

# **Technische Universität München**

Klinik für Gefäßchirurgie, Klinikum rechts der Isar

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

## **Die Evaluation der Funktion der Metalloproteasen ADAMs in humanen abdominalen Aortenaneurysmen**

**Christina Lipp**

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. apl. Prof. Dr. J. Mehilli

Die Dissertation wurde am 22.11.2011 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.01.2013 angenommen.

Meinen Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Das abdominale Aortenaneurysma .....	8
1.1.1	Epidemiologie	8
1.1.2	Klinik	9
1.1.3	Morphologie	9
1.1.4	Diagnostik und Screening	10
1.1.5	Behandlung	12
1.2	Atherosklerose .....	14
1.2.1	Risikofaktoren	14
1.2.2	Pathogenese	14
1.3	Entstehung von abdominalen Aortenaneurysmen .....	16
1.3.1	Histologische Veränderungen	16
1.3.2	Pathogenese	17
1.4	Metalloproteasen in abdominalen Aortenaneurysmen .....	18
1.4.1	Die Familie der ADAMs	20
1.4.2	ADAM 8	21
1.4.3	ADAM 9	21
1.4.4	ADAM 10	22
1.4.5	ADAM 12	22
1.4.6	ADAM 15	23
1.4.7	ADAM 17	24
1.4.8	Tissue Inhibitor of Metalloprotease (TIMPs)	25
1.5	Aufgabenstellung .....	27
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
2.1	Chemikalien und Geräte.....	28
2.2	Untersuchungsmaterial .....	31
2.3	Histologie und Immunhistochemie.....	31
2.3.1	Anfertigung der Schnitte	31
2.3.2	Hämalaun-Eosin-Färbung	31
2.3.3	Elastica-van-Gieson-Färbung	32
2.3.4	Vorbehandlung	32
2.3.5	LSAB-Methode	33
2.3.6	APAAP-Methode	33
2.3.7	Färbungen zur Charakterisierung der aneurysmalen Gefäßwand	34
2.3.8	Spezifische immunhistochemische Färbungen	35

2.3.9	Klassifizierung und Auswertung der histologischen Präparate	35
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.4.1	RNA-Isolierung	37
2.4.2	cDNA-Synthese	38
2.4.3	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	38
2.4.4	Elektrophorese	39
2.4.5	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	42
2.4.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse	43
2.5	Westernblot	43
2.5.1	Proteinextrahierung	43
2.5.2	Zusammensetzung der Gele	43
2.5.3	Aufbereitung der Proben	44
2.5.4	Elektrophorese	44
2.5.5	Transfer	45
2.5.6	Immunreaktion	45
2.5.7	Detektion	46
<b>3</b>	<b>Resultate</b>	<b>48</b>
3.1	Patientencharakterisierung	48
3.2	Optimierung immunhistochemischer Antikörper	48
3.3	Histologische Charakterisierung	49
3.4	Immunhistochemische Untersuchung	55
3.4.1	Analyse der Expressionsmuster	55
3.4.2	Gegenüberstellung der Expressionsmuster	64
3.5	Primeroptimierung für die qRT-PCR	68
3.6	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	71
3.6.1	Normierung der qRT-PCR-Ergebnisse auf GAPDH	72
3.6.2	Normierung der qRT-PCR-Ergebnisse auf TIMP 1 und 3	75
3.6.3	Korrelationen	76
3.7	Westernblot	78
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
4.1	Patientencharakterisierung	80
4.2	Histologische Charakterisierung	81
4.3	Interpretation der Ergebnisse	82
4.3.1	ADAM 8	82
4.3.2	ADAM 9	83
4.3.3	ADAM 10	84
4.3.4	ADAM 12	85



4.3.5	ADAM 15	85
4.3.6	ADAM 17	87
4.3.7	TIMP 1 und 3	89
4.4	Erörterung der Methoden .....	90
4.4.1	Immunhistochemische Untersuchung	90
4.4.2	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	91
4.4.3	Westernblot	91
4.5	Schlussfolgerung und Zukunftsperspektive .....	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>111</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Aa	Arteriae
AAA	Abdominales Aorten Aneurysma
ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease
ADAM-TS	A Disintegrin and Metalloproteinase with a Thrombospondin Motif
AGE	Advanced Glycosylation Endproduct
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovins Serum-Albumin
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DGG	Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie
DNA	desoxy ribonucleic acid
cDNA	complementary DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EC	endothelial cell
ECL	Elektrochemilumineszenz
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELAM	endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül
EVAR	endovascular Aneurysma Repair
EvG	Elastica-van-Gieson
ECM	extrazelluläre Matrix
F-Primer	Forward-Primer
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	heparin binding EGF
HER	human epidermal growth factor receptor
HDL	High-Density-Lipoprotein
HE	Hämalaun-Eosin
HRP	horse raddish peroxidase

HSV	Herpes simplex Virus
hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
ICAM	Inter Cellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
inf.	Inferior
KHK	koronare Herzkrankheit
kDa	kilo-Dalton
LDL	Low-Density-Lipoprotein
hoLDL	hoch oxidiertes LDL
moLDL	minimal oxidiertes LDL
LSAB	Labelled-Streptavidin-Biotin
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MMP	Matrixmetalloprotease
NK	natural killer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
NTP	Nukleosidtriphosphat
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PCAM	Platelet Cellular Adhesion Molecule
PCR	polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QRT-PCR	Real-time-PCR (quantitativ)
RA	rheumatoide Arthritis
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	ribonucleic acid
mRNA	messenger-RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer-RNA
RER	raues endoplasmatisches Reticulum
ROS	reactive oxygen species
R-Primer	Reverse-Primer

