

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Gefäßchirurgie

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

(Univ.-Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein)

Quantitative Expression und zelluläre Lokalisation von Cathepsinen in abdominalen Aortenaneurysmen

Fabian Karl Lohöfer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein
2. Univ.-Prof. Dr. H. Berger
3. Univ.-Prof. Dr. R. Lange

Die Dissertation wurde am 30.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 10.04.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Abdominales Aortenaneurysma.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Diagnostik und Therapie.....	1
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.2 Proteasen.....	4
1.3 Cathepsine	5
1.3.1 Beteiligung in physiologischen und pathologischen Prozessen.....	5
1.3.2 Rolle bei der Atherosklerose.....	6
1.3.3 Cathepsine im Aortenaneurysma – Stand der Forschung.....	8
1.4 Motivation und Fragestellung.....	9
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Materialien und Reagenzien	12
2.1.1 Immunhistochemie.....	12
2.1.2 PCR.....	15
2.1.3 Western Blot.....	20
2.1.4 Immunpräzipitation.....	25
2.2 Patienten	25
2.3 Präparatgewinnung.....	26
2.3.1 Für Immunhistochemie und RT-PCR.....	26
2.3.2 Für Western Blot.....	26
2.3.3 Serumgewinnung für Immunpräzipitation.....	26
2.4 Histologische Untersuchungen.....	26
2.4.1 Anfertigung der Schnittpräparate.....	26
2.4.2 Routinefärbungen - HE und Elastika van Gieson.....	27
2.4.3 Optimierung immunhistochemischer Färbungen.....	27
2.4.4 Immunhistochemische Färbungen.....	29
2.4.4.1 APAAP-Methode.....	29
Färbeprotokoll Smooth Muscle Aktin und von Willebrand Faktor.....	30
2.4.4.2 LSAB-Methode.....	31
Färbeprotokoll CD3, CD20 und CD68.....	32
Färbeprotokoll Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C.....	33

2.4.5 Semiquantitative Auswertung.....	35
2.5 RT-PCR.....	35
2.5.1 RNA-Extraktion	35
2.5.2 cDNA-Synthese.....	37
2.5.3 Primerdesign.....	38
2.5.4 RT-PCR Optimierung.....	38
2.5.5 Quantitative Real-Time RT-PCR	41
2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.5.7 Statistische Auswertung.....	42
2.6 Western Blot.....	43
2.6.1 Probengewinnung.....	43
2.6.2 Proteinbestimmung.....	43
2.6.3 Durchführung.....	44
2.6.3.1 Elektrophorese.....	44
2.6.3.2 Blotting.....	45
2.6.3.3 Coomassie brilliant blue.....	45
2.6.3.4 Ponceau S.....	45
2.6.3.5 Immunblotting.....	46
2.6.4 Auswertung.....	48
2.7 Immunpräzipitation.....	48
2.7.1 Proteinbestimmung.....	48
2.7.2 Durchführung.....	48
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Patientencharakterisierung.....	50
3.2 Histologische Untersuchungen.....	51
3.2.1 Charakterisierung der AAA-Präparate.....	51
3.2.2 Immunhistochemie von Cathepsinen und Cystatin C.....	54
3.3 Quantitative Real-Time RT-PCR.....	63
3.4 Western Blot Analyse.....	73
3.5 Serumuntersuchung.....	74
4 Diskussion.....	75
4.1 Patientencharakterisierung.....	75
4.2 Histologische Untersuchungen	75
4.3 Quantitative Real-Time RT-PCR.....	83
4.4 Western Blot Analyse.....	87

4.5 Serumuntersuchung.....	88
4.6 Fazit.....	90
5 Zusammenfassung.....	92
6 Literaturverzeichnis.....	94
7 Publikationen.....	109
8 Danksagung.....	110

Abkürzungsverzeichnis

AAA	Abdominales Aortenaneurysma
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AOD	Aortic occlusive disease
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
BCA	Bicinchoninic acid = Bicinchoninsäure
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CD	Cluster of differenzation
Ct	Cycle threshold
CT	Computertomografie
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dpi	Dots per inch
EC	Endothelial cell = Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EVAR	Endovascular aneurysm repair
EvG	Elastika van Gieson
ECM	Extracellular matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LSAB	Labeled streptavidin-biotin
MCP-1	Macrophage chemoattractant protein-1
MHC	Major histocompatibility complex

MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	Messenger ribonucleic acid
OAR	Open aneurysm repair
OD	Optical density
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFU	Relative fluorescence units = relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Rounds per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat
SMC	Smooth muscle cell = glatte Muskelzelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
T _m	Primer melting temperature
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

1 Einleitung

1.1 Abdominales Aortenaneurysma

Als Aneurysma wird eine 1,5-fache Erweiterung des Durchmessers einer Arterie definiert. Bei einem durchschnittlichen Durchmesser der infrarenalen Aorta von 2 cm – hier sind über 90 % der abdominalen Aortenaneurysmen lokalisiert (Siewert 2006, S. 461; Heider et al. 2007, S. 600) – bedeutet dies, dass man ab 3,0 cm von einem abdominalen Aortenaneurysma spricht. Allerdings müssen hier auch die altersbedingte Zunahme des Aortendurchmessers und geschlechtsspezifische Unterschiede – bei Frauen ist der Aortendurchmesser etwas kleiner – beachtet werden (Eckstein et al. 2009, S. 658).

1.1.1 Epidemiologie

Das abdominale Aortenaneurysma (AAA) ist eine Erkrankung, von der vor allem in der älteren Bevölkerung eine beachtliche Anzahl von Menschen betroffen ist. Die Prävalenz eines AAA über 3,0 cm beträgt über 65 Jahren 5,5 % bei Männern und 1,3 % bei Frauen (Eckstein et al. 2009, S. 658), wobei über 80 % der abdominalen Aortenaneurysmen keinerlei Symptome hervorrufen (Heider et al. 2007, S. 600). Die Ruptur eines AAA hat allerdings mit einer Gesamtleblichkeit von immer noch über 80 % eine infauste Prognose (Kniemeyer et al. 2000; Shimizu et al. 2006). Das Risiko für eine Ruptur nimmt mit dem Durchmesser des Aneurysmas zu und steigt ab 5 cm exponentiell an (Brewster et al. 2003, S. 1107; Reed et al. 1997, S. 2064). Ein zusätzlich erhöhtes Rupturrisiko besteht außerdem bei starken Rauchern, einer positiven Familienanamnese, bei einem schlecht eingestellten arteriellen Hypertonus, exzentrischer Form, hoher Wandspannung und bei Frauen (Brewster et al. 2003, S. 1109).

1.1.2 Diagnostik und Therapie

Um nun abdominale Aortenaneurysmen frühzeitig zu erkennen und damit die durch AAA bedingte Mortalität zu senken, ist ein Sonografiescreening sinnvoll. Dies gilt insbesondere für Männer ab dem 65. Lebensjahr, sowie für Frauen und Männern aller Altersklassen mit einer positiven Familienanamnese. Frauen ab dem 65. Lebensjahr sollten bei einer Raucheranamnese oder beim Vorliegen anderer kardiovaskulärer Erkrankungen untersucht werden (Eckstein et al. 2009, S. 662). Vorteile dieser Untersuchungsmethode sind eine breite Verfügbarkeit, die einfache technische

Durchführbarkeit, die geringen Kosten, das Ausbleiben einer Strahlenbelastung und eine Sensitivität und Spezifität von 98 % (Lindholt et al. 1999, S. 472; Gussmann et al. 2008). Andere diagnostische Verfahren, die bei der Planung offener chirurgischer und endovaskulärer Aneurysmaausschaltungen zum Einsatz kommen sind die CT-Angiografie, die Magnetresonanztomografie und die Angiografie, wobei der CT-Angiografie die größte Bedeutung zukommt (Gussmann et al. 2008).

Als geeigneter Schwellenwert, um die Indikation für eine operative oder endovaskuläre Therapie zu stellen, werden zur Zeit ein Durchmesser von 5,5 cm für Männer und zwischen 4,5 und 5,0 cm für Frauen angesehen. Unterhalb dieser Grenzwerte genügt nach Studienlage eine abwartend überwachende Haltung mit regelmäßigen Kontrollen (Collin 1999). Ein vorzeitiges therapeutisches Eingreifen ist nur bei einer Größenzunahme von mehr als 1 cm pro Jahr oder der Entwicklung von Symptomen vonnöten (Brewster et al. 2003, S. 1113; Collin 1999, S. 408).

Zur Ausschaltung eines behandlungsbedürftigen AAA stehen zwei Verfahren zur Auswahl. Das ist zum einen die offene Operation (OAR), zum anderen die endovaskuläre Aneurysmaausschaltung (EVAR). Die offene Operation – sie ist technisch bei fast allen Patienten möglich – wird entweder über eine mediane Laparatomie oder einen retroperitonealen Zugang durchgeführt. Der infrarenale Abschnitt der Aorta wird ausgeklemmt, das Aneurysma eröffnet, offene Lumbalarterien werden übernäht und eine Rohr- (70 %) oder Bifurkationsprothese (30 %) implantiert. Das Aneurysma wird dann zur Ummantelung der Prothese belassen, um einer Protheseninfektion vorzubeugen. Gegebenenfalls müssen die A.mesenterica inferior oder die Nierenarterien reimplantiert werden (Siewert 2006, S. 463). Bei der endovaskulären Versorgung wird unter Röntgenkontrolle über die A.femoralis eine Stentprothese in den aneurysmatisch erweiterten Teil vorgeschoben und dort entfaltet. Voraussetzung dafür sind ausreichende Verankerungszonen für beide Enden der Gefäßprothese (Siewert 2006, S. 464). Vorteile einer endovaskulären Versorgung sind geringere Blutverluste, kürzere Aufenthalte auf der Intensivstation, kürzere Krankenhausaufenthalte und die schnellere Erholung nach dem Eingriff (Brewster et al. 1998, S. 996; May et al. 1998, S. 213; Zarins et al. 1999, S. 292). Nachteile und Risiken des EVAR sind das Auftreten von Endoleckagen (Schurink et al. 1999), die häufigere Notwendigkeit sekundärer Eingriffe (Laheij et al. 2000), eine mögliche Konversion zu einer offenen Operation und die Ruptur des Aneurysmas (Brewster et al. 2003, S. 1113). Eine endovaskuläre Versorgung eignet sich deshalb vor allem für ältere Patienten mit hohem Operationsrisiko, solange die anatomischen Voraussetzungen für die technische Durchführbarkeit gegeben sind (Brewster et al. 1998, S. 1002; Bernhard et al. 2002, S. 1155).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

In der Vergangenheit wurde das AAA oft als eine Manifestation der Atherosklerose angesehen (Patel et al. 1995). Allerdings müssen auch noch andere Mechanismen an der Entstehung eines AAA beteiligt sein, denn nur 9 bis 16 % der Patienten mit ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen der abdominalen Aorta entwickeln dort auch ein Aneurysma (Blanchard et al. 2000, S. 575; Shimizu et al. 2006, S. 988). Auf der anderen Seite entwickeln auch Patienten ohne ausgeprägte atherosklerotische Manifestationen an der Aorta ein Aneurysma (Shimizu et al. 2006, S. 988). Das heißt zwar, dass atherosklerotische Veränderungen möglicherweise einen permissiven Charakter für die Entwicklung eines AAA aufweisen, sie aber weder notwendige noch hinreichende Bedingung zur Entstehung eines solchen sind. Hinzu kommt, dass auch Unterschiede zwischen AAA und atherosklerotischen Manifestationen an der Gefäßwand bestehen. Beispielsweise sind bei der Atherosklerose vor allem Intima und Media, beim AAA hingegen Media und Adventitia betroffen (Ailawadi et al. 2003, S. 548). Risikofaktoren und Komorbiditäten des abdominalen Aortenaneurysmas sind das Alter, eine familiäre Belastung, Nikotinabusus, eine koronare Herzkrankheit und die arterielle Hypertonie (Lederle et al. 1997, S. 441; Eckstein et al. 2009, S. 658). Erhöhte Blutfette spielen im Gegensatz zur Atherosklerose eine untergeordnete Rolle (Lindholt et al. 2001b, S. 51). Durch das Vorhandensein von Risikofaktoren erhöht sich jedoch nicht nur die Prävalenz, sondern es steigt auch das Risiko für die Ruptur eines AAA.

Pathogenetisch gesehen führen hämodynamische Einflüsse, Degenerations- und Thrombus-induzierte Hypoxieprozesse, sowie Abbauprodukte medialer Proteine und andere bislang nicht bekannte Faktoren zur Ausbildung von Neogefäßen und zur Einwanderung von Entzündungszellen in die Gefäßwand. Bedingt durch die Freisetzung von verschiedenen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies aus eben diesen Entzündungszellen kommt es zu einer weiteren Einwanderung von Lymphozyten und zur Freisetzung verschiedenster Proteasen (z.B. MMPs, ADAM, ADAMTS, Cathepsine). Letztere führen durch Abbauvorgänge der extrazellulären Matrix in der Tunica media zur Destabilisierung und daraus folgender aneurysmatischer Erweiterung der abdominalen Aorta. Erhöhte Wandspannung führt zu weiteren Umbauvorgängen und Zunahme des Gefäßdurchmessers. Ohne adäquate Therapie kann dieser selbstverstärkende Prozess zu einer Ausdünnung und Schwächung der AAA-Wand führen, welche letztendlich den hämodynamischen Kräften nicht mehr gewachsen ist und rupturiert (Ailawadi et al. 2003, S. 586–588). Die vorwiegende Lokalisation von Aneurysmen in der infrarenalen Aorta scheint die Ursache zum einen in einem verminderten Elastin-Kollagen Verhältnis der abdominalen Aorta im Vergleich zu proximaleren Abschnitten

(Ailawadi et al. 2003, S. 586), zum anderen in der dort herrschenden Hämodynamik mit erhöhter Wandspannung zu haben (Moore et al. 1992, S. 391). Schließlich ist die aneurysmatisch veränderte Gefäßwand durch eine Vielzahl histologischer Veränderungen gekennzeichnet. Dazu zählen der Abbau von Kollagen und Elastin (Krettek et al. 2003) in Media und Adventitia, der durch Apoptose bedingte Verlust an glatten Muskelzellen der Media (Henderson et al. 1999; Li et al. 1997; López-Candales et al. 1997), sowie das Vorkommen von Lymphozyteninfiltraten und Makrophagen und die Neovaskularisation (Ailawadi et al. 2003, S. 584). Entscheidende biologische Hauptfaktoren für die Pathogenese sind dabei der proteolytische Abbau von Bindegewebe der Gefäßwand, Entzündungsvorgänge und Immunreaktionen, die Wandspannung und molekulargenetische Faktoren (Wassef et al. 2001). Dabei spielen gerade proteolytische Enzyme eine wesentliche Rolle bei der Progression von AAA. Allerdings ist die Rolle der verschiedenen Proteasen in diesem Zusammenhang bisher nicht hinreichend geklärt.

1.2 Proteasen

Proteasen (oder Peptidasen) sind Enzyme, deren Funktion darin besteht die Hydrolyse von Peptidbindungen zu katalysieren (Neurath, Walsh 1976). Sie werden in Exopeptidasen und Endopeptidasen unterschieden. Exopeptidasen spalten endständige Peptidbindungen, Endopeptidasen spalten hingegen Peptidbindungen, die im inneren Bereich von Peptidketten liegen. Sie sind es auch, die hauptsächlich an der Spaltung extrazellulärer Proteine beteiligt sind (Garcia-Touchard et al. 2005, S. 1119). Hierbei kommen verschiedene Mechanismen zum Tragen, nach denen die Proteasen in vier Hauptgruppen unterteilt werden: nämlich in Aspartat-, Cystein-, Serin- und Metalloproteasen (Chapman et al. 1997, S. 64). Während etwa die Serin- und Metalloproteasen optimal bei neutralem pH funktionieren, benötigen die Cysteinproteasen ein saures Milieu. Metalloproteasen sind gekennzeichnet durch ein Metall-Atom im aktiven Zentrum, in den meisten Fällen ist dies ein Zinkion. Zu ihnen gehören beispielsweise Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Adamalysine und Pappalysine. Gerade für die MMPs wurde eine Beteiligung bei verschiedensten Pathologien nachgewiesen und intensiv untersucht, etwa bei der Angiogenese, beim Tumorwachstum und der Metastasierung (Roy et al. 2006, S. 609). Auch in der Pathogenese des AAA konnte für die MMPs eine Beteiligung nachgewiesen werden (Reeps et al. 2009). Zu den Serinproteasen gehören zum Beispiel viele Gerinnungsfaktoren (Thrombin, Protein C, Faktor VII, IX, X und XII). Auch zwei Cathepsine werden ihnen zugerechnet (siehe 1.3). Vertreter der Aspartatproteasen sind beispielsweise Pepsin und Renin. Zu ihnen gehören ebenfalls zwei

Cathepsine (siehe 1.3). Zu den Cysteinproteasen werden beispielsweise die Caspasen gezählt, die eine Schlüsselrolle bei der Apoptose spielen. Außerdem wird dieser Gruppe der Großteil der Cathepsine zugerechnet (Garcia-Touchard et al. 2005).

1.3 Cathepsine

Cathepsine zählen unter den bekannten Proteasen zu den potentesten, insbesondere im Hinblick auf ihre elastolytische Wirksamkeit (Chapman et al. 1997). Beim Menschen konnten bislang 15 verschiedenen Cathepsinen nachgewiesen werden. Diese unterteilen sich in 11 Cysteinproteasen (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X) (Rossi et al. 2004), zwei Aspartatproteasen (Cathepsin D und E) und zwei Serinproteasen (Cathepsin A und G) (Zavasnik-Bergant, Turk 2006, S. 349; Reich et al. 2010).

1.3.1 Beteiligung in physiologischen und pathologischen Prozessen

Ein Großteil der Cysteinproteasen ist unter physiologischen Bedingungen intrazellulär lokalisiert und befindet sich in Lysosomen und Endosomen vieler Zellen. Dort sind sie daran beteiligt intra- und extrazelluläre Proteine abzubauen. Allerdings spielen diese proteolytischen Enzyme auch außerhalb dieser Zellkompartimente eine wichtige Rolle (Liu et al. 2004, S. 1360). Beispielsweise sind Cathepsine in der Schilddrüse an der Abspaltung der Schilddrüsenhormone vom Prohormon Thyreoglobulin beteiligt (Dunn et al. 1991) und in den Nieren an der proteolytischen Prozessierung von Prorenin zu Renin (Jutras, Reudelhuber 1999). In nicht unerheblichem Maße sind Cathepsine auch an den Vorgängen der Apoptose beteiligt (Chwieralski et al. 2006, S. 144–145). Untersucht wurde dazu beispielsweise der Einfluss von Cathepsin B auf die Apoptose von Hepatozyten (Roberts et al. 1997; Guicciardi et al. 2000) und die Apoptose im Rahmen der Immunregulation (Michallet et al. 2003; Michallet et al. 2004). Bei der neuronalen Apoptose sind Cathepsin B und L beteiligt (Felbor et al. 2002), bei Lungenerkrankungen spielt Cathepsin D für den apoptotischen Zelltod eine Rolle (Thibodeau et al. 2004). Eine weitere Funktion der Cathepsine ergibt sich im Rahmen der durch den Major histocompatibility complex Typ II (MHC-II) vermittelten Antigenpräsentation, wobei die Cathepsine F, L und S die größte Rolle spielen (Chapman et al. 1997, S. 78; Lutgens et al. 2007, S. 3030; Hsing, Rudensky 2005; Shi et al. 2000). Cathepsin K wird auch von Osteoklasten exprimiert und hat als Kollagenase eine wichtige Funktion bei Umbauvorgängen des Knochens. Außerdem wurde ihm eine wichtige Rolle beim Riesenzelltumor nachgewiesen (Lindeman et al. 2004, S. 593). Ein Mangel dieser Protease durch eine Mutation im

Cathepsin K Gen ist die Ursache der Pyknodysostose, bei der es zu Störungen im Knochenumbau kommt, weil Osteoklasten nicht mehr in der Lage sind kollagene Matrix zu degradieren. (Motyckova, Fisher 2002). Bei der Neoangiogenese im Rahmen der Wundheilung der Haut hat etwa Cathepsin S eine entscheidende Funktion (Shi et al. 2003). Cathepsine tragen auch zum invasiven Wachstum und zur Neoangiogenese beim Pankreaskarzinom bei und erwiesen sich als gute Prognosemarker für ein Rezidiv kurativ resezierter Adenokarzinome des Pankreas (Niedergethmann et al. 2004; Joyce et al. 2004). Für Cathepsin D konnten wichtige Funktionen bei Entstehung, Fortschreiten und Metastasierung des Mammakarzinoms nachgewiesen werden (Liudet-Coopman et al. 2006). Auch wurde es als möglicher immunhistochemischer Marker für dessen Progression untersucht (Abbott et al. 2010). Auch scheinen die Cathepsine eine wichtige Rolle bei Invasion und Metastasierung verschiedener weiterer Tumorentitäten zu spielen, so etwa beim Uveamelanom (Paroan et al. 2009), beim kolorektalen Karzinom (Sullivan et al. 2009) und beim Nasopharynxkarzinom (Xu et al. 2009), um nur einige Beispiele zu nennen, die in jüngerer Zeit Gegenstand von Untersuchungen waren.

Der wichtigste extrazelluläre Inhibitor der Cysteinproteasen ist Cystatin C, das zur Superfamilie der Cystatine und innerhalb dieser wiederum zur Familie der Typ-2-Cystatine gehört. Zur Superfamilie der Cystatine gehören daneben noch die intrazellulär wirkenden Typ-1-Cystatine (Stefine) und die ebenfalls extrazellulär wirkenden Kininogene (Turk et al. 2001, S. 4631; Shi et al. 1999, S. 1191; Chapman et al. 1997, S. 71). Die stärkste inhibitorische Wirksamkeit hat Cystatin C auf die Cathepsine L und S, gefolgt von Cathepsin B und Cathepsin H (Hall et al. 1998, S. 4077). Cystatin C, dessen Gen auf Chromosom 20 lokalisiert ist (Abrahamson et al. 1989, S. 223), besitzt eine atomare Masse von 13 kDa (Shi et al. 1999, S. 1191). Die Bestimmung der Serumkonzentration von Cystatin C kann routinemäßig zur nicht invasiven Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate und als Marker einer frühen Nierenfunktionsstörung eingesetzt werden (Lindholt et al. 2001a, S. 1473). Cystatin C ist außerdem in den meisten Körperflüssigkeiten vorhanden, wobei die höchsten Konzentrationen in Samenflüssigkeit, Liquor und Milch gefunden wurden (Abrahamson et al. 1986).

1.3.2 Rolle bei der Atherosklerose

Neben den oben genannten Krankheiten sind Cathepsine auch an verschiedensten Vorgängen im Rahmen der Atheroskleroseentstehung beteiligt, was in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte. In der Pathogenese der Atherosklerose kommt es in der Anfangsphase zur

Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutstrom in die Gefäßwand. Dazu muss von diesen allerdings die subendotheliale Basalmembran – bestehend aus Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronektin (Kittelberger et al. 1990) – überwunden werden, indem diese extrazellulären Matrix-Komponenten abgebaut werden. Dieser Abbau extrazellulärer Matrix (ECM) ist ebenso für die Einsprossung von Neogefäßen notwendig (Libby, Schönbeck 2001, S. 259). Bei diesen Vorgängen spielen vermutlich Cathepsine eine wichtige Rolle. Es konnten nämlich in der Basalmembran früher atherosklerotischer Läsionen bedeutende Mengen an Cathepsin K und S nachgewiesen werden (Sukhova et al. 1998, S. 578). Für Makrophagen, die von Monozyten abstammen, konnte gezeigt werden, dass sie beachtenswerte Mengen der Cathepsine K, L und S sezernieren (Liu et al. 2004, S. 1363). Auch bei In-vitro-Versuchen wurde eine stimulierte Einwanderung von Monozyten durch einen Hemmstoff von Cathepsinen deutlich reduziert (Sukhova et al. 2003). Ein weiterer wichtiger Vorgang in der Pathogenese der Atherosklerose ist die Einwanderung glatter Muskelzellen der Media in die Intima. Dazu müssen sie jedoch die Lamina elastica interna überwinden. Allerdings stellen die elastischen Fasern ein Hindernis dar, wie bei In-vitro-Experimenten gezeigt werden konnte (Ooyama et al. 1987). An der Degradierung dieses Elastins sind vermutlich ebenfalls Cathepsine beteiligt, die von glatten Muskelzellen sezerniert werden. So konnte zum Beispiel in vitro gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen unter Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β und IFN- γ aktives Cathepsin S sezernieren, welches in der Lage ist Elastin abzubauen (Sukhova et al. 1998, S. 579). Nach derzeitigem Wissen sind unter den Cysteincathepsinen – in absteigender Reihenfolge – die Cathepsine V, K und S diejenigen, mit der stärksten elastolytischen Wirksamkeit (Yasuda et al. 2004, S. 36770). Alle drei werden unter anderem von Makrophagen exprimiert. Doppel-knockout-Mäuse für den LDL-Rezeptor und für Cathepsin S entwickelten deutlich weniger ausgeprägte atherosklerotische Läsionen als Knockout-Mäuse nur für den LDL-Rezeptor. In deren Intima befanden sich deutlich weniger glatte Muskelzellen, Makrophagen und Lipide (Sukhova et al. 2003). Wie schon oben beschrieben sind Cathepsine an der Apoptose beteiligt. Dies ist auch bei der Atherosklerose der Fall. Oxidiertes LDL destabilisiert in phagozytierenden Zellen die Membran der Lysosomen, sodass aus diesen Cathepsine ins Zytoplasma freigesetzt werden und den apoptotischen Tod der Zelle initiieren (Li et al. 2001; Li et al. 1998). So kommt es zu extrazellulären Lipidablagerungen in der Gefäßwand. Auch die Neovaskularisation ist für die Vorgänge bei der Atherosklerose von essenzieller Bedeutung, weil darüber etwa Leukozyten oder Plasmabestandteile, wie Lipoproteine, an den Ort des Geschehens gebracht werden. An dieser Neovaskularisation sind wahrscheinlich ebenfalls Cathepsine beteiligt, wobei sie hier wiederum

extrazelluläre Matrix degradieren (Shi et al. 2003; Premzl et al. 2006; Wang et al. 2006). Allerdings fehlen hierzu speziellere Untersuchungen in Bezug auf die Atherosklerose. Für Cathepsin L konnte auch gezeigt werden, dass dessen Serumspiegel bei Patienten mit einer Stenose in mindestens einer Koronararterie signifikant erhöht war (Liu et al. 2006b).

1.3.3 Cathepsine im Aortenaneurysma – Stand der Forschung

Obwohl abdominale Aortenaneurysmen meist auch mit atherosklerotischen Veränderungen in der Gefäßwand einhergehen, oder möglicherweise die Atherosklerose den Anstoß zur Aneurysmaentstehung gibt, handelt es sich doch um zwei verschiedene Entitäten. Deshalb ist es nicht ohne Weiteres möglich Erkenntnisse bezüglich der Cathepsine in der Atherosklerose auf das AAA zu übertragen. Allerdings wurde die Rolle der Cathepsine speziell im AAA bisher nur sehr bruchstückhaft untersucht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Bisherige Studien zu Cathepsinen im AAA

Cathepsin/Cystatin	Methoden	Untersuchungsmaterial	Literatur
Cathepsin D, L	Protease assay	6 AAA 6 Kontrollen	(Gacko, Glowinski 1998)
Cathepsin K, S Cystatin C*	WB ELISA (Serum) IHC*	4/6* AAA 11/4* Kontrollen	(Shi et al. 1999)
Cystatin C	Bestimmung der Serumkonzentration	142 AAA	(Lindholt et al. 2001a)
Cathepsin L	IHC WB*	7/5* AAA 7/6* Kontrollen	(Liu et al. 2006b)
Cathepsin B, H, K, L, S Cystatin A, B, C	ELISA Specific fluorogenic substrate assays	82 AAA 13 AOD	(Abisi et al. 2007)
Cathepsin K, L, S Cystatin C	WB PCR	17 AAA 15 rupturierte AAA 11 Kontrollen	(Abdul-Hussien et al. 2007)

Im Jahr 1998 wurde von einer polnischen Forschergruppe die Aktivität der Cathepsine D und L in der AAA Gefäßwand und im parietalen Thrombus (Abscheidungsthrombus, der der Aneurysmawand von innen anliegt) untersucht (Gacko, Glowinski 1998). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität beider untersuchter Cathepsine in den AAA im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war. Auch in den parietalen Thromben konnte im Vergleich zu einfachen Blutgerinnseln eine erhöhte Aktivität nachgewiesen werden. Shi, Sukhova et al. aus den USA konnten 1999 mittels

Western Blot Analyse zeigen, dass die Expression der Cathepsine K und S in AAA-Präparaten im Vergleich zu solchen von Kontrollgefäßen erhöht, die Expression von Cystatin C hingegen vermindert war. Sie zeigte ebenfalls eine verminderte immunhistochemische Cystatin C Färbung von AAA-Präparaten im Vergleich zu Kontrollorten, die von Organspendern für eine Herztransplantation stammten. Serumanalysen (ELISA) und Ultraschalluntersuchungen der Aorta wiesen eine negative Korrelation von Cystatin C mit dem Durchmesser der abdominalen Aorta auf (Shi et al. 1999). 2001 wurde auch von Lindholt et al. eine negative Korrelation von Cystatin C Serumspiegeln mit dem AAA-Durchmesser und der Größenzunahme beschrieben (Lindholt et al. 2001a). Im Jahr 2006 wurde von Liu et al. die Expression von Cathepsin L im AAA mittels Immunhistochemie und Western Blot untersucht (Liu et al. 2006b). Dabei zeigte sich in der Immunhistochemie eine vermehrte Expression von Cathepsin L in den AAA-Präparaten im Vergleich zu Kontrollen, die von Organspendern für eine Herztransplantation stammten. Vor allem färbten sich die Regionen, in denen viele Makrophagen lokalisiert waren. Auch bei der Western Blot Analyse zeigten AAA im Vergleich zu Kontrollen eine vermehrte Expression. Abisi et al. aus Großbritannien verglichen 2007 die Proteinexpression und Aktivität der Cathepsine B, H, K, L, S und der Cystatine A, B, C in AAA-Präparaten mit der in Präparaten von Patienten mit einer aortalen Verschlusskrankheit (AOD) (Abisi et al. 2007). Als Methoden wurden Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) und Specific fluorogenic substrate assays verwendet. Bei der Bestimmung der Proteinexpression zeigten sich im AAA nur für Cathepsin H erhöhte, für Cystatin C verminderte Werte im Vergleich zur AOD. Die anderen Cathepsine und Cystatine wiesen keinen signifikanten Unterschiede auf. Die Aktivitäten der Cathepsine B, H, L und S waren in den AAA-Proben im Vergleich zu den AOD-Proben signifikant erhöht. Ebenfalls im Jahr 2007 publizierten Abdul-Hussien et al. aus den Niederlanden Ergebnisse, die unter anderem eine erhöhte Expression von mRNA der Cathepsine K, L und S in abdominalen Aortenaneurysmen im Vergleich zu Kontrollen zeigten (Abdul-Hussien et al. 2007). Für rupturierte und nicht rupturierte AAA zeigten sich keine Unterschiede. Diese Ergebnisse wurden auch durch Western Blot Analysen bestätigt. Für Cystatin C zeigten sich im Western Blot verminderte Proteinmengen im AAA, allerdings war das nicht bei der Expression von mRNA der Fall.

