartments of the renal allograft. mTOR inhibition was well tolerated with respect to regeneration, graft function, metabolism, and growth. Thus, the regenerative capacity of the transplanted kidney might be maintained best by mTORi in comparison to all other available immunosuppressants providing a rationale for the combination of mTORi with reduced CNI exposure to improve long-term graft function and survival.

### Supporting information

#### S1 Checklist.

(PDF)

**S1 Fig. Inflammatory infiltrate after kidney transplantation in vehicle and Rapa treated rats.** (A) ED1 and (B) ED2 positive macrophages in the outer medulla calculated as percentage of positive interstitial cells by immunohistochemistry. (C) CD8 positive T-cells in the outer medulla calculated as percentage of positive interstitial cells by immunohistochemistry.  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

(TIF)

#### S1 File.

(XLSX)

### Acknowledgments

This paper is dedicated to Prof. Duska Dragun who always strived to improve kidney transplantation by envisioning novel pathophysiologic and therapeutic concepts. She led this project until her passing in December 2020.

We thank Edda Christians for excellent technical assistance.

### Author Contributions

**Conceptualization:** Uwe Hoff, Jan Hinrich Bräsen, Klemens Budde, Anette Melk, Björn Hegner.

**Data curation:** Uwe Hoff, Denise Markmann, Daniela Thurn-Valassina, Melina Nieminen-Kelhä, Zulrahman Erlangga, Jessica Schmitz, Jan Hinrich Bräsen, Anette Melk, Björn Hegner.

**Formal analysis:** Uwe Hoff, Denise Markmann, Daniela Thurn-Valassina, Melina Nieminen-Kelhä, Zulrahman Erlangga, Jessica Schmitz, Jan Hinrich Bräsen, Anette Melk, Björn Hegner.

**Funding acquisition:** Klemens Budde.

**Investigation:** Denise Markmann, Daniela Thurn-Valassina, Melina Nieminen-Kelhä, Zulrahman Erlangga, Jessica Schmitz, Jan Hinrich Bräsen, Björn Hegner.

**Methodology:** Uwe Hoff, Melina Nieminen-Kelhä, Jan Hinrich Bräsen, Anette Melk, Björn Hegner.

**Supervision:** Klemens Budde, Anette Melk, Björn Hegner.

**Validation:** Uwe Hoff, Zulrahman Erlangga, Jessica Schmitz, Björn Hegner.

**Visualization:** Jan Hinrich Bräsen, Björn Hegner.

**Writing – original draft:** Björn Hegner.

**Writing – review & editing:** Zulrahman Erlangga, Jessica Schmitz, Klemens Budde, Anette Melk.

## References

1. Van Loon E, Bernards J, Van Craenenbroeck AH, Naesens M. The Causes of Kidney Allograft Failure: More Than Alloimmunity. A Viewpoint Article. *Transplantation*. 2020; 104(2): e46–e56. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003012> PMID: 32000235
2. Naesens M, Kuypers DR, De Vusser K, et al. The histology of kidney transplant failure: a long-term follow-up study. *Transplantation*. 2014; 98(4): 427–435. <https://doi.org/10.1097/TP.000000000000183> PMID: 25243513
3. Sosa Pena MDP, Lopez-Soler R, Melendez JA. Senescence in chronic allograft nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018; 315(4): F880–F889. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00195.2016> PMID: 27306980
4. van Willigenburg H, de Keizer PLJ, de Bruin RWF. Cellular senescence as a therapeutic target to improve renal transplantation outcome. *Pharmacol Res*. 2018; 130: 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.015> PMID: 29471104
5. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019; 99(2): 1047–1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018> PMID: 30648461
6. Naesens M. Replicative senescence in kidney aging, renal disease, and renal transplantation. *Discov Med*. 2011; 11(56): 65–75. PMID: 21276412
7. Braun H, Schmidt BM, Raiss M, et al. Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(9): 1467–1473. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011100967> PMID: 22797186
8. Koppelstaetter C, Schratzberger G, Perco P, et al. Markers of cellular senescence in zero hour biopsies predict outcome in renal transplantation. *Aging Cell*. 2008; 7(4): 491–497. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00398.x> PMID: 18462273
9. McGlynn LM, Stevenson K, Lamb K, et al. Cellular senescence in pretransplant renal biopsies predicts postoperative organ function. *Aging Cell*. 2009; 8(1): 45–51. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00447.x> PMID: 19067655
10. Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int*. 2004; 65(2): 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x> PMID: 14717921
11. Westhoff JH, Hilgers KF, Steinbach MP, et al. Hypertension induces somatic cellular senescence in rats and humans by induction of cell cycle inhibitor p16INK4a. *Hypertension*. 2008; 52(1): 123–129. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099432> PMID: 18504326
12. Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G, et al. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295(5): F1563–F1573. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90302.2008> PMID: 18768588
13. Jennings P, Koppelstaetter C, Aydin S, et al. Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(3): F831–F838. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00005.2007> PMID: 17596534
14. Koppelstaetter C, Kern G, Leierer G, Mair SM, Mayer G, Leierer J. Effect of cyclosporine, tacrolimus and sirolimus on cellular senescence in renal epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2018; 48: 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.004> PMID: 29309803
15. Melk A, Schmidt BM, Vongwiwatana A, Rayner DC, Halloran PF. Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16INK4a in deteriorating renal transplants and diseased native kidney. *Am J Transplant*. 2005; 5(6): 1375–1382. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00846.x> PMID: 15888044
16. Melk A, Schmidt BM, Braun H, et al. Effects of donor age and cell senescence on kidney allograft survival. *Am J Transplant*. 2009; 9(1): 114–123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02500.x> PMID: 19133932

17. Abbadie C, Pluquet O. Unfolded Protein Response (UPR) Controls Major Senescence Hallmarks. *Trends Biochem Sci.* 2020; 45(5): 371–374. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.02.005> PMID: 32311331
18. Alimonti A, Nardella C, Chen Z, et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2010; 120(3): 681–693. <https://doi.org/10.1172/JCI40535> PMID: 20197621
19. Dong D, Cai GY, Ning YC, et al. Alleviation of senescence and epithelial-mesenchymal transition in aging kidney by short-term caloric restriction and caloric restriction mimetics via modulation of AMPK/mTOR signaling. *Oncotarget.* 2017; 8(10): 16109–16121. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14884> PMID: 28147330
20. Schaub T, Gorgen D, Maus D, et al. mTORC1 and mTORC2 Differentially Regulate Cell Fate Programs to Coordinate Osteoblastic Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 20071. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56237-w> PMID: 31882658
21. Nie D, Zhang J, Zhou Y, Sun J, Wang W, Wang JH. Rapamycin Treatment of Tendon Stem/Progenitor Cells Reduces Cellular Senescence by Upregulating Autophagy. *Stem Cells Int.* 2021; 2021: 6638249. <https://doi.org/10.1155/2021/6638249> PMID: 33603790
22. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017; 169(2): 361–371.
23. Weichhart T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology.* 2018; 64(2): 127–134. <https://doi.org/10.1159/000484629> PMID: 29190625
24. Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol.* 2015; 17(8): 1049–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195> PMID: 26147250
25. Waldner M, Fantus D, Solari M, Thomson AW. New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation. *Br J Clin Pharmacol.* 2016; 82(5): 1158–1170. <https://doi.org/10.1111/bcp.12893> PMID: 26810941
26. Mehrabi A, Fonouni H, Kashfi A, et al. The role and value of sirolimus administration in kidney and liver transplantation. *Clin Transplant.* 2006; 20 Suppl 17: 30–43. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2006.00598.x> PMID: 17100699
27. Timsit MO, Yuan X, Floerchinger B, Ge X, Tullius SG. Consequences of transplant quality on chronic allograft nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2010(119): S54–58. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.424> PMID: 21116319
28. Dragun D, Hoff U, Park JK, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int.* 2000; 58(5): 2166–2177. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00390.x> PMID: 11044238
29. Dragun D, Bohler T, Nieminen-Kelha M, et al. FTY720-induced lymphocyte homing modulates post-transplant preservation/reperfusion injury. *Kidney Int.* 2004; 65(3): 1076–1083. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00478.x> PMID: 14871428
30. Brasen JH, Nieminen-Kelha M, Markmann D, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor (LOX-1)-mediated pathway and vascular oxidative injury in older-age rat renal transplants. *Kidney Int.* 2005; 67(4): 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00240.x> PMID: 15780115
31. Fuller TF, Hoff U, Rose F, et al. Effect of mycophenolate mofetil on rat kidney grafts with prolonged cold preservation. *Kidney Int.* 2006; 70(3): 570–577. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001591> PMID: 16788694
32. Fuller TF, Hoff U, Kong L, et al. Cytoprotective Actions of FTY720 Modulate Severe Preservation Reperfusion Injury in Rat Renal Transplants. *Transplantation.* 2010; 89(4): 402–408. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181caa499> PMID: 20177341
33. Fuller TF, Kusch A, Chaykovska L, et al. Protein kinase C inhibition ameliorates posttransplantation preservation injury in rat renal transplants. *Transplantation.* 2012; 94(7): 679–686. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318265c4d8> PMID: 22932117
34. Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, et al. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* 2003; 63(6): 2134–2143. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00032.x> PMID: 12753300
35. Gorgen D, Hegner B, Kusch A, et al. Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Hypertension.* 2011; 57(3): 648–654. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.166157> PMID: 21300662
36. White E, Hildemann WH, Mullen Y. Chronic kidney allograft reactions in rats. *Transplantation.* 1969; 8(5): 602–617. <https://doi.org/10.1097/00007890-196911000-00007> PMID: 4928429
37. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007; 357(25): 2562–2575. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067411> PMID: 18094377