# 1 Einleitung

## 1.1 Das abdominale Aortenaneurysma

### 1.1.1 Epidemiologie

Das abdominale Aortenaneurysma (AAA) ist die häufigste Aneurysmaerkrankung der großen Gefäße. Bei einer Erweiterung der Bauchaorta auf einen Durchmesser von mehr als 3 cm wird definitionsgemäß von einem Aneurysma gesprochen. Männer sind sechsmal häufiger betroffen als Frauen (*Gussmann A. et al. 2008*). Die Prävalenz reicht von 2,6% bei der 60- bis 64-jährigen männlichen Bevölkerung, bis hin zu 9% bei der über 75-jährigen Männern. Bei einem beträchtlichen Teil der Aneurysmaträger liegen weitere atherosklerotische Gefäßveränderungen vor, e.g. KHK, pAVK und andere Aneurysmen (*Eckstein H.-H. et al. 2006*). Neben dem männlichen Geschlecht und einem Alter über 65 Jahren, gilt das Rauchen als einer der Hauptrisikofaktoren. Das Risiko, ein AAA zu entwickeln, ist für Raucher viermal höher als für Nichtraucher. Des Weiteren ist die Größenzunahme des AAAs bei Rauchern beschleunigt. Nachdem der Nikotinkonsum der weiblichen Bevölkerung sich dem der männlichen Bevölkerung angleicht, ist eine Zunahme des Anteils der AAA-Trägerinnen zu erwarten. Als weitere Risikofaktoren sind eine positive Familienanamnese, Hypercholesterinämie, Hypertonie, sowie vaskuläre Begleiterkrankungen zu nennen (*Gussmann A. et al. 2008, Sakalihan N. et al. 2005, Vardulaki K.A. 2000*). Mit progredienter Größenzunahme steigt auch die Rupturgefahr des Aneurysmas. Im Rahmen des Small Aneurysm Trials in Großbritannien (UKSAT) wurde bei Frauen mit rupturiertem AAA ein Aortendurchmesser von 5 cm festgestellt, wogegen der Wert männlicher Teilnehmer bei 6 cm lag. Verglichen mit männlichen Patienten wurde für Frauen ein dreifach erhöhtes Rupturrisiko errechnet. Neben Durchmesser und Geschlecht wurden unter anderem ein fortgesetzter Nikotinkonsum und Bluthochdruck als weitere Risikofaktoren für eine Ruptur identifiziert (*Brown L.C. et al. 1999, Powell J.T. 2000, Choke E. et al. 2005*). Eine exzentrische Morphologie deutet neben Größe und progredientem Wachstum ebenfalls auf eine gesteigerte Rupturgefahr hin (*Eckstein H.-H. et al. 2009*). Das progressive Wachstum bis zur Ruptur verläuft keinesfalls linear (*Michel J.B. et al. 2011*). Die familiäre Häufung wurde im Rahmen einer großangelegten Studie von 1986 bis 1991 in Belgien eruiert. Familien mit vererbten Bindegewebsstörungen (e.g. Ehlers-Danlos-Syndrom) wurden ausgeschlossen. Bei familiär gehäuften AAA zeigten sich ein früherer Krankheitsbeginn und eine erhöhte Rupturrate im Vergleich zu sporadischen Fällen (*Verloes A. et al. 1995*). Im Falle einer Ruptur ist von einer Sterblichkeit von 65-85% auszugehen (*Sakalihan N. et al. 2005*). Für das Jahr 2007 bezifferte die bundesdeutsche Todesfallstatistik die Todesrate durch Ruptur eines AAAs auf 1.295 Fälle. Allerdings wird bei ca. 20.000 unklaren plötzlichen Todesfällen eine deutlich höhere Dunkelziffer angenommen (*Eckstein H.-H. et al. 2009*).

### 1.1.2 Klinik

Die Einteilung des AAAs erfolgt in drei Stadien (*Gussmann A. et al. 2008*). Rund 90% der AAA werden als Zufallsbefunde, meist im Rahmen der sonographischen Untersuchung oder Palpation des Abdomens, festgestellt. Diese asymptomatischen AAA fallen unter Stadium I. Im Stadium II zeigt sich bereits eine klinische Symptomatik. Häufig treten dabei Abdominal- und Rückenschmerzen auf. Entsprechend der Lage des AAAs können neurologische Symptome, Harnstau, aortocavale und -enterale Fisteln, distale Embolien und tiefe Beinvenenthrombosen auftreten.

Bei Ruptur des AAAs spricht man von Stadium III. Dabei kann es sich sowohl um eine intrasackale als auch um eine retroperitoneale (gedeckte) Ruptur handeln. Hierbei treten plötzliche massive Schmerzen auf, welche durch den rapiden Blutverlust häufig mit Kreislaufinstabilität einhergehen. Insbesondere bei der freien Ruptur in den Peritonealraum sind diese Symptome stark ausgeprägt. Ungefähr die Hälfte der betroffenen Patienten verstirbt noch vor Erreichen der Klinik (*Eckstein H.-H. et al. 2006, Gollledge J. et al. 2006, Gussmann A. et al. 2008*).

### 1.1.3 Morphologie

Spricht man von einem AAA, geht man in der Regel von einem infrarenal gelegenen Aortenaneurysma aus (*Sakalihan N. et al. 2005*). In selteneren Fällen können jedoch die Abgänge der Nierenarterien mit einbezogen sein. Ab einer 1,5-fachen Erweiterung der infrarenalen Aorta handelt es sich um ein Aneurysma, gebräuchlicher ist jedoch die Definition des Aortendurchmessers in Zentimetern. Hierbei liegt die Grenze bei 3 cm. Wesentlich ist die Abgrenzung von Aneurysma spurium und Aneurysma dissecans. Beim AAA handelt es sich um ein Aneurysma verum, was bedeutet, dass alle drei Wandschichten (Intima, Media und Adventitia) in die Aussackung mit einbezogen sind. Bei den meisten AAA handelt es sich um fusiforme Aneurysmen, wobei die Aorta in ihrem gesamten Umfang betroffen ist. Diese sind abzugrenzen von sacciformen Aneurysmen, welche sich als nur teilweise Ausstülpung der Aortenwand darstellen. Handelt es sich um ein inflammatorisches AAA, finden sich perianeurysmale und peritoneale Fibrosierungen, sowie Verwachsungen mit umliegenden Strukturen (*Sakalihan N. et al. 2005, Johnston K.W. et al. 1991*).

## 1.1.4 Diagnostik und Screening

### 1.1.4.1 Palpation

Die Aussagekraft der palpatorischen Untersuchung ist abhängig vom Körperbau des Patienten. Gerade bei adipösen Patienten ist die Tastsicherheit stark herabgesetzt. Bei schlanken Patienten kann das AAA als pulsierender Tumor getastet werden.

### 1.1.4.2 Sonographie

In Anbetracht der schlechten Prognose im Falle einer Ruptur stellt sich die Frage nach einem effektiven und einfachen diagnostischen Mittel, welches regelmäßige Verlaufskontrollen ermöglicht. Die Sonographie wird aufgrund eindeutiger Studienergebnisse der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (DGG) als Screeningmaßnahme für Männer, insbesondere mit Risikofaktoren, ab dem 65. Lebensjahr empfohlen (Tab. 1). Gleiches gilt für Frauen mit Risikofaktoren und für Patienten aller Altersstufen mit positiver Familienanamnese. Im Rahmen einer Metaanalyse großangelegter Studien konnte eine hochsignifikante Reduktion der AAA-bedingten 5-Jahres-Mortalität festgestellt werden (*Böckler D. et al. 2009, Eckstein H.-H. et al. 2009*).