1.4 Motivation und Fragestellung

Das abdominale Aortenaneurysma (AAA) ist in der alternden Bevölkerung eine häufige Erkrankung, die nicht selten unbemerkt bleibt, weil sie meistens keine Beschwerden verursacht. Die

Gefahr für die Betroffenen besteht darin, dass ein AAA häufig die Ruptur der erweiterten Bauchschlagader verursacht, was in über 80 % der Fälle zum Tode führt. Ein Großteil dieser Patienten stirbt bereits vor Erreichen eines Krankenhauses. Aus diesen Gründen ist es unumgänglich, Betroffene zu erkennen und rechtzeitig das Aneurysma operativ oder interventionell zu versorgen. Als Kriterien für die Indikationsstellung zu einer Operation oder endovaskulären Therapie stehen bis heute nur der Durchmesser, eine schnelle Größenzunahme oder die Entwicklung von Symptomen zur Verfügung. Allerdings ist es durchaus möglich, dass auch kleine Aneurysmen rupturieren, sehr große Aneurysmen jedoch über viele Jahre stabil bleiben. Hier wäre es wünschenswert für den jeweiligen Patienten das Risiko besser einschätzen zu können, um einerseits gefährdeten Personen rechtzeitig eine Therapie anzubieten, andererseits Menschen mit einem geringen Risiko nicht den erheblichen Risiken eines operativen Eingriffs auszusetzen. Ein Ansatz dazu ist es die molekularbiologischen Vorgänge, die zu der Entstehung und Progression von AAA führen, besser zu verstehen. Entscheidend in der Pathogenese des Bauchaortenaneurysmas ist die Destabilisierung der Gefäßwand durch den Abbau extrazellulärer Matrix – im Speziellen Elastin und Kollagen. Daran sind verschiedenste Proteasen beteiligt und unter anderem auch Cathepsine. Gerade die Cathepsine scheinen mit ihrem ausgeprägten elastolytischen Potenzial ein vielversprechender Ansatzpunkt für genauere Untersuchungen zu sein. Cathepsine wurden bereits bei vielen anderen Erkrankungen und physiologischen Vorgängen untersucht. Dazu zählen verschiedene Tumorerkrankungen, Knochenumbauvorgänge, Wundheilung und Atherosklerose. Dabei wurde festgestellt, dass sich Cathepsine an vielen pathophysiologischen Vorgängen beteiligen, die auch in der aneurysmatischen Gefäßwand von Bedeutung sind. Dazu zählen z.B. der Abbau extrazellulärer Matrix, die Neoangiogenese oder die Apoptose. Deshalb ist zu vermuten, dass dies auch im AAA der Fall ist. Für andere Proteasen, wie etwa MMPs, wurde bereits in verschiedenen Studien deren Bedeutung in der Pathogenese des AAA untersucht. Dass auch Cathepsine in der AAA-Pathogenese von entscheidender Bedeutung sind konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden, allerdings sind die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen sehr bruchstückhaft und lassen noch viele Fragen unbeantwortet. Um nun einen umfassenden Überblick über die Bedeutung der Cathepsine im AAA zu bekommen befasst sich diese Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

- Welche pathophysiologischen Veränderungen – inklusive Zellbeteiligung und extrazellulären Gewebebestandteilen – charakterisieren das AAA verglichen mit einer gesunden Aortenwand?
- In welchen Zellen innerhalb der AAA-Gefäßwand werden klinisch relevante Cathepsine (B, D, K, L und S) bzw. ihr Inhibitor Cystatin C exprimiert?
- Exprimieren die Zellen der gesunden Aortenwand ebenfalls dieselben Cathepsine und Cystatin C?
- Gibt es Unterschiede in der zellulären Cathepsinexpression zwischen Patienten mit symptomatischen und asymptomatischen AAA?
- Wie groß ist die quantitative Cathepsin/Cystatin-Expression in AAA-Gefäßwänden im Vergleich zu den Aorten von Kontrollpatienten?
- Gibt es auch Unterschiede in der quantitativen Cathepsin/Cystatin-Expression zwischen Patienten mit symptomatischen und asymptomatischen AAA?
- Werden Cathepsine, die in der erkrankten Gefäßwand exprimiert werden, und Cystatin C bei AAA-Patienten vermehrt bzw. vermindert in das Blut abgegeben?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Reagenzien

2.1.1 Immunhistochemie

Geräte:

- Color Video Camera 3CCD Color MC 3255 (Sony, Tokio, Japan)
- Eindeckgerät Promounter RCM 2000 (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)
- Mikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl-Zeiss Lichtmikroskopie, Jena, Deutschland)
- Mikrotom HM335E (Microm international, Walldorf, Deutschland)
- Vortex-Rüttler MS1 Minishaker (IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland)

Materialien:

- Adhäsionsobjektträger SuperFrost® Plus (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- Mikrotomklingen R35 und S35 (Feather, Osaka, Japan)
- Objektträger SuperFrost® (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)

Chemikalien:

- Dako REAL™ Antibody Diluent S2022 (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- DAKO ChemMate™ Detection System, APAAP, Mouse Code No. K 5000 (DAKO, Glostrup, Dänemark)
 - APAAP-Immunkomplex
 - Sekundärantikörper
 - Substrate-Buffer
 - Chromogen Red 1
 - Chromogen Red 2

- Chromogen Red 3
- Levamisole
- Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/ Mouse Code K5001 (DAKO, Glostrup, Dänemark)
 - Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) (90 ml ready-to-use)
 - Biotinylated anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins in buffered solution, containing carrier protein and sodium azide.
 - Streptavidin Peroxidase (HRP) (90 ml ready-to-use)
 - Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in buffered solution, containing carrier protein and preservative.
 - DAB Diaminobenzidine Solution (5 ml 50 x cocentrated)
 - 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.
 - HRP Substrate Buffer (250 ml ready-to-use)
 - Buffered solution, containing hydrogen peroxide and preservative.
- EDTA
- Ethanol 70 %
- Ethanol 96 %
- Hämalaun, sauer, nach Mayer
- Isopropanol 100 %
- PBS
- Poly-L-Lysine Solution P 8920 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Pritt Bastelkleber (Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- Protease Typ XXIV, bakteriell (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Serum Ziege S1000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- Trizma Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Wasserstoff-Peroxid, 3 %

- Xylol

Antikörper:

- Primärantikörper:
 - CD3, Rabbit Anti-Human, polyklonal, A0452 (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)
 - CD20, Mouse Anti-Human, monoklonal, M0755, Klon L26 (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)
 - CD68, Mouse Anti-Human, monoklonal, M0814, Klon KP1 (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)
 - vWF, Mouse Anti-Human, monoklonal, M0616, Klon F8/86 (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)
 - Muscle Actin, Mouse Anti-Human, monoklonal, M0635, Klon HHF35 (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)
 - Cathepsin B, Mouse monoclonal [CB131] to Cathepsin B (ab26395) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin D, Mouse monoclonal [CTD-19] to Cathepsin D (ab6313) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin K, Mouse monoclonal [3F9] to Cathepsin K (ab37259) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin L, Mouse monoclonal [13C2] to Cathepsin L (ab50799) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin S, Goat polyclonal to Cathepsin S (ab18822) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cystatin C, Rabbit polyclonal to Cystatin C (ab33487) (Abcam, Cambridge, UK)
- Sekundärantikörper:
 - Rabbit Anti-Goat, biotinyliert, polyclonal, E0466 (1,6 g/l) (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)

Lösungen:

- Citratpuffer pH 6,0
 - 2,1 g Citrat-Monohydrat
 - 1000 ml Aqua dest.
 - mit Natronlauge 2 N pH einstellen
- Polylysinkleber:
 - Poly-L-Lysine Solution P 8920 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
 - Pritt Bastelkleber (Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- TRIS-Gebrauchslösung: 10fach mit Aqua dest. verdünnter TRIS-Puffer
- TRIS-Puffer, pH 7,6
 - 60,5 g Trizma Base
 - 700 ml Aqua dest.
 - mit HCl pH einstellen, mit Aqua dest auf 1000 ml auffüllen
 - 90 g NaCl

2.1.2 PCR**Geräte:**

- Gel-Kammer (wide) mini-sub cell GT (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Mastercycler personal (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- DU 530 UV vis spectrophotometer (Beckman Coulter, Brea, USA)
- PowerSupply Model 200/2.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Stratagene Eagle Eye II Imaging System (Pegasus System Inc., Rockville, USA)
- SYBR-Green-Cycler iQ™ 5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Materialien:

- 96 Multiply® PCR Platte natur (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)

Chemikalien:

- Agarose peqGOLD universal 35-1010 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- cDNA Synthesis Kit RevertAid, K1622 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)
 - Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/μl)
 - RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/μl)
 - 5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT)
 - 10 mM dNTP Mix
 - Oligo(dT)₁₈ Primer (100 μM, 0,5 μg/μl (15_{A260} u/ml))
 - DEPC-treated Water
- DNA-Leiter peqGOLD 50 bp, 25-2000 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- dNTP-Set peqGOLD, 20-2011 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- Ethidiumbromid 0,5 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Ethanol 100 %
- Ethanol 70 %
- Glykogen, REF 10 091 393 001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- JURKAT DNA (100 ng/μl)
- High Pure RNA Paraffin Kit 03 270 289 001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland):
 - Tissue Lysis Buffer
 - Proteinkinase K, PCR grade
 - Binding Buffer

- Wash Buffer I
- Wash Buffer II
- DNase I
- DNase Incubation Buffer, 10x conc.
- Elution Buffer
- High Pure Filter Tubes
- Collection Tubes
- Mastermix KAPA SYBR 07-KK4600-02 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- NaAcetat (3 M, pH 4,5)
- PCR-Wasser double processed (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Proteinkinase K, rekombinant, REF 03 115 879 001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Reactionbuffer Y, 10x (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- RNaseZAP (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- SAWADY `Hot` Taq-DNA-Polymerase (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- SDS 10 %
- Xylencyanol 6x
- Xylol

Primer:

Bezeichnung	Sequenz (5' ->3')	Schmelztemperatur T _m [°C]
• CathB-F1	ctacagcccgcactacaaacag	62,1
• CathB-F2	tatcagccacaaatccagcaac	58,4
• CathB-F3	ttcttgcgactcttgggacttc	60,3
• CathB-R1	atgatgtccttctcgtattgg	58,4
• CathB-R2	cacgggtagcatcttggttat	60,3
• CathB-R3	tgacgaggatgacagggaacta	60,3
• CathD-F1	gctctgccaccctacctgttca	64,0
• CathD-F2	gaaacagaggagagtccagag	62,1
• CathD-F3	cccacacaccccacacactcg	65,8
• CathD-R1	ttgtcccctctcactccttc	62,1
• CathD-R2	ccacagaacaaaacagcaagtc	58,4
• CathD-R3	ccaggaggaggaaaaccacaga	64,0
• CathK-F1	aagggaacaagcactggataa	56,5
• CathK-F2	aacagattccatcagcaggat	56,5
• CathK-F3	gacctccttcagttttacagc	60,3
• CathK-F4	ggagctgactccgcaatcccg	65,8
• CathK-F5	acaaccaacaggcaaggcagc	64,0
• CathK-F6	gcctggaggggccaactcaaga	65,8
• CathK-R1	gttcttatttcgagccatgagg	58,4
• CathK-R2	tattgcttctgtgggtcttct	58,4
• CathK-R3	tatccagtgttgtttcccttc	58,4
• CathK-R4	tgtctggcttcgtttcggcagc	64,0
• CathK-R5	ggccacagagacaggtcccact	65,8
• CathK-R6	agccccctccacagccatcatt	64,0
• CathL-F1	tacactcatccttctgccttt	58,4
• CathL-F2	atcagggtcagtggttcttg	60,3
• CathL-F3	agggtcagtggttcttgttg	60,3
• CathL-R1	tcctccatccttcttcattcat	56,5
• CathL-R2	tgagataagcctcccagtttc	58,4
• CathS-F1	tgttcacactttgcctatgac	58,4
• CathS-F3	ttctgacctcccctgaagta	58,4
• CathS-R1	aggggtccataaggaaataaa	56,5

• CathS-R2	ggaataaaggcccaagaaac	56,5
• CathS-R3	taaggatgctccttttctctgg	58,4
• CysC-F1	accaggagacagacagagaagg	62,1
• CysC-F2	gcctgtgcctatcacctcttat	60,3
• CysC-R1	ggctatgagaagcaagaaggaa	58,4
• CysC-R2	ccttctctgtctgtctcctggt	62,1
• CysC-R3	atgagaagcaagaaggaaggag	58,4
• GAPDH-F2	cactgccaacgtgtcagtgggtg	64,0
• GAPDH-F3cD	tcaagtggggcgatgctggc	63,5
• GAPFH-F4cD	ggggctggcattgccctcaa	59,6
• GAPDH-R2	tgtagcccaggatgcccttgag	64,0
• GAPDH-R3cD	tgggggcatcagcagagggg	65,5
• GAPDH-R4cD	ggctggtggtccaggggtct	59,8

Lösungen:

- Agarosegel 2 %:
 - 50 / 100 ml 1x TBE Puffer
 - 1 / 2 g Agarose peqGOLD universal 35-1010 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
 - 50 / 100 µl Ethidiumbromid 0,5 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- TBE-DNA-Elektrophoresepuffer 10x
 - 108 g Trizma Base
 - 55 g Borsäure
 - 40 ml 0,5 M EDTA
 - auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

2.1.3 Western Blot

Geräte:

- Blot-Apparatur Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- CanoScan 8800 F (Canon, Tokyo, Japan)
- Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Entwicklermaschine für Röntgenfilme CAT SRX-101A (Konica Minolta, Tokyo, Japan)
- Gel-Apparatur (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Photometer Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom Ltd., Cambridge, UK)
- PowerPac HC (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Short Plate (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Materialien:

- Glass Plate 1,5 mm (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Kämme (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Medical X-Ray Film 100NIF (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- PVDF-Membran
- Zellkultur Testplatte 96F (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

Chemikalien:

- Acrylamid 30 %
- Acrylamid/Bis-Acrylamid 37:1 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- APS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- BSA (Bovines Serumalbumin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
 - BSA (1:10) Verdünnung: 90 µl Lysispuffer + 10 µl BSA (10 mg/ml)
 - BSA (1:5) Verdünnung: 80 µl Lysispuffer + 20 µl BSA (10 mg/ml)

- Pierce® BCA Protein Assay Kit (Reagent B: Reagent A 1:50) (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)
 - BCA™ Protein Assay Reagent A
 - BCA™ Protein Assay Reagent B
- Ponceau S Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Proteinmarker III peqGOLD, vorgefärbt, (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- SDS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, USA)
 - Luminol/Enhancer
 - Stable Peroxidase Buffer
- TEMED (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Trizma-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Antikörper:

- Primärantikörper:
 - Cathepsin B, rabbit polyclonal to Cathepsin B (ab30443) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin D, Mouse monoclonal [CTD-19] to Cathepsin D (ab6313) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin K, Mouse monoclonal [3F9] to Cathepsin K (ab37259) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin L, rabbit polyclonal to Cathepsin L (ab49984) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cathepsin S, Goat polyclonal to Cathepsin S (ab18822) (Abcam, Cambridge, UK)
 - Cystatin C, Rabbit polyclonal to Cystatin C (ab33487) (Abcam, Cambridge, UK)
 - GAPDH, Mouse, monoklonal [6C5] to GAPDH, ab8245 (Abcam, Cambridge, UK)

- Sekundärantikörper:
 - Donkey Anti-Goat IgG, HAF109 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)
 - Goat Anti-Mouse IgG, TM-001-HR (Thermo Scientific, Waltham, USA)
 - Goat Anti-Rabbit IgG, TR-001-HR (Thermo Scientific, Waltham, USA)

Lösungen:

- Blocking-Puffer:
 - 45 ml Aqua dest.
 - 5 ml 10fach TBS-Puffer
 - 2,5 g Magermilchpulver
 - 50 µl Tween 20
- Coomassie-Blue-Lösung:
 - 50 ml Methanol
 - 10 ml Ethansäure
 - 40 ml Aqua dest.
 - 0,5 mg Coomassie brilliant Blue
- Elektrophoresepuffer:
 - 1000 ml Aqua dest.
 - 3 g Trizma-Base
 - 144 g Glycin
 - 10 g SDS
- Ladepuffer zweifach:
 - 3,25 ml Aqua dest.
 - 1,25 ml 0,5 M TRIS-Cl (pH 6,8)
 - 3,00 ml Glycerin 30 %

- 2,00 ml SDS
- 0,5 ml Bromphenolblau
- Lysepuffer:
 - 50 mM TRIS-HCl pH 8
 - 150 mM NaCl
 - 1 % NP-40
 - 0,1 % SDS
 - 0,5 % Natriumdesoxycholat
 - 0,02 % Natriumazid
- Sammelgel, 5%ig :
 - 2,75 ml Aqua dest.
 - 1,25 ml 1,5 M Tris-Cl (pH 6,8)
 - 0,85 ml Acrylamid 30 %
 - 50 µl SDS 10 % in Aqua dest.
 - 25 µl APS 10 % in Aqua dest.
 - 5 µl TEMED
- TBS-Puffer, 10fach (pH 7,6):
 - 24,2 g Trizma-Base
 - 80 g NaCl
 - 800 ml Aqua dest.
 - mit HCl pH einstellen, mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
- Transferpuffer:
 - 800 ml Aqua dest.
 - 100 ml Methanol
 - 100 ml Millipore-Wasser

- 3 g Trizma-Base
- 14,4 g Glycine
- Trenngel, 10%ig:
 - 4,10 ml Aqua dest.
 - 2,50 ml 1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)
 - 3,30 ml Acrylamid 30 %
 - 100 µl SDS 10 % in Aqua dest.
 - 50 µl APS 10 % in Aqua dest.
 - 5 µl TEMED
- Trenngel 15%ig:
 - 2,40 ml Aqua dest.
 - 2,50 ml 1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)
 - 5,00 ml Acrylamid 30 %
 - 100 µl SDS 10 % in Aqua dest.
 - 50 µl APS 10 % in Aqua dest.
 - 5 µl TEMED
- TRIS-Cl, 0,5 M (pH 6,8):
 - 6,00 g Trizma-Base
 - 80 ml Aqua dest.
 - mit HCl pH einstellen, mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
- TRIS-Cl, 1,5 M (pH 8,8):
 - 18,15 g Trizma-Bse
 - 170 ml Aqua dest.
 - mit HCl pH einstellen, mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
- Waschpuffer:

- 90 ml Aqua dest.
- 10 ml 10fach TBS
- 100 µl Tween

Software:

- Photoshop Elements 2.0 (Adobe, San Jose, USA)

2.1.4 Immunpräzipitation**Materialien/Chemikalien:**

- Catch and Release® v2.0 Reversible Immunoprecipitation System (Millipore Corporation, Billerica, USA)
 - Antibody Capture Affinity Ligand
 - Catch and Release® Wash Buffer, 10X
 - Catch and Release® Denaturing Elution Buffer, 1X
 - Catch and Release® Spin Columns
 - Catch and Release® Capture Tubes

Antikörper:

- siehe 2.1.3

2.2 Patienten

Insgesamt wurden AAA-Präparate von 40 Patienten untersucht, die sich in den Jahren 2005 bis 2008 einer offenen Aneurysma-Operation in der Klinik für Gefäßchirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unterzogen. Histologische Untersuchungen und quantitative Real-Time RT-PCR wurden an AAA-Präparaten von 32 Patienten durchgeführt. Innerhalb dieser Gruppe wurden zusätzlich die Präparate von 8 asymptomatischen AAA-Patienten mit Präparaten von 4 symptomatischen AAA-Patienten verglichen. Von 8 AAA-Patienten wurden zusätzlich Serumproben mittels Immunpräzipitation untersucht. An AAA-Präparate von weiteren 8 Patienten wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Als Kontrollen dienten 10 Aorten-

Präparate von Patienten, die im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München obduziert wurden.

2.3 Präparatgewinnung

2.3.1 Für Immunhistochemie und RT-PCR

Die Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen und die quantitative Real-Time RT-PCR wurden im Rahmen einer offenen Aneurysmaoperation aus der Gefäßwand der erweiterten infrarenalen Aorta entnommen. Sofort nach der Entnahme wurden sie zur Fixierung in 4%iges Formalin eingelegt. Dort wurden sie für 24 Stunden belassen. Bei besonders verkalkten Gefäßwänden wurden die Präparate im Anschluss an die Formalinfixierung so lange in EDTA entkalkt, bis die Schneidfähigkeit erreicht war. Danach wurden die Gewebeproben in einer Alkoholreihe ansteigender Konzentration entwässert und in Paraffin eingebettet.

2.3.2 Für Western Blot

Auch die Präparate für die Western Blot Analyse wurden im Rahmen offener Aneurysmaoperationen entnommen. Im Gegensatz zu den Präparaten für Immunhistochemie und PCR wurde hierbei jedoch keine Formalinfixierung durchgeführt. Die Präparate wurden stattdessen sofort wie unter 2.6.1 beschrieben weiterverarbeitet und anschließend bis zur Western Blot Analyse eingefroren.

2.3.3 Serumgewinnung für Immunpräzipitation

Bei den Patienten, die sich einer offenen Aneurysmaoperation unterzogen wurde präoperativ Blut entnommen. Das gewonnene Heparinblut wurde ca. 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um es ausreichend gerinnen zu lassen, und anschließend 10 min bei 1000x g und 4 °C abzentrifugiert. Das als Überstand verbliebene Serum wurde abpipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.4 Histologische Untersuchungen

2.4.1 Anfertigung der Schnittpräparate

Aus den in Paraffinblöcke eingebetteten Präparaten wurden am Mikrotom HM335E (Microm international, Walldorf, Deutschland) Schnitte von 2-3 µm Dicke erstellt. Um eine bessere

Schneidbarkeit zu erreichen wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte auf -15 °C gekühlt. In einem Wasserbad von 41 °C wurden die Schnitte auf die Objektträger aufgezogen. Für HE und Elastika van Gieson Färbungen wurden die Objektträger SuperFrost® (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Für immunhistochemische Färbungen wurden die Adhäsionsobjektträger SuperFrost® Plus (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) benutzt. Zusätzlich wurden hierbei die Schnitte noch mit einem Gemisch aus Pritt Bastelkleber (Henkel, Düsseldorf, Deutschland) und Poly-L-Lysine Solution P 8920 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) auf dem Objektträger fixiert, um ein späteres Ablösen bei der Antigendemaskierung zu verhindern. Zuletzt wurden die Präparate bei 56 °C für 48 h getrocknet.

2.4.2 Routinefärbungen - HE und Elastika van Gieson

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung und die Elastika van Gieson Färbung wurden vom Routinelabor des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München durchgeführt. Da es sich hierbei um Standardfärbungen handelt, werden diese im Folgenden nicht näher beschrieben.

2.4.3 Optimierung immunhistochemischer Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen für die Cathepsine B, D, K, L, S und Cystatin mussten für den jeweiligen Antikörper zuerst optimiert werden. Hierfür wurden verschiedene Parameter variiert. Dazu gehörten die Methoden zur Antigendemaskierung, die Konzentration des Primärantikörpers, die Inkubationsdauer mit dem Primärantikörper und die Blockade unspezifischer Antikörperreaktionen (Tabelle 2). Die endgültigen Färbeprotokolle werden weiter unten beschrieben. Jeder Antikörper wurde an zwei AAA-Präparaten, sowie an je einer, vom Hersteller empfohlenen Positivkontrolle (Tabelle 2) getestet. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen wurden zusätzlich Färbungen unter Weglassen des Primärantikörpers durchgeführt. Alle diese Färbungen wurde mit der LSAB-Methode durchgeführt.

Tabelle 2: Positivkontrollen und Parameter, die bei der Optimierung der Antikörper variiert wurden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Die letztendlich verwendeten Parameter sind **fett gedruckt**.

Antikörper	Positivkontrolle	Methoden zur Antigen-demaskierung	Verdünnung des Primärantikörpers	Inkubationszeit des Primärantikörpers	Blockade unspezifischer Antikörperreaktionen
Cathepsin B	Haut	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:50	1 h bei RT	60-minütige Inkubation mit Ziegen-Serum
		20 min bei 900 W in der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6,0 kochen		24 h bei 4 °C	keine
		keine			
Cathepsin D	Mammakarzinom	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:200	1 h bei RT	30-minütige Inkubation mit Ziegen-Serum
			1:400		60-minütige Inkubation mit Ziegen-Serum
		20 min bei 900 W in der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:800		
			1:2000		
		keine	1:8000		
			1:16000		
Cathepsin K	Mammakarzinom	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:100	1 h bei RT	keine
		20 min bei 900 W in der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:200		
			1:400		
		keine	1:1000		
Cathepsin L	Leber	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:25	1 h bei RT	keine
		keine	1:30		
Cathepsin S	Tonsille	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:10	1 h bei RT	keine
			1:20		
			1:25		
		keine	1:50		
Cystatin C	Gehirn	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	1:50	1 h bei RT	30-minütige Inkubation mit Ziegen-Serum
			1:100		keine
		keine	1:200		

2.4.4 Immunhistochemische Färbungen

2.4.4.1 APAAP-Methode

Die immunhistochemischen Färbungen gegen Smooth Muscle Aktin (SM-Aktin) und von Willebrand Faktor wurden mit der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode durchgeführt. Hierfür wurde das DAKO ChemMate™ Detection System, APAAP, Mouse Code No. K 5000 (DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet. Bei der APAAP-Methode bindet zunächst ein primärer Maus-Antikörper an das gewünschte Antigen. An diesen bindet dann ein sekundärer Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper. Letzterer bildet eine Brücke zwischen dem primären Antikörper und dem APAAP-Immunkomplex, der aus einem monoklonalen IgG1-Mausimmunglobulin und der daran gebundenen, aus Kälberdarm gewonnenen, alkalischen Phosphatase besteht (Abb. 1). Nach Zufügen des Substrates der alkalischen Phosphatase, kommt es durch die Reaktion zu einem roten Farbniederschlag.

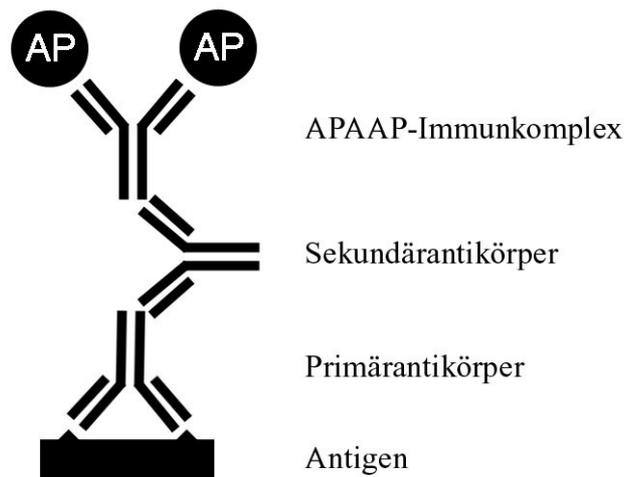


Abb. 1: schematische Darstellung der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP); AP = alkalische Phosphatase

Färbeprotokoll Smooth Muscle Aktin und von Willebrand Faktor

Tabelle 3: Antikörper, Verdünnungen und Arten der Antigendemaskierung für immunhistochemische Färbungen gegen Smooth Muscle Aktin (SM-Aktin) und von Willebrand Faktor (vWF)

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Antigendemaskierung
Smooth Muscle Aktin (glatte Muskelzellen)	Muscle Actin, Mouse Anti-Human, monoclonal, M0635, Klon HHF35 (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)	1:200	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen
von Willebrand Faktor (Endothelzellen)	vWF, Mouse Anti-Human, monoklonal, M0616, Klon F8/86 (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)	1:500	5 µg Protease + 5 ml Tris-Puffer 20 min Protease Typ XXIV, bakteriell (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

Bevor mit der immunhistochemischen Färbung begonnen wurde, wurden die Schnittpräparate über Nacht bei 56 °C im Brutschrank gelagert, um ein sicheres Anhaften der Präparate am Objektträger zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Xylol: 2 x 10 min => Isopropanol 100 %: 2 x 5 min => Ethanol 96 %: 5 min => Ethanol 70 % 5 min => Aqua dest.). Danach erfolgte die Antigendemaskierung, entweder durch 7-minütiges Kochen im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 (Smooth Muscle Aktin) oder durch 20-minütiges Einwirken der Protease Typ XXIV, bakteriell (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) (von Willebrand Faktor). [Durch die Antigendemaskierung werden die Quervernetzungen von Proteinen, die bei der Formalin-Fixierung entstanden sind, teilweise wieder aufgehoben. Dadurch ist es den Antikörpern wieder besser möglich an die vorher maskierten Epitope zu binden.] Nach dreimaligem Spülen mit Tris-Puffer wurde der jeweilige Primärantikörper mit Antikörper-Diluent S2022 (REAL Antibody Diluent, DAKO, Glostrup, Dänemark) verdünnt (Tabelle 3). Davon wurden 100 µl je Objektträger aufgetragen und die Schnitte für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Tris-Puffer, wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen und 25 min inkubiert. Es wurde wieder dreimal mit Tris-Puffer gewaschen. Nun wurde für 25 min mit dem APAAP-Immunkomplex inkubiert und darauf wieder dreimal gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Chromogen Substrates (750 µl Substrate Buffer, je 30 µl Chromogen Red 1, 2, 3) aufgetragen und nach 15 min wiederum dreimal mit Tris-Puffer gespült. Dann wurde, um die Zellkerne anzufärben, für 20 Sekunden eine Färbung mit Hämalaun (sauer, nach Mayer) durchgeführt und anschließend mit Leitungswasser für einige Minuten gespült. Zuletzt wurden die Schnittpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und am Promounter

RCM 2000 (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) eingedeckt.

Die Objektträger wurden immer in einer feuchten Kammer inkubiert, um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Dies gilt auch für alle anderen beschriebenen immunhistochemischen Färbungen und wird im Folgenden nicht mehr explizit erwähnt.

2.4.4.2 LSAB-Methode

Für die immunhistochemischen Färbungen, die mit der LSAB-Methode (labeled streptavidin-biotin) durchgeführt wurden, wurde das Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse Code K5001 (DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet. Hierbei bindet im ersten Schritt der primäre Antikörper an die Epitope des zugehörigen Antigens. An diesen bindet dann ein biotinylierter sekundärer Antikörper. In Abhängigkeit vom primären Antikörper wurde entweder die im oben genannten Kit enthaltene Lösung verwendet, die sowohl biotinylierte Ziege-Anti-Maus-, als auch Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline enthält, oder es kam ein biotinylierter Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper (Rabbit Anti-Goat, biotinyliert, polyclonal, E0466 (1,6 g/l) (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)) zum Einsatz, wenn der primäre Antikörper von der Ziege stammte. Der biotinylierte sekundäre Antikörper reagiert mit mehreren Streptavidinmolekülen, welche mit Meerrettichperoxidase konjugiert sind (Abb. 2). Zuletzt setzt die Peroxidase H_2O_2 zu H_2O um wobei Diaminobenzidin als Elektronendonator dient, also oxidiert wird. Durch dessen Oxidation entsteht ein braunes Endprodukt.

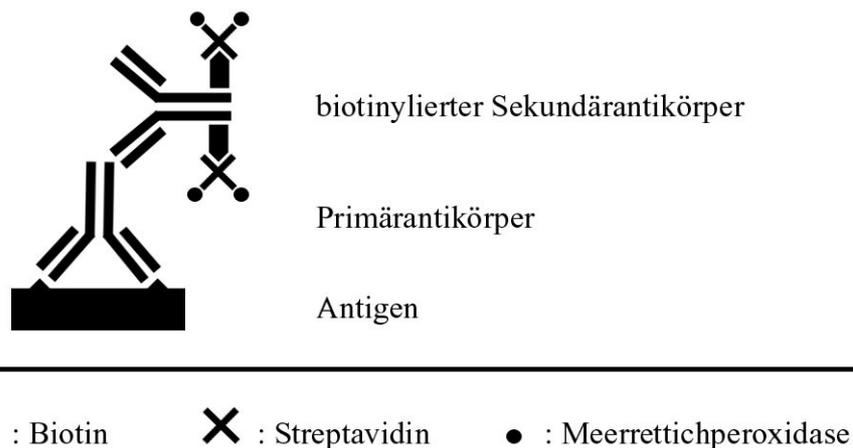


Abb. 2: schematische Darstellung der labeled streptavidin-biotin-Methode (LSAB)

Färbeprotokoll CD3, CD20 und CD68

Tabelle 4: Antikörper, Verdünnungen und Art der Antigendemaskierung für immunhistochemische Färbungen gegen CD3, CD20 und CD68

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Antigendemaskierung
CD3 (T-Zellen)	CD3, Rabbit Anti-Human, polyklonal, A0452 (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark)	1:400	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen
CD20 (B-Zellen)	CD20, Mouse Anti-Human, monoklonal, M0755, Klon L26 (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark)	1:500	
CD68 (Makrophagen)	CD68, Mouse Anti-Human, monoklonal, M0814, Klon KP1 (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark)	1:2000	

Bevor mit der immunhistochemischen Färbung begonnen wurde, wurden die Schnittpräparate über Nacht bei 56 °C im Brutschrank gelagert, um sicheres Anhaften der Präparate am Objektträger zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Xylol: 2 x 10 min => Isopropanol 100 %: 2 x 5 min => Ethanol 96 %: 5 min => Ethanol 70 % 5 min => Aqua dest.). Danach erfolgte die Antigendemaskierung durch 7-minütiges Kochen mit Citratpuffer pH 6,0 im Schnellkochtopf. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer wurde die Peroxidase mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 15 min geblockt. Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen und die Schnittpräparate mit dem primären Antikörper (100 µl je Objektträger) eine Stunde inkubiert. Die Antikörper wurden mit Antikörper-Diluent S2022 (REAL Antibody Diluent, DAKO, Glostrup, Dänemark) verdünnt (Tabelle 4). Wieder wurde dreimal gespült, für 25 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend wieder dreimal mit Tris-Puffer gespült. Dann wurden die Präparate mit Streptavidin Peroxidase inkubiert und nach 25 min erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Chromogen Substrates (DAB + HRP Substrat Puffer 1:50) aufgetragen, nach 2 Minuten wurde wiederum dreimal mit Tris-Puffer gespült. Dann wurde, um die Zellkerne anzufärben, für 20 Sekunden eine Färbung mit Hämalaun (sauer, nach Mayer) durchgeführt und anschließend mit Leitungswasser für einige Minuten gespült. Zuletzt wurden die Schnittpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit dem Eindeckgerät Promounter RCM 2000 (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) eingedeckt.