38. Lee S, Huen S, Nishio H, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(2): 317–326. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009060615> PMID: 21289217
39. Cao Q, Harris DC, Wang Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology (Bethesda)*. 2015; 30(3): 183–194.
40. Viana SD, Reis F, Alves R. Therapeutic Use of mTOR Inhibitors in Renal Diseases: Advances, Drawbacks, and Challenges. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 3693625. <https://doi.org/10.1155/2018/3693625> PMID: 30510618
41. Herranz N, Gallage S, Mellone M, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol*. 2015; 17(9): 1205–1217. <https://doi.org/10.1038/ncb3225> PMID: 26280535
42. Sagiv A, Krizhanovsky V. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology*. 2013; 14(6): 617–628. <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9473-0> PMID: 24114507
43. Bemelman FJ, de Fijter JW, Kers J, et al. Early Conversion to Prednisolone/Everolimus as an Alternative Weaning Regimen Associates With Beneficial Renal Transplant Histology and Function: The Randomized-Controlled MECANO Trial. *Am J Transplant*. 2017; 17(4): 1020–1030. <https://doi.org/10.1111/ajt.14048> PMID: 27639190
44. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(7): 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823> PMID: 24954210
45. Hegner B, Lange M, Kusch A, et al. mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(2): 232–238. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179457> PMID: 19074484
46. Andrade LG, Tedesco-Silva H. Critical analysis of graft loss and death in kidney transplant recipients treated with mTOR inhibitors. *J Bras Nefrol*. 2017; 39(1): 70–78. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170012> PMID: 28355407
47. Montero N, Quero M, Melilli E, et al. Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors Combined With Calcineurin Inhibitors as Initial Immunosuppression in Renal Transplantation: A Meta-analysis. *Transplantation*. 2019; 103(10): 2031–2056. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002769> PMID: 31343574
48. Baar MP, Van Willigenburg H, de Keizer PLJ. Maintenance and repair of an aging life cycle. *Oncotarget*. 2017; 8(50): 86985–86986. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18046> PMID: 29152057
49. Kirkland JL, Tchkonja T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med*. 2020; 288(5): 518–536. <https://doi.org/10.1111/joim.13141> PMID: 32686219
50. Gingell-Littlejohn M, McGuinness D, McGlynn LM, et al. Pre-transplant CDKN2A expression in kidney biopsies predicts renal function and is a future component of donor scoring criteria. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068133> PMID: 23861858

### 3. Diskussion

#### 3.1 Protektive Aktivierungsmuster des mTOR-Netzwerks

Die hier vorgestellten Arbeiten beleuchten die Bedeutung des mTOR-Signalnetzwerkes für die zelluläre Stressresistenz gegenüber pathogenen Stimuli. Diese kann über den Erhalt der endogenen Regenerationsfähigkeit vor beschleunigten Alterungsprozessen nach unterschiedlichen Schädigungen schützen. Im Zentrum stehen dabei die Erkenntnisse, die in der unter 2.3 vorgestellten Publikation veröffentlicht wurden. In diesen Arbeiten wurden beispielhaft MSC untersucht, die in ihrer Funktion als Vorläuferzellen für VSMC an der Erhaltung, Reparatur und Regeneration des Gefäßsystems beteiligt sind. In einem *in vitro* Modell für Arteriosklerose wurde systematisch die Bedeutung der beiden unterschiedlichen Signaltransduktionselemente mit Beteiligung von mTOR, mTORC1 und mTORC2, für die hierbei pathophysiologisch wichtige Ausbildung des osteoblastären kalzifizierenden Phänotyps auf molekularer Ebene analysiert. Es zeigte sich, dass für die Differenzierung von MSC zu osteoblastenartigen Zellen die Steuerung und Koordination von Zellschicksalsprogrammen wie Autophagie, zellulärer Seneszenz und Apoptose durch beide mTOR-Komplexe wichtig ist. Andererseits konnte durch eine spezifische Modulation der Aktivierungszustände von mTORC1 und mTORC2 die Konversion von MSC zum osteoblastären Phänotyp deutlich reduziert werden. Dies war bei einer Hemmung von mTORC1 mit gleichzeitiger Aktivierung von mTORC2 durch Rapamycin zu beobachten. In weiteren pharmakologischen und genetischen Untersuchungen wurde herausgearbeitet, dass insbesondere die Aktivierung von mTORC2 hierfür entscheidend ist. Unter dieser Aktivitätskonstellation des mTOR-Netzwerks bleibt der Autophagie-Flux erhalten und zelluläre Seneszenz sowie Apoptose werden unterdrückt. Durch diese Befunde konnten wir eine neue Funktion von mTORC2 bei der osteoblastären Differenzierung von MSC etablieren, die therapeutische Ansatzpunkte auch für vaskuläre Schädigungen im Rahmen physiologischer oder pathologisch akzelerierter Alterungsprozesse bietet.

Diesen entscheidenden Experimenten waren zahlreiche Studien vorausgegangen, in denen wir die phänotypische Modulationsfähigkeit von MSC in Hinblick auf vaskulär relevante Zelltypen erforscht hatten.

### 3.2 Steuerung der MSC-Plastizität durch mTOR in Bezug auf vaskuläre Homöostase und pathologische Gefäßumbauprozesse

Bereits in unseren ersten Untersuchungen mit MSC haben wir festgestellt, dass unter den Standardzellkulturbedingungen, die eine starke Expansion der Zellen fördern, nicht nur die multilineäre Differenzierungsfähigkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten erhalten bleibt, sondern auch Charakteristika von VSMC nachweisbar sind. Hierzu gehörte die Expression typischer Proteine wie glattnuskuläres Calponin, die kurze Isoform der MLCK und SM22 $\alpha$ , was wir erstmals in der unter 2.1 dargestellten Arbeit veröffentlichten. Bemerkenswert war insbesondere der Nachweis funktioneller L-Typ-Cav1.2-Kalziumkanäle, die für VSMC charakteristisch sind und maßgeblich an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind. Dies wurde ausführlich in einer Folgearbeit (siehe 2.2) abgehandelt. Beide Studien kamen außerdem zu dem Schluss, dass der glattnuskuläre Phänotyp von MSC über mTOR reguliert wird, wobei eine Hemmung von mTOR mit Rapamycin zu einer Stabilisierung des differenzierten kontraktiven Phänotyps führte.

Diese Befunde untermauern das unter 1.5 erläuterte Konzept, dass ein Kontinuum aus MSC, Perizyten und VSMC besteht [Bautch VL, Nat Med 2011], das unter physiologischen Bedingungen die Gewebshomöostase der Gefäße aufrechterhält und den normalen ‚Verschleiß‘ ausgleicht. Unter pathologischen Bedingungen sind jedoch ebenso alle Komponenten dieses Zellsystems auch an der Ausbildung von Gefäßschäden wie der Arteriosklerose beteiligt [Kramann R et al., Cell Stem Cell 2016]. Wir haben uns vor diesem Hintergrund bewusst dafür entschieden, die weiteren Untersuchungen mit MSC und nicht mit ausdifferenzierten VSMC durchzuführen, da im Vergleich zu VSMC relativ wenig über die Funktion von MSC als deren Vorläuferzellen bekannt war und es uns sehr vielversprechend erschien, bereits diese Vorläuferzellen therapeutisch zu adressieren. Eine hierdurch zu erzielende Stärkung des endogenen Regenerationspotenzials könnte nicht nur die Entstehung neuer Gefäßschäden verhindern, sondern möglicherweise auch zur Reduktion bereits eingetretener maladaptiver Veränderungen im Sinne einer Reparatur beitragen.

Hierbei gab es jedoch zu bedenken, dass die Funktion der körpereigenen MSC im Rahmen von Krankheiten intrinsisch gestört sein könnte. Dies haben wir selbst beispielhaft für MSC von Patienten mit systemischer Sklerose (SSc) gezeigt [Hegner B et al., PLoS One 2016]: MSC von SSc-Patienten wiesen im Vergleich zu MSC von

gesunden Spendern eine gestörte vaskulär-glattmuskuläre Differenzierung auf. Die durch den Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) induzierte Differenzierung von MSC zu Myofibroblasten ergab in Zellen von SSc-Patienten eine höhere Expression kontraktile Proteine mit stärkerer Migrationsaktivität und verminderter Proliferationsrate sowie eine gesteigerte Synthese von Kollagen bei gleichzeitig reduzierter Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) [Hegner B et al., PLoS One 2016]. Das veränderte Ansprechen auf TGF- $\beta$ 1 war mit einer stärkeren Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors Typ 1 und gesteigerter kanonischer und nicht-kanonischer TGF- $\beta$ -Signaltransduktion verbunden [Hegner B et al., PLoS One 2016]. Eine solche aberrante Funktion von Vorläuferzellen wie den MSC kann zu einer gestörten endogenen Regenerationsfähigkeit führen, die zur Entstehung und Progression von Krankheiten beitragen kann. Das genannte Beispiel eröffnet so die These, dass intrinsisch dysfunktionale MSC schon auf Ebene der Vorläuferzellen an der Entwicklung von Vaskulopathie und Fibrose im Rahmen der SSc beteiligt sein können.