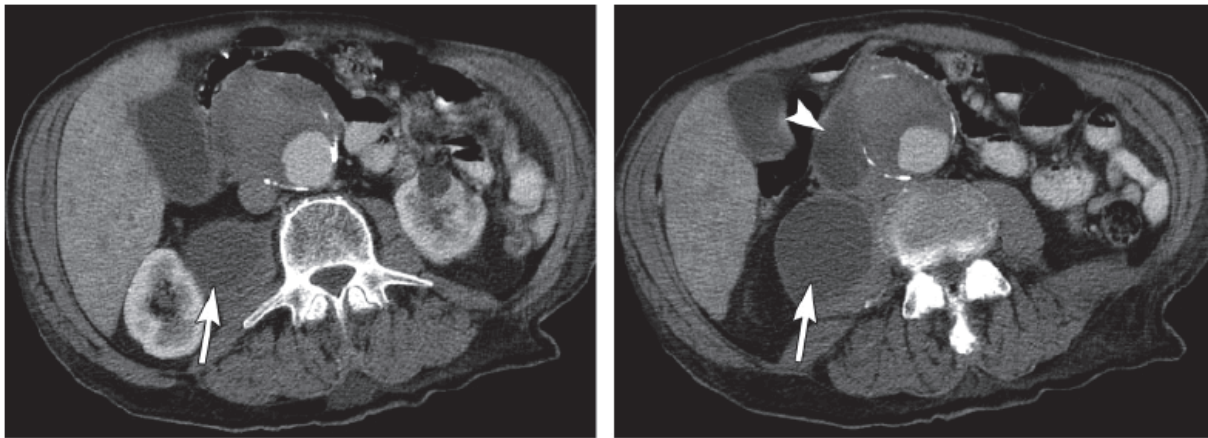
Aortendurchmesser (cm)	Empfehlung
< 3,0	keine weitere Untersuchung
3,0 - 4,0	jährliche Ultraschalluntersuchung
4,0 - 4,5	halbjährliche Ultraschalluntersuchung
> 4,5	Überweisung an den Gefäßmediziner

**Tabelle 1:** Screeningempfehlung an Hausärzte (*nach Böckler D. et al. 2009*)

Um optimale Untersuchungsergebnisse zu erzielen, wird die Sonographie der abdominalen Aorta am nüchternen Patienten durchgeführt. Der Patient wird während der Untersuchung auf dem Rücken gelagert. Im Rahmen der Untersuchung wird die abdominale Aorta mit dem Sonographiegerät im Quer-, Längs- und Paramedianschnitt beurteilt. Dabei können die räumliche Ausdehnung und Begrenzung von Aneurysmen, das durchströmte Restlumen, sowie die Dicke und Lage des intraluminalen Thrombus begutachtet werden. Weiterhin werden die Abgänge der Aa. renales, des Truncus coeliacus, der A. mesenterica superior und der Aa. iliaca dargestellt (*Eckstein H.-H. et al. 2009, Arbeitskreis vaskulärer Ultraschall 2004*). Verkalkungen stellen sich in der Sonographie als schattengebende Auflagerungen der Gefäßwand dar. Thrombotischer Inhalt zeigt sich als meist unregelmäßiges, echoarmes Material im Lumen. Im AAA findet sich häufig eine Manschette aus thrombotischem Material, der intraluminalen Thrombus. Mit Hilfe des Farbdopplers lässt sich das durchflossene Lumen eindeutig von thrombotischem Material unterscheiden (*Ugurluoglu A. 2007*).

### 1.1.4.3 Computertomographie

Die Computertomographie (CT) wird insbesondere zur weiteren Beurteilung sonographisch festgestellter AAA mit einem Durchmesser von über 4,5 cm herangezogen (*Eckstein H.-H. et al. 2009*). Vor allem bei klinischem Verdacht auf eine Ruptur ist eine sofortige kontrastmittelgestützte CT-Untersuchung zur Therapieplanung angezeigt (Abb. 1). In diesem Fall spielt die Sonographie eine sekundäre Rolle, zumal von einem nicht nüchternen Patienten auszugehen ist. Zudem können mit Hilfe der Computertomographie mögliche andere Ursachen unspezifischer abdominaler Schmerzen abgeklärt werden. Im Notfall wird in der Regel eine endovaskuläre Behandlung (EVAR) angestrebt. Je nach Beschaffenheit des AAAs (Kapitel 1.1.5) muss jedoch auf eine EVAR zugunsten einer konventionellen Operation verzichtet werden (*Eckstein H.-H. et al. 2006, Rakita D. et al. 2007*).



**Abbildung 1:** AAA-Ruptur, von kranial (li) nach kaudal (re), Psoashämatom rechts (Pfeil) und retroperitoneale Blutung (Pfeilspitze) (*aus Rakita D. et al. 2007*)

#### 1.1.4.4 Klassifikation

Die Klassifikation nach Allenberg (Abb. 2) (Altenberg J.R. et al. 1996) dient der morphologischen Einteilung des AAAs und gibt zugleich Aufschluss über mögliche Therapieoptionen. Je nach Lage der Abgänge von Nieren- und Beckengefäßen kommt eine endovaskuläre Therapie (EVAR) in Frage (siehe Kapitel 1.1.5.2).

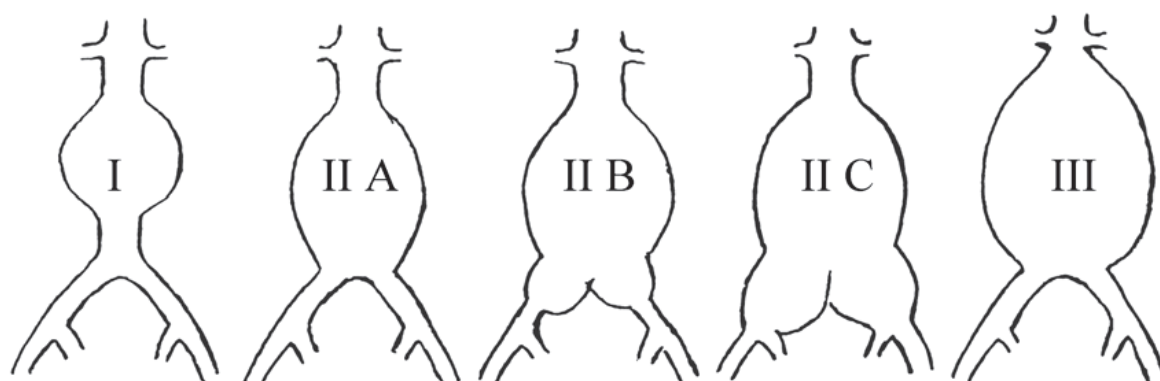


Abbildung 2: Morphologische Klassifikation (nach Allenberg J.R. et al. 1996)

#### 1.1.5 Behandlung

##### 1.1.5.1 Operative Therapie

Ab einem AAA-Durchmesser von 5,5 cm wird ein elektiver Eingriff empfohlen. Elektive Eingriffe in Zentren mit hohem Erfahrungsschatz zeichnen sich durch eine geringe Mortalitätsrate aus (Lederle F.A. 2009). In den 50er Jahren erfolgte erstmals die operative Ausschaltung eines AAAs mit Hilfe von Gefäßprothesen. Zur Darstellung des AAAs wird ein retro- oder transperitonealer Zugang genutzt. Nach Präparation, Abklemmen und Eröffnung des Aneurysmas werden zunächst kleinere rückblutende Arterien überstoichen. Die Prothese wird an nicht aneurysmatisch veränderte Gefäßpartien angeschlossen. Um die Prothese vor Infektionen zu schützen, wird der Aneurysmasack anschließend über der Prothese vernäht. Verglichen mit den neueren minimal-invasiven Verfahren zeigt die Operation zwar langfristige Erfolge, ist jedoch aufgrund des invasiven Vorgehens mit einer höheren Morbiditäts- und Mortalitätsrate verbunden. Daher wurde in den 80er Jahren die EVAR (Endovascular Aneurysm Repair) etabliert (Eliason J.L. et al. 2008).