Färbeprotokoll Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C

Tabelle 5: Antikörper mit jeweiliger Verdünnung und Inkubationsdauer sowie Art der Antigenmaskierung und Blockade unspezifischer Antikörperreaktionen

Antigen	Primärer Antikörper	Verdünnung und Inkubationsdauer	Sekundärer Antikörper	Antigen-demaskierung	Blockade unspezifischer Antikörperreaktionen
Cathepsin B	Cathepsin B, Mouse monoclonal [CB131] to Cathepsin B (ab26395) (Abcam, Cambridge, UK)	1:50 24 h bei 4 °C	im Kit enthalten	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	60-minütige Inkubation mit Ziegen Serum (1:100 mit Tris-Puffer verdünnt)
Cathepsin D	Cathepsin D, Mouse monoclonal [CTD-19] to Cathepsin D (ab6313) (Abcam, Cambridge, UK)	1:16000 1 h bei RT	im Kit enthalten	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	60-minütige Inkubation mit Ziegen Serum (1:100 mit Tris-Puffer verdünnt)
Cathepsin K	Cathepsin K, Mouse monoclonal [3F9] to Cathepsin K (ab37259) (Abcam, Cambridge, UK)	1:200 1 h bei RT	im Kit enthalten	20 min bei 900 W in der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	
Cathepsin L	Cathepsin L, Mouse monoclonal [13C2] to Cathepsin L (ab50799) (Abcam, Cambridge, UK)	1:30 1 h bei RT	im Kit enthalten	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	
Cathepsin S	Cathepsin S, Goat polyclonal to Cathepsin S (ab18822) (Abcam, Cambridge, UK)	1:25 1 h bei RT	Rabbit Anti-Goat, biotinyliert, polyclonal, E0466 (1,6 g/l) (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) Verdünnung 1:50	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	
Cystatin C	Cystatin C, Rabbit polyclonal to Cystatin C (ab33487) (Abcam, Cambridge, UK)	1:200 1 h bei RT	im Kit enthalten	7 min im Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6,0 kochen	30-minütige Inkubation mit Ziegen Serum (1:100 mit Tris-Puffer verdünnt)

Bevor mit der immunhistochemischen Färbung begonnen wurde, wurden die Schnittpräparate über Nacht bei 56 °C im Brutschrank gelagert um sicheres Anhaften der Präparate am Objektträger zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Xylol: 2 x 10 min => Isopropanol 100 %: 2 x 5 min => Ethanol 96 %: 5 min => Ethanol 70 % 5 min => Aqua dest.). Danach erfolgte die Antigendemaskierung. Hierfür wurden die Präparate in Citratpuffer pH 6,0 gekocht, entweder für 7 min im Schnellkochtopf (Cathepsin B, D, L, S, Cystatin C) oder für 20 min in der Mikrowelle bei 900 W (Cathepsin K), wobei nach 10 min Citratpuffer nachgefüllt wurde, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer wurde die Peroxidase mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 15 min geblockt, anschließend wurde wieder dreimal gewaschen. Bei Cathepsin B, Cathepsin D und Cystatin C wurden, vor dem Auftragen des Primärantikörpers die Schnitte mit Ziegen Serum S1000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) inkubiert um unspezifische Antikörperreaktionen zu blockieren (60 min bei Cathepsin B und, 30 min bei Cystatin C). Dadurch kam es zu weniger unspezifischen Färbungen des Hintergrundes und es wurden bessere Ergebnisse erzielt. Das Ziegen Serum wurde nicht abgewaschen, sondern nur abgeschüttelt. Die Präparate wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper entweder eine Stunde bei Raumtemperatur (Cathepsin D, K, L, S, Cystatin C) oder 24 Stunden bei 4 °C (Cathepsin B) inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit dem Antikörper-Diluent S2022 (REAL Antibody Diluent, DAKO, Glostrup, Dänemark) verdünnt (Tabelle 5). Nach dreimaligem Spülen wurde 25 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Bei Cathepsin S wurde der biotinylierte Kaninchen-anti-Ziege Antikörper (Rabbit Anti-Goat, biotinyliert, polyclonal, E0466 (1,6 g/l) (DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark)) verwendet. Dieser wurde mit dem Antikörper-Diluent S2022 (REAL Antibody Diluent, DAKO, Glostrup, Dänemark) verdünnt. Für alle anderen wurde die im LSAB-Kit enthaltene Lösung mit sekundären Antikörpern (Biotinylated anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins in buffered Solution) verwendet. Danach wurde dreimal mit Tris-Puffer gespült, für 25 min mit Streptavidin Peroxidase inkubiert und erneut dreimal gespült. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Chromogen Substrates (DAB + HRP Substrat Puffer 1:50) aufgetragen, nach 2 min wurde wiederum dreimal mit Tris-Puffer gespült. Dann wurde, um die Zellkerne anzufärben, für 20 Sekunden eine Färbung mit Hämalaun (sauer, nach Mayer) durchgeführt und anschließend mit Leitungswasser für einige Minuten gespült. Zuletzt wurden die Schnittpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

2.4.5 Semiquantitative Auswertung

Die Auswertung der histologischen Färbungen erfolgte semiquantitativ, wobei die immunhistochemische Anfärbung der jeweiligen Zellen durch eine Skala von - bis +++ quantifiziert wurde (Tabelle 6).

Tabelle 6: Beschreibung der Symbole zur semiquantitativen Auswertung

-	-/+	+	++	+++
keine Anfärbung der Zellen	keine bis leichte Anfärbung	leichte Anfärbung	kräftige Anfärbung	sehr starke Anfärbung

Anhand verschiedener histologischer und immunhistochemischer Färbungen wurden die Gefäßwände charakterisiert. Die HE-Färbung wurde durchgeführt um die Zellularität der Präparate und die Entzündungsinfiltrate zu quantifizieren. Das mengenmäßige Vorkommen von Kollagen und Elastin wurde anhand der EvG-Färbung bestimmt. Makrophagen wurden mit Antikörpern gegen CD68, T-Zellen mit CD3, B-Zellen mit CD20 und glatte Muskelzellen mit Smooth Muscle Aktin-Antikörpern angefärbt. Mit Antikörpern gegen von Willebrand Faktor wurden Endothelzellen gefärbt, zum einen die luminalen Endothelzellen der Aortenwand, zum andern die Endothelzellen von Gefäßen, die im Rahmen der Neovaskularisation entstanden sind. Alle oben genannten Zellen wurden hinsichtlich der Expression der Cathepsine und Cystatin C untersucht. Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte am Mikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl-Zeiss Lichtmikroskopie, Jena, Deutschland). Fotos von den Präparaten wurden mit der Color Video Camera 3CCD Color MC 3255 (Sony, Tokio, Japan) erstellt.

2.5 RT-PCR

2.5.1 RNA-Extraktion

Um den eventuell möglichen Abbau von RNA durch RNasen zu vermeiden, wurde das beim Schneiden verwendete Material vorher mit RNaseZAP (Invitrogen, Carlsbad, USA) gereinigt. Von den Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden am Mikrotom HM335E (Microm international, Walldorf, Deutschland) jeweils zwei 10 µm dicke Schnitte gewonnenen. Zu diesen wurde jeweils 800 µl Xylol zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Ethanol 100 % zugegeben und gemischt. Das Gemisch wurde 4 min bei 12.000 rpm und RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Erneut wurden 1000 µl Ethanol 100 % zugegeben,

gemischt und 4 min bei 12.000 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entparaffinierte Präparat in einem Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 10 min bei 55 °C getrocknet.

Nach der Entparaffinierung erfolgte die RNA-Isolierung mit dem High Pure RNA Paraffin Kit 03 270 289 001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Zu den getrockneten Präparaten wurden jeweils 100 µl Tissue Lysis Buffer, 16 µl 10 % SDS und 40 µl Proteinkinase K, PCR grade zugegeben. Dann wurden die Proben im Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) über Nacht bei 55 °C und 350 rpm inkubiert. Danach wurden 10 µl Proteinkinase K, rekombinant, REF 03 115 879 001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zugegeben und eine weitere Stunde bei 55 °C und 350 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 325 µl Binding Buffer und 325 µl Ethanol 100 % zugegeben und gemischt. Die High Pure Filter Tubes wurden in die Collection Tubes eingesetzt und die Proben in die High Pure Filter Tubes überführt und 30 s bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Es wurde nochmals 2 min bei 12000 rpm abzentrifugiert und wieder der Durchlauf verworfen. Je Röhrchen wurde 500 µl Wash Buffer I zugegeben, 15 s bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde noch zweimal mit Wash Buffer II wiederholt, wobei beim ersten Mal 500 µl Wash Buffer II, beim zweiten Mal 300 µl zugegeben wurden. Es wurde weitere 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dann wurde das High Pure Filter Tube in ein autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt, 90 µl Elution Buffer zugegeben, 2 min bei RT inkubiert und 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Das High Pure Filter Tube wurde verworfen.

An der nun isolierten RNA erfolgte als nächster Schritt das Verdauen der DNA mittels DNase. Dazu wurden je Probe 10 µl DNase Incubation Buffer und 1 µl DNase I zugegeben, gemischt und 45 min bei 37 °C im Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

Danach wurde die RNA aufgereinigt. Je Probe wurden 20 µl Tissue Lysis Buffer, 18 µl 10 % SDS und 40 µl Proteinkinase K zugegeben, gemischt und im Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 1 h bei 55 °C und 350 rpm inkubiert. Anschließend wurden, wie bei der RNA-Isolierung, jeweils 325 µl Binding Buffer und 325 µl Ethanol 100 % zugegeben und gemischt. Die High Pure Filter Tubes wurden in die Collection Tubes eingesetzt und die Proben in die High Pure Filter Tubes überführt und 30 s bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Es wurde nochmals 2 min bei 12000 rpm abzentrifugiert und wieder der Durchlauf verworfen. Je

Röhrchen wurde 500 µl Wash Buffer I zugegeben, 15 s bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde noch zweimal mit Wash Buffer II wiederholt, wobei beim ersten Mal 500 µl Wash Buffer II, beim zweiten Mal 300 µl zugegeben wurden. Es wurde weitere 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dann wurde das High Pure Filter Tube in ein autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt 90 µl Elution Buffer zugegeben, 2 min bei RT inkubiert und 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Das High Pure Filter Tube wurde verworfen.

Zuletzt erfolgte die RNA-Fällung. Zum Schutz der temperaturempfindlichen RNA wurde, um die Proben zu kühlen, auf Eis gearbeitet. Zu den Proben, mit der im vorausgehenden Schritt aufgereinigten RNA, wurden je 250 µl Ethanol 100 %, 10 µl NaAcetat (3 M, pH 4,5) und 1,5 µl Glykogen, REF 10 091 393 001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zugegeben, gemischt und 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, je 1 ml Ethanol 70 % zugegeben und gemischt. Dann wurde erneut 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewonnenen RNA-Pellets wurden für einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl PCR-Wasser double processed (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) resuspendiert. Dann wurden die Proben für 10 min bei -20 °C eingefroren und anschließend die RNA-Konzentration bestimmt.

Dazu wurde jeweils 1 µl der Proben mit PCR-Wasser double processed (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) 1:100 verdünnt und davon im Photometer die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Eine OD_{260} -Einheit entspricht einer Konzentration einsträngiger RNA von 40 µg/ml. Die RNA-Konzentration berechnete sich folgendermaßen:

$$RNA - Konzentration (\mu g / ml) = OD_{260} \cdot 40 \mu g / ml \cdot 100$$

2.5.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das cDNA Synthesis Kit RevertAid, K1622 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Je Probe wurde 1 µg RNA verwendet.

$$V_{RNA} (ml) = \frac{1 \mu g}{RNA - Konzentration (\mu g / ml)}$$

Die RNA wurde jeweils mit DEPC-treated Water auf 11 µl aufgefüllt. Es wurde 1 µl des Oligo(dT)₁₈ Primer zugegeben, gemischt, 5 min bei 65 °C auf dem Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert und dann auf Eis gestellt und weitere 2 min inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe ein Ansatz aus 4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 µl des 10 mM dNTP Mix und 1 µl Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcriptase zugegeben, gemischt und kurz anzentrifugiert. Dann wurde 1 h bei 43 °C inkubiert und anschließend die Reaktion bei 70 °C für 5 min gestoppt. Die Proben wurden anzentrifugiert und bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C eingefroren.

2.5.3 Primerdesign

Um die gewünschten Primer zu entwerfen wurde die Anwendung Primer BLAST des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) verwendet. Dafür wurde jeweils die mRNA Sequenz benötigt, die für das jeweilige Cathepsin/Cystatin C kodiert. Für die Größe der Primer wurde ein Bereich zwischen 15 und 27 Basen festgelegt, die Schmelztemperatur sollte zwischen 57 °C und 63 °C liegen. Als gewünschte Länge des PCR Produkts wurde ein Bereich von 70 bis 140 Basen gewählt. Da mRNA nur Exons und keine Introns enthält, musste darauf geachtet werden, dass die von den jeweiligen Primern definierte Sequenz nur im Bereich von Exons lag.

2.5.4 RT-PCR Optimierung

Vor Durchführung der quantitativen Real-Time RT-PCR mit den Proben der abdominalen Aortenaneurysmen und Kontrollortaen wurden zuerst verschiedene Primerpaare getestet um optimale Ergebnisse zu erzielen. Hierfür wurde JURKAT DNA verwendet. Dazu wurde der Mastercycler personal (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet. Als annealing Temperatur wurden zunächst 55 °C gewählt. Es wurden Reaktionsansätze von je 50 µl hergestellt. Diese setzten sich zusammen aus jeweils 36 µl PCR-Wasser double processed (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 5 µl 10x Reactionbuffer Y (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), 5 µl dNTPs aus dem dNTP-Set peqGOLD, 20-2011 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), 0,25 µl SAWADY 'Hot' Taq-DNA-Polymerase (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), 2 µl DNA, 1 µl des Primer F (forward) und 1 µl des Primer R (reverse). Im Anschluss an die PCR wurde von den Proben eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 3). Die Ergebnisse der Verschiedenen Primerpaare wurden

verglichen und jeweils die besten für das weitere Vorgehen ausgewählt (Tabelle 7). Nach der Auswahl der besten Primerpaare, wurde mit diesen mehrere Durchläufe der quantitativen Real-Time RT-PCR mit verschiedenen annealing Temperaturen durchgeführt, um die, für das jeweilige Primerpaar, am besten geeignete Temperatur herauszufinden. Es wurde sowohl mit DNA, als auch mit cDNA getestet (Abb. 4). Zusätzlich wurden von der quantitativen Real-Time RT-PCR auch Durchläufe durchgeführt, in denen den Reaktionsansätzen anstatt der DNA bzw. cDNA eine äquivalente Menge Wasser zugesetzt wurde. Dies diente dazu ein Vorkommen von etwaigen Primerdimeren nachzuweisen bzw. auszuschließen.

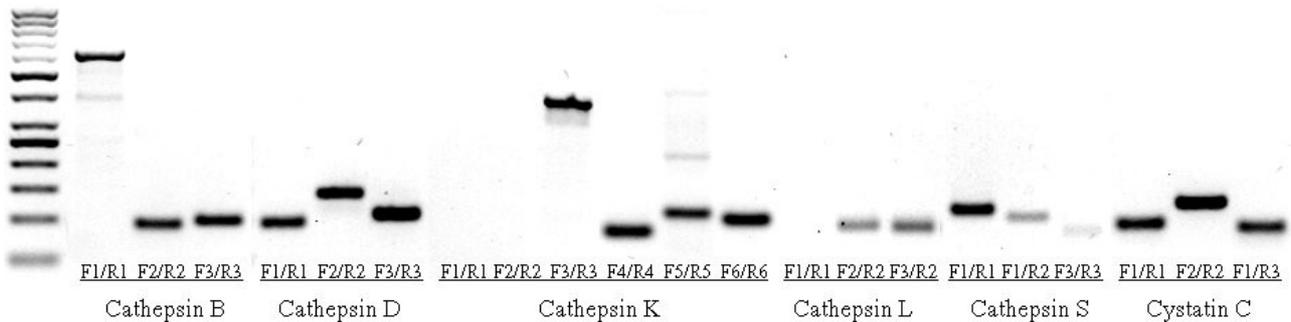


Abb. 3: Agarose-Gelelektrophorese der getesteten Primerpaare, 55 °C, JURKAT DNA

Tabelle 7: Getestete Primerpaare mit Fragmentlängen der PCR-Produkte, die Primerpaare, die für die quantitative Real-Time RT-PCR verwendet wurden sind fett gedruckt

Primerpaar	Fragmentlänge des PCR-Produktes
CathB-F1/CathB-R1	78 bp
CathB-F2/CathB-R2	94 bp
CathB-F3/CathB-R3	100 bp
CathD-F1/CathD-R1	94 bp
CathD-F2/CathD-R2	138 bp
CathD-F3/CathD-R3	104 bp
CathK-F1/CathK-R1	87 bp
CathK-F2/CathK-R2	130 bp
CathK-F3/CathK-R3	121 bp
CathK-F4/CathK-R4	85 bp
CathK-F5/CathK-R5	110 bp
CathK-F6/CathK-R6	103 bp
CathL-F1/CathL-R1	137 bp
CathL-F2/CathL-R2	89 bp
CathL-F3/CathL-R2	86 bp
CathS-F1/CathS-R1	117 bp
CathS-F1/CathS-R2	104 bp
CathS-F3/CathS-R3	83 bp
CysC-F1/CysC-R1	90 bp
CysC-F2/CysC-R2	121 bp
CysC-F1/CysC-R3	86 bp
GAPDH-F2/GAPDH-R2	122 bp
GAPDH-F3cD/GAPDH-R3cD	135 bp
GAPDH-F4cD/GAPDH-R4cD	136 bp

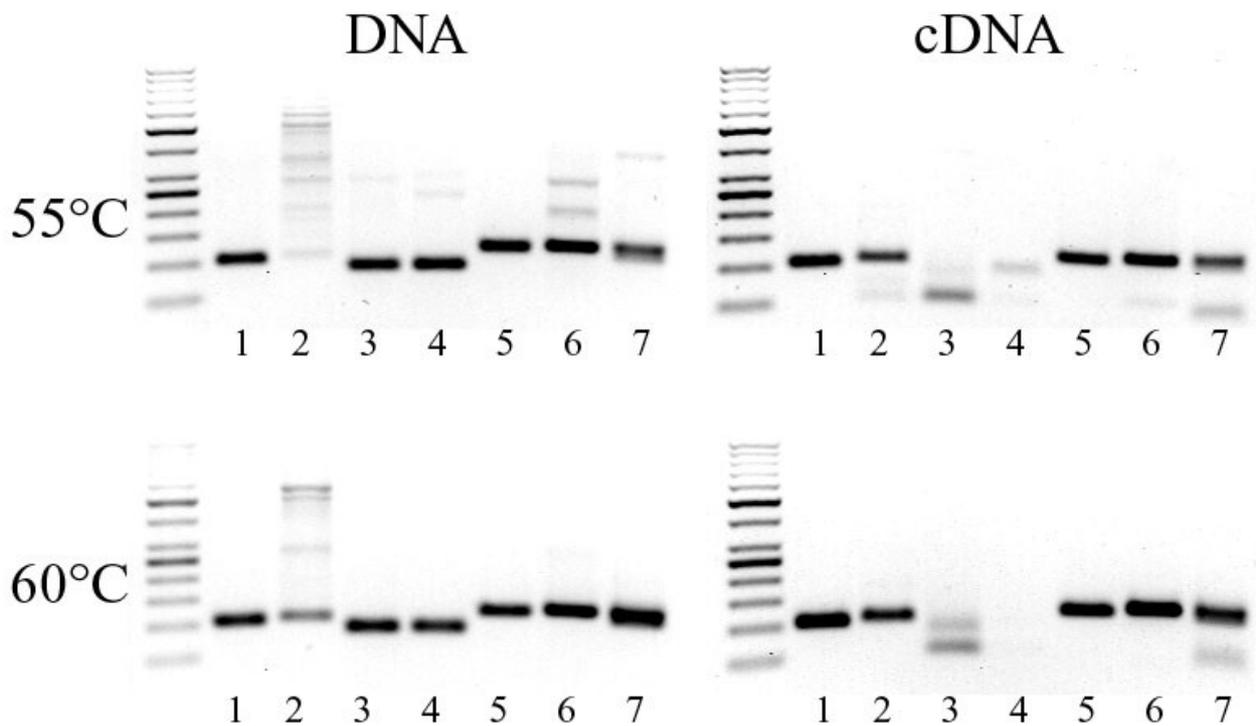


Abb. 4: Optimierung der quantitativen Real-Time RT-PCR; dargestellt sind Versuchsdurchläufe mit DNA und cDNA bei 55 °C und 60 °C; 1: Cathepsin B, 2: Cathepsin D, 3: Cathepsin K, 4: Cathepsin L, 5: Cathepsin S, 6: Cystatin C, 7: GAPDH

2.5.5 Quantitative Real-Time RT-PCR

Für die quantitative Real-Time RT-PCR wurde je Probe ein Ansatz von 25 µl hergestellt. Dieser setzte sich zusammen aus jeweils 9,5 µl PCR-Wasser double processed (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 12,5 µl Mastermix KAPA SYBR 07-KK4600-02 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), 0,5 µl des Primer F (forward), 0,5 µl des Primer R (reverse) (Tabelle 8) und 2 µl cDNA. Die Proben wurden in eine 96-well PCR-Platte pipettiert. Zum Eichen wurden in die jeweilige Platte zusätzlich zweimal Wasser, zweimal 5 ng DNA und zweimal 10 ng DNA pipettiert. Die quantitative Real-Time RT-PCR wurde am SYBR-Green-Cycler iQ™ 5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) durchgeführt. Die PCR erfolgte unter den folgenden Bedingungen: Zu Beginn wurde die DNA-Polymerase durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C aktiviert. Darauf folgten 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung für 10 s bei 95 °C, Primerhybridisierung für 30 s bei der für die jeweiligen Primerpaare optimalen Annealing Temperatur (Tabelle 8) und Elongation für 10 s bei 72 °C.

Tabelle 8: Primerpaare und jeweils verwendete Annealing Temperatur; F=forward, R=reverse

	Primer	Annealing Temperatur
Cathepsin B	F3/R3	58 °C
Cathepsin D	F3/R3	60 °C
Cathepsin K	F4/R4	60 °C
Cathepsin L	F3/R2	55 °C
Cathepsin S	F1/R1	55 °C
Cystatin C	F2/R2	58 °C
GAPDH	F4cD/R4cD	60 °C

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurde von den Proben eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel gegossen. Das zugegebene Ethidiumbromid dient der Sichtbarmachung der Nukleinsäuren. Es lagert sich zwischen deren Basen ein und fluoresziert unter ultraviolettem Licht. Als Marker wurde die DNA-Leiter peqGOLD 50 bp, 25-2000 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet. Hiervon wurden 2 µl mit 18 µl PCR-Wasser double processed (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 4 µl Xylencyanol 6x verdünnt und davon 20 µl auf das Gel aufgetragen. Zu den Proben wurden je 10 µl (RT-PCR) oder 5 µl Xylencyanol 6x (quantitative Real-Time RT-PCR) gegeben und von jeder Probe 20 µl auf das Gel aufgetragen. Dann wurde entweder für 60 min eine Spannung von 80 V (RT-PCR) oder für 30 min eine Spannung von 100 V (quantitative Real-Time RT-PCR) angelegt. Anschließend wurden die Gele am Stratagene Eagle Eye II Imaging System (Pegasus System Inc., Rockville, USA) fotografiert.

2.5.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten der quantitativen Real-Time RT-PCR erfolgte mit der Software SPSS 17.0.. Im ersten Schritt wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, um zu testen ob die Messwerte der PCR normalverteilt sind. Normalverteilte stetige Stichproben wurden anschließend mit dem Studentschen T-Test für zwei unabhängige Variablen miteinander verglichen. Nicht normalverteilte Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn der P-Wert < 0,05 war.

2.6 Western Blot

2.6.1 Probengewinnung

Proben von frischen Operationspräparaten eines infrarenalen Aortenaneurysmas wurden klein geschnitten, mit flüssigem Stickstoff überschichtet und in einer Reibschale zerkleinert. Die zerkleinerten Proben wurden im Anschluss mit Lysepuffer überschichtet und 15-30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden sie mehrmals gemischt. Das hierbei entstandene Homogenisat wurde anschließend auf dem Vortex-Rüttler nochmals 30 s gemischt und dann 15-30 min bei 4 °C und 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde separiert und Proteinbestimmung und Western Blot Analyse zugeführt.

2.6.2 Proteinbestimmung

Vor der Durchführung der Western Blot Analyse und der Immunpräzipitation wurde von den jeweils verwendeten Proben eine Proteinbestimmung durchgeführt. Für die Western Blot Analyse wurden anschließend 100 µg Protein je Probe verwendet, für die Immunpräzipitation 500 µg. Als Standard für die Proteinbestimmung wurde eine BSA-Standardreihe verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: BSA-Standardreihe

Proteinmenge in µg	BSA-Verdünnung
0	0 µl BSA + 10 µl Lysispuffer
2,5	2,5 µl BSA (1:10) + 7,5 µl Lysispuffer
5	5,0 µl BSA (1:10) + 5,0 µl Lysispuffer
7,5	7,5 µl BSA (1:10) + 2,5 µl Lysispuffer
10	10,0 µl BSA (1:10) + 0,0 µl Lysispuffer
15	7,5 µl BSA (1:5) + 2,5 µl Lysispuffer
20	10,0 µl BSA (1:5) + 0,0 µl Lysispuffer

Sowohl von den Standardproben, als auch von Proben (1 µl Probe + 9 µl Lysispuffer) wurden je 10 µl in eine 96-Wellplatte pipettiert und anschließend jeweils 200 µl der Arbeitslösung (Pierce® BCA Protein Assay Kit (Reagent B: Reagent A 1:50) (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)) zugegeben. Nach 30-minütigem Inkubieren bei 37 °C wurde am Photometer Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) die Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Aus den Werten der Standardproben wurde eine Standardkurve erstellt und

anhand dieser die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.6.3 Durchführung

Der Western Blot wurde mit folgenden Geräten der Firma BIO-RAD durchgeführt. Zum Gießen der Gele und zur Elektrophorese wurde das Ready Gel System, zum anschließenden Blotting die Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell verwendet. Als Stromquelle kam der PowerPac HC Power Supply zum Einsatz.

2.6.3.1 Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde zuerst ein 10 % bzw. 15 % (Cystatin C) Polyacrylamid-Trenngel (Zusammensetzung siehe 2.1.3) gegossen und mit 1 ml 100 % Ethanol überschichtet. Nachdem es nach 15-30 min polymerisiert war, wurde das Ethanol abgegossen, mit destilliertem Wasser nachgespült und die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurde darüber das 5 % Sammelgel gegossen und ein im BIO-RAD Ready Gel System enthaltener Kamm eingesetzt um die Taschen zu Formen, in die die Proben eingebracht wurden. Nach der Polymerisation des Sammelgels (15-30 min) wurde der Kamm entfernt und die entstandenen Taschen mit destilliertem Wasser gespült. Die Taschen wurden mit den Proben und einem Marker befüllt, je Tasche mit 30 µl. Als Marker wurden 20 µl Proteinmarker III peqGOLD, vorgefärbt, (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet und mit 10 µl Lysepuffer verdünnt. Die Proben wurden zuvor, je nach vorher bestimmtem Proteingehalt, mit Loadingpuffer auf 30 µl aufgefüllt, 5 min bei 95 °C gekocht, kurz anzentrifugiert und auf Eis gestellt. Leere Taschen im Gel wurden mit 30 µl Lysepuffer befüllt, um ein besseres Ergebnis zu erzielen. Die Elektrophorese wurde in der mit Elektrophoresepuffer befüllten Kammer des BIO-RAD Ready Gel System durchgeführt. Als Spannung wurden für die ersten 20 min 100 V und für weitere ca. 45 min 200 V gewählt. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem die Front das Gel vollständig durchlaufen hatte.

2.6.3.2 Blotting

Anschließend wurde das Gel aus der Apparatur entfernt und für 15-30 min in Transferpuffer equilibriert. Gleichzeitig wurde die PVDF-Blottingmembran 1 Minute in Methanol gelegt und dann ebenfalls 15-30 min in Transferpuffer equilibriert. Das Gel und die PVDF-Membran wurden übereinander zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren in die BIO-RAD Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell gelegt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 15 V und einer Dauer von 60 min.

2.6.3.3 Coomassie brilliant blue

Die Coomassie brilliant blue Färbung wurde bei der Optimierung des Western Blot verwendet. Mit ihr wurden die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel angefärbt. Hiermit wurde kontrolliert, ob beim Blotting ein ausreichender Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte. Dazu wurde das Gel unter leichtem Wippen 30 min bei RT in Coomassie-Blue-Lösung inkubiert und anschließend so lange mit Aqua dest. gewaschen bis blaue Proteinbanden sichtbar waren und der Hintergrund klar war. Dann wurde das Gel fotografiert (Abb. 5).

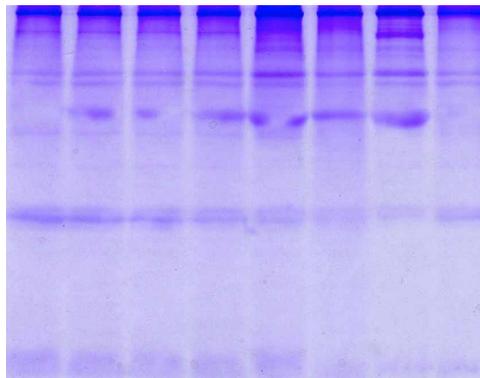


Abb. 5: Coomassie brilliant blue Färbung eines Polyacrylamidgels

2.6.3.4 Ponceau S

Die Ponceau S Färbung wurde durchgeführt um zu überprüfen, ob die Proteine beim Blotting auf die PVDF-Membran übertragen wurden. Die Membran wurde hierfür 5 min bei RT in Ponceau S Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) inkubiert, mit Aqua dest. entfärbt und fotografiert (Abb. 6). Vor der Weiterverwendung wurde die Membran noch mehrmals mit Aqua dest. gewaschen, bis keine roten Banden mehr vorhanden waren.

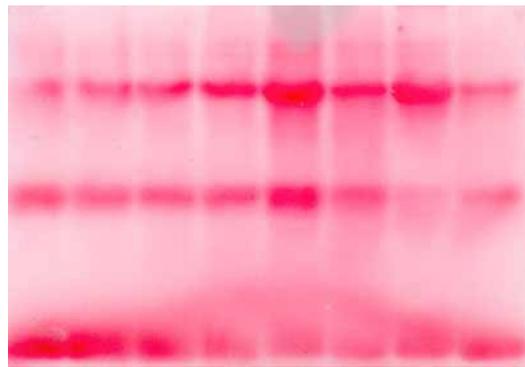


Abb. 6: Ponceau S Färbung einer PVDF-Membran

2.6.3.5 Immunblotting

Nach dem Transfer wurde die Membran bei Raumtemperatur und unter leichtem Wippen für 60 min in Blocking-Puffer inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in der entsprechenden Konzentration mit Blocking-Puffer verdünnt (Tabelle 10). Die Membran wurde in 10 ml davon über Nacht (ca. 16 h) bei 4 °C unter Wippen inkubiert.

Tabelle 10: Verdünnung der verwendeten Antikörper

Antigen	Antikörper	Verdünnung
Cathepsin B	Cathepsin B, rabbit polyclonal to Cathepsin B (ab30443) (Abcam, Cambridge, UK)	1:1000
Cathepsin D	Cathepsin D, Mouse monoclonal [CTD-19] to Cathepsin D (ab6313) (Abcam, Cambridge, UK)	1:1000
Cathepsin K	Cathepsin K, Mouse monoclonal [3F9] to Cathepsin K (ab37259) (Abcam, Cambridge, UK)	1:1000
Cathepsin L	Cathepsin L, rabbit polyclonal to Cathepsin L (ab49984) (Abcam, Cambridge, UK)	1:1000
Cathepsin S	Cathepsin S, Goat polyclonal to Cathepsin S (ab18822) (Abcam, Cambridge, UK)	1:200
Cystatin C	Cystatin C, Rabbit polyclonal to Cystatin C (ab33487) (Abcam, Cambridge, UK)	1:500
GAPDH	GAPDH, Mouse, monoklonal [6C5] to GAPDH, ab8245 (Abcam, Cambridge, UK)	1:5000

Die Membran wurde viermal jeweils 5 Minuten mit 15-20 ml Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde je nach Herkunft des primären Antikörpers ausgewählt und ebenfalls

mit Blocking-Puffer verdünnt. (Tabelle 11) Die Membran wurde unter Wippen in 10 ml bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert.

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper und deren Verdünnung

Herkunft des Primärantikörpers	Sekundärantikörper	Verdünnung
Ziege	Donkey Anti-Goat IgG, HAF109 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)	1:1000
Maus	Goat Anti-Mouse IgG, TM-001-HR (Thermo Scientific, Waltham, USA)	1:5000
Kaninchen	Goat Anti-Rabbit IgG, TR-001-HR (Thermo Scientific, Waltham, USA)	1:2500

Die Membran wurde in Waschpuffer viermal 5 min gewaschen und anschließend für 4 min unter Lichtausschluss in 10 ml des SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, USA) inkubiert (Luminol/Enhancer : Stable Peroxidase Buffer 1:1). Die Membran wurde zwischen zwei handelsüblichen Overheadfolien in eine Röntgenfilmkassette gelegt. In der Dunkelkammer erfolgte die Belichtung auf Medical X-Ray Filme 100NIF (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Die Belichtungszeiten wurden variiert. Die Filme wurden mit der Entwicklermaschine für Röntgenfilme CAT SRX-101A (Konica Minolta, Tokyo, Japan) entwickelt. Durch die Chemilumineszenz wurden die Bindungen der Antikörper auf dem Film sichtbar gemacht.

Um bei der Auswertung die Ergebnisse der Western Blot Untersuchungen der verschiedenen Cathepsine und Cystatin C untereinander vergleichen zu können, erfolgte mit jeder Membran noch ein Immunblot mit einem Standard. Hierfür wurde GAPDH verwendet. Nach der Belichtung der Filme, wurde die jeweilige Membran viermal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem, in Blocking-Puffer verdünnten, GAPDH-Antikörper, Mouse, monoklonal [6C5] to GAPDH, ab8245 (Abcam, Cambridge, UK) für 60 min. Die Membran wurde wieder viermal 5 min gewaschen und für 60 min mit dem, ebenfalls in Blocking-Puffer verdünnten, Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran wieder, wie oben beschrieben, mit der Chemilumineszenzlösung inkubiert, und die Filme belichtet. Als Belichtungszeiten wurden die gleichen, wie beim ersten Mal verwendet.