Gegen die Verwendung von MSC sprachen vor allem am Anfang einige Unklarheiten hinsichtlich ihres Differenzierungspotenzials vor allem bei Verwendung von Zellen aus verschiedenen Ursprungsgeweben wie Knochenmark oder Fettgewebe und der Möglichkeit, im Rahmen exogener Zelltherapien krankhaftes oder verlorengewesenes Gewebe zu ersetzen. Auf die initiale Euphorie, die auf einer nahezu unbegrenzt scheinenden Vielfalt an Differenzierungsmöglichkeiten [Jiang Y et al., Nature 2002] und klinischen Einsatzgebieten bei bisher kaum zu behandelnden schweren Erkrankungen wie Schlaganfall oder ischämischer Myokardnekrose beruhte, folgte eine Phase der Ernüchterung. Einige Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen nicht unabhängig reproduziert werden, so dass das erstaunlich große Differenzierungspotenzial von MSC angezweifelt wurde. Außerdem stellte sich heraus, dass eine quantitativ bedeutsame Integration von exogen zugeführten Zellen zum Gewebersatz unrealistisch war [Pittenger MF et al., NPJ Reg Med 2019]. Es blieben jedoch beachtenswerte parakrine Effekte durch von MSC freigesetzte Faktoren, die therapeutisch nutzbar gemacht werden können, und die Verbindung von MSC zu vaskulären und paravaskulären Zellen mit Implikationen für die endogene Regeneration und vaskuläre Pathologien [Pittenger MF et al., NPJ Reg Med 2019]. Wir haben daher weiterhin unsere Untersuchungen auf MSC fokussiert.

Die Differenzierungsfähigkeit in Osteoblasten war die erste Eigenschaft, die MSC zugeordnet wurde [Owen M et al., Ciba Found Symp 1988] und stellt bis heute ein



wesentliches Merkmal bei ihrer Definition dar [Dominici M et al., *Cytotherapy* 2006]. Die ursprüngliche Funktion wurde im Zusammenhang mit der Bildung und dem Umbau von Knochen und Zähnen gesehen. Durch die Rolle als vaskuläre Progenitorzellen im perivaskulären Raum erhält die Möglichkeit einer Differenzierung in osteoblastenartige Zellen, die eine charakteristische extrazelluläre Matrix mit Ablagerung von Hydroxylapatit produzieren, eine zusätzliche Bedeutung für die Entstehung von kalzifizierenden Gefäßumbauprozessen wie Arteriosklerose und Atherosklerose [Kramann R et al., *Cell Stem Cell* 2016]. Eine solche Differenzierung läuft außerdem der regenerativen Aufgabe von MSC zuwider, vaskuläre Zellen im Rahmen der Aufrechterhaltung einer physiologischen Gefäßfunktion zu ersetzen. Interessanterweise findet man einen vergleichbaren Prozess auch bei VSMC. Bei diesen Zellen ist er im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose und Arteriosklerose als pathophysiologische Antwort auf unterschiedliche Schädigungen oder im Rahmen der altersbedingten Degeneration gut charakterisiert. Es handelt sich hierbei nicht lediglich um die Ablagerung von Kalzium und Phosphat, sondern um einen aktiv von den Zellen getragenen Vorgang, der der membranösen und enchondralen Ossifikation entspricht [Shao JS et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; Neven E et al., *Kidney Int* 2011], und somit als Transdifferenzierung anzusehen ist. Ein wesentlicher Aspekt ist, dass es hierbei auch zur Apoptose der Zellen kommt. Die daraus resultierenden Zellfragmente, die Apoptosekörper („apoptotic bodies“), dienen als Nidus für die Ablagerung von Hydroxylapatit, dem Hauptbestandteil sowohl der Knochenmatrix als auch der kalzium- und phosphathaltigen Ablagerungen bei Arteriosklerose [Proudfoot D et al., *Circ Res* 2000; Shroff RC et al., *Circulation* 2008]. Die Aktivierung von mTORC2 war in unseren Studien wesentlich für den Schutz von MSC vor Kalzifizierung (siehe 2.3), was unter anderem über antiapoptotische Mechanismen erklärt werden kann, die von mTORC2 über Akt auf FoxO3a vermittelt werden [Feehan RP et al., *Cell Signal* 2016]. In einem Einzelscreening von 63 unterschiedlichen Urämietoxinen aus den Gruppen der wasserlöslichen und proteingebundenen Toxine sowie der Mittelmoleküle auf ihr Potenzial, eine osteoblastäre Differenzierung und Kalzifizierung von MSC zu induzieren, identifizierten wir die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und TNF- $\alpha$  als die potentesten Einzelkomponenten des urämischen Milieus [Hegner B et al., *Sci Rep* 2018]. Interessanterweise wirken beide Zytokine über eine Aktivierung von mTORC1 [Saxton RA et al., *Cell* 2017], die wir als wesentliches Merkmal der osteoblastären Differenzierung von MSC gesehen haben (siehe 2.3). Dies legt die

Vermutung nahe, dass der Arteriosklerose fördernde Effekt von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  auch über eine Aktivierung von mTORC1 in MSC mit konsekutiver osteoblastärer Differenzierung und Apoptose vermittelt wird.

### 3.3 Autophagie als mTOR-abhängiger Modulator der MSC-Kalzifizierung

Die früheste Veränderung, die wir auf Ebene der Zellschicksale im Verlauf der kalzifizierenden osteoblastären Transformation von MSC beobachten konnten, war eine Hemmung der Autophagie (siehe 2.3). Andererseits wurde durch die mTOR-Modulation mit Rapamycin der Autophagie-Flux aufrechterhalten und in der Folge die Kalzifizierung deutlich reduziert. Diese protektive Wirkung von Rapamycin wurde wiederum aufgehoben, wenn die Autophagie zusätzlich durch niedrige Konzentrationen von Bafilomycin A1 pharmakologisch blockiert wurde. Dies deutet darauf hin, dass der Autophagie eine zentrale Rolle in der Regulation des Übergangs von MSC von einem undifferenzierten Zustand hin zu osteoblastären kalzifizierenden Zellen zukommt. Dies ist besonders interessant, da die unter 1.2 beschriebene lebensverlängernde Wirkung, die in zahlreichen Organismen nach einer Unterbindung der mTORC1 Signaltransduktion zum Beispiel durch Rapamycin oder durch genetische Manipulationen beobachtet wurde, auch mit einer Aktivierung der Autophagie erklärt werden kann [Wilhelm T et al., FEBS J 2018]. Hierbei kommen zwei unterschiedliche Aspekte der Autophagie zu tragen, die auf unterschiedliche Weise bei der zellulären Reaktion auf Stress der Anpassung der Zelle dienen und als Überlebensmechanismus fungieren. Einerseits sichert Autophagie in Zeiten von Nährstoffmangel die Bereitstellung von grundlegenden Stoffwechselelementen, indem über diesen Prozess Zellbestandteile abgebaut und die Bausteine in den basalen Zellstoffwechsel eingebracht werden, um das Überleben der Zelle zu gewährleisten [Yang Z et al., Nat Cell Biol 2010]. Hieran zeigt sich die Bedeutung von mTORC1 für die Integration von Informationen über die Verfügbarkeit von Energie und Nährstoffen in die Steuerung des Zellmetabolismus [Saxton RA et al., Cell 2017], da Nährstoffmangel zu einer Inhibition von mTORC1 und dadurch zur Aktivierung von Autophagie führt [Kim J et al., Nat Cell Biol 2011]. Andererseits werden über Autophagie insbesondere solche Zellstrukturen abgebaut, die aufgrund von molekularer Schädigung ihre Funktionalität eingebüßt haben. Dies betrifft beispielsweise falsch gefaltete Proteine im Rahmen einer intrazellulären Qualitätskontrolle für Proteine, der sogenannten ‚Antwort auf

ungefaltete Proteine' (unfolded protein response, UPR), sowie geschädigte Zellorganellen. Solche Strukturen können die Funktion der gesamten Zelle nachhaltig stören und dazu führen, dass die betroffene Zelle in einen seneszenten Zustand übergeht oder das Apoptoseprogramm einleitet [Almanza A et al., FEBS J 2018]. Auf diese Weise trägt Autophagie wesentlich zur Erhaltung einer optimalen Zellfunktionalität bei, die im jugendlichen Organismus anzutreffen ist und im Laufe des Lebens und besonders unter der Einwirkung metabolischer und anderer pathologischer Stressoren abnimmt.

Von den in Kapitel 1.1 genannten neun typischen molekularen und zellphysiologischen Veränderungen, die mit dem Altern einhergehen [Lopez-Otin et al., Cell 2013], können somit zumindest drei durch die beschriebene Beeinflussung des mTOR-Systems positiv beeinflusst werden: Durch die Stärkung der Autophagie wird einem **Verlust des Proteomgleichgewichts**, der Proteostase, entgegengewirkt, was wiederum die **Induktion zellulärer Seneszenz** verhindert. Bezogen auf MSC als vaskuläre Vorläuferzellen bedeutet dies, dass der **Stammzellpool** erhalten bleibt und weiterhin seine regenerative Funktion ausüben kann.