### 1.1.5.2 Endovaskuläre Therapie

Bei der endovaskulären Therapie des AAAs, kurz genannt EVAR (Endovascular Aneurysm Repair), wird ein Stentgraft-System über die Becken- oder Oberschenkelgefäße in die Aorta eingebracht. Nach erfolgter angiographisch korrekter Positionierung wird der Stentgraft entfaltet (Abb. 3). Er schützt das Aneurysma fortan vor Druckbelastungen und verhindert durch eine innere Schienung die Ruptur. Allerdings kommt diese Technik nur in Frage, wenn zwischen Nierengefäßen und Aneurysma gesunde Aortenwand zur Verankerung des Stents vorhanden ist (Abb. 2). Aufgrund dieser Tatsache ist die Durchführung einer EVAR bei rund einem Drittel der Patienten nicht möglich (Lederle F.A. 2009). Verglichen mit dem offenen Verfahren ist die EVAR mit höheren Kosten und bislang schlechteren Langzeit-Ergebnissen verbunden (Eliason J.L. et al. 2008). Die 2010 veröffentlichte EVAR-1 Studie legt eine geringere peri- und postoperative Mortalitätsrate im Vergleich zum operativen Vorgehen nahe. Trotz der bislang schlechteren Langzeitergebnisse, kann die EVAR als wertvolles Verfahren, insbesondere in Notfallsituationen, betrachtet werden. Die EVAR unterliegt zudem einer ständigen Optimierung durch technischen Fortschritt und wachsenden Erfahrungsschatz (Nordon I.M. et al. 2011).



**Abbildung 3:** Angiographie nach Einsetzen des Stents im Rahmen einer EVAR (aus Rakita D. et al. 2007)

## 1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose stellt das wichtigste pathomorphologische Korrelat der Aneurysmaerkrankung dar. Dennoch entwickelt nur ein kleiner Teil der Atherosklerosepatienten ein AAA (*Guo D.-C. et al. 2006*). Um die Entstehung des AAAs im Speziellen betrachten zu können, folgt zunächst eine Zusammenfassung zur Pathologie der Atherosklerose.

Achtet man auf eine korrekte Nomenklatur ist die Arteriosklerose der Überbegriff aller Gefäßverhärtungen, darunter fallen insbesondere die Atherosklerose und seltenere Formen, e.g. Mönckeberg-Mediasklerose. Die Atherosklerose betrifft große und mittlere Arterien vom muskulären Typ. Die WHO definiert Atherosklerose als „eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (*Baretton G.B. et al. 2004*). In der westlichen Bevölkerung treten bereits im Kindesalter erste Manifestationen der Atherosklerose auf. Die initiale Läsion ist durch Verdickung der Intima und erhöhtem Gehalt an Makrophagen gekennzeichnet. Im Verlauf bilden sich „fatty streaks“, welche mit der frühen Einlagerung von Lipiden gleichzusetzen sind. Treten Lipide in der Progression extrazellulär auf, spricht man von Atherombildung. Kommt es zur Fibrosierung des Atheroms, können thrombämorrhagische Komplikationen auftreten, welche durch den Einriss der fibrösen Kappe bedingt sind. Im weiteren Verlauf kommt es zur Kalzifikation und Fibrosierung des Gefäßes (*Bräsen J.H. et al. 1997*).

### 1.2.1 Risikofaktoren

Neben Umweltfaktoren wie fettreicher Diät, Rauchen und Bewegungsmangel, gibt es auch eine große Anzahl erblich bedingter Risikofaktoren: erhöhte LDL-/VLDL-Spiegel, erniedrigte HDL-Spiegel, Homocysteinämie, familiäre Belastung, Diabetes mellitus, Adipositas, erhöhte Spiegel von Gerinnungsfaktoren, Depression, männliches Geschlecht und metabolisches Syndrom. Bei gemeinsamem Auftreten mehrerer Risikofaktoren, kommt es zur Potenzierung des Risikos (*Bräsen J.H. et al. 1997, Lysis A.J. 2000*).

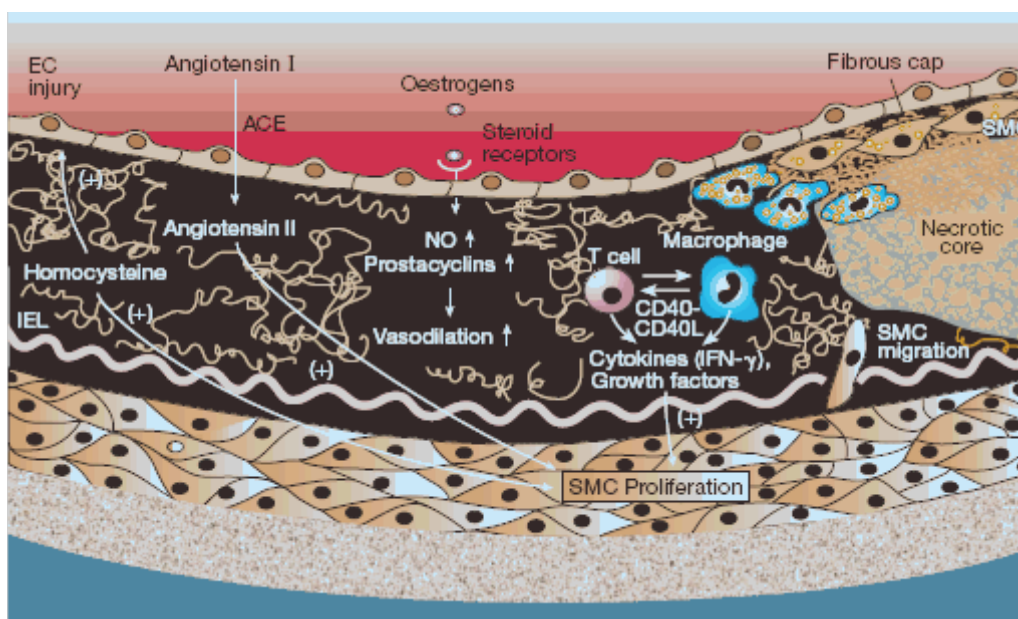
### 1.2.2 Pathogenese

Lange Zeit war nur der Zusammenhang zwischen Atherosklerose und Dyslipoproteinämie bekannt. Erst in den 70er Jahren gerieten Wachstumsfaktoren und die Bedeutung der glatten Muskelzellen, im Rahmen der Untersuchung von Re-Stenosen nach endovaskulären