2.6.4 Auswertung

Die Filme wurden mit einem Flachbett-Scanner mit Durchlichteinheit (CanoScan 8800 F (Canon, Tokyo, Japan)) mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt. Für die Auswertung der Versuchsergebnisse wurde die Software Photoshop Elements 2.0 (Adobe, San Jose, USA) verwendet. Die Farbinformation der Bilder wurde verworfen und die Bilder wurden als Negativ dargestellt. Um die Banden zu quantifizieren wurden diese markiert und sowohl die Anzahl der erfassten Pixel (p), als auch der durchschnittliche Grauwert der jeweiligen Bande (b) bestimmt. Außerdem wurde der Grauwert des Hintergrundes (h) in der unmittelbaren Umgebung der entsprechenden Bande erfasst und von dem der Bande subtrahiert. Um die absolute Intensität der jeweiligen Bande zu erhalten wurde die Differenz der Grauwerte mit der Anzahl der Pixel multipliziert. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Intensitäten der Banden mit einem Standard (GAPDH) verglichen. Die Auswertung der Banden des Standards erfolgte gleichermaßen. Um die relative Intensität in Bezug auf den Standard zu erhalten wurde der Quotient aus beiden berechnet (siehe Formel).

$$\text{relative Intensität der Bande} = \frac{p \cdot (b - h)}{p_{GAPDH} \cdot (b_{GAPDH} - h_{GAPDH})}$$

2.7 Immunpräzipitation

2.7.1 Proteinbestimmung

siehe 2.6.2

2.7.2 Durchführung

Für die Immunpräzipitation wurde das Catch and Release® v2.0 Reversible Immunoprecipitation System (Millipore Corporation, Billerica, USA) verwendet. Der im Kit enthaltene 10x Catch and Release® Wash Buffer wurde mit Aqua dest. auf 1x verdünnt. Zuerst wurde der untere Teil der Säulen (Catch and Release® Spin Columns) abgebrochen, die Kappe abgeschraubt, die Spin Columns in jeweils ein Sammelröhrchen (Catch and Release® Capture Tube) eingesetzt und der Inhalt 30 s bei 5000 rpm abzentrifugiert. Dann wurde je Säule 400 µl des 1x Waschpuffers zugegeben, 30 s bei 5000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Vor dem nächsten Schritt wurden die Säulen wieder mit dem zu Beginn abgebrochenen Teil verschlossen. In die Säulen wurden nun ein Gemisch aus jeweils 10 µl des Affinity Ligand, 1 bis 10 µl des jeweiligen Antikörpers (Tabelle 12) und einem gewissen Volumen

der zu untersuchenden Serumprobe gegeben, das 500 µg Protein enthielt. Die Proteinkonzentration wurde vorher in der oben beschriebenen Proteinbestimmung festgestellt. Mit Wash Buffer wurde auf ein Gesamtvolumen von 500 µl je Säule aufgefüllt.

Tabelle 12: Antikörper und deren Volumina, die für die Immunpräzipitation verwendet wurden

Antigen	Antikörper	verwendetes Volumen
Cathepsin B	Cathepsin B, rabbit polyclonal to Cathepsin B (ab30443) (Abcam, Cambridge, UK)	1 µl
Cathepsin D	Cathepsin D, Mouse monoclonal [CTD-19] to Cathepsin D (ab6313) (Abcam, Cambridge, UK)	1 µl
Cathepsin K	Cathepsin K, Mouse monoclonal [3F9] to Cathepsin K (ab37259) (Abcam, Cambridge, UK)	10 µl
Cathepsin L	Cathepsin L, rabbit polyclonal to Cathepsin L (ab49984) (Abcam, Cambridge, UK)	2 µl
Cathepsin S	Cathepsin S, Goat polyclonal to Cathepsin S (ab18822) (Abcam, Cambridge, UK)	10 µl
Cystatin C	Cystatin C, Rabbit polyclonal to Cystatin C (ab33487) (Abcam, Cambridge, UK)	4 µl

Nachdem die Säulen wieder mit der Kappe verschlossen worden waren, wurden sie 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Dann wurde der untere Teil der Säule und die Kappe wieder entfernt, die Säule in ein Sammelröhrchen gesetzt und 30 s bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Nun wurde noch viermal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen (jeweils 30 s bei 5000 rpm abzentrifugiert) und der Durchlauf jeweils verworfen. Die Säulen wurden in ein neues Sammelröhrchen gesetzt und das immunpräzipitierte Antigen mit je 70 µl Catch and Release® Denaturing Elution Buffer, 1X eluiert. Nach Zentrifugation für 30 s bei 5000 rpm wurde der Durchlauf bei -20 °C aufbewahrt und dann damit eine Western Blot Analyse durchgeführt (siehe 2.6).

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakterisierung

Von den 40 AAA-Patienten waren 34 männlich und 6 weiblich. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der operativen Aneurysmatherapie betrug 68,2 Jahre (41 bis 88 Jahre). Der durchschnittliche, in der Computertomographie bestimmte, Aneurysmadurchmesser betrug 6,7 cm (3,9 bis 11,2 cm). Zusätzlich wurden Begleiterkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren (Tabelle 13), sowie die medikamentöse Therapie (Tabelle 14) der Patienten erfasst. Die 10 Kontrollpersonen hatten ein durchschnittliches Alter von 53 Jahren (38 bis 67 Jahre). Davon waren 8 männlich und 2 weiblich.

Tabelle 13: Begleiterkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren der untersuchten Patienten

Hypertonie	72,2 %
Diabetes mellitus	16,7 %
Hyperlipidämie	50,0 %
Nikotinabusus	55,6 %
Niereninsuffizienz	0,0 %
Koronare Herzkrankheit	38,9 %
periphere arterielle Verschlusskrankheit	16,7 %
Carotisstenose	16,7 %

Tabelle 14: Medikamentöse Therapie der untersuchten Patienten

ASS / Clopidogrel	61,1 %
β-Blocker	61,1 %
ACE-Hemmer	33,3 %
Statine	38,9 %
Protonenpumpenhemmer	83,3 %
Thromboseprophylaxe	77,8 %
Diuretika	27,8 %

3.2 Histologische Untersuchungen

3.2.1 Charakterisierung der AAA-Präparate

Alle AAA-Präparate wurden anhand histologischer und immunhistochemischer Färbungen charakterisiert (Tabelle 15). Anhand der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) wurden Zellularität, Entzündungsinfiltrate, atherosklerotische Veränderungen und Verkalkungen beurteilt. Elastische Fasern und Kollagen wurden mit der Elastika van Gieson Färbung angefärbt. Die CD68 Färbung wurde zur Darstellung von Makrophagen verwendet, die SM-Aktin Färbung für glatte Muskelzellen und die von Willebrand Faktor Färbung (vWF) für Endothelzellen des Lumens und von Gefäßen, die im Rahmen der Neovaskularisation gebildet wurden (Abb. 7). Dabei wurde das Bild der aneurysmatisch veränderten Aortenwand vor allem von Entzündungsinfiltraten, Makrophagen und Neogefäßen geprägt. Die ausgeprägteste Neovaskularisation befand sich im Übergangsbereich zwischen Media und Adventitia. Entzündungsinfiltrate waren bevorzugt im Bereich ausgeprägter Neovaskularisation lokalisiert. Makrophagen waren oft in größeren Infiltraten in den Gefäßwänden der abdominalen Aortenaneurysmen lokalisiert (Abb. 8). Des Weiteren zeigte sich meist ein Verlust von Kollagen, Elastin und glatten Muskelzellen der Media. Auch waren bei den meisten Präparaten atherosklerotische Veränderungen, zum Teil mit Verkalkungen vorhanden.

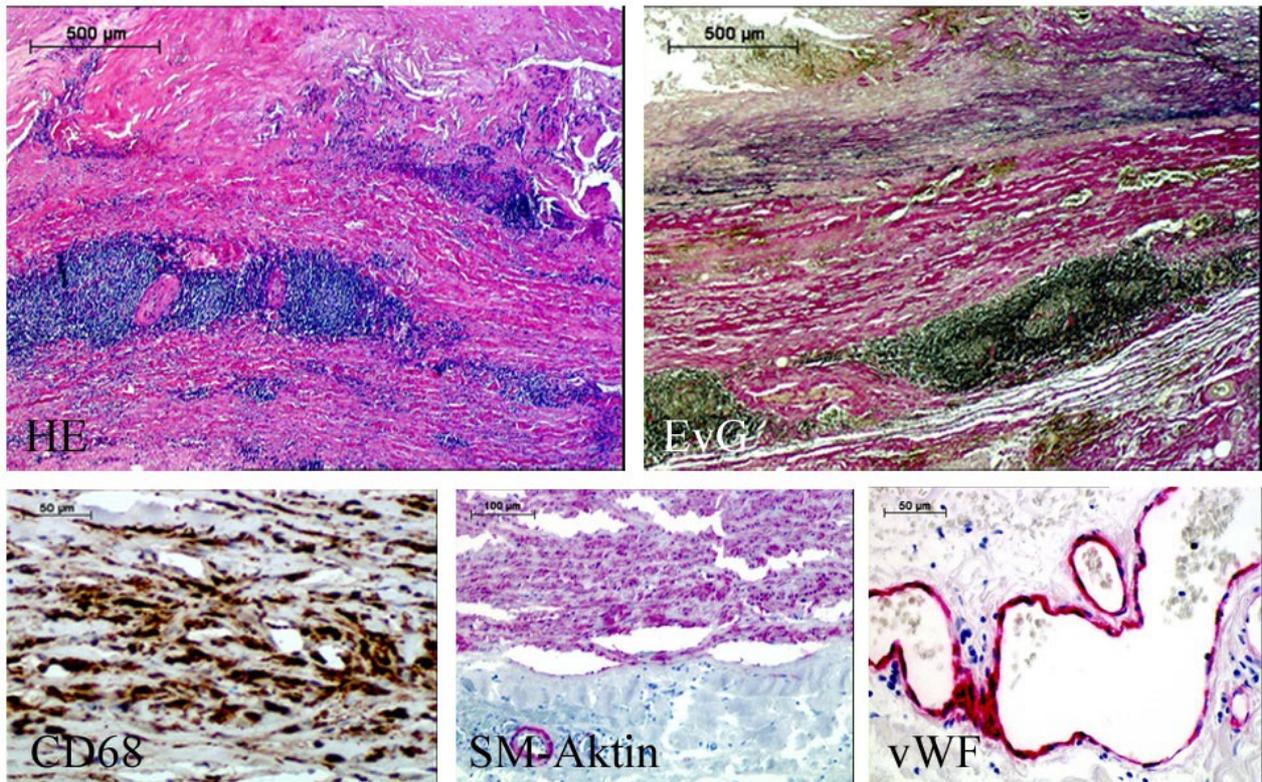


Abb. 7: Darstellung der Färbemethoden anhand derer der histologische Aufbau der AAA-Gefäßwände charakterisiert wurde. Gezeigt sind die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE), die Elastika van Gieson Färbung (EvG), sowie die immunhistochemischen Färbungen von Makrophagen (CD68), glatten Muskelzellen (SM-Aktin) und Endothelzellen (vWF)

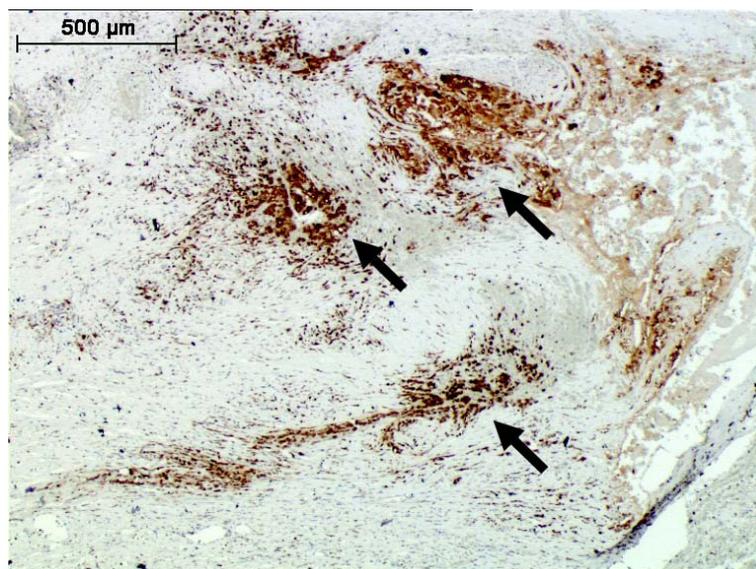


Abb. 8: Makrophagozytäre Infiltrate in der Gefäßwand eines AAA (Pfeile); Immunhistochemische CD68 Färbung

Tabelle 15: Semiquantitative Charakterisierung von 20 AAA Präparaten; Quantifizierung von Zellularität und Entzündungsinfiltraten (HE), Elastin und Kollagen (EvG), Makrophagen (CD68), glatten Muskelzellen (SMCs) (SM-Aktin), Neogefäßen (vWF), Verkalkungen und atherosklerotischen Veränderungen

Präparat	HE		EvG		CD68	SM-Aktin	vWF	Verkalkung	Atheroskl.
	Zellularität	Infiltrate	Elastin	Kollagen	Makrophagen	SMCs	Neov./ECs		
1	+/++	+/++	+	+	+/++	+/++	+/++	-	+
2	++	++/+++	+/++	+/++	+/-	+/++	++	-	+
3	+	++	+/-	++	++	+/-	++	+/++	++/+++
4	++/+++	+++	+	+	++/+++	+/-	++/+++	+/-	++
5	+	++	+	++	+/++	+	+	++	++/+++
6	+	+/++	+/-	++	+	+	++	+	+/++
7	+	+/++	+/-	+	+	+/-	++	+/-	+/++
8	+	+/-	+	+	+	+	+	-	++
9	+/++	+/-	++	+	+/-	++	+/-	+/-	-
10	++	++	-	+	+++	+	++/+++	++	++
11	+	+	+	+/++	+	?	+/++ ?	-	++
12	+/++	+	++/+++	+/++	+	+	++	-	+
13	++	++/+++	+/++	+/++	+/++	++	++	-	+/++
14	+	++	++	+/++	+	+	++	++/+++	+/++
15	+/++	-	+++	+	+	+++	+/++	-	+
16	+	+/++	+/-	++	+	+	+/++	+/++	++/+++
17	++	+/++	+	+/++	+	+	+	++	+
18	++	+	+/++	+/++	+/-	++	+++	+/++	+/-
19	++	+/-	+/++	+	-	+	+	-	-
20	+/++	+	+/++	++	+	?	+	+	++

Zusätzlich wurden AAA-Präparate von asymptomatischen Patienten (n=8) mit denen von symptomatischen Patienten (n=4) verglichen. Dabei war in den Präparaten von symptomatischen Patienten im Vergleich zu den asymptomatischen die Zellularität erhöht und es zeigten sich vermehrt Makrophagen und Entzündungsinfiltrate. Hingegen waren Elastin, Kollagen und glatte Muskelzellen reduziert. Bei der Neovaskularisierung waren keine relevanten Unterschiede zu verzeichnen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Vergleich der Präparate von asymptomatischen und symptomatischen Patienten; semiquantitative Auswertung von - bis +++, SMCs = smooth muscle cells

	Zellularität	Infiltrate	Elastin	Kollagen	Makrophagen	SMCs	Neogefäße
asymptomatisch	+ / ++	+ / ++	+ / ++	++	+ / ++	++	+ / ++
symptomatisch	++ / +++	++ / +++	+ / -	+ / ++	++	+	+ / ++

3.2.2 Immunhistochemie von Cathepsinen und Cystatin C

In den AAA-Präparaten wurde die Expression der Cathepsine und die von Cystatin C in luminalen Endothelzellen, glatten Muskelzellen der Media, Makrophagen, Infiltraten und Endothelzellen und glatte Muskelzellen von reifen bzw. unreifen Neogefäßen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl sämtliche untersuchten Cathepsine, als auch Cystatin C von den meisten Zellen exprimiert wurden (Tabelle 17). Luminale Endothelzellen zeigten in der Immunhistochemie ein positives Färbeverhalten für die Cathepsine B, D, K und S. Für Cathepsin L und Cystatin C konnte hierbei keine Expression nachgewiesen werden (Abb. 9). Die glatten Muskelzellen der Media wiesen eine Anfärbung für alle Cathepsine und Cystatin C auf (Abb. 10). Das Gleiche gilt für Makrophagen, wobei sich diese von allen Zellen jeweils am stärksten anfärbten (Abb. 11). Die Zellen der Entzündungsinfiltrate wurden am stärksten bei der Färbung gegen Cathepsin B angefärbt, gefolgt von Cathepsin D und S. Die Cathepsine K und L und Cystatin C wurden schwach exprimiert. Zur genaueren Differenzierung wurden zusätzlich noch Färbungen für B-Zellen (CD20) und T-Zellen (CD3) durchgeführt. Dabei zeigten sich für B- und T-Zellen keine Unterschiede hinsichtlich ihres Färbeverhaltens für Cathepsine und Cystatin C (Abb. 12). Auch in den Zellen der Neogefäße wurde Cathepsin B am stärksten exprimiert. An nächster Stelle stand wiederum Cathepsin D. Darauf folgten die restlichen untersuchten Proteasen. Cathepsin K wies die geringste Expression auf. Die Endothelzellen zeigten jeweils eine stärkere Anfärbung als die glatten Muskelzellen der reifen Neogefäße. Zwischen den Endothelzellen von reifen und unreifen Neogefäßen waren keine Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 13 und Abb. 14). Die glatten Muskelzellen der reifen Neogefäße wiesen eine geringere Expression von Cathepsinen und Cystatin C auf als die glatten Muskelzellen der Media.

Tabelle 17: Expression von Cathepsinen und Cystatin C in Zellen des AAA; untersucht wurden luminale Endothelzellen (EC), glatte Muskelzellen der Media (SMC), Makrophagen, Infiltrate und Endothelzellen (EC) und glatte Muskelzellen von reifen bzw. unreifen Neogefäßen; semiquantitative Auswertung von - bis +++ (Erklärung siehe Material und Methoden)

AAA	luminale ECs	SMCs Media	Makro- phagen	Infiltrate	Neogefäße		
					unreif	reif	
					ECs	ECs	SMCs
Cathepsin B	+/-	+	++/+++	++/+++	++	++	+
Cathepsin D	+	+ /+++	+++	+ /+++	+ /+++	+ /+++	+
Cathepsin K	+/-	+	++	+/-	- bis +/-	- bis +/-	- bis +/-
Cathepsin L	-	+	+ /+++	+/-	+	+	- bis +/-
Cathepsin S	+/-	+	++/+++	+ /+++	+	+	- bis +/-
Cystatin C	-	+	++	- bis +/-	+	+	- bis +/-

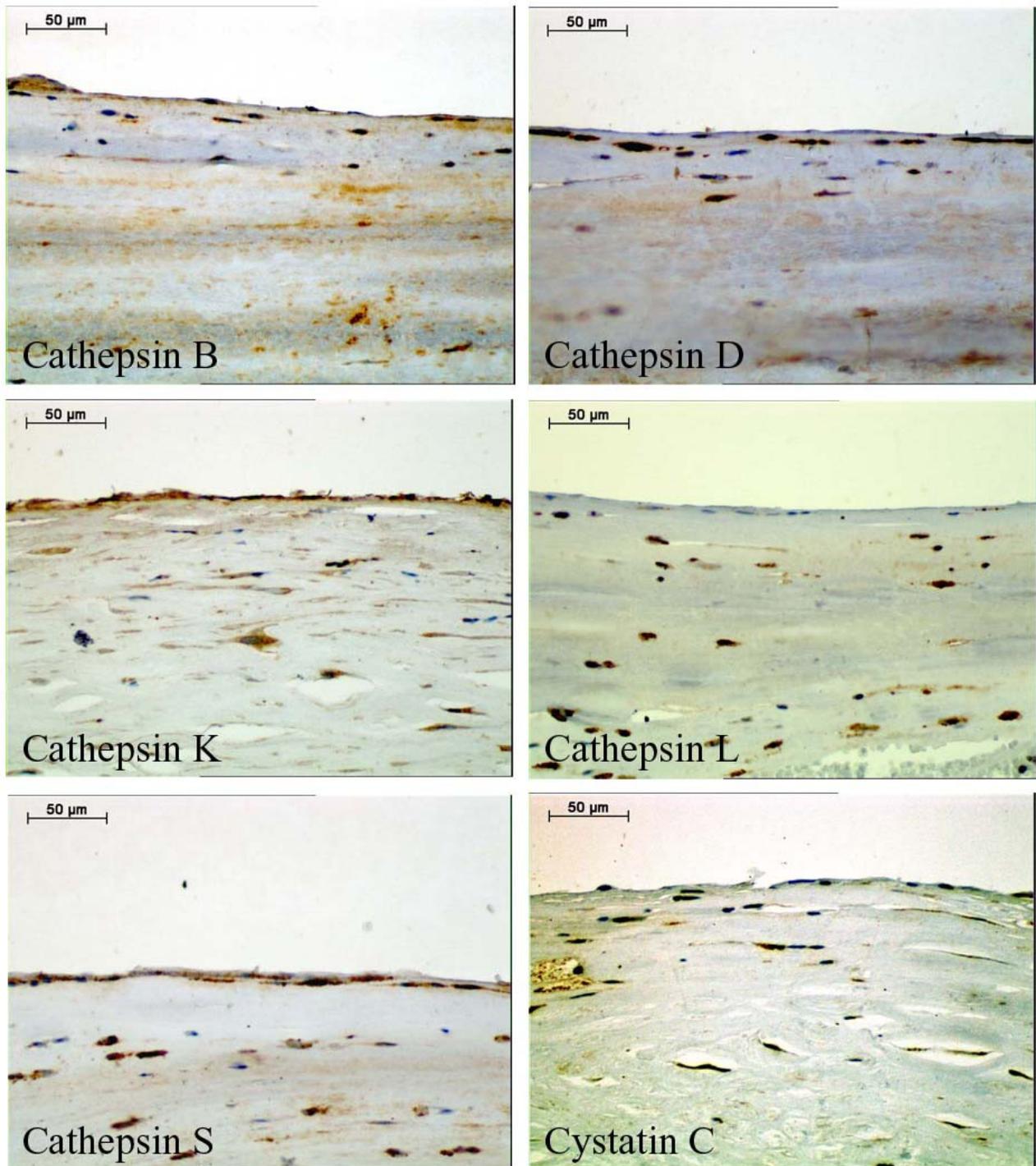


Abb. 9: Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C in luminalen Endothelzellen eines AAA; immunhistochemische Färbungen

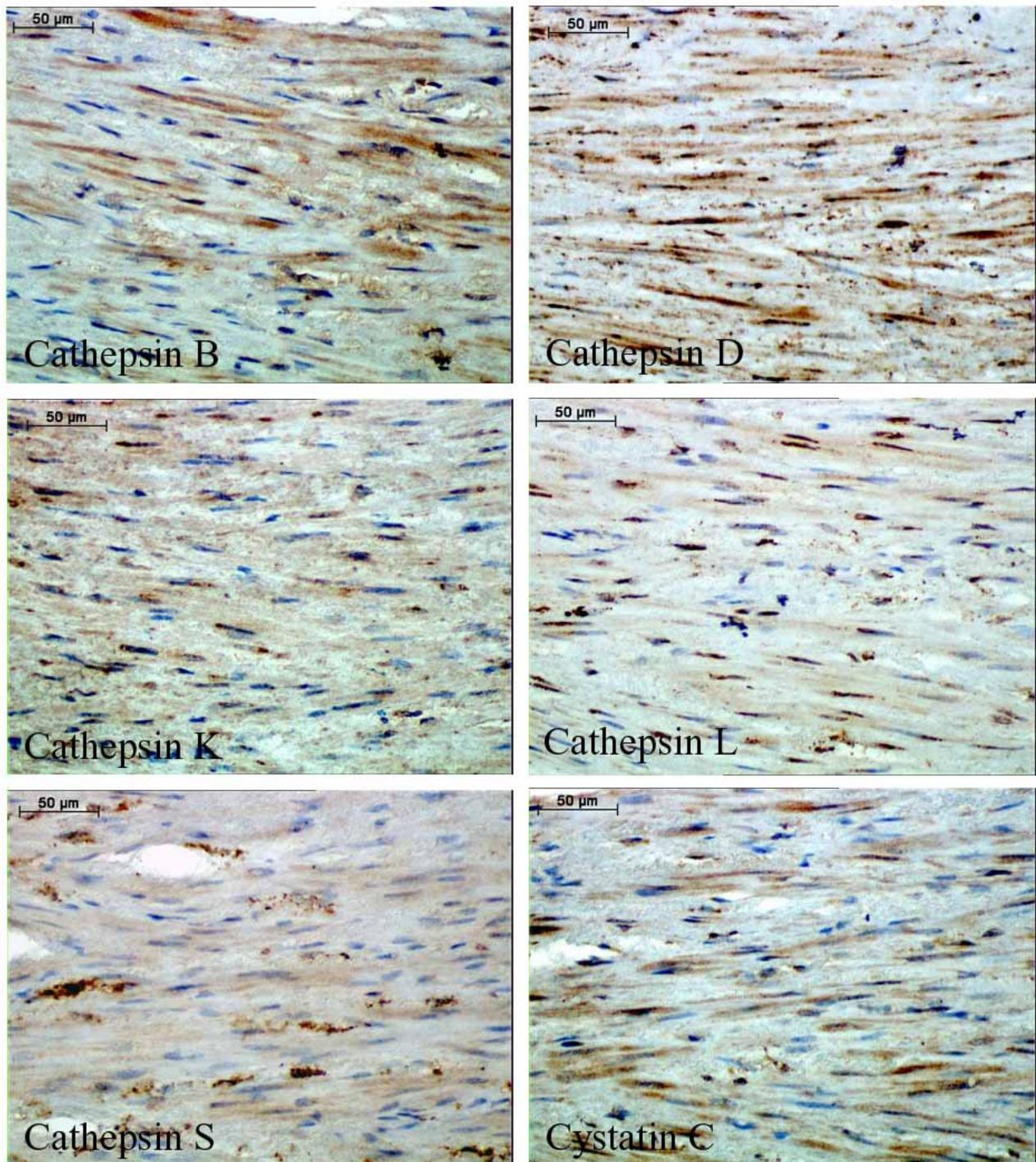


Abb. 10: Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C in glatten Muskelzellen der Media eines AAA; immunhistochemische Färbungen

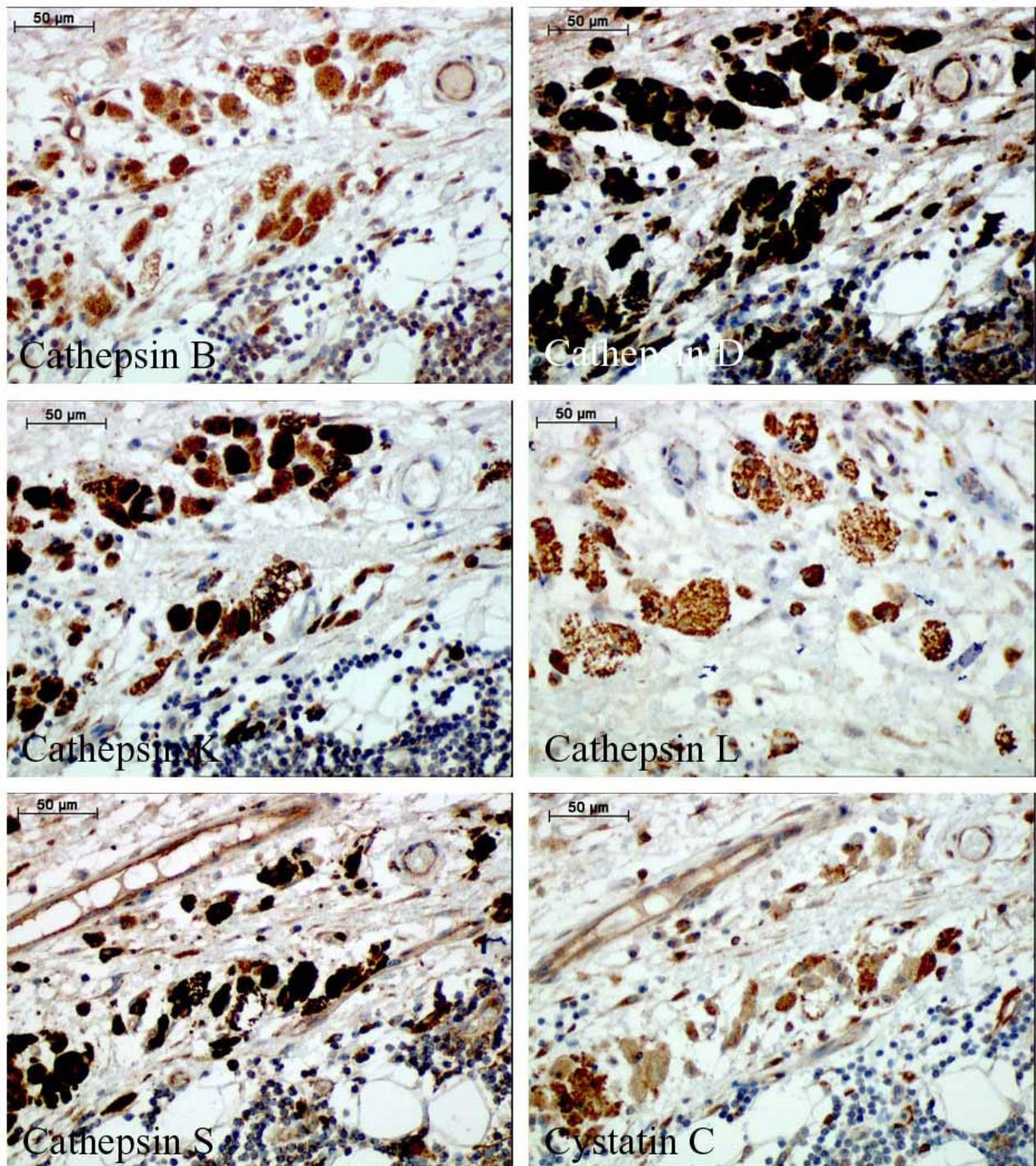


Abb. 11: Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C in Makrophagen eines AAA; immunhistochemische Färbungen

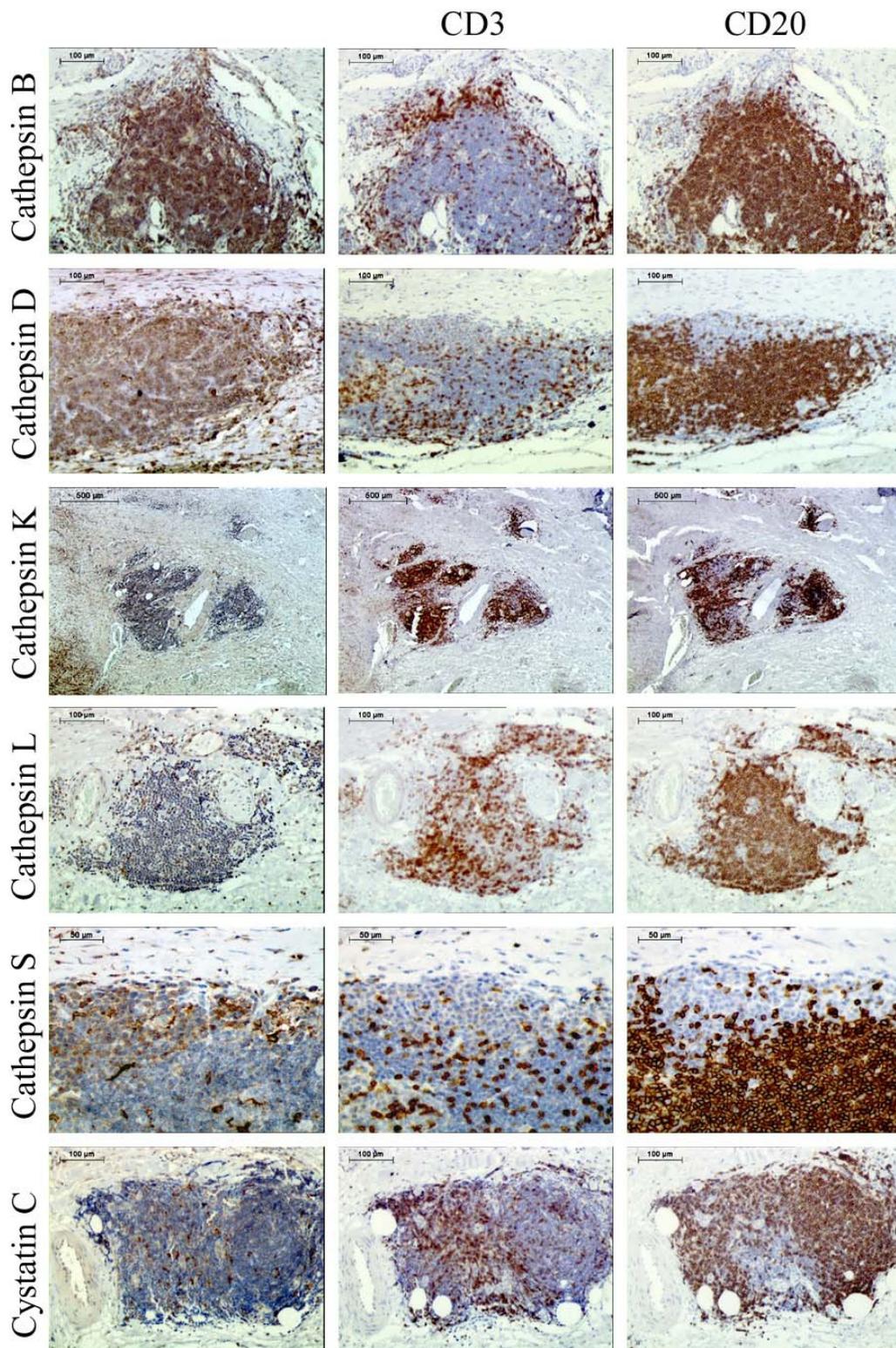


Abb. 12: Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C in Entzündungsinfiltraten eines AAA (1. Spalte); zur genaueren Differenzierung der Infiltrate wurden T-Zellen mit CD3 Antikörpern (2. Spalte) und B-Zellen mit CD20 Antikörpern (3. Spalte) angefärbt ; immunhistochemische Färbungen