### 3.4 Die protektive Wirkung der mTORC2-Aktivierung

Wir konnten in unseren Studien eindeutig unterschiedliche Aktivierungsmuster des mTOR-Netzwerks dem undifferenzierten, pluripotenten Vorläuferzellphänotyp von MSC einerseits und dem kalzifizierenden osteoblastenähnlichen Phänotyp andererseits zuordnen. Die Hemmung von mTORC1 mit gleichzeitiger starker Aktivierung von mTORC2 führte zu einer Steigerung des Autophagie-Fluxes, während zelluläre Seneszenz und Apoptose zurückgingen. Der undifferenzierte Phänotyp wurde stabilisiert und die Umwandlung zu Osteoblasten wurde verhindert. Bemerkenswerterweise war hierbei die mTORC2-Aktivierung ausschlaggebend, wie wir durch genetische und pharmakologische Interventionen zeigen konnten (siehe 2.3). Dies deutet auf eine bisher unbekannte Rolle von mTORC2 in der Stammzellbiologie hin. Im Zuge der osteoblastären Differenzierung von MSC beobachteten wir eine Aktivierung sowohl von mTORC1 als auch von mTORC2, was nach einer frühzeitigen Hemmung der Autophagie eine Zunahme von Seneszenz und Apoptose sowie schließlich die massive kalzifizierende Transformation der Zellen zur Folge hatte. Metabolische Zustände mit hohem kardiovaskulärem Risiko wie Diabetes mellitus Typ

2 und Adipositas durch hohe Kalorienzufuhr gehen typischerweise mit einer Aktivierung von mTORC1 einher [Laplante M et al., Cell 2012], so dass unsere Befunde eine Verbindung zu verminderter Stammzellfunktion von MSC und eingeschränktem Regenerationspotenzial perivaskulärer Progenitorzellen mit gesteigerter vaskulärer Vulnerabilität herstellen können.

Auch in anderen Krankheitsmodellen, die wir und andere Gruppen untersucht haben, führte eine Behandlung mit Rapamycin bzw. die Hemmung von mTORC1 mit parallel verlaufender Aktivierung von mTORC2 zu einer Abmilderung kardiovaskulärer Pathologien: Atherosklerose in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen wurde beispielsweise durch Rapamycin ebenso vermindert [Gadioli AL et al., Braz J Med Biol Res 2009] wie die Gefäßkalzifizierung in Ratten mit chronischer Niereninsuffizienz [Zhao Y et al., Kidney Int 2015]. In einer weiteren Studie mit Urämie induzierter Gefäßkalzifizierung in Mäusen kam es unter Rapamycinbehandlung zu einer verringerten Kalziumablagerung in der Aorta, die mit der Induktion von Autophagie in den beteiligten Zellen einherging [Frauscher B et al., Front Immunol 2018], was mit unseren Befunden in MSC übereinstimmt. Wir haben ein Mausmodell zur kardioresalen Interaktion etabliert, in dem uninephrektomierten Tieren ein Pellet mit kontinuierlicher Freisetzung des Mineralokortikoids Deoxykortikosteronazetat (DOCA) implantiert wurde. Zusätzlich erfolgte eine Kochsalzbelastung mit 1% NaCl-haltigem Trinkwasser. Ein konsekutiver Blutdruckanstieg wurde durch Gabe von Hydralazin verhindert. Nach sechs Wochen war eine konzentrische Myokardhypertrophie nachweisbar [Karatas A et al., Hypertension 2008]. Wurden die Tiere gleichzeitig mit Rapamycin behandelt, kam es bei männlichen Mäusen zu einer deutlichen Verringerung von Hypertrophie und Fibrose bei erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion und intaktem Kapillarnetz [Gürgen D et al., Hypertension 2013]. Dies war assoziiert mit vermindertem mTORC1- und verstärktem mTORC2-Signaling, vergleichbar mit dem Muster, welches MSC vor Kalzifizierung schützte (siehe 2.3). In einem Myokardinfarktmodell führte die Überexpression des inhibitorischen mTORC1-Modulators Proline Rich AKT Substrate of 40 kDa (PRAS40) ebenfalls zu einer Reduktion der mTORC1-Aktivität mit reziproker Steigerung der mTORC2-Aktivität, was zu einer Reduktion der Infarktgröße und Mortalität führte [Völkers M et al., Circulation 2013]. Auch hier war der Effekt von mTORC2 abhängig, wie weitere genetische Interventionen zeigten [Völkers M et al., Circulation 2013]. Die gleiche Gruppe hat mit ähnlichen Methoden der mTOR-Modulation in einem Modell für

druckinduzierte Myokardhypertrophie, der transaortalen Konstriktion, in Mäusen nachgewiesen, dass auch hier die Hemmung von mTORC1 mit gleichzeitiger Aktivierung von mTORC2 vor pathologischen Umbauprozessen schützte und die kardiale Pumpfunktion bewahrte [Völkers M et al., Proc Natl Acad Sci 2013]. All diese Befunde deuten darauf hin, dass eine Hemmung von mTORC1 mit gleichzeitiger Steigerung der mTORC2-Aktivität im kardiovaskulären System eine potente protektive Wirkung hat. Unsere Studien lassen außerdem erkennen, dass insbesondere mTORC2 hierbei von großer Bedeutung ist und dass die differenzielle Steuerung von Zellschicksalsprogrammen durch mTORC1 und mTORC2 wie die Förderung von Autophagie sowie die Unterdrückung von Seneszenz und Apoptose durch diese Signaltransduktionsmuster eine adaptive zelluläre Antwort ermöglicht. Dies bedeutet letztlich den Erhalt bzw. die Förderung der physiologischen Stressresistenz und des endogenen Regenerationspotenzials.

### 3.5 Ableitung klinischer Perspektiven

Bei der Übertragung dieser Erkenntnisse in die Klinik mit dem Ziel, durch eine gezielte mTOR-Modulation die Entstehung kardiovaskulärer Pathologien zu verhindern oder diese sogar ganz oder teilweise zu beheben, sind eine Vielzahl von Punkten zu berücksichtigen.

#### 3.5.1 Geschlechtsaspekte

Von großer Bedeutung sind hierbei geschlechtsspezifische Unterschiede im Ansprechen des mTOR-Signalnetzwerkes auf physiologische und pathologische Stimuli sowie auf therapeutische Interventionen. Die unter 1.2 erwähnte Lebensverlängerung von Mäusen durch Rapamycin war in Weibchen deutlicher ausgeprägt als in Männchen, wie eine Metaanalyse von 29 Studien zeigte [Swindell WR, J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2017]. In unserem oben genannten Mausmodell zur renokardialen Interaktion bei Mineralokortikoidexzess unter normotensiven Bedingungen waren weibliche Tiere vor einer Myokardhypertrophie geschützt [Karatas A et al., Hypertension 2008]. Diese Protektion war von intaktem Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ )-Signaling abhängig. ER $\beta$ -defiziente (ER $\beta^{-/-}$ ) weibliche Mäuse wiesen eine deutlich stärkere Hypertrophie des Myokards auf als männliche Mäuse [Gürgen D et al.,

Hypertension 2011]. Außerdem kam es bei diesen Tieren zu einer dilatativen statt einer konzentrischen Hypertrophie mit deutlicher Myokardfibrose, so dass ein Ausfall der Signaltransduktion über ER $\beta$  geschlechtsspezifisch zu einer maladaptiven kardialen Antwort bzw. zu einem Verlust der physiologischen protektiven Mechanismen in weiblichen Mäusen führte [Gürgen D et al., Hypertension 2011]. Die pharmakologische Modulation der mTOR-Signaltransduktion in diesem Modell, die wir in einer weiteren Arbeit untersuchten, resultierte in weiblichen Tieren ebenfalls in einer dilatativen linksventrikulären Hypertrophie mit Myokardfibrose und Verlust von Kapillaren, vergleichbar mit den Befunden in weiblichen ER $\beta$ <sup>-/-</sup>-Mäusen [Gürgen D et al., Hypertension 2013]. Weibliche Wildtypmäuse zeigten eine hohe intrinsische mTORC2-Aktivität. Sowohl die mTOR-Modulation mit Rapamycin als auch die genetische Ablation des ER $\beta$  führten in weiblichen Mäusen jedoch zu einer deutlichen Abnahme des mTORC2-Signalings, das auch unter DOCA/Salz nicht hochreguliert wurde [Gürgen D et al., Hypertension 2013]. Im Gegensatz dazu wirkte die Rapamycin-Intervention bei männlichen Mäusen umfassend protektiv, was mit einer Aktivierung von mTORC2 verbunden war (siehe oben). In Zellkulturexperimenten mit weiblichen Kardiomyozyten, die zur Nachahmung einer physiologischen Hypertrophie mit Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) stimuliert wurden, beobachteten wir, dass die mTORC2-Aktivität durch Rapamycin nur dann reduziert wurde, wenn die Zellen gleichzeitig mit 17 $\beta$ -Östradiol (E2) behandelt wurden [Kusch A et al., PLoS One 2015]. Auf funktioneller Ebene verminderte Rapamycin den trophischen Effekt von E2 auf die Kardiomyozyten, wie an einer geringeren Zellgröße abzulesen war. Außerdem war die Expression der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) 2A unter Rapamycin und E2 ebenfalls reduziert, was auf eine Einschränkung der Kontraktilität schließen lässt [Kusch A et al., PLoS One 2015]. Diese Ergebnisse zeigen eindrücklich, dass die basale Aktivität und die Responsivität des mTOR-Netzwerks auf endogene und exogene Stimuli geschlechtsspezifischen und hormonellen Unterschieden unterliegen, die gravierende Auswirkungen auf den Phänotyp und die Adaptationsfähigkeit des Organismus haben. Diese Besonderheiten müssen unbedingt bei klinischen Interventionen berücksichtigt werden und können zu differenzierten Strategien für prä- und postmenopausale Frauen sowie für Männer führen.