Interventionen, in den Fokus der Wissenschaft. Ein Jahrzehnt später wiederum konnten Zusammenhänge zwischen endothelialer Dysfunktion, Inflammation und Atherosklerose beschrieben werden (*Libby P. 2002*). Initial kommt es zu einer Schädigung des Endothels. Verschiedene Noxen (e.g. Rauchen, Hyperlipidämie, Hypertonus) können die Endothelpermeabilität intakter Arterien erhöhen. Insbesondere an Abzweigungen und Abbiegungen des Gefäßsystems wirken hohe Scherkräfte, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Läsionen führt. Durch das geschädigte Endothel können nun ApoB-tragende Lipoproteine, wie LDL und VLDL, in die Intima eintreten. Dort kommt es zur Oxidation (minimal oxidiertes LDL) und Einlagerung des LDL. ApoA-tragendes HDL hingegen wirkt protektiv, indem es die Oxidation des LDL verhindert und den Cholesterinanteil des LDL in das Blut zurückführt (*Koba S. et al. 2011, Lusis A.J. 2000*).

Das eingelagerte minimal oxidierte LDL (moLDL) greift nun in verschiedene Regelkreise ein. Es führt zur Hemmung des NO-Synthetase (NOS), wodurch ein wichtiger Mediator der Vasodilatation und Inhibitor der Expression endothelialer Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (ELAMs) entfällt. VCAM-1 (vascular adhesion molecule) ist eine bekannter Vertreter der ELAMs. Zusätzlich stimuliert moLDL Endothelzellen gezielt zur Produktion von Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren. Diese Mechanismen führen zur Rekrutierung von Monozyten und deren Ausdifferenzierung zu Makrophagen (Abb. 4) (*Libby P. 2002, Lusis A.J. 2000*). Im weiteren Verlauf wird moLDL zu hoLDL (hoch oxidiertes LDL) oxidiert und von Makrophagen aufgenommen, wodurch Schaumzellen entstehen. Die Bildung und Aufnahme von hoLDL wird unter anderem von TNF- $\alpha$  reguliert (*Koba S. et al. 2011, Lusis A.J. 2000*). Kommt es zur Apoptose der Schaumzellen, werden Lipide freigesetzt, welche eine wachsende extrazelluläre Matrix (ECM) bilden (*Lusis A.J. 2000*).

Makrophagen der atherosklerotischen Intima stimulieren glatte Muskelzellen (SMCs). Diese vermehren sich, wandern in die Intima ein und bilden eine Kapsel um den wachsenden Lipidplaque (Abb. 4), das Atherom. Von Makrophagen und T-Zellen sezernierte Zytokine regen SMCs zur Produktion extrazellulärer Matrix (ECM) an, dabei bildet sich eine fibröse Kappe über dem atherosklerotischen Plaque (*Lusis A.J. 2000*).



**Abbildung 4:** Plaquebildung (aus Lulis A.J., 2000)

Im Rahmen chronisch inflammatorischer Prozesse wurde unter anderem auf Endothelzellen, Makrophagen und SMCs der CD40-Rezeptor nachgewiesen, welcher der Subfamilie der TNF-Rezeptoren angehört. CD40-vermittelten Prozessen wird eine große Bedeutung im Rahmen der fortschreitenden Atherosklerose zugeschrieben: Apoptose von SMCs, Degradierung der ECM, und somit der fibrösen Kappe, sowie Ausschüttung von prokoagulatorischen Mediatoren führen zu zunehmender Instabilität und thrombhämorrhagischen Komplikationen (Kooten van C. 2000, Schönbeck U. 2000).

### 1.3 Entstehung von abdominalen Aortenaneurysmen

#### 1.3.1 Histologische Veränderungen

Abdominale Aortenaneurysmen zeichnen sich histologisch insbesondere durch den Verlust von SMCs und elastischen Fasern, sowie einer Erhöhung des Kollagenanteils aus. Es kommt somit zu einer Ausdünnung der Media und dadurch zu einer strukturellen Schwächung der Aortenwand. In apoptotischen SMCs wird Kalzium eingelagert, was zu einer Gefäßverkalkung führt. Während sich die inflammatorischen Prozesse im Rahmen der Atherosklerose weitestgehend auf die Intima beschränken, ist beim AAA die gesamte Gefäßwand betroffen. Media und insbesondere Adventitia weisen Infiltrate auf (Guo D.-C. et al. 2006, Michel J.B. et al. 2011). Die entzündlichen Zellen wandern vor allem durch die Vasa vasorum in das Gewebe ein (Guo D.-C. et al. 2006). Weiterhin liegt meist ein intraluminaler Thrombus anstelle der physiologischen Intima vor (Michel J.B. et al. 2011). Entsprechende histologische Abbildungen sind Kapitel 3 zu entnehmen.

### 1.3.2 Pathogenese

In Abgrenzung zur Atherosklerose, sind bei der Aortenaneurysmaerkrankung alle Wandschichten von entzündlichen Veränderungen betroffen. Dabei infiltrieren entzündliche Zellen die Aortenwand sowohl durch die Intima als auch durch die Vasa vasorum der Adventitia (Guo D.-C. et al. 2006, Herron G.S. et al. 1991). Th2-Zellen und die zugehörigen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 konnten in AAA in erhöhter Anzahl, verglichen mit gesunden und rein atherosklerotischen Aorten, nachgewiesen werden (Schönbeck U. et al. 2002). Während die inflammatorischen Prozesse in stenosierenden atherosklerotischen Prozessen Th1-betont sind, gibt es Hinweise auf eine Verschiebung der Immunantwort von Th1- zu Th2-Zytokinen im Rahmen der Aneurysmaerkrankung (Shimizu K. et al. 2006).

Dennoch stellt sich die Frage, ob das AAA auf dem Boden der Atherosklerose entsteht, oder ob es auch unabhängig begünstigende Faktoren gibt.