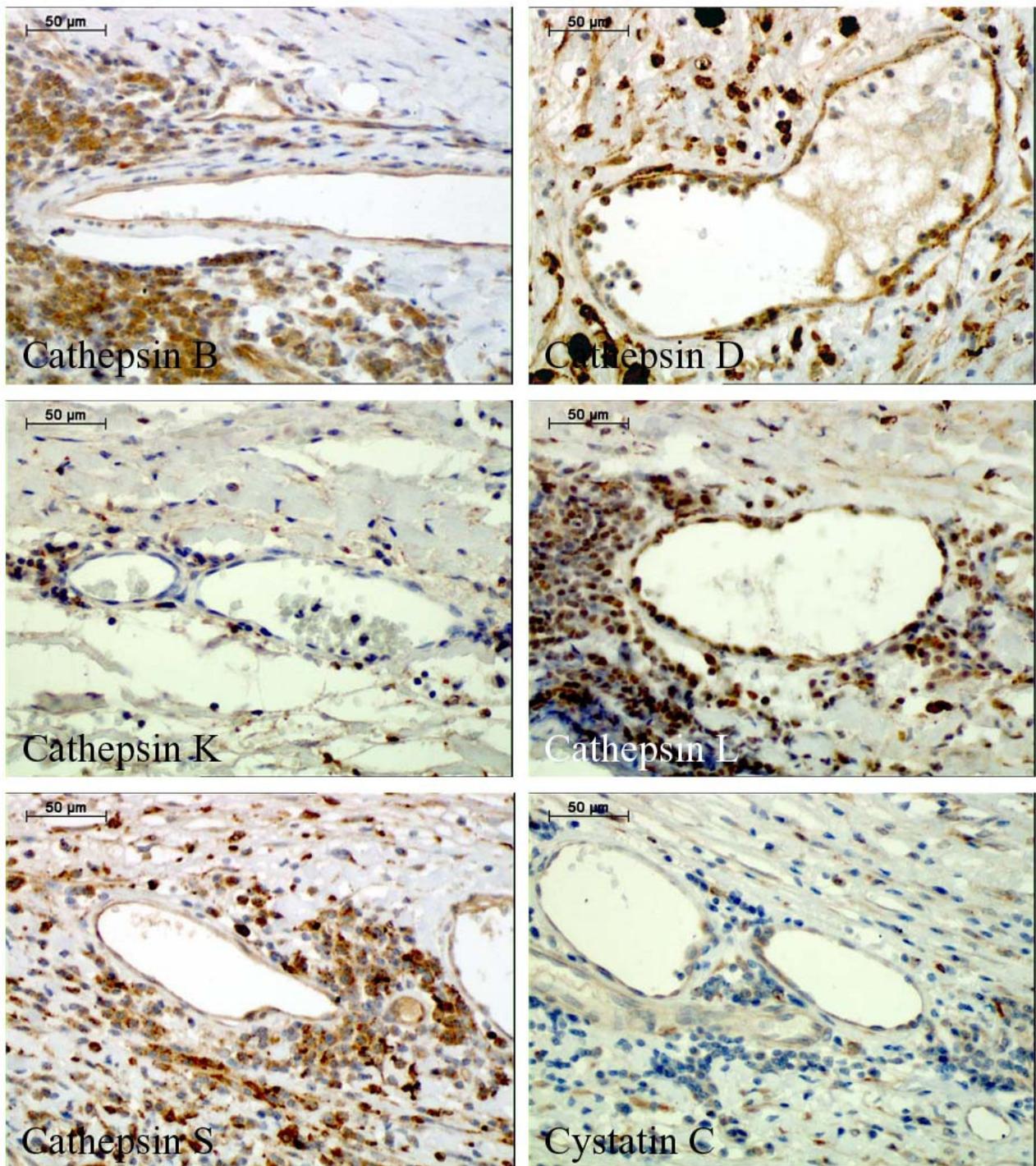


Abb. 13: Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C in unreifen Neogefäßen eines AAA; immunhistochemische Färbungen

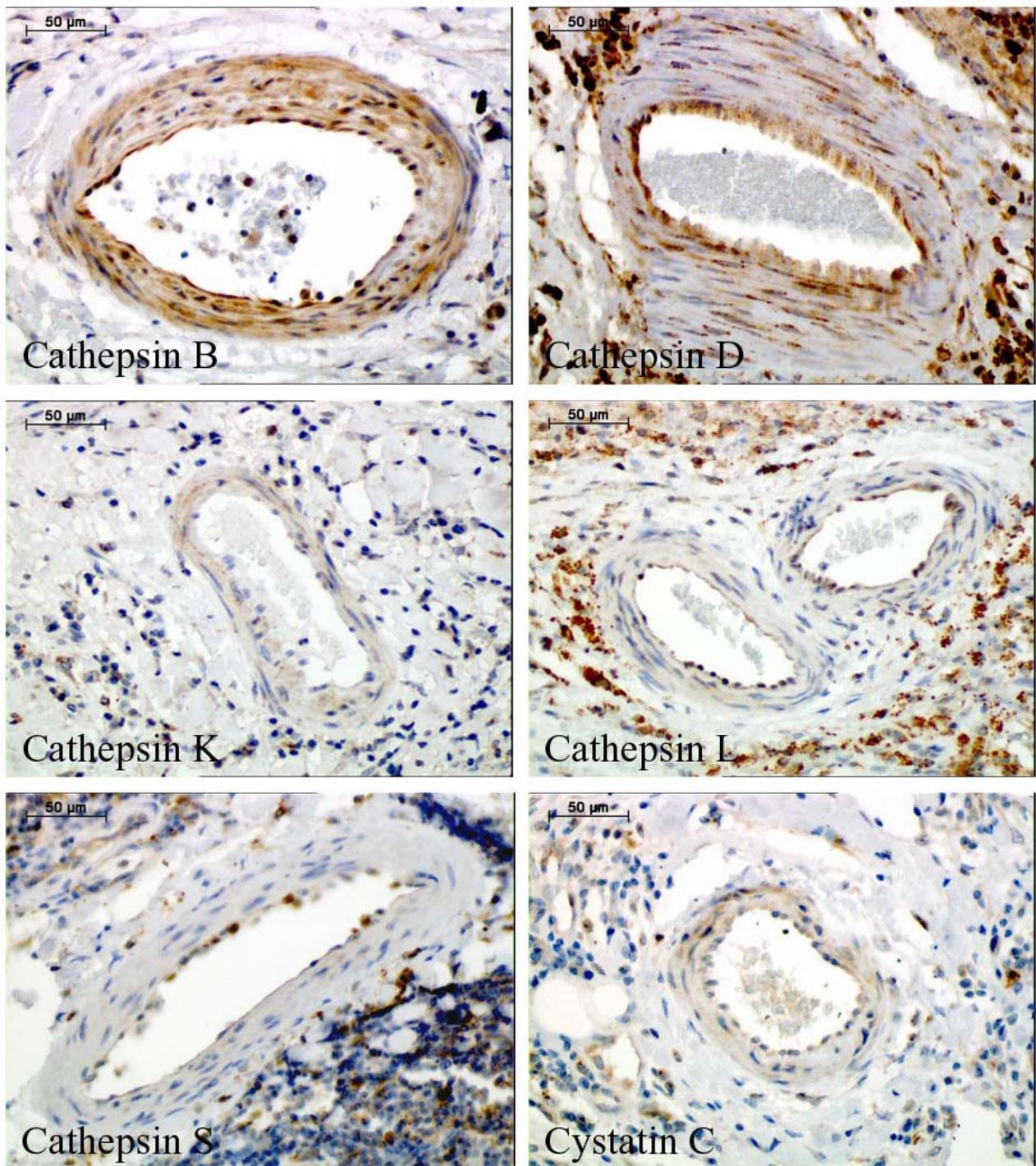


Abb. 14: Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C in reifen Neogefäßen eines AAA; immunhistochemische Färbungen

Beim Vergleich zwischen den Präparaten von symptomatischen und asymptomatischen Patienten zeigten sich in den immunhistochemischen Färbungen für Cathepsine und Cystatin C kaum nennenswerte Unterschiede im Färbeverhalten der einzelnen untersuchten Zelltypen (Tabelle 18). Cathepsin D wurde in SMCs der Media symptomatischer Patienten (+/++) etwas stärker als bei asymptomatischen Patienten (+) exprimiert. Ein weiterer leichter Unterschied zeigte sich für Cathepsin S. Hier war bei symptomatischen Patienten die Expression in den Entzündungsinfiltraten (+/++ zu +) und Endothelzellen reifer Neogefäße (+ zu +/- bis +) minimal erhöht.

Tabelle 18: Vergleich der Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C zwischen AAA-Präparaten von symptomatischen und asymptomatischen Patienten in der Immunhistochemie. Untersucht wurden luminale Endothelzellen (EC), glatte Muskelzellen der Media (SMC), Makrophagen, Infiltrate und Endothelzellen (EC) und glatte Muskelzellen (SMC) von reifen bzw. unreifen Neogefäßen. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ von - bis +++ (Erklärung siehe 2.4.5).

		luminale ECs	SMCs Media	Makro- phagen	Infiltrate	Neogefäße		
						unreif		reif
						ECs	ECs	SMCs
Cathepsin B	asymptoma- tisch	-	+	++	+	+	+	+
	symptoma- tisch	-	+	++	+	+	+	+
Cathepsin D	asymptoma- tisch	+/-	+	+++	+ / ++	+	+	+
	symptoma- tisch	+/-	+ / ++	+++	+ / ++	+	+	+
Cathepsin K	asymptoma- tisch	+/-	+	++	- bis +/-	+/-	+/-	- bis +/-
	symptoma- tisch	+/-	+	++	- bis +/-	+/-	+/-	- bis +/-
Cathepsin L	asymptoma- tisch	-	+/-	+	+/-	+	+	+/-
	symptoma- tisch	-	+/-	+	+/-	+	+	+/-
Cathepsin S	asymptoma- tisch	-	+/-	+++	+	+	+/- bis +	-
	symptoma- tisch	-	+/-	+++	+ / ++	+	+	-
Cystatin C	asymptoma- tisch	-	+/-	+	+/-	+/- bis +	+/-	- bis +/-
	symptoma- tisch	-	+/-	+	+/-	+/- bis +	+/-	- bis +/-

In den Aortenpräparaten der Kontrollpatienten konnte in den luminalen Endothelzellen eine Expression der Cathepsine B, D, K, L und S nachgewiesen werden. Cystatin C wurde von diesen Zellen nur vereinzelt schwach exprimiert. In den glatten Muskelzellen der Media konnte für Cathepsin S und Cystatin C keine Expression nachgewiesen werden, die Cathepsine B, K und L wurden schwach, Cathepsin D stärker exprimiert (Tabelle 19).

Tabelle 19: Expression von Cathepsinen und Cystatin C in luminalen Endothelzellen (ECs) und glatten Muskelzellen der Media (SMCs) von Kontrollaorten; semiquantitative Auswertung von - bis +++ (Erklärung siehe 2.4.5)

Kontrollen	luminale ECs	SMCs Media
Cathepsin B	+	+/-
Cathepsin D	+	++
Cathepsin K	+	+/-
Cathepsin L	+	+/-
Cathepsin S	+	-
Cystatin C	+/-	-

3.3 Quantitative Real-Time RT-PCR

Bei der quantitativen Real-Time RT-PCR konnte die Expression auf mRNA-Ebene für alle untersuchten Cathepsine und für Cystatin C sowohl in AAA als auch in Kontrollaorten nachgewiesen werden. Wurden die Ergebnisse auf die mRNA-Expression von GAPDH normiert (Abb. 15), zeigte sich für Cathepsin D ($p < 0,001$), Cathepsin K ($p = 0,018$) und Cystatin C ($p = 0,002$) eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den Kontroll-Präparaten im Vergleich zu den AAA-Präparaten. Für Cathepsin L zeigte sich eine erhöhte Expression in AAA im Vergleich zu Kontrollen, aber der Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,127$). Cathepsin B ($p = 0,472$) und S ($p = 0,204$) wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression auf mRNA-Ebene in AAA und Kontrollen auf.

Wurde die mRNA-Expression der Cathepsine B, D, K, L und S auf die mRNA-Expression ihres Inhibitors Cystatin C normiert (Abb. 16), so wiesen Cathepsin B ($p = 0,021$) und L ($p = 0,018$) in AAA eine signifikant erhöhte mRNA-Expression im Verhältnis zu Kontrollaorten auf. Auch für Cathepsin K war die mRNA-Expression in AAA im Vergleich zu Kontrollen erhöht, allerdings war der Unterschied nicht statistisch signifikant ($p = 0,286$). Für die Cathepsine D ($p = 0,979$) und S ($p = 0,517$) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen AAA und Kontrollaorten

nachgewiesen werden.

Insgesamt wies Cathepsin K mengenmäßig sowohl in AAA (Median=0,1827), als auch in den Kontrollen (Median=0,4038) die höchste mRNA-Expression auf. In den AAA folgten darauf Cathepsin L (Median=0,0429), Cathepsin B (Median=0,0287), Cathepsin S (Median=0,0261), Cystatin C (Median=0,0194) und Cathepsin D (Median=0,0054). In den Kontrollorten folgte in absteigender Reihenfolge Cystatin C (Median=0,1454), Cathepsin S (Median=0,0800), Cathepsin D (Median=0,0193), Cathepsin L (Median=0,0139) und Cathepsin B (Median=0,0103) (Abb. 17).

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von Cathepsinen und Cystatin C zwischen Präparaten von Patienten mit symptomatischen und asymptomatischen AAA verglichen. Dabei zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen Patienten mit symptomatischen und asymptomatischen Aortenaneurysmen (Abb. 18).

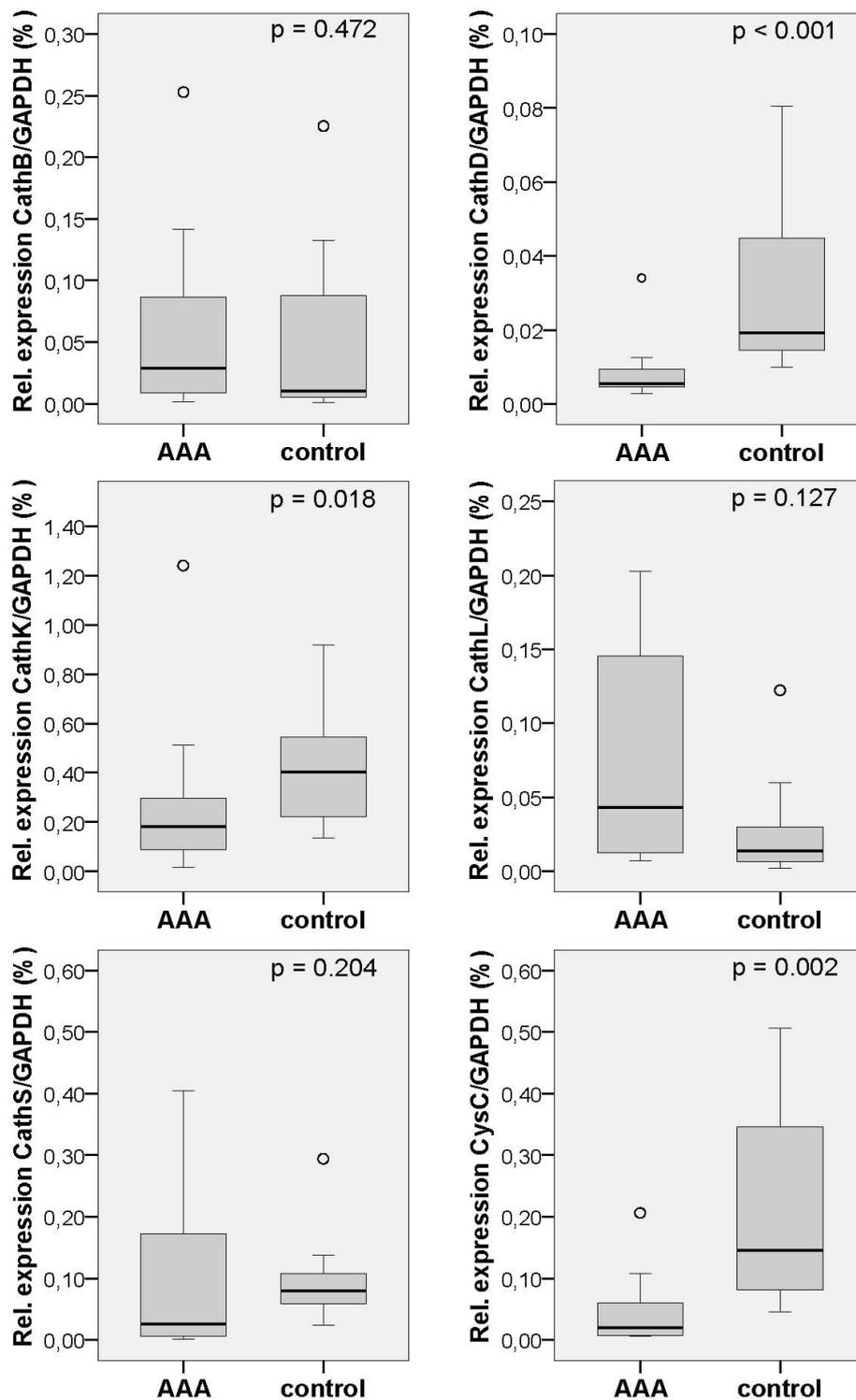


Abb. 15: Quantitative Real-Time RT-PCR; Relative Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C normiert auf GAPDH in %; Vergleich der jeweiligen Expression von AAA-Präparaten mit Kontroll-Präparaten; der p-Wert zeigt die Signifikanz des Expressionsunterschiedes zwischen AAA und Kontrollen

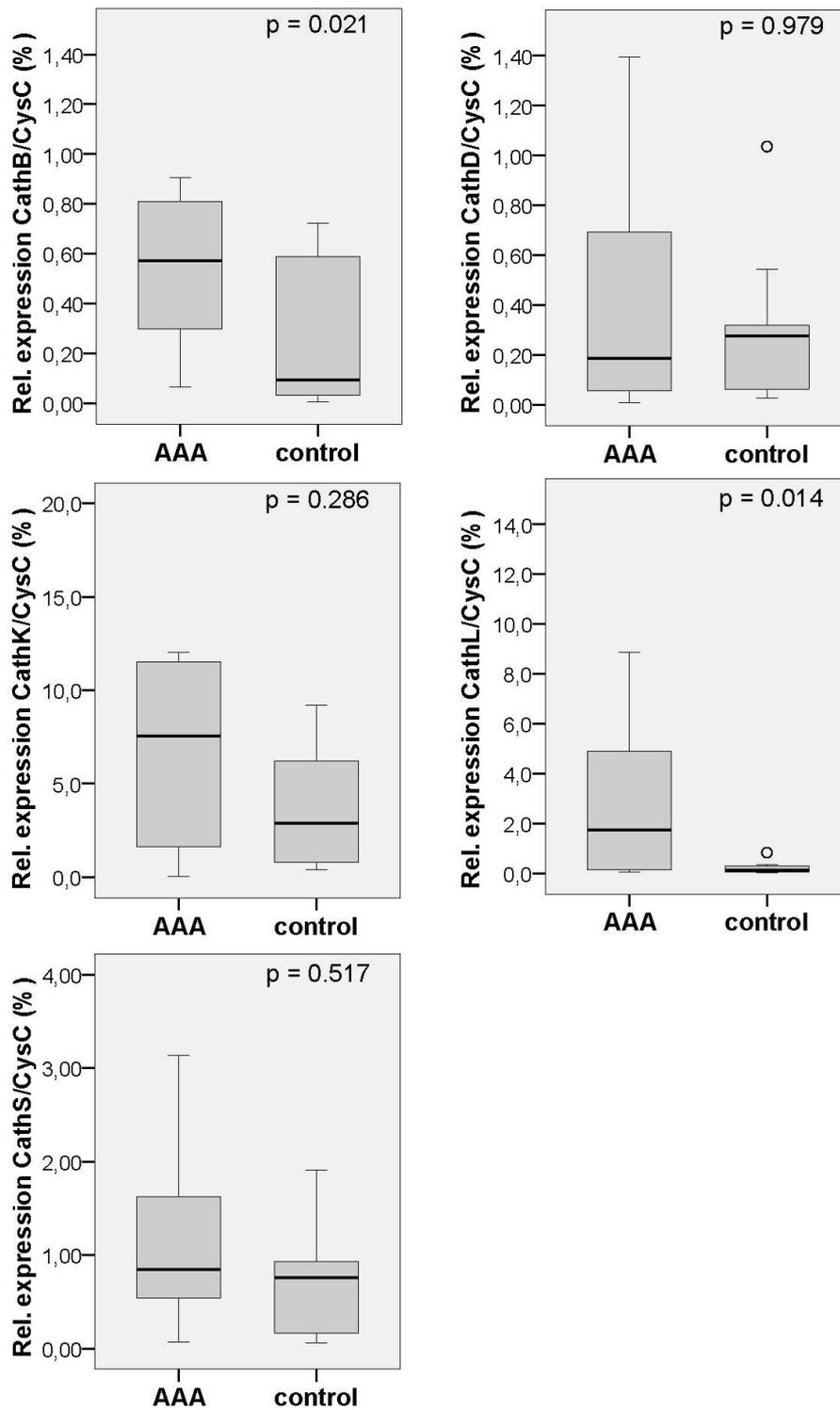


Abb. 16: Quantitative Real-TimeRT-PCR; Relative Expression von Cathepsin B, D, K, L, S normiert auf den Inhibitor Cystatin C in %; Vergleich der jeweiligen Expression von AAA-Präparaten mit Kontroll-Präparaten; der p-Wert zeigt die Signifikanz des Expressionsunterschiedes zwischen AAA und Kontrollen

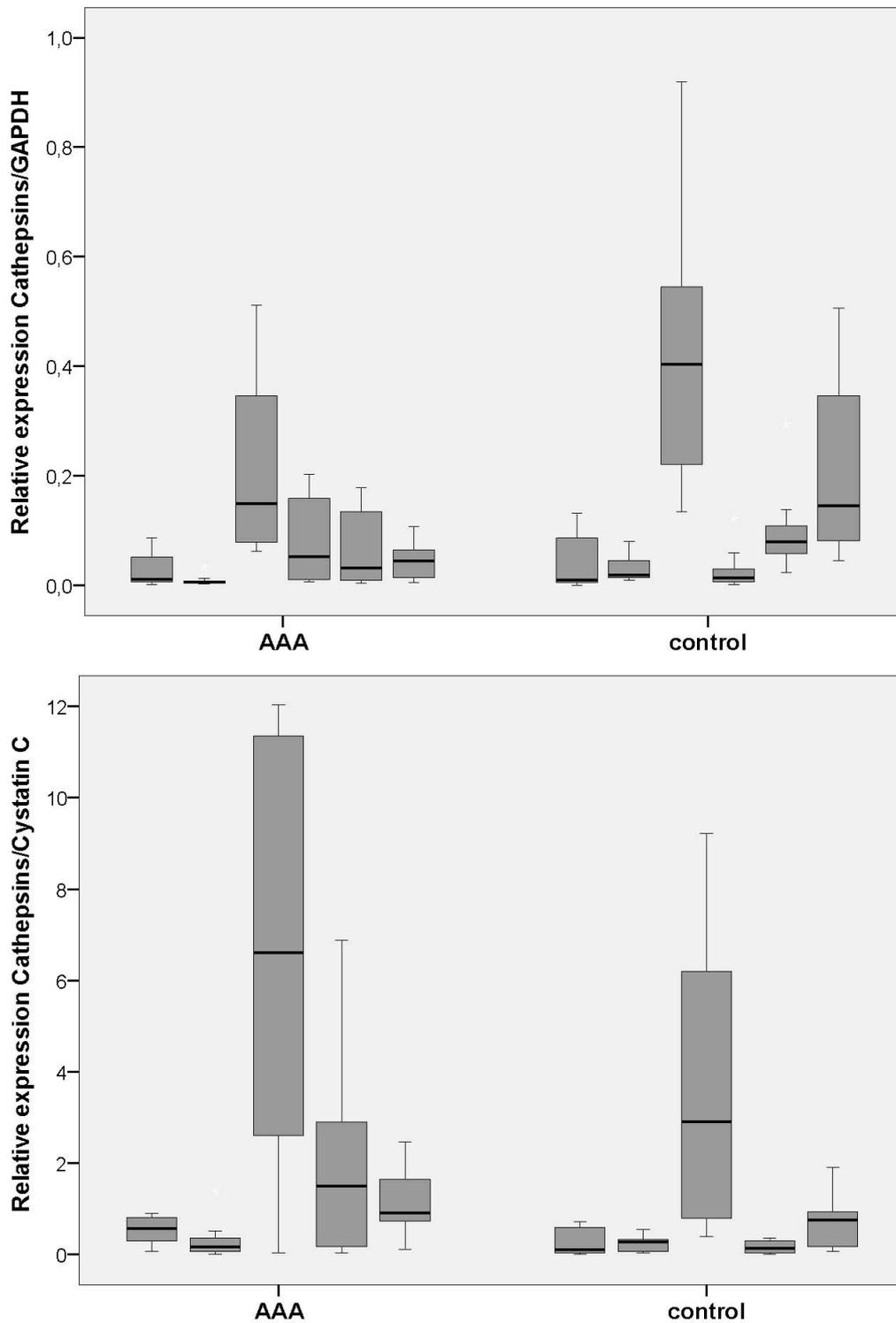


Abb. 17: Quantitative Real-Time RT-PCR

oben: Relative Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C (v.l.n.r) normiert auf GAPDH in %; Vergleich der jeweiligen Expression von AAA-Präparaten mit Kontroll-Präparaten

unten: Relative Expression von Cathepsin B, D, K, L, S (v.l.n.r.) normiert auf den Inhibitor Cystatin C in %; Vergleich der jeweiligen Expression von AAA-Präparaten mit Kontroll-Präparaten

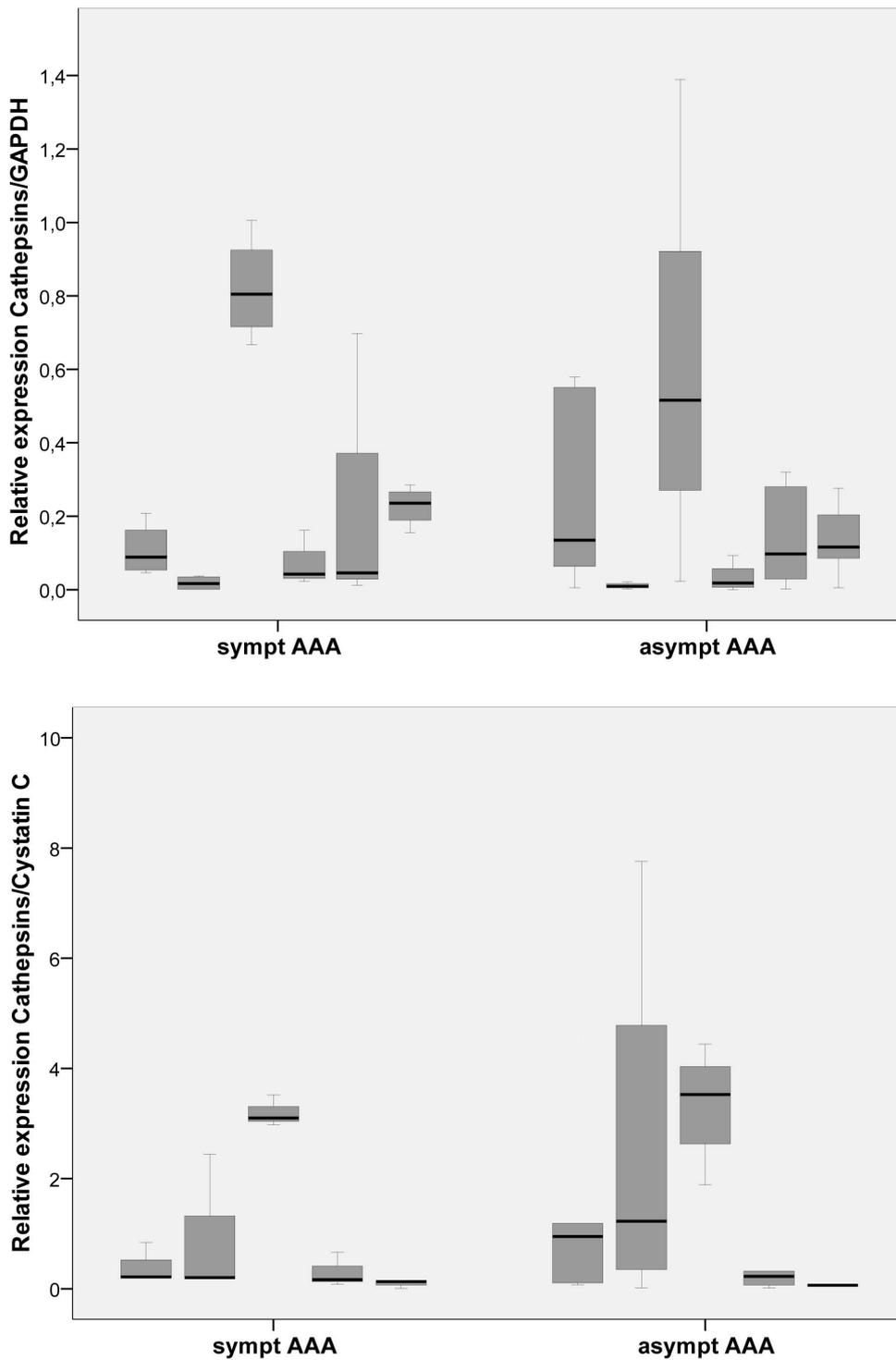


Abb. 18: Quantitative Real-Time RT-PCR

oben: Relative Expression von Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C (v.l.n.r) normiert auf GAPDH in %; Vergleich der Expression von symptomatischen AAAs und asymptomatischen AAAs

unten: Relative Expression von Cathepsin B, D, K, L, S (v.l.n.r) normiert auf den Inhibitor Cystatin C in %; Vergleich der Expression von symptomatischen AAAs und asymptomatischen AAAs

Um sicherzustellen, dass die gemessenen Werte auch von den gewünschten PCR-Produkten stammten und nicht von etwaigen Primerdimeren wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt.

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird durch kontinuierliche Temperaturerhöhung die DNA aufgeschmolzen. Dabei spaltet sich die doppelsträngige DNA des jeweiligen PCR-Produktes, bei einer für dieses charakteristischen Temperatur, in zwei Einzelstränge. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green freigesetzt, woraus ein Abfall der Fluoreszenz resultiert (Abb. 19). Eine Unterscheidung der gewünschten PCR-Produkte von Primerdimeren ist dadurch möglich, dass die Primerdimere einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen. Um die maximalen Änderungen der Intensität der Fluoreszenz besser identifizieren zu können wurden die Schmelzkurven auch als Peakkurven dargestellt. Dabei handelt es sich um die negative erste Ableitung der Schmelzkurve nach der Temperatur $[-d(\text{RFU})/dT]$. Das Peakmaximum entspricht dabei der Schmelztemperatur des jeweiligen PCR-Produktes (Abb. 20).

Für das PCR-Produkt des Primerpaares CathB-F3/CathB-R3 ergab sich eine Schmelztemperatur von ca. 81 °C, für CathD-F3/CathD-R3 waren es ca. 80 °C (Abb. 19 und Abb. 20), für CathK-F4/CathK-R4 ca. 86 °C, für CathL-F3/CathL-R2 ca. 79 °C, für CathS-F1/CathS-R1 ca. 78 °C, für CysC-F2/CysC-R2 ca. 84 °C und für GAPDH-F4cD/GAPDH-R4cD ca. 83 °C.