### 3.5.2 Alternative pharmakologische Interventionen zu Rapamycin

Rapamycin ist die prototypische Substanz zur pharmakologischen Beeinflussung der mTOR-Signaltransduktion. Dank dieses Moleküls wurde das bedeutende und komplexe mit mTOR zusammenhängende Netzwerk überhaupt erst entdeckt. Je mehr über dieses mTOR-Netzwerk bekannt wird, desto mehr stellt sich die Frage, ob andere pharmakologische Substanzen, mit denen man gezielter die erwünschten Modulationen des Signaling herbeiführen kann, für therapeutische Ansätze geeigneter sind. Rapamycin zeichnet sich durch eine potente Hemmung von vielen, aber nicht allen Funktionen von mTORC1 aus [Choo AY et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2008], während mTORC2 kontextabhängig reziprok aktiviert [Schaub T, Sci Rep 2019] oder durch eine Hemmung der Neubildung in der Aktivität reduziert [Sarbasov DD et al., Mol Cell 2006; Lamming DW et al., Science 2012] werden kann. Gerade eine verminderte mTORC2-Funktion scheint sich in vielen Fällen negativ auszuwirken, wie nicht nur unsere eigenen oben genannten Untersuchungen zeigen. So kann z. B. die Entstehung von Proteinurie und Fokal-segmentaler Glomerulosklerose in nierentransplantierten Patienten mit Rapamycin als Immunsuppressivum durch eine Reduktion der mTORC2-Aktivität in Podozyten mit konsekutiv gestörter Podozytenarchitektur und -funktion erklärt werden [Vollenbröker B et al., Am J Physiol Renal Physiol 2009]. Auch die negativen Auswirkungen von Rapamycin auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel werden mit einer Hemmung von mTORC2 bei Langzeitexposition gegenüber hohen Konzentrationen in Verbindung gebracht. In Mäusen führte eine Abnahme der mTORC2-Aktivität zu einer Reduktion der Lebenserwartung, während in Fliegen eine gesteigerte mTORC2-Aktivität positiv mit Langlebigkeit assoziiert war [Review in Green CL et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2022]. Neu entwickelte mTOR-Kinaseinhibitoren wie z.B. Sapanisertib, die gleichermaßen mTORC1 und mTORC2 durch Bindung an die katalytische Domäne von mTOR hemmen, oder gar duale PI3K/mTOR-Inhibitoren, die darüber hinaus auch die PI3K hemmen (z.B. Bimiralisib), mögen vielleicht in der Tumorthherapie einen Stellenwert haben. In diesem Setting kann eine möglichst starke Hemmung aller Signalwege, die Proliferation und Zellüberleben fördern, sinnvoll sein. Für einen regenerativen Ansatz chronischer Erkrankungen scheinen sie allerdings ungeeignet, da substanzielle unerwünschte Wirkungen zu erwarten sind und ein protektiver Effekt, der ja augenscheinlich, wie in dieser Arbeit gezeigt, wesentlich von einer Aktivierung von mTORC2 abhängig ist, nicht erwartet werden kann. Andererseits könnte die gezielte pharmakologische Hemmung von mTORC1 durch spezifische

Blocker [Lee BJ et al., Nat Chem Biol 2021] mit gleichzeitiger Aktivierung von mTORC2 durch ebenfalls spezifische Aktivatoren genau dasjenige Signaltransduktionsmuster induzieren, welches in dieser und anderen Arbeiten als protektiv gegen kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert wurde. Mögliche nachteilige Wirkungen auf Tumorentstehung und -progression, die eventuell aus einer mTORC2-Aktivierung resultieren können, müssen jedoch beachtet werden, auch wenn die reziproke mTORC2-Stimulation durch Rapamycin keinen solchen Effekt zeigte.

### 3.5.3 Nicht-pharmakologische Beeinflussung des mTOR-Netzwerks

Auch nicht-pharmakologische Interventionen können das mTOR-Netzwerk modulieren und bedeutende biologische Effekte hervorrufen, die sich prophylaktisch und therapeutisch nutzen lassen. Insbesondere die Zufuhr von Nährstoffen bietet unzählige Möglichkeiten der Einflussnahme, da die Hauptfunktion von mTOR die Steuerung gerade derjenigen Prozesse ist, die von der Verfügbarkeit biologisch verwertbarer Makromoleküle abhängen. Ein prominentes Beispiel ist die sogenannte ‚Kalorienrestriktion‘, also die Verminderung der Kalorienzufuhr auf ein niedrigeres Maß, das jedoch nicht zur Malnutrition führt. Hierdurch kann in ähnlich vielen Organismen eine Lebensverlängerung bewirkt werden wie durch eine pharmakologische oder genetische Reduktion der mTOR-Signaltransduktion [Saxton RA et al., Cell 2017]. In Hefen, Würmern und Fliegen mit vermindertem mTOR-Signaling hat eine zusätzliche Kalorienrestriktion keinen additiven Effekt auf die Verlängerung der Lebenszeit [Saxton RA et al., Cell 2017; Kaeberlein M et al., Science 2005; Hansen M et al., Aging Cell 2007; Kapahi P et al., Curr Biol 2004]. Andere Studien haben jedoch auch Hinweise auf nicht überlappende Effekte von Rapamycin und Kalorienrestriktion gefunden, vor allem in Säugetieren [Fok WC et al., J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2013; Yu Z et al., J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2015]. Die mTOR-abhängigen Mechanismen werden hierbei wesentlich in der Aufrechterhaltung der Proteostase durch eine Vermeidung der Akkumulation proteotoxischer Elemente als Folge sowohl einer verminderten Synthese als auch eines vermehrten Abbaus durch Steigerung der Autophagie vermutet [Saxton RA et al., Cell 2017]. Dies kann unter anderem auch die Funktion und das Regenerationspotenzial von Stammzellen verbessern. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Kalorienreduktion mTORC1-abhängig indirekt über eine Beeinflussung der Stammzellnische zu einer



Verbesserung der Selbsterneuerung intestinaler Stammzellen führt [Yilmaz ÖH et al., Nature 2012]. Neben der reinen Reduktion der zugeführten Kalorienmenge werden auch Interventionen geprüft, die nicht die Gesamtkalorien modifizieren, sondern lediglich die Zusammensetzung der Makronährstoffe verändern wie z.B. durch eine spezifische Reduktion der Proteine oder sogar nur einzelner essentieller Aminosäuren. Andere Ansätze beziehen sich auf die zeitliche Verteilung der Kalorienzufuhr mit unterschiedlich gestalteten Fastenphasen wie beim sogenannten Intervallfasten [Review: Green CL et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2022].

Eine Aktivierung von mTORC2 kann auch durch körperliche Aktivität erzielt werden, wie in einem Mausmodell zumindest in der Muskulatur gezeigt wurde [Kleinert M et al., J Physiol 2017]. Ob ein solcher Effekt auch in anderen Geweben wie der Gefäßwand oder in Vorläuferzellen wie MSC auftritt und inwieweit dies zu einer Verbesserung der kardiovaskulären Gesundheit durch Sport beiträgt, muss noch untersucht werden.

Auf der anderen Seite stehen Prozesse, durch die im Überschuss vorhandene Nährstoffe und Energie in Form von Makromolekülen gespeichert werden. Dies geschieht über die gleichzeitige Aktivierung von mTORC1 und mTORC2 durch Insulin. Hierdurch wird die Aufnahme von Glukose in die Zellen des Organismus gefördert, wo sie in Form von Glykogen gespeichert wird. Gleichzeitig werden Aminosäuren durch mTORC1 vermittelt in Muskelmasse umgewandelt. Auch die langfristige Speicherung von Energie in Form von Triglyzeriden im Fettgewebe wird durch die postprandiale Aktivierung von mTORC1 gesteuert [Review von Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020]. Physiologischerweise wechseln sich Phasen der Nährstoffzufuhr mit solchen von Nährstoffmangel ab, so dass es zu einem Wechsel von mTOR-Aktivierung und -Hemmung kommt. Werden jedoch dauerhaft Nährstoffe im Überschuss zugeführt, befindet sich der mTORC1-Weg ständig im aktivierten Zustand. Dies führt über Rückkopplungsmechanismen auf die PI3K zu einem verminderten Ansprechen auf Insulin und somit zur Insulinresistenz, die für den Diabetes mellitus Typ 2 charakteristisch ist [Liu GY et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2020]. Eine dauerhafte Aktivierung von mTORC1 durch übermäßige Nahrungszufuhr läuft den in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen zur Erhaltung der regenerativen Funktionen von MSC als Vorläuferzellen für glatte Gefäßmuskelzellen entgegen. Daher ist es denkbar, dass das hohe vaskuläre Risiko bei Adipositas und insbesondere bei Diabetes mellitus auch auf eine beeinträchtigte Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase als Folge einer gestörten Stammzellfunktion von perivaskulären MSC zurückzuführen ist.

### 3.5.4 mTOR und Diabetes mellitus Typ 2

Generell sinkt mit besserer Kontrolle des Blutzuckerspiegels das mikrovaskuläre Risiko bei Diabetikern unabhängig davon, wie die Blutzuckerkontrolle erreicht wurde [UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, Lancet 1998 (1)]. Bemerkenswerterweise wurde jedoch als erstes für Metformin im Vergleich zu Insulin ein zusätzlich schützender Effekt hinsichtlich kardiovaskulärer Mortalität in adipösen Typ 2-Diabetikern nachgewiesen [UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, Lancet 1998 (2); Holmann RR et al., N Engl J Med 2008]. Während Insulin mTORC1 und mTORC2 stimuliert und bekanntermaßen zu einer Gewichtszunahme führt, hemmt Metformin mTORC1 [Howell JJ et al., Cell Metab 2017] und hat eine Gewichtsreduktion zur Folge. Der kardiovaskuläre Zusatznutzen von Metformin über die reine Blutzuckersenkung hinaus könnte somit auf einer günstigen Modulation des mTOR-Netzwerkes beruhen, die unter anderem das regenerationsfördernde Potenzial von MSC stärkt, während Insulin hier nachteilig wirken könnte. Erst in jüngster Zeit wurden durch die Fokussierung der klinischen Studien bei der Prüfung neuer Antidiabetika auf kardiovaskuläre und Mortalitätsendpunkte neue Substanzklassen mit überzeugender Beeinflussung dieser relevanten Endpunkte identifiziert. Insbesondere die Inhibitoren des Natrium-Glukose-Kotransporters Typ 2 (sodium-glucose linked transporter 2; SGLT2) und die Analoga des Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) sind hier hervorzuheben. Ihre Auswirkungen auf das mTOR-Netzwerk und insbesondere auf vaskuläre Vorläuferzellen sollten näher untersucht werden. Sowohl für SGLT2-Inhibitoren als auch für GLP-1-Analoga wurde bereits in ersten Studien gezeigt, dass sie ähnlich wie Metformin über die Adenosinmonophosphat abhängige Kinase (AMPK) mTORC1 hemmen und Autophagie stimulieren [Yang L et al., Cell Signal 2022; Yang S et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 2020].