Im Rahmen einer Autopsiestudie konnte in den 90er Jahren gezeigt werden, dass der überwiegende Anteil der AAA mit schwerer allgemeiner Atherosklerose vergesellschaftet ist. Allerdings bleibt im Rahmen dieses Studienkonzeptes die Frage offen, ob generalisierte Atherosklerose vor der AAA-Entstehung bereits nachweisbar ist, oder sich erst später ausbildet. Verglichen mit Manifestationen an den Koronargefäßen, können atherosklerotische Veränderungen der abdominalen Aorta bereits zehn bis zwanzig Jahre früher nachgewiesen werden. Dies wirft wiederum die Frage auf, ob atherosklerotische Veränderungen je nach Lokalisation mit unterschiedlichen Risikoprofilen assoziiert sind (Reed D. 1992). In der Tat entwickeln nur 9-16% aller Atherosklerosepatienten ein AAA. Es ist daher anzunehmen, dass das alleinige Vorliegen von Atherosklerose nicht zur AAA-Entstehung führt. Allerdings können pro-inflammatorische Enzyme aus atherosklerotischen Läsionen durchaus zur AAA-Entstehung beitragen. Erhöhte CRP-Spiegel wurden im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie nachgewiesen. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Größe des AAAs und dem CRP-Spiegel (Shimizu K. et al. 2006, Vainas T. et al. 2003). Ein geringer Anteil der abdominalen und thorakalen Aneurysmen ist auf Bindegewbserkrankungen zurückzuführen. Dazu zählen Typ-III-Kollagen-Mutationen, Marfan-Syndrom und Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV (Sakalihan N. et al. 2005, Shimizu K. et al. 2006). Generell ist eine deutliche familiäre Häufung zu verzeichnen. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass auch Risikofaktoren, beispielsweise das Zigarettenrauchen als ausschlaggebender Risikofaktor, in den betroffenen Familien gehäuft vorhanden sein können. Außerdem liegen Hinweise auf ein autosomal-rezessives Vererbungsschema vor (Kuivaniemi H. 2003). Im Rahmen genetischer Untersuchungen wurden einige, möglicherweise für die AAA-Bildung verantwortliche, Gene identifiziert. Darunter kodierende Gene für IL-15 und Endothelin-Rezeptor A (Golledge J. 2006, Sakalihan N. et al. 2005).



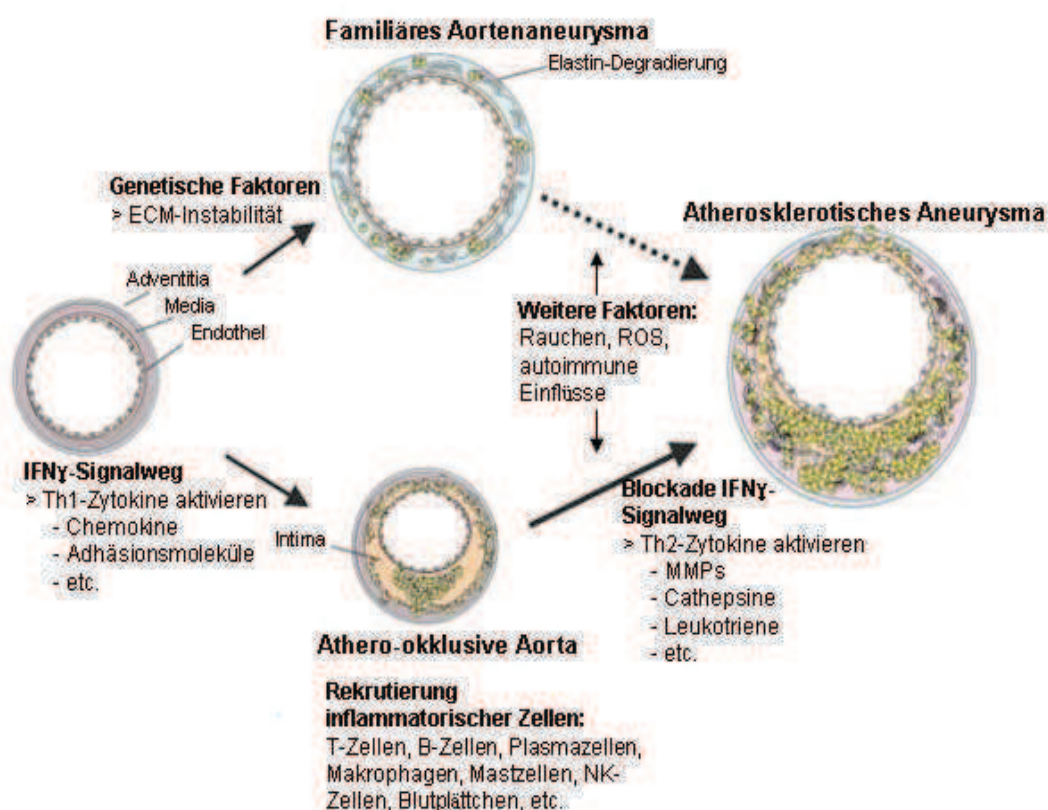


Abbildung 5: nach Shimizu K. et al. 2006

Shimizu et al. unterscheiden die Genese des AAA im Rahmen erblicher Bindegewebsschwäche von einer Genese ausgehend von Atherosklerose (Abb. 5). Während im Rahmen der frühen Atherogenese Th1-Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , die initiale Rekrutierung von Makrophagen steuern, werden Th1-Zytokine im Rahmen der Aneurysmabildung durch nicht vollständig identifizierte Faktoren unterdrückt (Shimizu K. et al. 2006).

#### 1.4 Metalloproteasen in abdominalen Aortenaneurysmen

Im Vergleich zu atherosklerotischen Aorten, wurden in abdominalen Aortenaneurysmen Proteasen in erhöhter Konzentration nachgewiesen (Shimizu K. et al. 2006). Bekannteste Vertreter aller bislang untersuchten Proteasen sind die Matrixmetalloproteasen (MMPs), insbesondere MMP-9 (Sukhova G.K. et al. 2006). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu den ADAMs, sollen im Folgenden zunächst vor die MMPs näher betrachtet werden und dabei aktuelle Aspekte der Aneurysmaforschung hervorgehoben werden.

MMPs und ADAMs gehören der Familie der Metalloproteasen an. Konkreter handelt es sich um Zink-Proteasen (auch Metzinkine genannt), welche wiederum in verschiedene Untergruppen unterteilt werden. Die MMPs gehören den Matrixinen an. Die Untergruppe der Adamalysine beinhaltet neben den ADAMs auch ADAM-TS (A Disintegrin and

Metalloprotease with a Thrombospondin Motif) und SVMPs (Snake Venom Metalloprotease) (Seals D.F. et al. 2003, Stocker W. et al. 1995).

Ein wesentliches strukturelles und funktionelles Merkmal der MMPs ist die Metalloproteasedomäne. MMPs können diverse Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) degradieren, darunter Elastin, Fibronectin, Laminin und sämtliche Kollagen-Typen, jedoch mit unterschiedlichen Affinitäten. Wichtigstes Substrat von MMP-2 und -9, welche insbesondere mit dem AAA assoziiert sind, ist Gelatin, welches durch Kollagenverdau entsteht. Bei AAA-Patienten konnten erhöhte Serumspiegel von MMPs nachgewiesen werden. Auch in der Aortenwand zeigte sich eine erhöhte MMP-mRNA-Expression. Insbesondere bei rupturgefährdeten Aneurysmen kommt es zu einer gesteigerten Expression von MMPs (Raffetto J.D. et al. 2008). Die bislang stärkste Expression in der Aneurysmawand weist MMP-9 auf (Tagaki H. et al. 2009). MMP-9 wird von Makrophagen sezerniert (Sakalihan N. et al. 1996). Neuere Studien implizieren einen Einfluss von MMP-2 und vor allem MMP-9 auf die Kontraktilität glatter Muskelzellen (SMC) innerhalb der Aortenwand. Intakte SMCs scheinen der fortschreitenden Dilatation der Gefäßwand entgegenzuwirken. MMPs werden durch TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloprotease) inhibiert. Ein Ungleichgewicht zugunsten der MMPs kann die Anfälligkeit für vaskuläre Erkrankungen, darunter auch die Entstehung von AAAs, begünstigen (Raffetto J.D. et al. 2008). Es wurden in den letzten Jahren synthetische MMP-Inhibitoren entwickelt, e.g. Batimastat. Weiterhin gibt es Hinweise, dass das Antibiotikum Doxycyclin als bekannter MMP-Inhibitor den Umfangszuwachs von AAAs reduzieren kann (Galis Z.S. et al. 1994, Thompson R.W. et al. 1999).