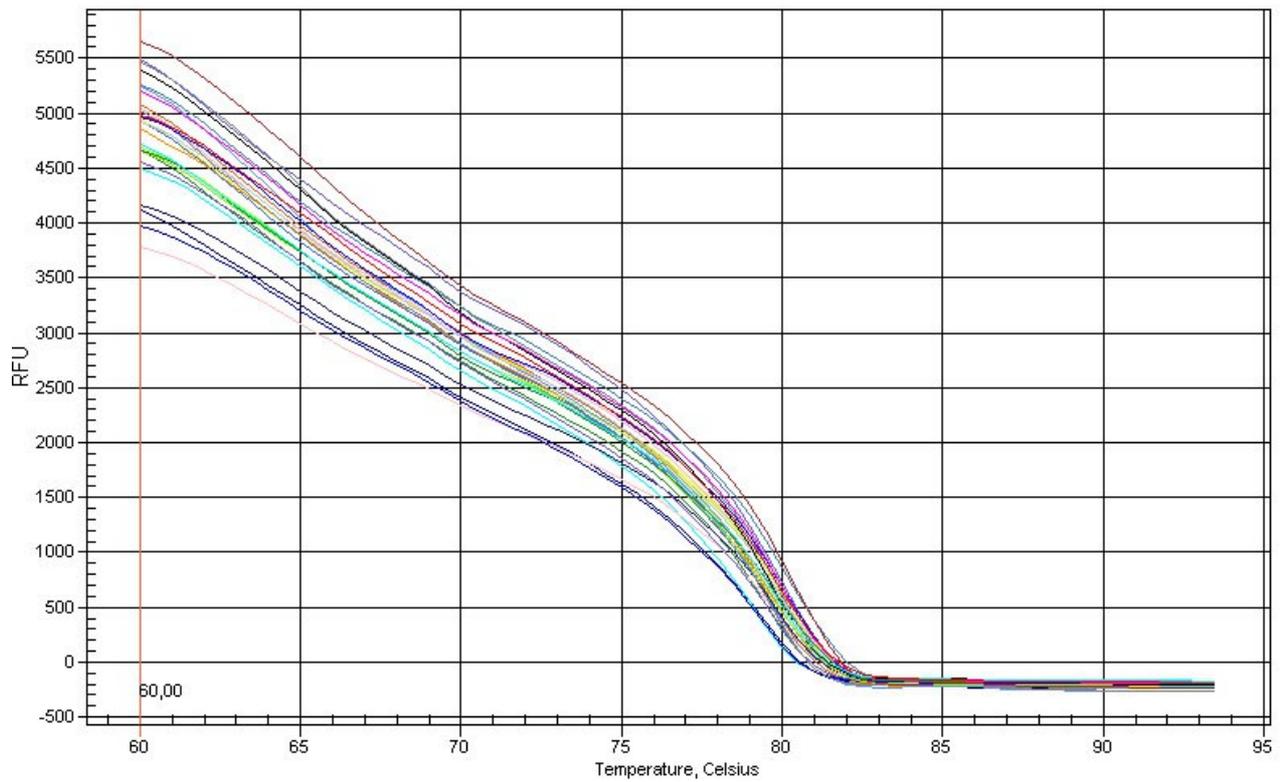


Abb. 19: Schmelzkurve der PCR-Produkte des Primerpaares CathD-F3/CathD-R3; x-Achse: Temperatur in °C, y-Achse: Fluoreszenz in relative fluorescence units (RFU)

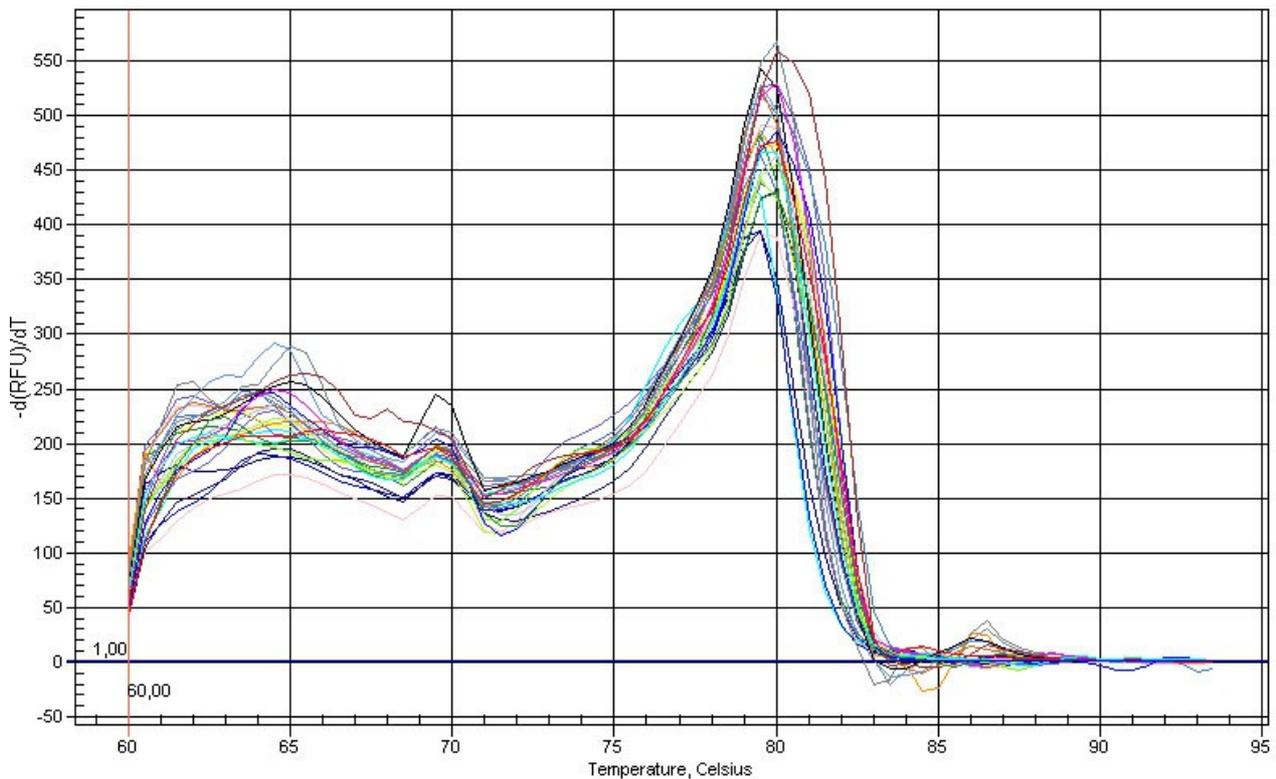


Abb. 20: Peakkurve der PCR-Produkte des Primerpaares CathD-F3/CathD-R3; x-Achse: Temperatur in °C, y-Achse: negative erste Ableitung der Schmelzkurve nach der Temperatur $[-d(\text{RFU})/dT]$

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt um die Amplifikationsprodukte der quantitativen Real-Time RT-PCR zu identifizieren und diese ebenfalls von den etwaigen Primerdimeren abzugrenzen. Dabei zeigten sich zum einen die Banden der gewünschten PCR-Produkte, die je nach verwendeten Primern eine Fragmentlänge von ca. 100 bp aufwiesen. Zum anderen wurde teilweise eine zweite Bande mit etwas kürzerer Fragmentlänge (50-100 bp) nachgewiesen (Abb. 21 und Abb. 22). Dabei handelt es sich aber nicht um Primerdimere, denn bei der Optimierung der PCR zeigten sich bei den Durchläufen ohne DNA bzw. cDNA keine Banden, die Primerdimeren entsprachen (siehe 2.5.4). Vermutlich entsprechen die zusätzlichen Banden partiell degraderter RNA, die bei der Formalinfixierung der Präparate entsteht. Die Doppelbanden waren nicht in allen Proben vorhanden, kamen aber sowohl in AAA-Proben als auch bei den Kontrollen vor.

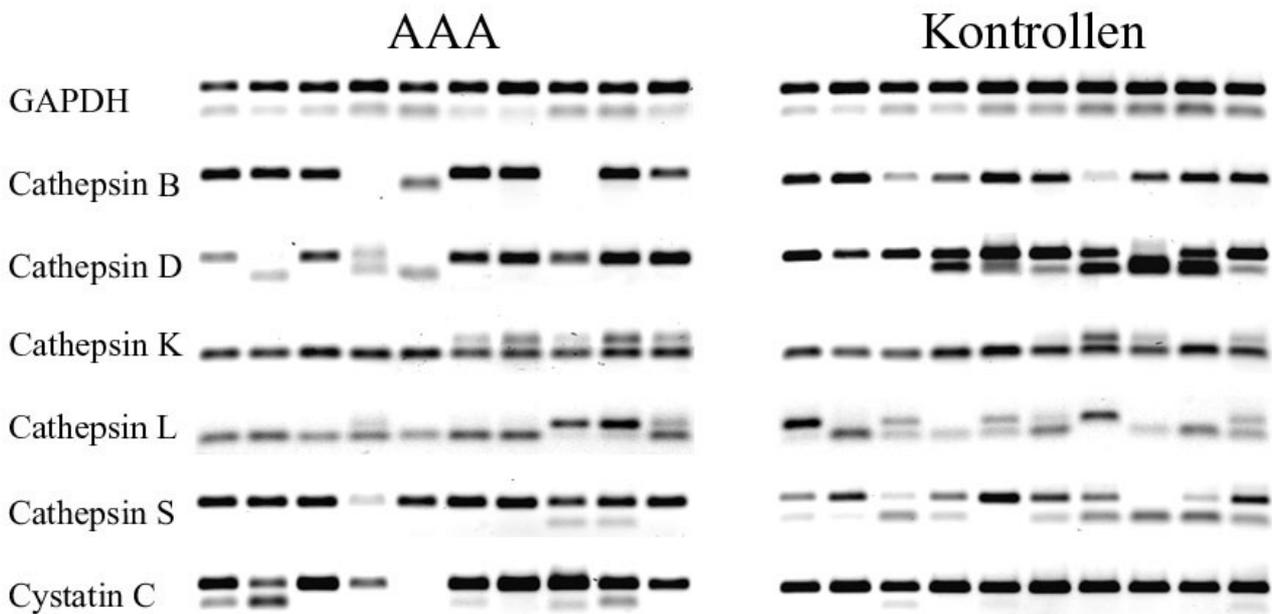


Abb. 21: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte von AAA und Kontrolllaorten; dargestellt sind GAPDH, Cathepsin B, D, K, L, S und Cystatin C an jeweils 10 Proben.

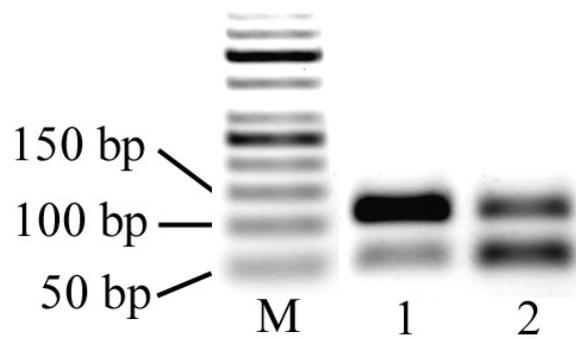


Abb. 22: Agarose-Gelelektrophorese; dargestellt sind die als Marker dienende DNA-Leiter (M), sowie zwei exemplarische AAA-Proben (1 und 2).

3.4 Western Blot Analyse

In der Western Blot Analyse von acht AAA-Präparaten konnte eine Expression der Cathepsine B, D, L und S sowie von Cystatin C nachgewiesen werden. Die Banden zeigten sich für Cathepsin B bei 31 kDa, für Cathepsin D bei 34 kDa, für Cathepsin L bei 34 kDa, für Cathepsin S bei 25 kDa und für Cystatin C bei 16 kDa (Abb. 23). Ein Vorkommen von Cathepsin K in den AAA-Proben konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normiert, welches als 100 % definiert wurde. Dessen Banden lagen bei 36 kDa. Außerdem wurden alle Ergebnisse hinsichtlich einer Hintergrundfärbung korrigiert (siehe 2.6.4) Den höchsten Wert bei der Expression wies Cystatin C mit 186 % auf. Cathepsin S zeigte mit 17 % den niedrigsten Wert. Die Expression der andern Cathepsine lag für Cathepsin B bei 101 %, für Cathepsin D bei 79 % und für Cathepsin L bei 80 % (Abb. 24).

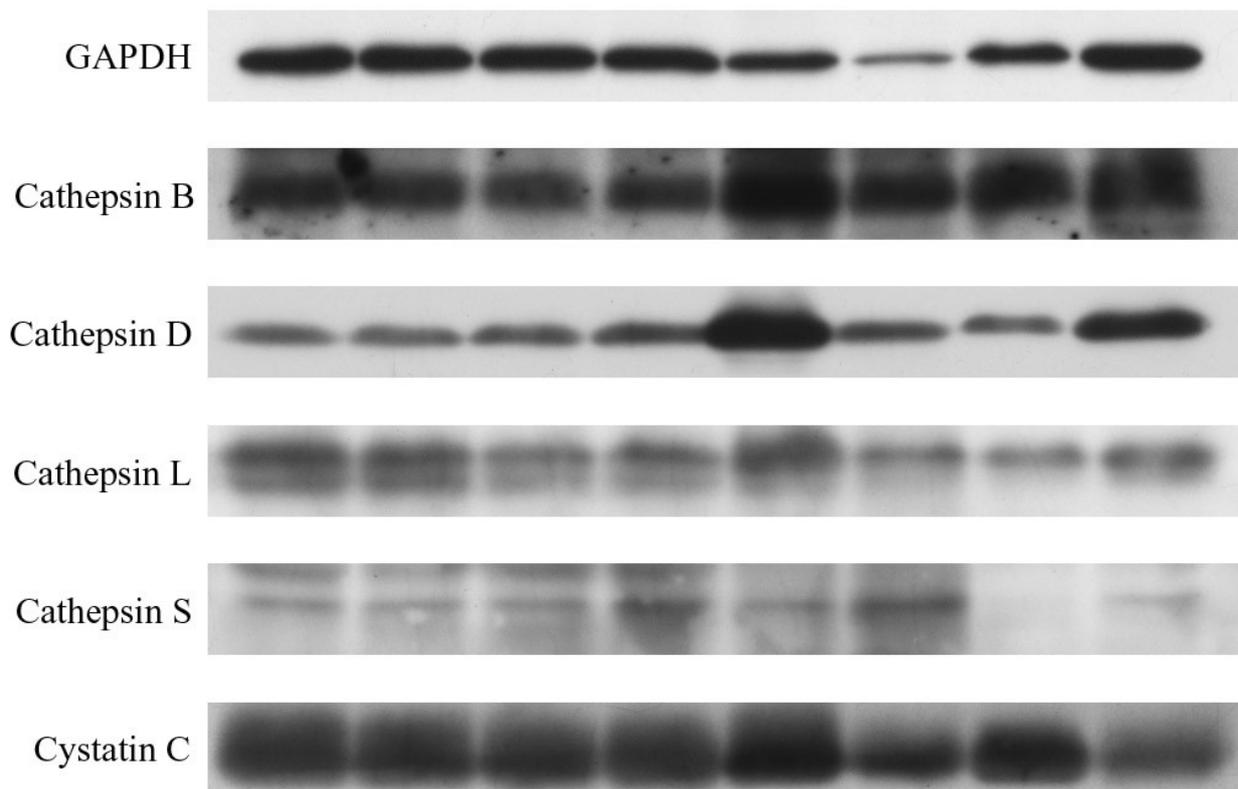


Abb. 23: Banden der Western Blot Analyse von 8 AAA-Präparaten: GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bei 36 kDa, Cathepsin B bei 31 kDa, Cathepsin D bei 34 kDa, Cathepsin L bei 34 kDa, Cathepsin S bei 25 kDa, Cystatin C bei 16 kDa

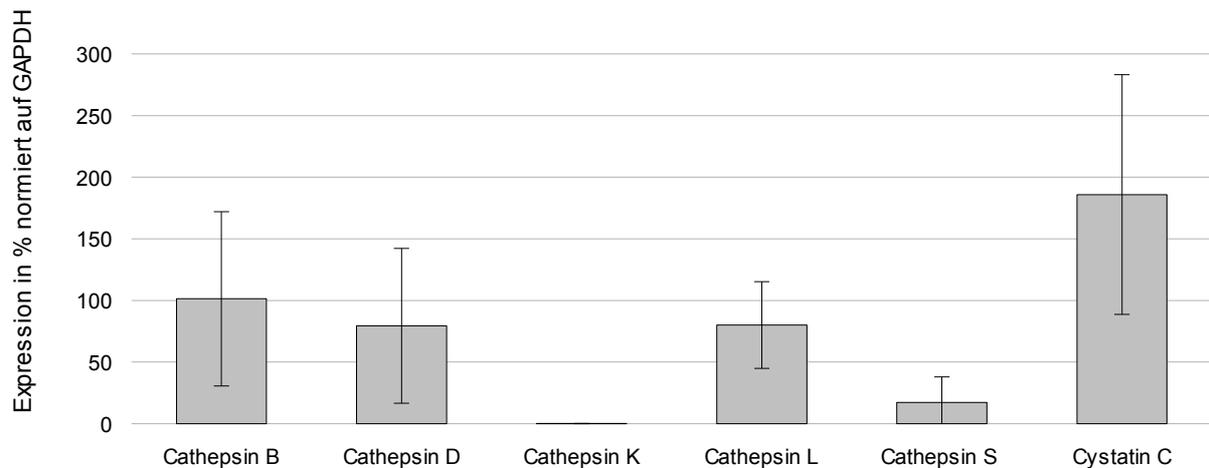


Abb. 24: Expression der Cathepsine und von Cystatin C in der Western Blot Analyse von 8 AAA-Präparaten; die Werte wurden auf GAPDH (100 %) normiert

3.5 Serumuntersuchung

Bei der Immunpräzipitation, die zur Untersuchung der Serumproben herangezogen wurde, konnte für Cathepsin B und Cystatin C ein Vorkommen im Serum gezeigt werden. Die Cathepsine D, K, L und S konnten hingegen nicht nachgewiesen werden. Im Western Blot, der im Anschluss an die Immunpräzipitation durchgeführt wurde, lagen die Banden für Cathepsin B bei ca. 31 kDa, für Cystatin C bei ca. 16 kDa (Abb. 25).

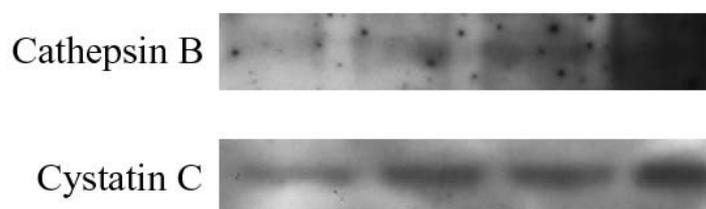


Abb. 25: Immunpräzipitation von Cathepsin B und Cystatin C; exemplarische Darstellung von 4 Serumproben; Cathepsin B bei 31 kDa, Cystatin C bei 16 kDa

4 Diskussion

4.1 Patientencharakterisierung

Das untersuchte Patientenkollektiv hatte ein durchschnittliches Alter von $68,2 \pm 10,3$ Jahren und entsprach damit dem Alter, in dem AAA-Patienten in deutschen Kliniken im Mittel operativ oder interventionell versorgt werden (Eckstein et al. 2007). In dieser Altersgruppe der über 65-Jährigen beträgt die Prävalenz des abdominalen Aortenaneurysmas 5,5 % (4-8 %) für Männer und 1,3 % (0,5-1,5 %) für Frauen (Eckstein et al. 2009). Auch die Häufigkeitsverteilung typischer Risikofaktoren und Komorbiditäten des AAA deckte sich im untersuchten Patientenkollektiv mit den Ergebnissen größerer epidemiologischer Untersuchungen (Baumgartner et al. 2008; Lederle et al. 1997). Mit einem durchschnittlichen maximalen Durchmesser der untersuchten Aneurysmen von $6,7 \pm 1,7$ cm, hatten die Bauchaorten der untersuchten Patienten ein Ausmaß erreicht, bei dem das jährliche Rupturrisiko ca. 10-20 % beträgt (Brewster et al. 2003; Reed et al. 1997). Folglich ist bei AAA diesen Durchmessers davon auszugehen, dass es sich um fortgeschrittene Krankheitsstadien handelt und diese somit ein geeignetes Untersuchungsmaterial für die hier durchgeführten Untersuchungen darstellen.

4.2 Histologische Untersuchungen

Zwar wurden in der Vergangenheit einzelne immunhistochemische Untersuchungen zur Cathepsinexpression in abdominalen Aortenaneurysmen durchgeführt, allerdings wurden dort jeweils nur einzelne Cathepsine wie z.B. B und L, bzw. Cystatin C untersucht (Shi et al. 1999; Liu et al. 2006b; Gacko et al. 1999). Außerdem wurde das Augenmerk bislang nur auf Makrophagen, glatte Muskelzellen der Media und Endothelzellen gerichtet. In dieser Arbeit wurden nun erstmals die vier relevanten Cysteinproteasen Cathepsin B, K, L und S deren Inhibitor Cystatin C und die Aspartatprotease Cathepsin D umfangreich immunhistochemisch untersucht. Hierzu wurde die Expression der Proteasen in allen Zelltypen der Gefäßwand beurteilt. Dazu zählen luminale Endothelzellen, glatte Muskelzellen der Media, Makrophagen, Lymphozyten der Entzündungsinfiltrate, sowie Endothelzellen und glatte Muskelzellen von reifen bzw. unreifen Neogefäßen. Dies trägt dazu bei genauer zu analysieren, inwieweit welche Zellen durch eine Expression der genannten Proteasen einen Beitrag zur proteolytischen Degradierung der AAA-Gefäßwand leisten können. Die Immunhistochemie bietet durch eine Anfärbung der Zellen den

Vorteil eines gezielten Nachweises der Cathepsinexpression in den verschiedenen Zellen auf Proteinebene. Quantitative Vergleiche sind mit dieser Methode jedoch nur bedingt möglich.

Makrophagen

Makrophagen sind im Rahmen der Atherosklerose an der überschießenden Immunreaktion beteiligt und führen schließlich zur chronischen Entzündung des betroffenen Gewebes. Zudem können sie auch direkt proteolytische Enzyme, wie etwa MMPs oder die hier untersuchten Cathepsine synthetisieren und sezernieren und sind somit auch in der Lage extrazelluläre Matrix zu degradieren (Newby 2008; Reddy et al. 1995). Des Weiteren sind Makrophagen in der Lage das perizelluläre Milieu durch eine in der Plasmamembran lokalisierte Vacuolar-type H^+ -ATPase anzusäuern. So ist es erst möglich, dass Proteasen wie die Cathepsine, die ihr pH-Optimum im sauren Bereich besitzen, im Extrazellularraum Strukturproteine degradieren können (Chapman et al. 1997; Reddy et al. 1995; Bossard et al. 1996; Brömme et al. 1996; Punturieri et al. 2000). Für die verschiedenen MMPs konnte bereits das Vorkommen im AAA nachgewiesen werden (Galis et al. 1994; Wilson et al. 2005; Reeps et al. 2009), die Cathepsine hingegen wurden diesbezüglich im AAA bisher nicht in größerem Umfang untersucht, wie es im Rahmen dieser Dissertation nun erstmals der Fall war. Hierbei wiesen die Makrophagen im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zelltypen, die das histologische Bild der aneurysmatischen Aortenwand prägen, die höchste Expression der untersuchten Cathepsine B, D, K, L und S auf. Auch Cystatin C zeigte in Makrophagen die stärkste Expression (Tabelle 17). Besonders makrophagozytäre Infiltrate (Abb. 8) zeigten eine sehr hohe Expression von Cathepsinen. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Cathepsine B, K, L und S nicht nur intrazellulär von Makrophagen exprimiert werden, sondern auch, dass Makrophagen diese Proteasen in ihrer aktiven Form in den perizellulären Raum abgeben können (Reddy et al. 1995; Punturieri et al. 2000). Dort scheinen sie eine maßgebliche Rolle beim Abbau extrazellulärer Matrix, im Speziellen von Elastin und Kollagen zu spielen, denn die elastinolytische Aktivität von Makrophagen konnte durch Inhibition der Cathepsine L und S fast vollständig außer Kraft gesetzt werden. Im Gegensatz dazu wurde die elastinolytische Aktivität von Makrophagen durch MMP-Inhibitoren wie etwa TIMP-1/2 nicht beeinträchtigt (Reddy et al. 1995). Dies gibt Grund zur Annahme, dass die hohe Cathepsinexpression in den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen in makrophagenreichen Regionen durch das hohe kollagenolytische und elastolytische Potential der Cathepsine in nicht unerheblichem Maße zu einer

Destabilisierung der Gefäßwand führen kann. Der verstärkte Abbau extrazellulärer Matrix begünstigt eine Größenzunahme des Aneurysmas und führt möglicherweise dazu, dass Bereiche mit größeren makrophagozytären Infiltraten durch eine lokale Destabilisierung der Aortenwand Prädilektionsstellen für eine Ruptur der Aneurysmawand darstellen können. Daneben wurde auch beschrieben, dass Cathepsine im Rahmen der Atherosklerose an Vorgängen beteiligt sind, die zum apoptotischen Zelltod von Makrophagen führen (Li et al. 2001). Da viele AAA auch atherosklerotische Läsionen in der Gefäßwand aufweisen, sind Cathepsine vermutlich auch im AAA an derartigen Vorgängen beteiligt. Ob allerdings die Apoptose von Makrophagen eine große Relevanz für Pathogenese, Progression und Ruptur von AAA hat ist fraglich. Eine wahrscheinlich wichtigere Rolle spielen, den Ergebnissen der hier durchgeführten Untersuchungen zufolge, die beschriebenen, von den Makrophagen sezernierten Cathepsine durch den Abbau extrazellulärer Matrix.

Lymphozyten

Lymphozyten, zu denen B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen zählen, sind Teil der spezifischen Immunabwehr. Im Rahmen der Entzündungsreaktionen bei der Atherosklerose und im AAA kommt es zu einer Einwanderung dieser Zellen aus dem Blutstrom in die Gefäßwand (Libby et al. 2002; Shimizu et al. 2006). Betreffend deren Bedeutung für die proteolytische Degradation der Aneurysmawand wurde bisher nur beschrieben, dass Lymphozyten durch Sekretion von Zytokinen die Expression und Aktivierung von verschiedenen Proteasen in anderen Zellen, wie etwa Makrophagen oder glatten Muskelzellen, induzieren können (Ailawadi et al. 2003). Außerdem sind T-Zellen durch die Sekretion von Zytokinen in der Lage, die Apoptose von glatten Muskelzellen zu induzieren (Henderson et al. 1999). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass Lymphozyten im AAA eine große Anzahl an MMPs exprimieren (Reeps et al. 2009). Diese Proteasen können durch den Abbau extrazellulärer Matrix die Gefäßwand direkt destabilisieren (Wilson et al. 2005; Wilson et al. 24.01.2006). Ob jedoch auch Lymphozyten eine relevante Quelle von Cathepsinen im abdominalen Aortenaneurysma darstellen, war allerdings bisher nicht Gegenstand histologischer Untersuchungen.

In den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass die Lymphozyten im AAA auch selbst Cathepsine exprimieren. Hierbei wiesen Lymphozyten in der semiquantitativen Auswertung nach den Makrophagen die höchste

Cathepsinexpression aller untersuchten Zelltypen auf. Es wurden besonders die Cathepsine B, D und S von den Lymphozyten exprimiert. Cathepsin K und L sowie Cystatin C wiesen eine deutlich schwächere Expression auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Proteasen in den Entzündungsinfiltraten sowohl von B-Zellen als auch von T-Zellen exprimiert werden. Welche Funktionen den Cathepsinen in diesen Zellen im speziellen zukommen, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Auch wurde in dieser Arbeit nicht untersucht ob die genannten Zellen in der Lage sind Cathepsine in das extrazelluläre Milieu zu sezernieren. Möglicherweise dienen den Lymphozyten Cathepsine bei der Einwanderung aus dem Blutkreislauf in die Gefäßwand, indem sie extrazelluläre Matrix degradieren. Dies wurde allerdings hier nicht untersucht. So waren in den AAA-Präparaten inflammatorische Infiltrate hauptsächlich in Bereichen ausgeprägter Neovaskularisation lokalisiert. Diese Vergesellschaftung von Neovaskularisation und Entzündungsinfiltraten, wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Thompson et al. 1996; Holmes et al. 1995). Es ist also möglich, dass die Lymphozyten der Entzündungsinfiltrate durch die Expression von Cathepsinen direkt zur Degradation und konsekutiven Destabilisierung der Aneurysmawand beitragen und nicht nur, wie bisher beschrieben, über die Stimulation anderer Zellen.

Glatte Muskelzellen der Media

Die glatten Muskelzellen der Media sind neben elastischen und kollagenen Fasern von entscheidender Bedeutung für Integrität und Wandstabilität großer Gefäße wie der abdominalen Aorta (Hoshina et al. 2004). Im Rahmen der AAA-Pathogenese kommt es zum einen zur Destabilisierung der aortalen Gefäßwand durch den Verlust glatter Muskelzellen (López-Candales et al. 1997), zum anderen können aber die SMCs der Media durch Freisetzung proteolytischer Enzyme – wie etwa MMPs – und den daraus folgenden Abbau extrazellulärer Matrix, auch aktiv die Gefäßwand destabilisieren (Patel et al. 1996). Einzelne Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass Cathepsine auch von glatten Muskelzellen der Media im AAA exprimiert werden und somit entscheidend an den genannten Vorgängen beteiligt sein können (Liu et al. 2006b). Allerdings wurde dies bisher nicht hinreichend untersucht.

In den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnte nun erstmals gezeigt werden, dass von den glatten Muskelzellen der Media der abdominalen Aortenaneurysmen sowohl die Cathepsine B, D, K, L und S, als auch Cystatin C exprimiert werden. Im Gegensatz dazu

konnten Cathepsine, mit Ausnahme von Cathepsin D, in den SMCs der Media der Kontrollaorten immunhistochemisch nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass es im Rahmen der Pathogenese des AAA zu einer Hochregulation der Cathepsinexpression in den glatten Muskelzellen der Media kommt. Im Rahmen der Aneurysmaentstehung an der abdominalen Aorta kommt es vermehrt zum apoptotischen Zelltod von glatten Muskelzellen (López-Candales et al. 1997; Henderson et al. 1999). Das führt zu einer Verminderung glatter Muskelzellen der Media. Dies wurde auch bei der Charakterisierung der histologischen AAA-Präparate beobachtet. Dass Cathepsine an den Vorgängen der Apoptose beteiligt sind, wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt und gibt Grund zur Annahme, dass dies auch bei der Pathogenese des AAA der Fall ist. Die unter physiologischen Bedingungen in den Lysosomen lokalisierten Cathepsine werden in das Zytoplasma der Zellen freigesetzt, wenn sich etwa durch oxidativen Stress die Permeabilität der lysosomalen Membran erhöht. Im Zytoplasma können dann von den Cathepsinen weitere Reaktionskaskaden initiiert werden, die letztendlich zum apoptotischen Zelltod führen. Zusätzlich können Cathepsine durch den proteolytischen Abbau überlebenswichtiger Proteine diesen Prozess unterstützen (Chwieralski et al. 2006). Untersucht wurde dazu beispielsweise der Einfluss von Cathepsin B auf die Apoptose von Hepatozyten (Roberts et al. 1997; Guicciardi et al. 2000) und die Apoptose im Rahmen der Immunregulation (Michallet et al. 2003; Michallet et al. 2004). Bei der neuronalen Apoptose sind Cathepsin B und L beteiligt (Felbor et al. 2002), bei Lungenerkrankungen spielt z.B. Cathepsin D für den apoptotischen Zelltod eine wichtige Rolle (Thibodeau et al. 2004). In-vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass SMCs nach Stimulation durch verschiedene Zytokine, die unter anderem im Rahmen der Atherogenese vermehrt ausgeschüttet werden, Cathepsine freisetzen und in der Lage waren Elastin zu degradieren. Nach Stimulation mit IL-1 β , TNF- α oder IFN- γ exprimierten die gezüchteten SMCs vermehrt Cathepsin S und waren in der Lage Elastin zu degradieren (Sukhova et al. 1998). Auch über diese Mechanismen können die SMCs der Media möglicherweise aktiv zur proteolytischen Degradierung von Strukturproteinen beitragen. Auffällig hingegen war, dass sich das Ausmaß der Expression von Cathepsin D kaum zwischen AAA und Kontrollen unterschied. Cathepsin D ist aber als einziges der untersuchten Cathepsine keine Cysteinprotease sondern eine Aspartatprotease. Somit wird es nicht, wie die Cysteinproteasen von Cystatin C inhibiert. Allerdings wurde bisher noch nicht untersucht wie Cathepsin D im AAA reguliert bzw. inhibiert wird. Allgemein wurde eine Hemmung von Cathepsin D durch α -2-Makroglobulin beschrieben (Gacko et al. 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cathepsine in SMCs vermutlich zum einen durch ihre Rolle bei der Apoptose von

SMCs, zum anderen durch die Sekretion und den daraus bedingten Abbau von Strukturproteinen in nicht unerheblichem Maße zur Destabilisierung der Aneurysmawand und zur Größenzunahme von AAA beitragen können.