### 3.5.5 Mögliche Nachteile einer mTORC-1-Inhibition

Bei allen Interventionen, die auf eine Hemmung von mTORC1 zielen, ist zu bedenken, dass das mTORC1-Signaling für anabole Prozesse wie den Aufbau von Muskelmasse unerlässlich ist. Dies könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass eine Abschwächung der mTORC1-Signale z.B. durch Kalorienrestriktion oder die genannten Antidiabetika zwar kardiovaskuläre Endpunkte reduzieren und das Leben verlängern kann, andererseits aber die Gefahr mit sich bringt, zu einem Verlust an Skelettmuskulatur zu

führen oder zumindest deren Aufbau zu hemmen. Ein Mangel an Skelettmuskelmasse, die sogenannte Sarkopenie, ist ein häufiges Problem geriatrischer Patienten. Durch die damit verbundene Abnahme an Muskelkraft kommt es zu einer deutlich erhöhten Sturzgefahr. Stürze haben wiederum durch Frakturen der zudem häufig osteopenen oder osteoporotischen Knochen eine substantielle Morbidität mit Verlust an Lebensqualität zur Folge. Untersuchungen in Nagern und Primaten zeigten jedoch, dass eine Kalorienrestriktion die altersbedingte Sarkopenie und den damit verbundenen Kraftverlust sogar verzögert und auch die Gebrechlichkeit messbar reduziert [Marzetti E et al., *Biofactors* 2009; Yamada Y et al., *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2018]. Daher sind möglicherweise auch beim Menschen diätetische oder pharmakologische Interventionen, die die mTORC1-Aktivität senken, nicht mit einem höheren Sarkopenie- und Sturzrisiko verbunden, sondern eher protektiv gegen Gebrechlichkeit. Diese Zusammenhänge und mögliche Unterschiede zwischen einzelnen Maßnahmen müssen in Zukunft erforscht werden.

Unsere Untersuchungen zeigten außerdem, dass die osteoblastäre Differenzierung und Kalzifizierung von MSC durch Hemmung von mTORC1 und Aktivierung von mTORC2 beeinträchtigt wird. Während dieser Effekt in der Gefäßwand durch die damit verbundene Reduktion von Arteriosklerose wünschenswert ist, kann er im Knochen, wo MSC als Vorläufer von Osteoblasten fungieren [Wang X et al., *Int Orthop* 2013], die Ausbildung von Osteopenie und Osteoporose verstärken. Knochen und Gefäßsystem stehen miteinander in Wechselwirkung und werden oft entgegengesetzt über endokrinologische und metabolische Signale reguliert [Thompson B et al., *Nat Rev Endocrinol* 2012]. So können fehlgesteuerte Differenzierungsprozesse einerseits zu einem Verlust an kalkhaltiger Knochenmatrix und andererseits zu einer verstärkten Gefäßverkalkung führen [Pennisi P et al., *Osteoporos Int* 2004; Hamerman D, *QJM* 2005]. Hier sind weitere Studien erforderlich, um die Auswirkungen der mTOR-Modulation durch unterschiedliche antidiabetische Therapieprinzipien und nicht-pharmakologischer Interventionen auf Sarkopenie, Gebrechlichkeit (‘Frailty’), Sturzneigung, Frakturhäufigkeit und Lebensqualität zu erforschen. Gerade beim geriatrischen Patienten rückt die Lebensqualität gegenüber einer reinen Lebensverlängerung häufig in den Vordergrund.

### 3.6 Seneszenz und senolytische Therapieansätze

Ein wichtiger Aspekt unserer Forschung war der Einfluss des mTOR-Netzwerkes auf die zentralen Zellschicksale Autophagie, Apoptose und Seneszenz. Diese unterschiedlichen Programme stehen in enger Wechselwirkung miteinander und können je nach Zelltyp und Kontext einander bedingen, verhindern oder sequenziell folgen. So kann Autophagie, wie oben dargestellt, vor Seneszenz schützen. Andererseits ist in seneszenten Zellen ein als ‚senescent cell antiapoptotic pathway‘ (SCAP) bezeichneter Mechanismus aktiv, der Apoptose und Zelltod verhindert [Review Kudlova N et al., Int J Mol Sci 2022]. Seneszenz bezeichnet das dauerhafte Einstellen der Zellteilung als Reaktion auf interne und externe Einflüsse wie Telomerverkürzung, DNA-Schädigung, epigenetische Veränderungen oder die Aktivierung von Onkogenen aber auch mitochondriale Dysfunktion, oxidativen Stress und metabolische Entgleisungen [Kudlova N et al., Int J Mol Sci 2022]. Die Akkumulation seneszenten Zellen beeinträchtigt zunehmend die Regenerationsfähigkeit des betroffenen Gewebes, so dass degenerative Schäden eintreten, die man typischerweise in einem alternden Organismus findet. Daher zählt Seneszenz zu den zentralen biologischen Veränderungen des Alterns (siehe 1.1). In den letzten Jahren wurden Ansätze entwickelt, die auf seneszenten Zellen abzielen [Kudlova N et al., Int J Mol Sci 2022]. Es wurden mehrere molekulare Ziele identifiziert, die zum Teil durch bereits bekannte Naturstoffe oder Pharmaka beeinflusst werden. Der mTOR-Signalweg und sein bisher am besten untersuchter Modulator, das Rapamycin, greifen an mehreren Stellen nicht nur in die Entwicklung von Seneszenz ein, sondern beeinflussen auch ihre Auswirkungen. Neben den bereits oben erläuterten Wirkungen auf die Seneszenzentstehung über Autophagieregulation interferiert mTOR mit dem sogenannten Seneszenz assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) [Herranz N et al., Nat Cell Biol 2015]. Seneszenten Zellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die sie in ihre Umgebung sezernieren. Dort entfalten sie sowohl autokrine als auch parakrine Wirkungen [Calcinotto A et al., Physiol Rev 2019]. Rapamycin reduziert beispielsweise die Interleukin-1 $\alpha$ -Expression und wirkt so der Ausbildung des SASP entgegen [Laberge RM et al., Nat Cell Biol 2015]. Viele Komponenten des SASP üben wiederum ihre Wirkung über das mTOR-Netzwerk aus [Calcinotto A et al., Physiol Rev 2019], so dass auch hier Rapamycin modulierend eingreifen kann. Den protektiven Einfluss einer mTOR-Modulation mit Rapamycin auf das SASP und die Regenerationsfähigkeit von Organen konnten wir

wie unter 2.5 beschrieben in einem Rattenmodell für Nierentransplantation zeigen. Auch für Metformin sind entsprechende Effekte gezeigt worden [Moiseeva O et al., *Aging Cell* 2013]. Ein weitergehender Ansatz ist die Elimination seneszenter Zellen aus Geweben oder Organismen, um so deren Regenerationsfähigkeit zu erhalten oder wiederherzustellen. Hierbei kommen Substanzen zum Einsatz, die z.B. durch die Inhibierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Navitoclax) oder die Hemmung von PI3K und Tyrosinkinase (Dasatinib, Quercetin) die seneszenzvermittelte Apoptosehemmung durchbrechen [Kudlova N et al., *Int J Mol Sci* 2022]. Diese ‚Senolytika‘ genannten Substanzen sind zwar in vitro und in vivo effektiv, wirken aber nicht spezifisch auf seneszente Zellen. Dadurch haben sie bedeutsame Nebenwirkungen, so dass klinische Studien bisher nicht durchgeführt wurden [Kirkland JL et al., *J Intern Med* 2020; Wissler Gerdes EO et al., *Mech Ageing Dev* 2021].

Als mögliche Interventionen zur Reduktion zellulärer Seneszenz mit dem Ziel, das endogene Regenerationspotenzial zu steigern, stehen somit derzeit die nicht-pharmakologischen Maßnahmen im Sinne einer Kalorienrestriktion bzw. Diätmodifikation sowie körperlichem Training [Bouzid MA et al., *Sports Med* 2015] und im Bereich der Pharmakologie Metformin und Rapamycin sowie verschiedene antioxidative Strategien [Kudlova N et al., *Int J Mol Sci* 2022] zur Verfügung. Um eine sichere und effektive Stärkung der endogenen Regeneration zu erreichen, die ein Altern in Gesundheit mit größtmöglicher Autonomie ermöglicht, bedarf es weiterer intensiver Forschung.

#### 4. Zusammenfassung

Dank des medizinischen Fortschritts ist die Lebenserwartung in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen. Chronische Erkrankungen vor allem des kardiovaskulären Systems schmälern jedoch diesen Erfolg, da durch sie die Jahre in Gesundheit nicht in gleichem Maße zugenommen haben. Die Folge ist eine alternde Gesellschaft mit hoher Krankheitslast und zunehmendem Pflegebedarf. Die Stärkung endogener regenerativer Ressourcen könnte eine anhaltende Resistenz gegenüber pathogenen Stimuli bis ins hohe Alter ermöglichen, so dass der Anteil gesunder Lebensjahre zunimmt und zu mehr Lebensqualität bei geringerer Belastung des Gesundheits- und Pflegesektors führt.