Im Rahmen histologischer Studien wurde die Expression von MMP-1, -2, -3, und -9 in abdominalen Aortenaneurysmen untersucht. Dabei konnten alle genannten MMPs in Endothelzellen (EC) und glatten Muskelzellen (SMC) nachgewiesen werden. Neben MMP-1, -2, -3, und -9, wurden weiterhin MMP -7, -8 und -12 in unreifen Neogefäßen detektiert. Abgesehen von MMP-2, wurden alle genannten MMPs in Infiltraten nachgewiesen. Der Gehalt von Infiltraten und Neogefäßen geht mit einer steigenden Invasion von MMPs einher. Weiterhin zeigt sich eine negative Korrelation zwischen Infiltrat- und Neogefäßgehalt und dem Gehalt an stabilisierenden Komponenten wie Elastin und Kollagen (Guo D.C. et al. 2006, Reeps C. et al. 2009).

### 1.4.1 Die Familie der ADAMs

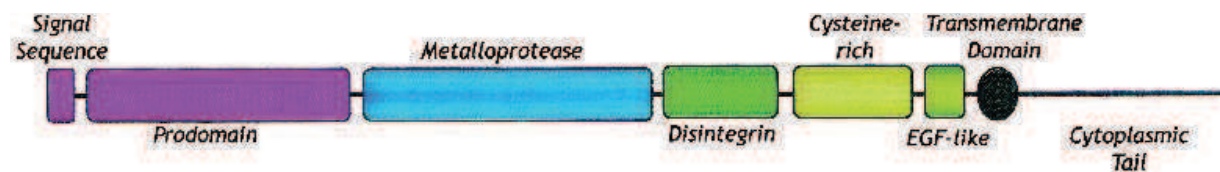


Abbildung 6: aus Seals D.F. et al. 2003

Zunächst soll an dieser Stelle im Allgemeinen auf Struktur und Eigenschaften der ADAMs eingegangen werden. In den nachfolgenden Kapiteln sollen ADAM 8, 9, 10, 12, 15 und 17 einzeln charakterisiert werden. Bislang sind 21 ADAMs im menschlichen Organismus bekannt, wovon 13 proteolytische Aktivitäten zugeschrieben werden (Shiomi T. et al. 2010). Man geht davon aus, dass ADAMs im rauen endoplasmatischen Reticulum (RER) synthetisiert werden und sich bis zur Abspaltung der Prodomäne in einem inaktiven Zustand befinden. Die Prodomäne (Abb. 6) fungiert zugleich als Chaperone (Blobel C.P. 2005). Mit Ausnahme von ADAM 8, werden alle in dieser Studie untersuchten ADAMs im Golgi-Apparat mit Hilfe von Proprotein-Convertasen durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. ADAM 8 verfügt über einen autoproteolytischen Mechanismus und versetzt sich somit selbst in seine aktive Form (Klein T. et al. 2011). Am besten untersucht ist bislang die proteolytische Funktion der ADAMs, welche durch die Metalloproteasedomäne (Abb. 6) verkörpert wird. Für die in vorliegender Studie eingeschlossenen ADAMs konnte eindeutig deren proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Die Metalloproteasedomäne der ADAMs zeigt enge strukturelle Verwandtschaft zu derer der MMPs (Blobel C.P. 2005, Klein T. et al. 2011, Seals D.F. et al. 2003). Die Disintegrindomäne (Abb. 6) der ADAMs gleicht strukturell derer der SVMPs. Allerdings ist bei allen ADAMs, mit Ausnahme von ADAM 15, die essentielle RGD-Sequenz (Arginin – Glycin – Asparagin) durch eine weitere Domäne überlagert und somit inaktiv (Blobel C.P. 2005, Klein T. et al. 2011). Eine weitere wesentliche Funktion der ADAMs ist das Shedding von Protein-Ectodomänen, was einer Freisetzung und somit Aktivierung membrangebundener Signalstoffe entspricht. Unter den durch ADAMs freigesetzten Signalstoffen sind einige wesentliche Liganden des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und Zytokine. Im Rahmen der genauen Charakterisierung der einzelnen ADAMs wird auf diese Zusammenhänge konkret eingegangen (Blobel C.P. 2005, Shiomi T. et al. 2010). Die Funktion der Cystein-reichen Domäne (Abb. 6) ist bislang wenig erforscht. Einigen Vertretern der ADAMs, darunter ADAM 12, wird die Fähigkeit zugeschrieben, mit Hilfe dieser Domäne ECM-Bestandteile (e.g. Proteoglykane) zu binden und dadurch möglicherweise Zellfusionen, Interaktionen und Adhäsionen zu vermitteln (Klein T. et al. 2011, Seals D.F. et al. 2003). Des Weiteren verfügen ADAMs über eine Domäne, welche strukturelle Ähnlichkeit mit Epidermal Growth Factor (EGF) aufweist und somit kurz EGF-like



Domain (Abb. 6) genannt wird. Jedoch ist die Funktionsweise dieser Domäne bislang noch weitestgehend ungeklärt (*Klein T. et al. 2011, Shiomi T. et al. 2010*). Der zytoplasmatische Schwanz (Abb. 6) ist in seiner Länge stark variabel und dient vermutlich der Interaktion mit Bestandteilen des Zytoskelettes und der Regulation der Metalloprotease-Aktivität (*Klein T. et al. 2011, Seals D.F. et al. 2003*).

### 1.4.2 ADAM 8

Ursprünglich wurde ADAM 8 als Oberflächenantigen CD156 auf menschlichen Makrophagen und Granulozyten isoliert (*Yoshiama K. et al. 1997*). Es handelt sich um ein 90kDa großes Enzym. Nach Autoprozessierung mit Verlust der Metalloproteasedomäne liegt es als kleineres (60kDa) Enzym vor (*Klein T. et al. 2011*). ADAM 8 wurde bisher in diversen Malignomen, darunter Nierenzellkarzinom und Lungenkrebs nachgewiesen (*Mochizuki S. et al. 2007*). Zudem konnte belegt werden, dass eine Transfektion von ADAM 8 die Invasivität von Tumoren steigert (*Ishikava N. et al. 2006*). Neuere Studien postulieren die Induktion von ADAM 8 durch Allergene und Th2-Zytokine im Rahmen des Asthmas. ADAM-8-mRNA ist bei Asthma-Patienten verstärkt nachweisbar und geht mit dem Schweregrad der Erkrankung einher. Möglicherweise erfüllt ADAM 8 eine tragende Funktion bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen (*Foley S. et al. 2007, Klein T. et al. 2011*). Des Weiteren gibt es Hinweise auf ein Mitwirken bei der Osteoklasten-Differenzierung und der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) (*Klein T. et al. 2011*). Insgesamt gehört ADAM 8 zu den bislang nur spärlich erforschten Mitgliedern der Familie der ADAMs.