Neogefäße

Die Versorgung der intakten Aortenwand geschieht im physiologischen Zustand zu einem bedeutenden Teil über Diffusion aus dem Gefäßlumen (Thompson et al. 1996, S. 464). In der Tunica media einer gesunden Aorta finden sich deshalb gewöhnlich nur sehr spärlich Vasa vasorum (Wolinsky, Glagov 1967). In Übereinstimmung damit fand sich auch in den für diese Untersuchungen verwendeten Kontrollaorten nur eine sehr geringe Vaskularisation des Gefäßwand. Ein anderes Bild zeigte sich in den AAA-Präparaten, wo zum Teil eine ausgeprägte Neovaskularisation zu finden war. Diese Einsprossung von neuen Gefäßen aus den Vasa vasorum stellt ein wesentliches Charakteristikum der Pathogenese des AAA dar (Ailawadi et al. 2003). Die Entstehung und das Wachstum von Neogefäßen setzen dabei den Abbau von endothelialer Basalmembran und perivaskulärer extrazellulärer Matrix voraus (Ingber, Folkman 1989; Libby, Schönbeck 2001). Dies erfordert lokale Abbauvorgänge durch verschiedene proteolytische Enzyme wie etwa MMPs (Carmeliet 2000; Reeps et al. 2009). Möglicherweise spielen auch Cathepsine hierbei mit ihrem ausgeprägten proteolytischen – insbesondere kollagenolytischen und elastolytischen – Potential eine entscheidende Rolle (Sukhova et al. 1998; Yasuda et al. 2004). In anderen Zusammenhängen konnte nämlich eine Beteiligung einzelner Cathepsine bei der Neovaskularisation bereits nachgewiesen werden. So wurde für Cathepsin S beschrieben, dass ein Mangel an dieser Cysteinprotease in hohem Maße die Neubildung von Mikrogefäßen im Rahmen der Wundheilung beeinträchtigt (Shi et al. 2003). Des Weiteren haben In-vitro-Untersuchungen an Endothelzellen von humanen Umbilicalvenen gezeigt, dass Cathepsin B z.B. einen wichtigen Beitrag zum Prozess der Neoangiogenese leistet (Premzl et al. 2006). Auch für Tumoren wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass eine erhöhte Expression von Cathepsinen mit einer vermehrten Angiogenese assoziiert ist (Mikkelsen et al. 1995; Kruszewski et al. 2004; van Hinsbergh et al. 2006). Allerdings wurde die Cathepsinexpression in den Zellen der Neogefäße speziell im AAA bisher nicht untersucht.

In den immunhistochemischen Färbungen an AAA-Präparaten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte nun für alle untersuchten Cathepsine eine Expression in

Endothelzellen unreifer, sowie reifer Neogefäße nachgewiesen werden (Tabelle 17). Einen möglichen Hinweis darauf, dass Cathepsine von den Endothelzellen neu aussprossender Gefäße vermehrt gebildet werden, gibt der Vergleich mit den luminalen Endothelzellen. Mit Ausnahme von Cathepsin K wurden nämlich alle untersuchten Cathepsine von den Endothelzellen der Neogefäße in höherem Maße exprimiert, als dies bei den luminalen Endothelzellen sowohl von AAA, als auch von Kontrollorten der Fall war. Auch Cystatin C wurde, im Gegensatz zu den luminalen Endothelzellen, in denen es nicht exprimiert wurde, in den Endothelzellen der Neogefäße nachgewiesen. Hier ist es möglicherweise als Cathepsininhibitor an der Regulation der Proteasenaktivität beteiligt, um ein Gleichgewicht aufrecht zu erhalten und überschießende Reaktionen im Rahmen der Neoangiogenese zu regulieren. Für Cathepsin L wurde beispielsweise beschrieben, dass es von endothelialen Progenitorzellen in höherem Maße exprimiert wird als von Endothelzellen (Urbich et al. 2005). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion von endothelialen Progenitorzellen und dem damit verbundenen Abbau extrazellulärer Matrix. So wurde in den hier durchgeführten immunhistochemischen Färbungen für Cathepsin L keine Expression in luminalen Endothelzellen der untersuchten AAA-Präparate nachgewiesen (Tabelle 17; Abb. 9). Die ECs der Neogefäße hingegen zeigten eine deutliche Expression dieser Protease (Tabelle 17; Abb. 13). Dies ist vermutlich auf eine Hochregulation der Expression des Cathepsins im Rahmen der Neoangiogenese zurückzuführen.

Luminale Endothelzellen

Die Endothelzellen der Gefäße bilden in Form einer einzelligen Schicht die Grenze zwischen Blutstrom und Gefäßwand. Hierbei spielen sie eine entscheidende Rolle bei verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. So haben sie beispielsweise Einfluss auf die Regulation der Blutgerinnung, den Tonus der Gefäßmuskulatur, sowie immunologische und inflammatorische Prozesse. Kommt es in diesen Zellen jedoch zu einer Störung der physiologischen Regulationsmechanismen, resultiert daraus eine endotheliale Dysfunktion. Diese stellt einen bedeutenden Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose dar (Rubanyi 1993). Dabei spielen auch Proteasen wie etwa MMPs oder Cathepsine eine wichtige Rolle (Liu et al. 2004; Hummel et al. 2001). Für MMPs konnte bereits gezeigt werden, dass sie auch von luminalen Endothelzellen im abdominalen Aortenaneurysma exprimiert werden (Reeps et al. 2009). Zur Expression von Cathepsinen durch luminale Endothelzellen im AAA gab es jedoch bisher keine Untersuchungen.

In den nun hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurden zwar Cathepsine in den Endothelzellen von Neogefäßen verstärkt exprimiert, jedoch zeigten auch lumenale Endothelzellen – sowohl von AAA, als auch von Kontrollortaorten – zum Teil eine Expression verschiedener Cathepsine. In den luminalen Endothelzellen der abdominalen Aortenaneurysmen wurden Cathepsin D und in schwächerem Ausmaß die Cathepsine B, K und S exprimiert. In den luminalen Endothelzellen der Kontrollortaorten konnten in geringem Maße alle Cathepsine nachgewiesen werden. Es stellt sich also die Frage welche Funktion den Cathepsinen in den luminalen Endothelzellen zukommt und warum sie auch in den luminalen Endothelzellen der Kontrollortaorten exprimiert wurden. Für die Cathepsine K und L wurde bereits gezeigt, dass deren Expression in Endothelzellen von Scherkräften im Gefäß abhängt (Platt et al. 2007; Platt et al. 2006). Für Cathepsin B konnte dieses Verhalten nicht nachgewiesen werden. Eine Expression von Cathepsin S in luminalen Endothelzellen wurde auch von Liu et al. beschrieben (Liu et al. 2004). Bei der Atherogenese kommt es zu Beginn zu einer Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutkreislauf, indem die Leukozyten an luminalen Endothelzellen adhären und anschließend durch die Endothelschicht und die Basalmembran in die Gefäßwand penetrieren (Libby 2000). An diesen Vorgängen sind verschiedene Moleküle wie etwa das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) oder das macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) beteiligt (Libby 2000). Ein Mangel oder eine gestörte Funktion dieser Moleküle führte bei Untersuchungen an Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Atherogenese (Gu et al. 1998; Inoue et al. 2002; Dansky et al. 2001). Möglicherweise spielen in luminalen Endothelzellen Cathepsine eine Rolle bei der Regulation dieser Moleküle. So zeigten Cathepsin S Knockout-Mäuse eine signifikante Reduktion dieser Moleküle im Serum (Sukhova et al. 2003). Möglicherweise sind auch Cathepsine an der Freisetzung von Adhäsionsmolekülen von der Oberfläche der Endothelzellen beteiligt, wie dies bei MMPs der Fall ist (Hummel et al. 2001). Die Tatsache, dass Cathepsine nicht nur von den luminalen Endothelzellen der abdominalen Aortenaneurysmen, sondern auch von denen der Kontrollortaorten exprimiert wurden, könnte darin bedingt sein, dass auch in den Kontrollortaorten teils atherosklerotische Veränderungen vorhanden waren.

Limitationen der immunhistochemischen Färbemethode

Die immunhistochemischen Färbungen von AAA-Präparaten und Kontrollen ermöglichen den Nachweis einer Expression der Cathepsine oder von Cystatin C in den verschiedenen Zellen der

Aortenwand. Die Methode ist aber nur bedingt geeignet, die Expression von Cathepsinen und Cystatin C untereinander quantitativ zu vergleichen. Dies beruht auf den unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Antikörper. Diese binden mit unterschiedlicher Affinität an die Epitope des Zielantigens. Um nun überhaupt eine Anfärbung in der richtigen Stärke zu erhalten, wurden die Färbungen hinsichtlich Antikörperkonzentration, Inkubationsdauer und weiterer Parameter optimiert (siehe 2.4.3). Dadurch bedingt kommt es zwangsläufig zu einer Angleichung des Gesamtfärbeverhaltens zwischen den verschiedenen Cathepsin/Cystatin C Färbungen. Um nun die Expression der Cathepsine quantitativ zu erfassen und Aussagen über den Aktivitätszustand der Cathepsine treffen zu können, wurden die quantitative Real-Time RT-PCR, sowie die Western Blot Analyse durchgeführt.

Bei den als Kontrollen verwendeten Präparaten wurden jeweils nur diejenigen Bereiche des Präparates ausgewertet, die in ihrer Struktur dem physiologischen Aufbau einer Aortenwand entsprachen. Dort kamen nur das Gefäßlumen auskleidende Endothelzellen und in der Tunica media glatte Muskelzellen vor. In diesen wurde die Expression von Cathepsinen und Cystatin C semiquantitativ erfasst. Die extrazelluläre Matrix bestand aus kollagenen und elastischen Fasern. Allerdings bestehen bei den meisten Menschen in den arteriellen Gefäßen, so auch in der abdominalen Aorta, ab einem gewissen Alter mehr oder weniger ausgeprägte atherosklerotische Veränderungen (de Leeuw et al. 2000). In diesen Bereichen atherosklerotischer Manifestationen konnten auch Makrophagen und andere inflammatorische Zellen nachgewiesen werden. Diese wurden allerdings nicht in der Auswertung erfasst.

4.3 Quantitative Real-Time RT-PCR

In den immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Cathepsinexpression in den verschiedenen Zellen der AAA-Gefäßwand anhand des Färbeverhaltens semiquantitativ erfasst. Dabei zeigte sich besonders für die Cathepsine B, D und S eine kräftige immunhistochemische Anfärbung, wobei meist die Expression in den Makrophagen, sowie den Zellen der Entzündungsinfiltrate und Neogefäße am höchsten war (siehe 3.2.2). Wie jedoch bereits oben beschrieben, ist die Immunhistochemie nur bedingt für eine quantitative Auswertung geeignet. Deshalb wurde die quantitative Real-Time RT-PCR durchgeführt, eine sehr sensitive Methode, die es ermöglicht die Expression von Cathepsinen und Cystatin C in AAA und Kontrollorten auf der mRNA-Ebene quantitativ vergleichen zu können.

Die quantitativen RT-PCR-Experimente zeigten in den AAA-Präparaten für Cystatin C eine

signifikant reduzierte mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollorten (Abb. 15). Der Grund dafür ist vermutlich, dass es im Rahmen von Entzündungsvorgängen zu einer Reduktion der Cystatin C Expression kommt. Das führt folglich zu einem Ungleichgewicht zwischen der Expression von Cathepsinen und ihrem Inhibitor Cystatin C zugunsten der Cathepsine (Chapman et al. 1990; Warfel et al. 1987). Eine Verminderung der Cystatin C Expression in AAA im Vergleich zu normalen Aorten wurde auch in Western Blot Analysen von Sukhova et al. gezeigt (Sukhova, Shi 2006). Auch Untersuchungen, die die Expression von Cathepsinen und Cystatin C in den Aortenwänden von AAA-Patienten mit der Expression von Patienten verglichen, die an einer Verschlusskrankheit der Aorta (AOD = aortic occlusive disease) erkrankt waren, zeigten in der AAA-Gefäßwand eine um 30 % niedrigere Cystatin C Expression, als in der AOD-Gefäßwand (Abisi et al. 2007).

In einer Studie von Abdul-Hussien et al. wurden bezüglich der mRNA-Expression von Cystatin C keine Unterschiede zwischen AAA und Kontrollen beschrieben (Abdul-Hussien et al. 2007). Allerdings wiesen die dort untersuchten AAA reduzierte Cystatin C Protein Mengen auf. Deshalb wurde vermutet, dass es zu einer sekundären Verminderung der Cystatin C Level käme, etwa durch vermehrten Abbau oder durch verstärkten Verbrauch infolge erhöhter Aktivität von Cysteinproteasen. In der hier durchgeführten quantitativen Real-Time RT-PCR konnte allerdings gezeigt werden, dass auch die Cystatin C mRNA in AAA im Vergleich zu Kontrollorten signifikant reduziert ist (Abb. 15). Das lässt darauf schließen, dass es im Rahmen der AAA-Pathogenese bereits auf der Ebene der Transkription zu einer Herabregulation der Cystatin C Expression kommt.

Von den untersuchten Cathepsinen zeigte in der quantitativen Real-Time RT-PCR nur Cathepsin L eine erhöhte mRNA-Expression in AAA im Vergleich zu Kontrollorten. Allerdings war der Unterschied nicht statistisch signifikant ($p=0,127$). Auch keines der anderen untersuchten Cathepsine wies eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den AAA-Präparaten im Vergleich mit den Kontrollorten auf. Die Cathepsine D und K zeigten sogar ein umgekehrtes Bild. Deren mRNA-Expression war in den AAA-Proben signifikant niedriger als in den Kontrollen. Cathepsin D fällt jedoch eine besondere Rolle zu. Es gehört zur Gruppe der Aspartatproteasen, im Gegensatz zu den Cathepsinen B, K, L und S, welche Cysteinproteasen sind. Die Cysteinproteasen werden von Cystatin C inhibiert. Cathepsin D hingegen wird als Aspartatprotease nicht von Cystatin C inhibiert. Für Cathepsin D wurde beschrieben, dass es beispielsweise von α -2-Makroglobulin irreversibel gehemmt wird (Gacko et al. 2007). Dies wurde aber bisher weder im AAA, noch bei anderen vaskulären Erkrankungen untersucht. Folglich ist über die Regulation dieser Protease

wenig bekannt.

Wurde hingegen die mRNA-Expression der einzelnen Cathepsine in Bezug zur Expression ihres endogenen Inhibitors Cystatin C gesetzt, so ergaben sich andere Ergebnisse. Normiert auf Cystatin C wiesen dann Cathepsin B und L eine signifikant erhöhte Aktivität in AAA-Präparaten auf. Diese Ergebnisse legen dar, dass es in der AAA-Gefäßwand insgesamt vermutlich nicht zu einer Hochregulierung der Cathepsinexpression auf Ebene der Transkription kommt. Die Cathepsine D und K wiesen zudem sogar eine verminderte mRNA-Expression auf. Es scheint vielmehr ein Ungleichgewicht zwischen Cathepsinen und deren Inhibitor Cystatin C zu bestehen, welches vor allem auf einer Herabregulation der Cystatin C mRNA-Expression beruht.

Die unveränderte, tendenziell eher verminderte mRNA-Expression der Cathepsine B, D, K und S in den untersuchten abdominalen Aortenaneurysmen könnte durch den veränderten histologischen Aufbau der AAA im Vergleich zu den Kontrollortaen begründet sein. Denn vermutlich kommt es zwar in den verschiedenen Zellen, die in der Aneurysma-Gefäßwand zu finden sind, zu einer Hochregulation der Cathepsinexpression, die auch in den immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, jedoch ist möglicherweise die Cathepsinexpression in ihrer Gesamtheit reduziert. Die Ursache dafür ist möglicherweise, dass es im Rahmen der Pathogenese des AAA zu einem deutlichen Verlust glatter Muskulatur der Media kommt, wie es in den hier durchgeführten histologischen Untersuchungen und früheren Untersuchungen nachgewiesen wurde (Henderson et al. 1999; López-Candales et al. 1997). In den Kontrollortaen werden Cathepsine von den glatten Muskelzellen der Media vermutlich zwar in geringerem Ausmaß exprimiert und nicht ins extrazelluläre Milieu sezerniert, allerdings imponiert die gesamte mRNA-Expression höher, bedingt durch die wesentlich größere Zellzahl.

Einzig Cathepsin L zeigte in AAA eine, wenn auch nicht signifikant, erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollortaen. Diese Protease wird scheinbar durch die Zellen der Aneurysma-Gefäßwand in einem Ausmaß exprimiert, dass eine etwaige Verminderung der gesamten mRNA-Expression durch einen Verlust an glatter Muskulatur der Media nicht derart ins Gewicht fällt. Für Cathepsin L wurde auch von Abdul-Hussien et al. beschrieben, dass AAA eine erhöhte mRNA-Expression im Vergleich mit Kontrollen aufweisen. Die anderen Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu dessen Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass auch die mRNA-Expression der Cathepsine K und S in AAA und rupturierten AAA im Vergleich zu Kontrollen erhöht ist (Abdul-Hussien et al. 2007).

Eine mögliche Ursache unterschiedlicher Untersuchungsergebnisse könnte in der unterschiedlichen Herkunft der Kontrollorten begründet sein. So wurden hier Aortenpräparate von Personen verwendet, die im rechtsmedizinischen Institut obduziert wurden. In den Untersuchungen von Abdul-Hussien et al. wurden hingegen Aortenpräparate untersucht die im Rahmen von Nierentransplantationen in Verbindung mit den Nierenarterien von den Spendern entnommen wurden (Abdul-Hussien et al. 2007). Außerdem lag in dessen Untersuchungen das durchschnittliche Alter der Personen, von denen die Kontrollen entnommen wurden, bei 48 Jahren, die dort untersuchten AAA stammte hingegen von wesentlich älteren Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 72 Jahren. Bei den hier untersuchten Proben war die Altersdifferenz zwischen AAA-Patienten und Kontrollpersonen hingegen geringer, mit einem durchschnittlichen Alter von 68 (AAA) beziehungsweise 53 Jahren (Kontrollen). Eine stärkere Angleichung des Alters der Kontrollgruppe an das der AAA-Patienten führt möglicherweise infolge von vermehrten atherosklerotischen Veränderungen bei den Kontrollpersonen zu einer höheren Cathepsinexpression, als das bei jüngeren Vergleichspersonen der Fall wäre. Durch diese Angleichung des Alters der beiden Untersuchungsgruppen wird vermieden, dass ein Unterschied in der mRNA-Expression zwischen AAA und Kontrollorten nur durch altersbedingte Veränderungen vorgetäuscht wird.

Es wurde weiterhin die Expression der untersuchten Cathepsine in symptomatischen Patienten untersucht und mit den Ergebnissen der asymptomatischen AAA-Patienten verglichen, um herauszufinden, ob bei Patienten mit klinisch höher eingeschätzter Rupturgefährdung die Expression von Cathepsinen erhöht ist. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt. Symptomatische AAA sind etwa durch Bauch-, Rücken-, oder Flankenschmerzen charakterisiert. Diese Symptome können aber möglicherweise alleine durch Größe, Form oder Lage des Aneurysmas bedingt sein und lassen nicht zwangsläufig auf eine erhöhte proteolytische Aktivität, eine verminderte Wandstabilität und damit auf eine erhöhte Rupturwahrscheinlichkeit schließen. Das Gleichgewicht zwischen Cathepsinen und deren Inhibitor Cystatin C ist bereits in den asymptomatischen AAA zu Gunsten der Cathepsine verschoben. Eine zusätzlich bestehende Symptomatik scheint somit, zumindest in Bezug auf die Cathepsinexpression, keinen Hinweis auf eine vermehrte proteolytische Aktivität in der AAA-Gefäßwand zu geben.

In der Agarose-Gelelektrophorese, die durchgeführt wurde um die Amplifikationsprodukte der quantitativen Real-Time RT-PCR zu identifizieren, wiesen ein Teil der untersuchten Proben Doppelbanden auf. Dies war sowohl bei AAA-Proben, als auch bei den Kontrollen der Fall. Die

Banden bei einer Fragmentlänge von ca. 100 bp entsprachen dabei den gewünschten PCR-Amplifikationsprodukten. Die zusätzlichen Banden lagen bei einer Fragmentlänge zwischen 50 und 100 bp. Hierbei handelte es sich aber nicht um Primerdimere, denn diese würden normalerweise eine kürzere Fragmentlänge aufweisen (ca. 30-50 bp). Wahrscheinlich ist, dass diese zusätzlichen Banden durch partiell degradierte RNA zustande kommen. Eine mögliche Ursache der Degradierung sind atherosklerotische Prozesse in den untersuchten Gefäßen. Denn neben den AAA-Proben wiesen auch die Kontrollen gewisse atherosklerotische Veränderungen auf. Eine andere Möglichkeit ist, dass es durch die verwendete Formalinfixierung zu einer Degradierung von RNA kommt, wie es bereits in früheren Publikationen beschrieben wurde (Specht et al. 2001; Rupp, Locker 1988; Goldsworthy et al. 1999; Stanta, Schneider 1991; Finke et al. 1993) .

4.4 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse wurde ergänzend zur quantitativen Real-Time RT-PCR an zusätzlichen 8 frischen, nicht in Formalin fixierten, AAA-Proben durchgeführt um die Cathepsinexpression neben der mRNA-Ebene auch auf Proteinebene zu untersuchen. Neben einer Quantifizierung (siehe 3.4) ließen sich hierbei anhand der Molekülmasse auch Aussagen über den Aktivitätszustand der untersuchten Cathepsine treffen. Eine derartige Untersuchung über den Aktivitätszustand der einzelnen Cathepsine im AAA ist neu und wurde bisher so noch nicht durchgeführt.

Cathepsin B wird als inaktives Proenzym mit einer Molekülmasse von 43 kDa synthetisiert und durch Abspaltung von einem Propeptid in seine aktiven Formen überführt. Dabei entsteht entweder die Einzelkettenform mit einer Molekülmasse von 31 kDa oder die Zweikettenform (25 und 5 kDa Untereinheiten). Die in der Western Blot Analyse detektierten Banden lagen für Cathepsin B bei ca. 31 kDa und entsprachen damit der aktiven Einzelkettenform. Cathepsin D wird als inaktives 52 kDa Proenzym synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung entsteht eine aktive zweikettige Form mit Molekülmassen von 34 und 14 kDa, die in der Western Blot Analyse ebenfalls nachgewiesen wurden. Cathepsin L wird als inaktives Proenzym mit einer Molekülmasse von 43 kDa synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung entsteht die aktive Einkettenform mit einer Molekülmasse von 34 kDa. Die in der Western Blot Analyse detektierten Banden entsprachen wiederum der aktiven Form des Enzyms. Auch bei Cathepsin S wurde dessen aktive Form bei 25 kDa detektiert. Einzig in der Western Blot Analyse von Cathepsin K konnten in den AAA-Proben keine Banden nachgewiesen werden. Möglicherweise war die Sensitivität des verwendeten Antikörpers zu gering, sodass kein Cathepsin K detektiert werden konnte.

In der Western Blot Analyse konnten somit Cathepsin B, D, L, S und Cystatin C in den AAA-Präparaten nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist, dass alle nachgewiesenen Cathepsine in den AAA-Präparaten in ihrer aktivierten Form vorlagen. Dies unterstreicht die mögliche Rolle der Cathepsine in der Pathogenese des abdominalen Aortenaneurysmas. Diese Aktivierung der hier untersuchten Cysteincathepsine aus inaktiven Proenzymen geschieht vermutlich insbesondere durch autokatalytische Prozessierung der jeweiligen Proenzyme. Dies bedeutet, dass bereits aktive Formen dieser Cysteinproteasen die inaktiven Proenzyme durch Abspaltung von Peptidketten ebenfalls in die aktive Form überführen können (McQueney et al. 1997; Ménard et al. 1998; Quraishi, Storer 2001).

Limitationen der Western Blot Analyse

Im Unterschied zu den histologischen Untersuchungen und der quantitativen Real-Time RT-PCR wurde die Western Blot Analyse nicht an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten durchgeführt, sondern an tiefgefrorenen Gewebelysaten der Gefäßwand. Für diese Studie war es nicht möglich an derartiges Material von gesunden Kontrollpersonen zu gelangen. Deshalb konnte in der Western Blot Analyse auch kein Vergleich der Expression zwischen AAA und Kontrollen erfolgen, wie es bei der quantitativen Real-Time RT-PCR an Formalin-fixierten Präparaten möglich war.

Um die Ergebnisse der Expression der untersuchten Cathepsine in der Western Blot Analyse jedoch möglichst untereinander vergleichbar zu machen, wurden alle Ergebnisse auf die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. GAPDH ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse und wird in allen Geweben und Zellen des Körpers in hohem Maße exprimiert, was es zum einem idealen Standard macht. Jedoch besitzen trotz Allem die verschiedenen verwendeten Antikörper unterschiedliche Affinitäten zu den Epitopen der zugehörigen Antigene. Daraus könnten möglicherweise Fehler in der Quantifizierung der Expression resultieren.

4.5 Serumuntersuchung

Die Immunpräzipitation mit Serumproben von AAA-Patienten wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß Cathepsine und deren Inhibitor Cystatin C bei Patienten mit einem abdominalen Aortenaneurysma ins Serum abgegeben werden. Bislang wurde bei AAA-Patienten Cathepsin D in Serum und Plasma (Gacko et al. 2006) und die Aktivität der Cathepsine B,

D und L im Plasma (Gacko et al. 2005) untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte Konzentration und Aktivität von Cathepsin D im Blut von Patienten mit AAA im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Cathepsin B und L zeigten bezüglich ihrer Aktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen AAA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Zur Expression der Cathepsine K und S im Serum von AAA-Patienten wurden bislang keine Untersuchungen publiziert. Für den Cathepsin Inhibitor Cystatin C konnte bislang in zwei Studien eine verminderte Cystatin C Serumkonzentration bei Patienten mit einem abdominalen Aortenaneurysma nachgewiesen werden (Shi et al. 1999; Lindholt et al. 2001a).

Mit der, in dieser Studie durchgeführten Immunpräzipitation wurden nun sowohl die Cathepsine B, D, K, L und S, als auch Cystatin C untersucht. Jedoch konnte nur das Vorkommen von Cathepsin B und Cystatin C im Serum der AAA-Patienten nachgewiesen werden. Cathepsin D, K, L und S wurden entweder nicht ins Serum abgegeben oder konnten aufgrund zu geringer Konzentrationen mit der verwendeten Methode nicht detektiert werden. Die Ergebnisse decken sich mit denen der Western Blot Analyse insofern, als dort in AAA-Präparaten Cathepsin B und Cystatin C die höchste Quantität aufwies. Außerdem konnte anhand der Molekülmasse gezeigt werden, dass Cathepsin B ebenfalls in seiner aktiven Form ins Serum abgegeben wird (siehe 4.4 und Abb. 25). Cathepsin B ist damit möglicherweise ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Die Ergebnisse müssten an einer größeren Fallzahl überprüft werden, die Seren der AAA-Patienten müssten mit denen von gesunden Kontrollpersonen verglichen werden und eine Korrelation der Serum Cathepsin B Konzentration mit dem Aneurysmadurchmesser wäre sinnvoll. Cathepsin B muss aber als möglicher Biomarker für das abdominale Aortenaneurysma kritisch gesehen werden, da es keinen spezifischen Marker für dieses darstellt. So wurde bereits beschrieben, dass die Serum Cathepsin B Konzentration beim kolorektalen Karzinom, beim hepatozellulären Karzinom, beim Magenkarzinom und beim Pankreaskarzinom im Vergleich zu tumorfreien Kontrollpatienten erhöht ist (Herszényi et al. 2008).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Untersuchungen konnte in einer Studie zur Aktivität verschiedener Enzyme im Plasma von AAA-Patienten (Gacko et al. 2005) eine Aktivität der Cathepsine B, D und L im Plasma von AAA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Die Aktivität von Cathepsin D war dabei im Plasma der AAA-Patienten signifikant erhöht. Die Aktivität der anderen beiden untersuchten Cathepsine zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen. Diese Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass die Erfassung einer Cathepsinexpression mittels Immunpräzipitation nicht so sensitiv ist, wie die

Aktivitätsbestimmung.

Auch angesichts der Tatsache, dass in Studien zur koronaren Herzkrankheit (KHK) mit anderen Methoden bereits eine erhöhte Serumkonzentration von Cathepsin L (Liu et al. 2009; Liu et al. 2006b) und Cathepsin S (Liu et al. 2006a) nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, dass die Methode der Immunpräzipitation nicht sensitiv genug ist die Cathepsine D, K, L und S nachzuweisen. Denn etwa 40 % (Tabelle 13) der untersuchten Patienten hatten neben dem AAA auch eine KHK und müssten folglich daher rührend eine erhöhte Cathepsin Expression ausweisen, selbst wenn das AAA zu keiner Erhöhung der Cathepsin Konzentration im Serum führen würde.

4.6 Fazit

In den immunhistochemischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass es in fast allen Zellen der AAA-Gefäßwand zu einer Hochregulierung der Cathepsinexpression kommt. Dabei können Cathepsine möglicherweise über verschiedene Mechanismen zur Größenprogression und zur Destabilisierung des AAA beitragen. Entscheidend sind dabei vor allem die Sekretion von Cathepsinen durch Makrophagen, Lymphozyten und glatte Muskelzellen, die zur Degradierung extrazellulärer Matrix führt, sowie die Beteiligung der Cathepsine an der Apoptose glatter Muskelzellen der Media. Außerdem sind die Cathepsine vermutlich von essenzieller Bedeutung für die Neovaskularisation, die ein weiteres Hauptcharakteristikum der AAA-Pathogenese darstellt. Dass es in AAA aber trotz dieser Hochregulierung der Cathepsinexpression in den verschiedenen Zellen, im Vergleich zu Kontrollen zum Teil zu einer insgesamt verminderten Expression der Cathepsine auf mRNA-Ebene kommt, liegt möglicherweise im ausgeprägten Verlust glatter Muskelzellen in der Media begründet. Denn diese stellen neben inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen oder Lymphozyten die Hauptquelle der untersuchten Proteasen dar. Das auf transkriptionaler Ebene bestehende Ungleichgewicht zwischen Cathepsinen auf der einen Seite und deren Inhibitor Cystatin C auf der anderen Seite liegt folglich vielmehr darin begründet, dass es in AAA im Vergleich zu Kontrollen zu einer signifikant verminderten Expression von Cystatin C kommt. Des Weiteren ist hervorzuheben, dass die Cathepsine nicht nur in den untersuchten Aortenaneurysmen nachgewiesen werden konnten, sondern auch mit Hilfe von Western Blot Analysen gezeigt werden konnte, dass diese dort auch in ihrer aktiven Form vorliegen. Für Cathepsin B konnte mittels Immunpräzipitation sogar gezeigt werden, dass es in seiner aktiven Form auch ins Serum der AAA-Patienten abgegeben wird. Die Zusammenschau aller Ergebnisse bekräftigt somit die Annahme, dass die Cathepsine mit ihrem

hohen proteolytischen Potenzial wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Entstehung und der Progression abdominalen Aortenaneurysmen spielen.

5 Zusammenfassung

Das abdominale Aortenaneurysma (AAA) ist eine häufige Erkrankung insbesondere älterer Menschen, die häufig aufgrund fehlender Symptome unbemerkt bleibt. Die große Gefahr für die Betroffenen besteht in der Ruptur des Aneurysmas, welche in der Mehrheit der Fälle rasch zum Tode führt. Entscheidende Prozesse in der Pathogenese des AAA sind unter anderem die Entzündung, der Abbau extrazellulärer Matrix, der Verlust glatter Muskelzellen der Media, sowie die Neovaskularisierung. Insbesondere die Degradierung des Bindegewebes der aortalen Gefäßwand führt zur Destabilisierung und Ruptur des Aneurysmas. An diesem Vorgang sind verschiedenste Proteasen beteiligt. Die Rolle der Cathepsine im AAA, die ein sehr hohes proteolytisches Potential besitzen, ist noch weitgehend ungeklärt. Das Ziel dieser Dissertation war es deshalb, die Expression und das Vorkommen relevanter Cysteinproteasen wie Cathepsin B, K, L, S und deren Inhibitor Cystatin C, sowie die Aspartatprotease Cathepsin D im AAA zu untersuchen und mit nicht aneurysmatischen Aorten zu vergleichen. Des Weiteren erfolgte erstmals auch der Vergleich zwischen symptomatischen und asymptomatischen AAA.

Zu diesem Zweck wurden in die Studie insgesamt 40 Patienten mit einem AAA, die einem offenen chirurgischen Eingriff unterzogen worden waren, und 10 Personen mit gesunder Aorta, einbezogen. Das intraoperativ entnommene Gewebe wurde entweder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet oder frisch tiefgefroren. Außerdem wurde den Patienten präoperativ das Blut für die Serumuntersuchung entnommen. Die Gewebeproben wurden hinsichtlich ihrer Morphologie anhand histologischer und immunhistochemischer Färbungen charakterisiert. Dabei wurden die Zellularität, Entzündungsinfiltrate und das Vorhandensein von Elastin, Kollagen, Makrophagen, glatter Muskelzellen der Media, Neovaskularisierung, sowie das Ausmaß atherosklerotischer Plaques und Verkalkung beurteilt. Immunhistochemische Färbungen von Cathepsinen, sowie Cystatin C dienen der Zuordnung deren Expression zu den einzelnen Zellen der AAA-Gefäßwand. Zur quantitativen Analyse der Expression von Cathepsinen und Cystatin C wurden die quantitative SYBRGreen-basierte Real-Time RT-PCR sowie Western Blot durchgeführt. Serumproben wurden auf das Vorkommen von Cathepsinen und Cystatin C mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot Analyse untersucht.