Die hier dargestellten Arbeiten zeigen, wie eine Modulation des mTOR-Signalnetzwerkes protektive Mechanismen auf zellulärer Ebene aktivieren kann, die vor pathologischen vorzeitigen Alterungsprozessen und altersassoziierten Erkrankungen schützen können. Insbesondere der Hemmung von mTORC1 bei gleichzeitiger Aktivierung von mTORC2 kommt hierbei eine herausragende Bedeutung zu: In humanen MSC, die als Vorläuferzellen für glatte Gefäßmuskelzellen ein relevantes Beispiel für den vaskulären Regenerationsapparat darstellen, wurde durch dieses Aktivierungsmuster des mTOR-Netzwerkes Autophagie gefördert und in der Folge zelluläre Seneszenz und Apoptose verhindert. Insgesamt resultierte diese Aktivierung protektiver Zellschicksale in einer Reduktion osteoblastärer Differenzierung und einem Schutz vor Kalzifizierung. Hieraus lässt sich das Potenzial ableiten, über eine entsprechende Beeinflussung des mTOR-Netzwerkes die endogene Regenerationsfähigkeit des Gefäßsystems durch MSC als vaskulären Progenitorzellen aufrechtzuerhalten. Außerdem stabilisierte der mTOR-Modulator Rapamycin in MSC einen kontraktile glattmuskulären Phänotyp. Als weiteres Beispiel diente ein Nierentransplantationsmodell der Ratte. Hier zeigte Rapamycin in der unmittelbaren Posttransplantationsphase eine deutliche Reduktion zellulärer Seneszenz in multiplen Organkompartimenten ohne negative Auswirkungen auf die vaskuläre Integrität und die Rückbildung des Konservierungs-Reperfusionsschadens. Hierdurch kann die Regenerationsfähigkeit der transplantierten Niere auch gegenüber künftigen schädigenden Einflüssen erhalten bleiben, so dass sie besser vor interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie geschützt ist.

Eine gezielte Beeinflussung des mTOR-Netzwerkes durch pharmakologische und nicht-pharmakologische Maßnahmen könnte über eine Aktivierung protektiver Zellschicksale das endogene Regenerationspotenzial körpereigener Vorläuferzellen erhalten und so vor vorzeitiger Alterung in Folge pathogener Stimuli und vor degenerativen Schäden im Alter schützen. Dies könnte eine Verlängerung der Gesundheitserwartung ermöglichen und so die Bedarfssteigerung finanzieller und humaner Ressourcen trotz des demographischen Wandels hin zu einer immer älteren Gesellschaft dämpfen.

## 5. Literaturangaben

Almanza A, Carlesso A, Chinthia C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 2019;286(2):241-278.

doi:10.1111/febs.14608

Bautch VL. Stem cells and the vasculature. *Nat Med.* 2011;17(11):1437-1443.

doi:10.1038/nm.2539

Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN, et al. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons. *Cell Transplant.* 2006;15(8-9):711-721.

doi:10.3727/000000006783981503

Bitto A, Ito TK, Pineda VV, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife.* 2016;5:e16351. doi:10.7554/eLife.16351

Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, et al. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* 2010;11(1):35-46.

doi:10.1016/j.cmet.2009.11.010

Bouزيد MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports Med.* 2015;45(9):1245-1261. doi:10.1007/s40279-015-0348-1

Brown EJ, Albers MW, Shin TB, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature.* 1994;369(6483):756-758. doi:10.1038/369756a0

Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1047-1078.

doi:10.1152/physrev.00020.2018

Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(45):17414-17419. doi:10.1073/pnas.0809136105

Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-313.

doi:10.1016/j.stem.2008.07.003

de Souza LE, Malta TM, Kashima Haddad S, Covas DT. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related?. *Stem Cells Dev.* 2016;25(24):1843-1852.

doi:10.1089/scd.2016.0109

Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):715-723.

doi:10.1161/ATVBAHA.113.302070

Dibble CC, Elis W, Menon S, et al. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell.* 2012;47(4):535-546. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.009



- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Düvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010;39(2):171-183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022
- Edelman DA, Jiang Y, Tyburski J, Wilson RF, Steffes C. Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. *J Surg Res*. 2006;135(2):305-311. doi:10.1016/j.jss.2006.06.010
- Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984;37(10):1231-1237. doi:10.7164/antibiotics.37.1231
- Feehan RP, Shantz LM. Negative regulation of the FOXO3a transcription factor by mTORC2 induces a pro-survival response following exposure to ultraviolet-B irradiation. *Cell Signal*. 2016;28(8):798-809. doi:10.1016/j.cellsig.2016.03.013
- Fok WC, Zhang Y, Salmon AB, et al. Short-term treatment with rapamycin and dietary restriction have overlapping and distinctive effects in young mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013;68(2):108-116. doi:10.1093/gerona/gls127
- Frauscher B, Kirsch AH, Schabhüttl C, et al. Autophagy Protects From Uremic Vascular Media Calcification. *Front Immunol*. 2018;9:1866. Published 2018 Aug 14. doi:10.3389/fimmu.2018.01866
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403. doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-340. doi:10.1097/00007890-197404000-00001
- Gadioli AL, Nogueira BV, Arruda RM, et al. Oral rapamycin attenuates atherosclerosis without affecting the arterial responsiveness of resistance vessels in apolipoprotein E-deficient mice. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(12):1191-1195. doi:10.1590/s0100-879x2009005000036
- García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*. 2008;416(3):375-385. doi:10.1042/BJ20081668
- GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [published correction appears in *Lancet*. 2019 Jun

22;393(10190):e44]. *Lancet*. 2018;392(10159):1859-1922. doi:10.1016/S0140-6736(18)32335-3

Green CL, Lamming DW, Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(1):56-73. doi:10.1038/s41580-021-00411-4

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*. 2006;11(6):859-871. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007

Gürgen D, Hegner B, Kusch A, et al. Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Hypertension*. 2011;57(3):648-654. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.166157

Gürgen D, Kusch A, Klewitz R, et al. Sex-specific mTOR signaling determines sexual dimorphism in myocardial adaptation in normotensive DOCA-salt model. *Hypertension*. 2013;61(3):730-736. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00276

Hamerman D. Osteoporosis and atherosclerosis: biological linkages and the emergence of dual-purpose therapies. *QJM*. 2005;98(7):467-484. doi:10.1093/qjmed/hci077

Hansen M, Taubert S, Crawford D, Libina N, Lee SJ, Kenyon C. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2007;6(1):95-110. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00267.x

Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-395. doi:10.1038/nature08221

Hegner B, Schaub T, Catar R, et al. Intrinsic Deregulation of Vascular Smooth Muscle and Myofibroblast Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Systemic Sclerosis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153101. doi:10.1371/journal.pone.0153101

Hegner B, Schaub T, Janke D, et al. Targeting proinflammatory cytokines ameliorates calcifying phenotype conversion of vascular progenitors under uremic conditions in vitro. *Sci Rep*. 2018;8(1):12087. doi:10.1038/s41598-018-30626-z

Herranz N, Gallage S, Mellone M, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype [published correction appears in *Nat Cell Biol*. 2015 Oct;17(10):1370]. *Nat Cell Biol*. 2015;17(9):1205-1217. doi:10.1038/ncb3225

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*. 1996;32(4):687-698.

Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, et al. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation*. 2002;106(12 Suppl 1):1143-1150.

Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359(15):1577-1589. doi:10.1056/NEJMoa0806470

Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005;123(4):569-580. doi:10.1016/j.cell.2005.10.024

Howell JJ, Hellberg K, Turner M, et al. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab*. 2017;25(2):463-471. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.009

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>; abgerufen 19.03.2022

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [published correction appears in Nature. 2007 Jun 14;447(7146):879-80]. *Nature*. 2002;418(6893):41-49. doi:10.1038/nature00870

Kaeberlein M, Powers RW 3rd, Steffen KK, et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*. 2005;310(5751):1193-1196. doi:10.1126/science.1115535

Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol*. 2004;14(10):885-890. doi:10.1016/j.cub.2004.03.059

Karatas A, Hegner B, de Windt LJ, et al. Deoxycorticosterone acetate-salt mice exhibit blood pressure-independent sexual dimorphism. *Hypertension*. 2008;51(4):1177-1183. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107938

Keith CT, Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science*. 1995;270(5233):50-51. doi:10.1126/science.270.5233.50

Khan SS, Singer BD, Vaughan DE. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell*. 2017;16(4):624-633. doi:10.1111/accel.12601

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152

Kirkland JL, Tchkonina T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med*. 2020;288(5):518-536. doi:10.1111/joim.13141

Kleinert M, Parker BL, Fritzen AM, et al. Mammalian target of rapamycin complex 2 regulates muscle glucose uptake during exercise in mice. *J Physiol*. 2017;595(14):4845-4855. doi:10.1113/JP274203

Kramann R, Goettsch C, Wongboonsin J, et al. Adventitial MSC-like Cells Are Progenitors of Vascular Smooth Muscle Cells and Drive Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):628-642. doi:10.1016/j.stem.2016.08.001

- Kudlova N, De Sanctis JB, Hajduch M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4168. doi:10.3390/ijms23084168
- Kusch A, Schmidt M, Gürgen D, et al. 17 $\beta$ -Estradiol regulates mTORC2 sensitivity to rapamycin in adaptive cardiac remodeling. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123385. doi:10.1371/journal.pone.0123385
- Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation [published correction appears in *Nat Cell Biol.* 2021 May;23(5):564-565]. *Nat Cell Biol.* 2015;17(8):1049-1061. doi:10.1038/ncb3195
- Lamming DW, Ye L, Katajisto P, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science.* 2012;335(6076):1638-1643. doi:10.1126/science.1215135
- Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017
- Lee BJ, Boyer JA, Burnett GL, et al. Selective inhibitors of mTORC1 activate 4EBP1 and suppress tumor growth [published correction appears in *Nat Chem Biol.* 2021 Jun 29;:] [published correction appears in *Nat Chem Biol.* 2021 Nov;17(11):1209]. *Nat Chem Biol.* 2021;17(10):1065-1074. doi:10.1038/s41589-021-00813-7
- Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jan 31;:]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(4):183-203. doi:10.1038/s41580-019-0199-y
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol.* 1977;55(1):48-51. doi:10.1139/y77-007
- Marzetti E, Lees HA, Wohlgemuth SE, Leeuwenburgh C. Sarcopenia of aging: underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction. *Biofactors.* 2009;35(1):28-35. doi:10.1002/biof.5
- Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- $\kappa$ B activation. *Ageing Cell.* 2013;12(3):489-498. doi:10.1111/accel.12075
- Neven E, De Schutter TM, De Broe ME, D'Haese PC. Cell biological and physicochemical aspects of arterial calcification. *Kidney Int.* 2011;79(11):1166-1177. doi:10.1038/ki.2011.59
- Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther.* 2006;14(6):840-850. doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.016

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60. doi:10.1002/9780470513637.ch4

Pennisi P, Signorelli SS, Riccobene S, et al. Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels. *Osteoporos Int*. 2004;15(5):389-395. doi:10.1007/s00198-003-1550-9

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143

Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20. doi:10.1161/01.RES.0000135902.99383.6f

Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med*. 2019;4:22. doi:10.1038/s41536-019-0083-6

Powers RW 3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*. 2006;20(2):174-184. doi:10.1101/gad.1381406

Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*. 2000;87(11):1055-1062. doi:10.1161/01.res.87.11.1055

Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, et al. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab*. 2012;15(5):713-724. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.007

Rousseau A, Bertolotti A. An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature*. 2016;536(7615):184-189. doi:10.1038/nature18943

Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35-43. doi:10.1016/0092-8674(94)90570-3

Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, et al. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1995;270(2):815-822. doi:10.1074/jbc.270.2.815

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22(2):159-168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029

Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease [published correction appears in *Cell*. 2017 Apr 6;169(2):361-371]. *Cell*. 2017;168(6):960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004

Schaub T, Janke D, Zickler D, et al. High cut-off dialysis mitigates pro-calcific effects of plasma on vascular progenitor cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):1144. doi:10.1038/s41598-020-80016-7

Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo).* 1975;28(10):727-732. doi:10.7164/antibiotics.28.727

Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1423-1430. doi:10.1161/01.ATV.0000220441.42041.20

Shroff RC, McNair R, Figg N, et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation.* 2008;118(17):1748-1757. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783738

Swindell WR. Meta-Analysis of 29 Experiments Evaluating the Effects of Rapamycin on Life Span in the Laboratory Mouse. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72(8):1024-1032. doi:10.1093/gerona/glw153

Thompson B, Towler DA. Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(9):529-543. doi:10.1038/nrendo.2012.36

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). [published correction appears in *Lancet* 1999 Aug 14;354(9178):602]. *Lancet.* 1998;352(9131):837-853. (1)

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). [published correction appears in *Lancet* 1998 Nov 7;352(9139):1558]. *Lancet.* 1998;352(9131):854-865. (2)

Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature.* 2003;426(6967):620. doi:10.1038/426620a

Völkers M, Konstandin MH, Doroudgar S, et al. Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. *Circulation.* 2013;128(19):2132-2144. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003638

Völkers M, Toko H, Doroudgar S, et al. Pathological hypertrophy amelioration by PRAS40-mediated inhibition of mTORC1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(31):12661-12666. doi:10.1073/pnas.1301455110

Vollenbröcker B, George B, Wolfgart M, Saleem MA, Pavenstädt H, Weide T. mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(2):F418-F426. doi:10.1152/ajprenal.90319.2008

- Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop*. 2013;37(12):2491-2498. doi:10.1007/s00264-013-2059-2
- Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet*. 2016;388(10041):276-284. doi:10.1016/S0140-6736(16)30508-6
- White WE, Yaqoob MM, Harwood SM. Aging and uremia: Is there cellular and molecular crossover?. *World J Nephrol*. 2015;4(1):19-30. doi:10.5527/wjn.v4.i1.19
- Wilhelm T, RIchly H. Autophagy during ageing - from Dr Jekyll to Mr Hyde. *FEBS J*. 2018;285(13):2367-2376. doi:10.1111/febs.14453
- Wissler Gerdes EO, Misra A, Netto JME, Tchkonja T, Kirkland JL. Strategies for late phase preclinical and early clinical trials of senolytics. *Mech Ageing Dev*. 2021;200:111591. doi:10.1016/j.mad.2021.111591
- Wu SH, Yu JH, Liao YT, et al. Comparison of the Infant and Adult Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Proliferation, Senescence, Anti-oxidative Ability and Differentiation Potential. *Tissue Eng Regen Med*. 2022;19(3):589-601. doi:10.1007/s13770-022-00431-x
- Yamada Y, Kemnitz JW, Weindruch R, Anderson RM, Schoeller DA, Colman RJ. Caloric Restriction and Healthy Life Span: Frail Phenotype of Nonhuman Primates in the Wisconsin National Primate Research Center Caloric Restriction Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73(3):273-278. doi:10.1093/gerona/glx059
- Yang L, Liang B, Li J, et al. Dapagliflozin alleviates advanced glycation end product induced podocyte injury through AMPK/mTOR mediated autophagy pathway. *Cell Signal*. 2022;90:110206. doi:10.1016/j.cellsig.2021.110206
- Yang S, Lin C, Zhuo X, et al. Glucagon-like peptide-1 alleviates diabetic kidney disease through activation of autophagy by regulating AMP-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;319(6):E1019-E1030. doi:10.1152/ajpendo.00195.2019
- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010;12(9):814-822. doi:10.1038/ncb0910-814
- Yilmaz ÖH, Katajisto P, Lamming DW, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*. 2012;486(7404):490-495. doi:10.1038/nature11163
- Yu Z, Wang R, Fok WC, Coles A, Salmon AB, Pérez VI. Rapamycin and dietary restriction induce metabolically distinctive changes in mouse liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(4):410-420. doi:10.1093/gerona/glu053
- Zhao Y, Zhao MM, Cai Y, et al. Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation. *Kidney Int*. 2015;88(4):711-721. doi:10.1038/ki.2015.160

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich Duska Dragun danken. Von Duska habe ich in vielen intensiven Jahren unendlich viel über Wissenschaft und Medizin, aber dank ihrer breit gefächerten Interessen auch in anderen Bereichen des Lebens und der Kultur gelernt. Ihr verdanke ich einen großen Teil des mir heute zur Verfügung stehenden ‚Handwerkszeugs‘. Von ihr kamen viele großartige Ideen, die die hier dargestellten Arbeiten wesentlich geprägt haben. Leider durfte sie diesen wichtigen Meilenstein unserer gemeinsamen Arbeit nicht mehr erleben.

Kai-Uwe Eckardt danke ich für die großzügige Unterstützung und für wertvolle Ratschläge zu meiner Habilitation und weiteren Forschungstätigkeit. Als ‚Externer‘ fühle ich mich in der Nephrologie der Charité weiterhin heimisch und stets willkommen.

Mein großer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Duska Dragun, allen voran Theres und Dennis, die nicht nur ganz wesentlichen Anteil an zahlreichen Projekten und Publikationen haben, sondern mittlerweile über viele Jahre gute Freunde sind. Theres, unendlichen Dank für Deine großartige Unterstützung bei eigentlich allem, was man sich so vorstellen kann! Ebenso herzlich danke ich Maria, Daniel und Clemens. Ihr habt im Rahmen Eurer Doktorarbeiten und weit darüber hinaus zum Gelingen der Projekte beigetragen. Aurélie, Angelika, Uwe und Rusan waren mir immer kompetente und bereitwillige Ratgeberinnen, zuverlässige Kooperationspartnerinnen und tolle Kolleginnen. Euch allen danke ich für Eure Freundschaft!

Allen Kooperationspartnerinnen innerhalb und außerhalb der Charité bin ich für zahlreiche Diskussionen, großartige experimentelle Beiträge und die teilweise große Ausdauer dankbar, die zum Erreichen der gemeinsamen Ziele unabdingbar waren.

Sehr oft denke ich an die Anfänge der wissenschaftlichen Arbeiten in Köln-Merheim, die hier ein wichtiges Ziel erreichen. Ich danke Manfred Weber und Eckardt Schulze-Lohoff in besonderem Maße, dass sie mir das Thema der Mesenchymalen Stammzellen anvertrauten und meine Forschung im frühesten Stadium förderten.

Meiner Familie gilt mein größter Dank. Dadurch, dass ich mir der uneingeschränkten Liebe und Unterstützung meiner Eltern immer gewiss sein konnte, hatte ich beste Voraussetzungen für die Verwirklichung meiner Träume. Einer dieser Träume geht nun mit dieser Arbeit in Erfüllung.



## Erklärung

### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
  
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
  
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Björn Hegner

30.05.2024