In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Cathepsine und Cystatin C von den meisten Zellen der AAA-Gefäßwand exprimiert wurden, insbesondere von Makrophagen, Lymphozyten, sowie den Zellen der Neogefäße. Auch in den

Zellen der Kontrollorten wurden Cathepsine immunhistochemisch nachgewiesen. Beim histologischen Vergleich zwischen symptomatischen und asymptomatischen AAA zeigte sich bei den symptomatischen Aortenaneurysmen zum einen ein stärkerer Verlust an glatten Muskelzellen der Media sowie kollagenen und elastischen Fasern, zum anderen ein vermehrtes Vorkommen von Makrophagen und inflammatorischen Infiltraten. Hinsichtlich der Expression von Cathepsinen und Cystatin C waren in den immunhistochemischen Untersuchungen zwischen symptomatischen und asymptomatischen AAAs jedoch keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Dies konnte auch mit der quantitativen Real-Time RT-PCR bestätigt werden. Interessanterweise zeigte der quantitative Vergleich zwischen AAA und Kontrollorten eine signifikant verringerte mRNA-Expression von Cystatin C ($p=0,002$), sowie Cathepsin D ($p<0,001$) und K ($p=0,018$) in den Aortenaneurysmen. Wurde jedoch die mRNA-Expression auf die Aktivität der einzelnen Cathepsine beurteilt (Normalisierung auf die Expression dessen Inhibitors Cystatin C), so wurde eine signifikant höhere Aktivität für Cathepsin B ($p=0,021$) und L ($p=0,014$) beobachtet. Die Western Blot Analyse bestätigte das überwiegende Vorhandensein der aktiven Form der Cathepsine. Weiterhin konnten im Serum der AAA-Patienten mittels der Immunpräzipitation Cathepsin B und Cystatin C nachgewiesen werden.

Obwohl die Expression von Cathepsinen in den meisten Zellen der AAA-Gefäßwand nachgewiesen werden konnte, war interessanterweise die Cathepsinexpression in ihrer Gesamtheit in AAA-Präparaten, verglichen mit Kontrollorten, mengenmäßig reduziert. Aufgrund der verringerten Expression des Inhibitors Cystatin C zeigte sich jedoch in der AAA-Gefäßwand eine deutlich höhere Aktivität der untersuchten Cathepsine, insbesondere von Cathepsin B und L, was auch durch Western Blot bestätigt wurde. Die Zusammenfassung der Ergebnisse bekräftigt somit die Annahme, dass Cathepsine mit ihrem hohen proteolytischen Potential eine wichtige Rolle in der Entstehung und der Progression abdominalen Aortenaneurysmen spielen können.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, Daniel E.; Margaryan, Naira V.; Jeruss, Jacqueline S.; Khan, Seema; Kaklamani, Virginia; Winchester, David J. et al.: Reevaluating cathepsin D as a biomarker for breast cancer: serum activity levels versus histopathology. In: *Cancer biology & therapy*, Bd. 9 (2010), S. 23–30.
- Abdul-Hussien, Hazem; Soekhoe, Ratna G. V.; Weber, Ekkehard; Thüsen, Jan H. von der; Kleemann, Robert; Mulder, Adri et al.: Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. In: *The American journal of pathology*, Bd. 170 (2007), S. 809–817.
- Abisi, Said; Burnand, Kevin G.; Waltham, Matthew; Humphries, Julia; Taylor, Peter R.; Smith, Alberto: Cysteine protease activity in the wall of abdominal aortic aneurysms. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, Bd. 46 (2007), S. 1260–1266.
- Abrahamson, M.; Barrett, A. J.; Salvesen, G.; Grubb, A.: Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. In: *The Journal of biological chemistry*, Bd. 261 (1986), S. 11282–11289.
- Abrahamson, M.; Islam, M. Q.; Szpirer, J.; Szpirer, C.; Levan, G.: The human cystatin C gene (CST3), mutated in hereditary cystatin C amyloid angiopathy, is located on chromosome 20. In: *Human genetics*, Bd. 82 (1989), S. 223–226.
- Ailawadi, Gorav; Eliason, Jonathan L.; Upchurch, Gilbert R.: Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, Bd. 38 (2003), S. 584–588.
- Baumgartner, Iris; Hirsch, Alan T.; Abola, Maria Teresa B.; Cacoub, Patrice P.; Poldermans, Don; Steg, Philippe Gabriel et al.: Cardiovascular risk profile and outcome of patients with abdominal aortic aneurysm in out-patients with atherothrombosis: data from the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for*

- Cardiovascular Surgery, North American Chapter, Bd. 48 (2008), S. 808–814.
- Bernhard, Victor M.; Mitchell, R. Scott; Matsumura, Jon S.; Brewster, David C.; Decker, Maria; Lamparello, Patrick et al.: Ruptured abdominal aortic aneurysm after endovascular repair. In: Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter, Bd. 35 (2002), S. 1155–1162.
- Blanchard, J. F.; Armenian, H. K.; Friesen, P. P.: Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. In: American journal of epidemiology, Bd. 151 (2000), S. 575–583.
- Bossard, M. J.; Tomaszek, T. A.; Thompson, S. K.; Amegadzie, B. Y.; Hanning, C. R.; Jones, C. et al.: Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. In: The Journal of biological chemistry, Bd. 271 (1996), S. 12517–12524.
- Brewster, D. C.; Geller, S. C.; Kaufman, J. A.; Cambria, R. P.; Gertler, J. P.; LaMuraglia, G. M. et al.: Initial experience with endovascular aneurysm repair: comparison of early results with outcome of conventional open repair. In: Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter, Bd. 27 (1998), S. 992-1003; discussion 1004-5.
- Brewster, David C.; Cronenwett, Jack L.; Hallett, John W.; Johnston, K. Wayne; Krupski, William C.; Matsumura, Jon S.: Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. In: Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter, Bd. 37 (2003), S. 1106–1117.
- Brömme, D.; Okamoto, K.; Wang, B. B.; Biroc, S.: Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. In: The Journal of biological chemistry, Bd. 271 (1996), S. 2126–2132.
- Carmeliet, P.: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. In: Nature medicine, Bd. 6 (2000), S. 389–395.
- Chapman, H. A.; Reilly, J. J.; Yee, R.; Grubb, A.: Identification of cystatin C, a cysteine proteinase

- inhibitor, as a major secretory product of human alveolar macrophages in vitro. In: *The American review of respiratory disease*, Bd. 141 (1990), S. 698–705.
- Chapman, H. A.; Riese, R. J.; Shi, G. P.: Emerging roles for cysteine proteases in human biology. In: *Annual review of physiology*, Bd. 59 (1997), S. 63–88.
- Chwieralski, C. E.; Welte, T.; Bühling, F.: Cathepsin-regulated apoptosis. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, Bd. 11 (2006), S. 143–149.
- Collin, J.: UK small aneurysms trial. In: *Lancet*, Bd. 353 (1999), S. 407-8; author reply 409.
- Dansky, H. M.; Barlow, C. B.; Lominska, C.; Sikes, J. L.; Kao, C.; Weinsaft, J. et al.: Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Bd. 21 (2001), S. 1662–1667.
- Dunn, A. D.; Crutchfield, H. E.; Dunn, J. T.: Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. In: *The Journal of biological chemistry*, Bd. 266 (1991), S. 20198–20204.
- Eckstein, Hans-Henning; Böckler, Dittmar; Flessenkämper, Ingo; Schmitz-Rixen, Thomas; Debus, Sebastian; Lang, Werner: Ultrasonographic screening for the detection of abdominal aortic aneurysms. In: *Deutsches Ärzteblatt international*, Bd. 106 (2009), S. 657–663.
- Eckstein, H-H; Bruckner, T.; Heider, P.; Wolf, O.; Hanke, M.; Niedermeier, H-P et al.: The relationship between volume and outcome following elective open repair of abdominal aortic aneurysms (AAA) in 131 German hospitals. In: *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, Bd. 34 (2007), S. 260–266.
- Felbor, Ute; Kessler, Benedikt; Mothes, Walther; Goebel, Hans H.; Ploegh, Hidde L.; Bronson, Roderick T.; Olsen, Bjorn R.: Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 99 (2002), S. 7883–7888.
- Finke, J.; Fritzen, R.; Ternes, P.; Lange, W.; Dölken, G.: An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR. In: *BioTechniques*, Bd. 14 (1993), S. 448–453.

- Gacko, M.; Chyczewski, L.; Chrostek, L.: Distribution, activity and concentration of cathepsin B and cystatin C in the wall of aortic aneurysm. In: Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists, Bd. 50 (1999), S. 83–86.
- Gacko, M.; Glowński, S.: Cathepsin D and cathepsin L activities in aortic aneurysm wall and parietal thrombus. In: Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC, Bd. 36 (1998), S. 449–452.
- Gacko, Marek; Guzowski, Andrzej; Woźniak, Arkadiusz; Worowska, Anna; Greczaniuk, Artur: [Concentration and activity of cathepsin D in the blood plasma and serum of patients with abdominal aortic aneurysm]. In: Przegląd lekarski, Bd. 63 (2006), S. 265–267.
- Gacko, Marek; Minarowska, Alina; Karwowska, Alicja; Minarowski, Łukasz: Cathepsin D inhibitors. In: Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society, Bd. 45 (2007), S. 291–313.
- Gacko, Marek; Ostapowicz, Roman; Chrostek, Lech; Worowska, Anna; Kordecki, Kazimierz: Activity of enzymes with different subcellular localization in the blood plasma of patients with aortic aneurysm. In: Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, Bd. 11 (2005), S. CR211-3.
- Galis, Z. S.; Sukhova, G. K.; Lark, M. W.; Libby, P.: Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. In: The Journal of clinical investigation, Bd. 94 (1994), S. 2493–2503.
- Garcia-Touchard, Arturo; Henry, Timothy D.; Sangiorgi, Giuseppe; Spagnoli, Luigi Giusto; Mauriello, Alessandro; Conover, Cheryl; Schwartz, Robert S.: Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. In: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, Bd. 25 (2005), S. 1119–1127.
- Goldsworthy, S. M.; Stockton, P. S.; Trempus, C. S.; Foley, J. F.; Maronpot, R. R.: Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. In: Molecular carcinogenesis, Bd. 25 (1999), S. 86–91.
- Gu, L.; Okada, Y.; Clinton, S. K.; Gerard, C.; Sukhova, G. K.; Libby, P.; Rollins, B. J.: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. In: Molecular cell, Bd. 2 (1998), S. 275–281.

- Guicciardi, M. E.; Deussing, J.; Miyoshi, H.; Bronk, S. F.; Svingen, P. A.; Peters, C. et al.: Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. In: *The Journal of clinical investigation*, Bd. 106 (2000), S. 1127–1137.
- Gussmann, A.; Kühn, J.; Weise, U. (2008): Leitlinien zum Bauchaortenaneurysma. Herausgegeben von Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie. http://www.gefaesschirurgie.de/fileadmin/dateien-dgg/Aneurysmen_Bauch_Becken_2009-Mrz-26.pdf, zuletzt aktualisiert am 31.08.2008.
- Hall, A.; Ekiel, I.; Mason, R. W.; Kasprzykowski, F.; Grubb, A.; Abrahamson, M.: Structural basis for different inhibitory specificities of human cystatins C and D. In: *Biochemistry*, Bd. 37 (1998), S. 4071–4079.
- Heider, P.; Wolf, O.; Reeps, C.; Hanke, M.; Zimmermann, A.; Berger, H.; Eckstein, H. H.: [Aneurysms and dissections of the thoracic and abdominal aorta]. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*, Bd. 78 (2007), S. 600, 602-6, 608-10.
- Henderson, E. L.; Geng, Y. J.; Sukhova, G. K.; Whitemore, A. D.; Knox, J.; Libby, P.: Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. In: *Circulation*, Bd. 99 (1999), S. 96–104.
- Herszényi, László; István, Gábor; Cardin, Romilda; Paoli, Massimo de; Plebani, Mario; Tulassay, Zsolt; Farinati, Fabio: Serum cathepsin B and plasma urokinase-type plasminogen activator levels in gastrointestinal tract cancers. In: *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, Bd. 17 (2008), S. 438–445.
- Holmes, D. R.; Liao, S.; Parks, W. C.; Thompson, R. W.: Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, Bd. 21 (1995), S. 761-71; discussion 771-2.
- Hoshina, Katsuyuki; Koyama, Hiroyuki; Miyata, Tetsuro; Shigematsu, Hiroshi; Takato, Tsuyoshi; Dalman, Ronald L.; Nagawa, Hirokazu: Aortic wall cell proliferation via basic fibroblast growth factor gene transfer limits progression of experimental abdominal aortic aneurysm. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and]*

- International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter, Bd. 40 (2004), S. 512–518.
- Hsing, Lianne C.; Rudensky, Alexander Y.: The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. In: Immunological reviews, Bd. 207 (2005), S. 229–241.
- Hummel, V.; Kallmann, B. A.; Wagner, S.; Füller, T.; Bayas, A.; Tonn, J. C. et al.: Production of MMPs in human cerebral endothelial cells and their role in shedding adhesion molecules. In: Journal of neuropathology and experimental neurology, Bd. 60 (2001), S. 320–327.
- Ingber, D. E.; Folkman, J.: How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? In: Cell, Bd. 58 (1989), S. 803–805.
- Inoue, Shujiro; Egashira, Kensuke; Ni, Weihua; Kitamoto, Shiro; Usui, Makoto; Otani, Kisho et al.: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. In: Circulation, Bd. 106 (2002), S. 2700–2706.
- Joyce, Johanna A.; Baruch, Amos; Chehade, Kareem; Meyer-Morse, Nicole; Giraudo, Enrico; Tsai, Fong-Ying et al.: Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. In: Cancer cell, Bd. 5 (2004), S. 443–453.
- Jutras, I.; Reudelhuber, T. L.: Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. In: FEBS letters, Bd. 443 (1999), S. 48–52.
- Kittelberger, R.; Davis, P. F.; Stehbens, W. E.: Distribution of type IV collagen, laminin, nidogen and fibronectin in the haemodynamically stressed vascular wall. In: Histology and histopathology, Bd. 5 (1990), S. 161–167.
- Kniemeyer, H. W.; Kessler, T.; Reber, P. U.; Ris, H. B.; Hakki, H.; Widmer, M. K.: Treatment of ruptured abdominal aortic aneurysm, a permanent challenge or a waste of resources? Prediction of outcome using a multi-organ-dysfunction score. In: European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery, Bd. 19 (2000), S. 190–196.
- Krettek, Alexandra; Sukhova, Galina K.; Libby, Peter: Elastogenesis in human arterial disease: a role for macrophages in disordered elastin synthesis. In: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, Bd. 23 (2003), S. 582–587.

- Kruszewski, W. J.; Rzepko, R.; Wojtacki, J.; Skokowski, J.; Kopacz, A.; Jaśkiewicz, K.; Drucis, K.: Overexpression of cathepsin B correlates with angiogenesis in colon adenocarcinoma. In: *Neoplasma*, Bd. 51 (2004), S. 38–43.
- Laheij, R. J.; Buth, J.; Harris, P. L.; Moll, F. L.; Stelter, W. J.; Verhoeven, E. L.: Need for secondary interventions after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. Intermediate-term follow-up results of a European collaborative registry (EUROSTAR). In: *The British journal of surgery*, Bd. 87 (2000), S. 1666–1673.
- Lederle, F. A.; Johnson, G. R.; Wilson, S. E.; Chute, E. P.; Littooy, F. N.; Bandyk, D. et al.: Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. In: *Annals of internal medicine*, Bd. 126 (1997), S. 441–449.
- Leeuw, F. E. de; Groot, J. C. de; Oudkerk, M.; Witteman, J. C.; Hofman, A.; van Gijn, J.; Breteler, M. M.: Aortic atherosclerosis at middle age predicts cerebral white matter lesions in the elderly. In: *Stroke; a journal of cerebral circulation*, Bd. 31 (2000), S. 425–429.
- Li, P. F.; Dietz, R.; Harsdorf, R. von: Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. In: *FEBS letters*, Bd. 404 (1997), S. 249–252.
- Li, W.; Dalen, H.; Eaton, J. W.; Yuan, X. M.: Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Bd. 21 (2001), S. 1124–1130.
- Li, W.; Yuan, X. M.; Olsson, A. G.; Brunk, U. T.: Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Bd. 18 (1998), S. 177–184.
- Liaudet-Coopman, Emmanuelle; Beaujouin, Mélanie; Derocq, Danielle; Garcia, Marcel; Glondul-Lassis, Murielle; Laurent-Matha, Valérie et al.: Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. In: *Cancer letters*, Bd. 237 (2006), S. 167–179.
- Libby, P.: Changing concepts of atherogenesis. In: *Journal of internal medicine*, Bd. 247 (2000), S. 349–358.
- Libby, P.; Schönbeck, U.: Drilling for oxygen: angiogenesis involves proteolysis of the extracellular matrix. In: *Circulation research*, Bd. 89 (2001), S. 195–197.

- Libby, Peter; Ridker, Paul M.; Maseri, Attilio: Inflammation and atherosclerosis. In: *Circulation*, Bd. 105 (2002), S. 1135–1143.
- Lindeman, Jan H. N.; Hanemaaijer, Roeland; Mulder, Adri; Dijkstra, P. D. Sander; Szuhai, Károly; Bromme, Dieter et al.: Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone. In: *The American journal of pathology*, Bd. 165 (2004), S. 593–600.
- Lindholt, J. S.; Erlandsen, E. J.; Henneberg, E. W.: Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. In: *The British journal of surgery*, Bd. 88 (2001a), S. 1472–1475.
- Lindholt, J. S.; Heegaard, N. H.; Vammen, S.; Fasting, H.; Henneberg, E. W.; Heickendorff, L.: Smoking, but not lipids, lipoprotein(a) and antibodies against oxidised LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms. In: *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, Bd. 21 (2001b), S. 51–56.
- Lindholt, J. S.; Vammen, S.; Juul, S.; Henneberg, E. W.; Fasting, H.: The validity of ultrasonographic scanning as screening method for abdominal aortic aneurysm. In: *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, Bd. 17 (1999), S. 472–475.
- Liu, Jian; Ma, Likun; Yang, Jintian; an Ren; Sun, Zimin; Yan, Gengxing et al.: Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. In: *Atherosclerosis*, Bd. 186 (2006a), S. 411–419.
- Liu, Jian; Sukhova, Galina K.; Sun, Jiu-Song; Xu, Wei-Hua; Libby, Peter; Shi, Guo-Ping: Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Bd. 24 (2004), S. 1359–1366.
- Liu, Jian; Sukhova, Galina K.; Yang, Jin-Tian; Sun, Jiusong; Ma, Likun; an Ren et al.: Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. In: *Atherosclerosis*, Bd. 184 (2006b), S. 302–311.
- Liu, Yingxian; Li, Xiangping; Peng, Daoquan; Tan, Zheng; Liu, Hongmin; Qing, Yingnan et al.: Usefulness of serum cathepsin L as an independent biomarker in patients with coronary heart disease. In: *The American journal of cardiology*, Bd. 103 (2009), S. 476–481.
- López-Candales, A.; Holmes, D. R.; Liao, S.; Scott, M. J.; Wickline, S. A.; Thompson, R. W.:

- Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. In: *The American journal of pathology*, Bd. 150 (1997), S. 993–1007.
- Lutgens, Suzanne P. M.; Cleutjens, Kitty B. J. M.; Daemen, Mat J. A. P.; Heeneman, Sylvia: Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. In: *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Bd. 21 (2007), S. 3029–3041.
- May, J.; White, G. H.; Yu, W.; Ly, C. N.; Waugh, R.; Stephen, M. S. et al.: Concurrent comparison of endoluminal versus open repair in the treatment of abdominal aortic aneurysms: analysis of 303 patients by life table method. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, Bd. 27 (1998), S. 213-20; discussion 220-1.
- McQueney, M. S.; Amegadzie, B. Y.; D'Alessio, K.; Hanning, C. R.; McLaughlin, M. M.; McNulty, D. et al.: Autocatalytic activation of human cathepsin K. In: *The Journal of biological chemistry*, Bd. 272 (1997), S. 13955–13960.
- Ménard, R.; Carmona, E.; Takebe, S.; Dufour, E.; Plouffe, C.; Mason, P.; Mort, J. S.: Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. In: *The Journal of biological chemistry*, Bd. 273 (1998), S. 4478–4484.
- Michallet, Marie-Cécile; Saltel, Frederic; Preville, Xavier; Flacher, Monique; Revillard, Jean-Pierre; Genestier, Laurent: Cathepsin-B-dependent apoptosis triggered by antithymocyte globulins: a novel mechanism of T-cell depletion. In: *Blood*, Bd. 102 (2003), S. 3719–3726.
- Michallet, Marie-Cécile; Saltel, Frédéric; Flacher, Monique; Revillard, Jean-Pierre; Genestier, Laurent: Cathepsin-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: a possible mechanism of high dose tolerance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Bd. 172 (2004), S. 5405–5414.
- Mikkelsen, T.; Yan, P. S.; Ho, K. L.; Sameni, M.; Sloane, B. F.; Rosenblum, M. L.: Immunolocalization of cathepsin B in human glioma: implications for tumor invasion and angiogenesis. In: *Journal of neurosurgery*, Bd. 83 (1995), S. 285–290.
- Moore, J. E.; Ku, D. N.; Zarins, C. K.; Glagov, S.: Pulsatile flow visualization in the abdominal aorta under differing physiologic conditions: implications for increased susceptibility to

- atherosclerosis. In: *Journal of biomechanical engineering*, Bd. 114 (1992), S. 391–397.
- Motyckova, Gabriela; Fisher, David E.: Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. In: *Current molecular medicine*, Bd. 2 (2002), S. 407–421.
- Neurath, H.; Walsh, K. A.: Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 73 (1976), S. 3825–3832.
- Newby, Andrew C.: Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Bd. 28 (2008), S. 2108–2114.
- Niedergethmann, Marco; Wostbrock, Birgit; Sturm, Jörg W.; Willeke, Frank; Post, Stefan; Hildenbrand, Ralf: Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. In: *Pancreas*, Bd. 29 (2004), S. 204–211.
- Ooyama, T.; Fukuda, K.; Oda, H.; Nakamura, H.; Hikita, Y.: Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. In: *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, Bd. 7 (1987), S. 593–598.
- Paraoan, Luminita; Gray, Donna; Hiscott, Paul; Garcia-Finana, Marta; Lane, Brian; Damato, Bertil; Grierson, Ian: Cathepsin S and its inhibitor cystatin C: imbalance in uveal melanoma. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, Bd. 14 (2009), S. 2504–2513.
- Patel, M. I.; Hardman, D. T.; Fisher, C. M.; Appleberg, M.: Current views on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. In: *Journal of the American College of Surgeons*, Bd. 181 (1995), S. 371–382.
- Patel, M. I.; Melrose, J.; Ghosh, P.; Appleberg, M.: Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, Bd. 24 (1996), S. 82–92.
- Platt, Manu O.; Ankeny, Randall F.; Jo, Hanjoong: Laminar shear stress inhibits cathepsin L activity in endothelial cells. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Bd. 26 (2006), S. 1784–1790.

- Platt, Manu O.; Ankeny, Randall F.; Shi, Guo-Ping; Weiss, Daiana; Vega, J. D.; Taylor, W. R.; Jo, Hanjoong: Expression of cathepsin K is regulated by shear stress in cultured endothelial cells and is increased in endothelium in human atherosclerosis. In: American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, Bd. 292 (2007), S. H1479-86.
- Premzl, Ales; Turk, Vito; Kos, Janko: Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. In: Journal of cellular biochemistry, Bd. 97 (2006), S. 1230–1240.
- Punturieri, A.; Filippov, S.; Allen, E.; Caras, I.; Murray, R.; Reddy, V.; Weiss, S. J.: Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. In: The Journal of experimental medicine, Bd. 192 (2000), S. 789–799.
- Quraishi, O.; Storer, A. C.: Identification of internal autoproteolytic cleavage sites within the prosegments of recombinant procathepsin B and procathepsin S. Contribution of a plausible unimolecular autoproteolytic event for the processing of zymogens belonging to the papain family. In: The Journal of biological chemistry, Bd. 276 (2001), S. 8118–8124.
- Reddy, V. Y.; Zhang, Q. Y.; Weiss, S. J.: Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Bd. 92 (1995), S. 3849–3853.
- Reed, W. W.; Hallett, J. W.; Damiano, M. A.; Ballard, D. J.: Learning from the last ultrasound. A population-based study of patients with abdominal aortic aneurysm. In: Archives of internal medicine, Bd. 157 (1997), S. 2064–2068.
- Reeps, Christian; Pelisek, Jaroslav; Seidl, Stefan; Schuster, Tibor; Zimmermann, Alexander; Kuehnl, Andreas; Eckstein, Hans-Henning: Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. In: Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology, Bd. 76 (2009), S. 243–252.
- Reich, Michael; Spindler, Klaus-Dieter; Burret, Michael; Kalbacher, Hubert; Boehm, Bernhard O.; Burster, Timo: Cathepsin A is expressed in primary human antigen-presenting cells. In: Immunology letters, Bd. 128 (2010), S. 143–147.
- Roberts, L. R.; Kurosawa, H.; Bronk, S. F.; Fesmier, P. J.; Agellon, L. B.; Leung, W. Y. et al.: Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. In:

- Gastroenterology, Bd. 113 (1997), S. 1714–1726.
- Rossi, Andrea; Deveraux, Quinn; Turk, Boris; Sali, Andrej: Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. In: Biological chemistry, Bd. 385 (2004), S. 363–372.
- Roy, Roopali; Zhang, Bo; Moses, Marsha A.: Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. In: Experimental cell research, Bd. 312 (2006), S. 608–622.
- Rubanyi, G. M.: The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. In: Journal of cardiovascular pharmacology, 22 Suppl 4 (1993), S. S1-14.
- Rupp, G. M.; Locker, J.: Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. In: BioTechniques, Bd. 6 (1988), S. 56–60.
- Schurink, G. W.; Aarts, N. J.; van Bockel, J. H.: Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis of clinical studies. In: The British journal of surgery, Bd. 86 (1999), S. 581–587.
- Shi, G. P.; Bryant, R. A.; Riese, R.; Verhelst, S.; Driessen, C.; Li, Z. et al.: Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. In: The Journal of experimental medicine, Bd. 191 (2000), S. 1177–1186.
- Shi, G. P.; Sukhova, G. K.; Grubb, A.; Ducharme, A.; Rhode, L. H.; Lee, R. T. et al.: Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. In: The Journal of clinical investigation, Bd. 104 (1999), S. 1191–1197.
- Shi, G-P; Sukhova, G. K.; Kuzuya, M.; Ye, Q.; Du, J.; Zhang, Y. et al.: Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. In: Circulation research, Bd. 92 (2003), S. 493–500.
- Shimizu, Koichi; Mitchell, Richard N.; Libby, Peter: Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. In: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, Bd. 26 (2006), S. 987–994.
- Siewert, J. Rüdiger (2006): Chirurgie. Mit integriertem Fallquiz - 40 Fälle nach neuer AO. 8., komplett überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-11773 /Dig. Serial]).
- Specht, K.; Richter, T.; Müller, U.; Walch, A.; Werner, M.; Höfler, H.: Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. In:

- The American journal of pathology, Bd. 158 (2001), S. 419–429.
- Stanta, G.; Schneider, C.: RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. In: *BioTechniques*, Bd. 11 (1991), S. 304, 306, 308.
- Sukhova, G. K.; Shi, G. P.; Simon, D. I.; Chapman, H. A.; Libby, P.: Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. In: *The Journal of clinical investigation*, Bd. 102 (1998), S. 576–583.
- Sukhova, Galina K.; Shi, Guo-Ping: Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis? In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Bd. 1085 (2006), S. 161–169.
- Sukhova, Galina K.; Zhang, Yaou; Pan, Jie-Hong; Wada, Youichiro; Yamamoto, Takashi; Naito, Makoto et al.: Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. In: *The Journal of clinical investigation*, Bd. 111 (2003), S. 897–906.
- Sullivan, Shane; Tosetto, Miriam; Kevans, David; Coss, Alan; Wang, Laimun; O'Donoghue, Diarmuid et al.: Localization of nuclear cathepsin L and its association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Bd. 125 (2009), S. 54–61.
- Thibodeau, Michael S.; Giardina, Charles; Knecht, David A.; Helble, Joseph; Hubbard, Andrea K.: Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, Bd. 80 (2004), S. 34–48.
- Thompson, M. M.; Jones, L.; Nasim, A.; Sayers, R. D.; Bell, P. R.: Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. In: *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, Bd. 11 (1996), S. 464–469.
- Turk, V.; Turk, B.; Turk, D.: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. In: *The EMBO journal*, Bd. 20 (2001), S. 4629–4633.
- Urbich, Carmen; Heeschen, Christopher; Aicher, Alexandra; Sasaki, Ken-ichiro; Bruhl, Thomas; Farhadi, Mohammad R. et al.: Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. In: *Nature medicine*, Bd. 11 (2005), S. 206–213.
- van Hinsbergh, Victor W. M.; Engelse, Marten A.; Quax, Paul H. A.: Pericellular proteases in

- angiogenesis and vasculogenesis. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Bd. 26 (2006), S. 716–728.
- Wang, Bing; Sun, Jiusong; Kitamoto, Shiro; Yang, Min; Grubb, Anders; Chapman, Harold A. et al.: Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. In: *The Journal of biological chemistry*, Bd. 281 (2006), S. 6020–6029.
- Warfel, A. H.; Zucker-Franklin, D.; Frangione, B.; Ghiso, J.: Constitutive secretion of cystatin C (gamma-trace) by monocytes and macrophages and its downregulation after stimulation. In: *The Journal of experimental medicine*, Bd. 166 (1987), S. 1912–1917.
- Wassef, M.; Baxter, B. T.; Chisholm, R. L.; Dalman, R. L.; Fillinger, M. F.; Heinecke, J. et al.: Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, Bd. 34 (2001), S. 730–738.
- Wilson, W. Richard W.; Anderton, Marcus; Schwalbe, Edward C. et al.: Matrix Metalloproteinase-8 and -9 Are Increased at the Site of Abdominal Aortic Aneurysm Rupture. In: *Circulation*, Bd. 113 (2006), S. 438-445.
- Wilson, W. R. W.; Schwalbe, E. C.; Jones, J. L.; Bell, P. R. F.; Thompson, M. M.: Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. In: *The British journal of surgery*, Bd. 92 (2005), S. 828–833.
- Wolinsky, H.; Glagov, S.: Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. In: *Circulation research*, Bd. 20 (1967), S. 409–421.
- Xu, X.; Yuan, G.; Liu, W.; Zhang, Y.; Chen, W.: Expression of cathepsin L in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. In: *Experimental oncology*, Bd. 31 (2009), S. 102–105.
- Yasuda, Yoshiyuki; Li, Zhenqiang; Greenbaum, Doron; Bogyo, Matthew; Weber, Ekkehard; Brömme, Dieter: Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. In: *The Journal of biological chemistry*, Bd. 279 (2004), S. 36761–36770.
- Zarins, C. K.; White, R. A.; Schwarten, D.; Kinney, E.; Diethrich, E. B.; Hodgson, K. J.; Fogarty, T. J.: AneuRx stent graft versus open surgical repair of abdominal aortic aneurysms: multicenter prospective clinical trial. In: *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for*

Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter, Bd. 29 (1999), S. 292-305; discussion 306-8.

Zavasnik-Bergant, T.; Turk, B.: Cysteine cathepsins in the immune response. In: Tissue antigens, Bd. 67 (2006), S. 349–355.

7 Publikationen

- **Lohoefer F, Reeps C, Lipp C, Rudelius M, Zimmermann A, Eckstein HH, Pelisek J.** (2011) Histological analysis and localisation of cathepsins in human abdominal aortic aneurysm. *Pathobiology*, eingereicht.
- **Lohoefer F, Reeps C, Lipp C, Rudelius M, Haertl M, Eckstein HH, Pelisek J.** (2011) Quantitative expression and localisation of cysteine proteases in human abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Research*, eingereicht.
- **Lipp C, Lohoefer F, Reeps C, Rudelius M, Zimmermann A, Baumann M, Heemann U, Eckstein HH, Pelisek J.** (2011) Expression of a disintegrin and metalloprotease family of proteins in human abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Research*, im Druck.

8 Danksagung

- Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Henning Eckstein für seine Unterstützung und die Möglichkeit in seiner Abteilung an einem für mich hochinteressanten Thema forschen zu dürfen. Die von ihm geschaffene äußerst angenehme Atmosphäre an seiner Klinik hat mir die Arbeit und die Integration in sein Team leicht gemacht.
- Ich danke Herrn PD Dr. med. Christian Reeps für die Idee zum Thema dieser Dissertation, für seine Unterstützung und seinen kollegialen Umgang mit mir. Durch ihn konnte ich viele Einblicke in die Gefäßchirurgie gewinnen.
- Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. rer.nat. Jaroslav Pelisek, für mich ein Wissenschaftler, wie er im Buche steht und ein großer Glücksfall in meinem Studium. Mit seinem enormen wissenschaftlichen Engagement und seiner besonders positiven Persönlichkeit, hat er von Anfang an Begeisterung für die Wissenschaft bei mir geweckt. Herr Dr. Pelisek war jederzeit für mich da, sogar in seiner Freizeit und im Urlaub. Ich habe immer besonders gerne mit ihm zusammengearbeitet und habe sowohl fachlich, wie auch menschlich sehr viel von ihm gelernt. Er wird für mich immer ein Vorbild sein.
- Mein großer Dank gebührt Frau Renate Hegenloh für die Unterstützung bei der Laborarbeit. Anfangs für mich völliges Neuland, hat sie es verstanden mich hier schnell in alle Methoden einzuarbeiten und mir danach immer wieder helfend zur Seite zu stehen. Frau Hegenloh hat die Fähigkeit mit ihrer menschlichen Wärme aus ihrem Labor einen Ort zu machen an dem ich mich immer sehr wohl gefühlt habe.
- Ich danke meiner Mitdotorandin Frau Christina Lipp für unsere nette gemeinsame Zeit im Labor, fachlich gute Diskussionen und für ihre Freundschaft.
- Ich danke meinen Eltern für ihre Liebe und vorbehaltlose Unterstützung und dass sie mir jederzeit den Rücken für mein Studium und meine Dissertation freigehalten haben.