### 1.4.3 ADAM 9

Durch alternatives Spleißen werden zwei verschiedene Formen von ADAM 9 exprimiert: eine sekretorisch aktive und eine membrangebundene Form (*Hotoda N. et al. 2002*). Das reife Enzym ist 84 kDa groß. Die kleinere sekretorische Form (47 kDa) verfügt weiterhin über die Metalloproteasedomäne (*Klein T. et al. 2011*). ADAM 9 besitzt, zumindest in vitro, die Fähigkeit, TNF- $\alpha$  zu aktivieren. Weiterhin kann ADAM 9 HB-EGF aktivieren. ADAM 9 ist zudem eine  $\alpha$ -Sekretase, welche der Entstehung von schädlichem  $\beta$ -Amyloid, zugunsten des neuroprotektiven  $\alpha$ -Amyloids, im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung entgegenwirkt (*Seals D.F. et al. 2003*). Ferner wurde auch ADAM 9 in zahlreichen Malignomen nachgewiesen, wobei auch hier, in Anwesenheit von ADAM 9, eine verstärkte Invasivität auffiel. Bei Studien an Lebermetastasen wurden hohe Konzentrationen von ADAM 9 am Invasionsrand festgestellt. Weiterhin weisen Prostatakzinome eine erhöhte Expression von ADAM 9 auf (*Klein T. et al. 2011, Mochizuki S. et al. 2007*).

#### 1.4.4 ADAM 10

Erstmals konnte ADAM 10 im Jahre 1989 aus bovinen Myelinscheiden isoliert werden (*Chantry A. et al. 1989*). Es liegt als 56-58 kDa großes reifes Enzym vor (*Klein T. et al. 2011*). In der Nomenklatur wird parallel der Name Kuzbanian geführt, welcher dem Drosophila-Homolog der Metalloprotease entspricht. An der Fruchtfliege *Drosophila* wurde die Funktion von ADAM 10 bei der Hirnentwicklung erforscht. ADAM 10 wird eine tragende Rolle bei der lateralen Hemmung im Rahmen der Reifung des Nervensystems zugeschrieben (*Klein T. et al. 2011, Rooke J. et al. 1996*). ADAM-10-defiziente Mäuseembryos sterben am 10. Entwicklungstag und weisen dabei unter anderem schwere kardiovaskuläre Missbildungen auf. Ebenso wie von ADAM 9, liegen auch von ADAM 10 eine sekretorische und eine membrangebundene Form vor (*Hotoda N. et al. 2002*). Neben ADAM 9 ist auch ADAM 10 eine  $\alpha$ -Sekretase (*Seals D.F. et al. 2003*). Im Rahmen der Degeneration von extrazellulärer Matrix (ECM) besitzt ADAM 10 die Fähigkeit, Kollagen Typ IV zu spalten, welches unter anderem in der vaskulären Basallamina vorliegt und ihr die entscheidende Struktur gibt (*Millichip B.J. et al. 1998*). ADAM 10 wurde bisher unter anderem in Phäochromozytomen, Neuroblastomen, Magen-, Ovarial-, und Uteruskarzinomen und diversen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen. Wiederum wird in Anwesenheit von ADAM 10 eine Zunahme der Invasivität beschrieben, was sich unter anderem durch die Zerstörung von Kollagen Typ IV erklären lässt (*Mochizuki S. et al. 2007, Seals D.F. et al. 2003*). Zudem wurde eine erhöhte Expression von ADAM 10 in arthritisch verändertem Gelenkknorpel beschrieben, weshalb eine Beteiligung an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA) angenommen wird (*Chubinskaya S. et al. 2001*). Weiterhin besitzt ADAM 10 die Fähigkeit, TNF- $\alpha$  und EGF zu prozessieren (*Arduise C. et al. 2008*). Außerdem gibt es Hinweise, dass auch ADAM 10 an der Aktivierung von HB-EGF (heparin-binding epidermal-growth-factor) beteiligt ist. Zudem wurde ADAM 10 als eine der ausschlaggebenden Sheddasen von EGF und Betacellulin identifiziert, zwei weiteren EGFR-Liganden (*Sahin U. et al. 2004*).

#### 1.4.5 ADAM 12

Von ADAM 12 liegen ebenfalls zwei Spleißformen vor, eine sekretorische S-Form und eine membrangebundene L-Form (*Klein T. et al. 2011, Seals D. F. et al. 2003*). Die L-Form von ADAM 12, auch Meltrin- $\alpha$  genannt, konnte in menschlichen Skelett-, Herz- und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (*Gilpin et al., 1998*). Es gibt Hinweise, dass ADAM 12 an der Spaltung und somit Inaktivierung von IGFBP-3 und -5 (insulin-like growth factor binding protein) beteiligt ist. Somit erhöht ADAM 12 den Anteil des zirkulierenden IGF 1 (insulin-like growth factor) und 2, welchen positive Einflussnahme auf Wachstum und

Regeneration von Skelettmuskel zugeschrieben wird (*Kronqvist P. et al. 2002*). Im Blut von Schwangeren zeigten sich erhöhte ADAM-12-Konzentrationen, was mit einer Zunahme des IGF-Spiegels während der Gravidität korreliert. Bei Schwangeren mit Trisomie-18- oder -21-Feten bleibt ein Anstieg von ADAM 12 im Serum aus (*Klein T. et al. 2011, Loechel F. et al. 2001*). Eine Abnahme des IGF-Spiegels im Serum tritt bei Diabetes mellitus auf und wurde auch bei rheumatoider Arthritis festgestellt. Zudem ist ADAM 12 am Shedding von HB-EGF beteiligt. HB-EGF steuert neben physiologischen Prozessen, wie der Wundheilung, auch pathologische Vorgänge, wie Tumorwachstum, Hyperplasie glatter Muskelzellen und Atherosklerose (*Raab G. et al. 1997*). Unter Überexpression von ADAM 12 kommt es zu einer verbesserten Regeneration von traumatisiertem Muskelgewebe (*Klein T. et al. 2011*). Im Versuch an Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition von ADAM 12 das Fortschreiten einer kardialen Hypertrophie, welche eine Herzinsuffizienz bedingen kann, unterbindet (*Asakura M. et al. 2002*). Neben ADAM 1 und 3, werden ADAM 12 wichtige Funktionen bei der Fusion von Zellen zugeschrieben (*Seals D.F. et al. 2003*). Diese Funktion wird von der zysteinreichen Domäne gesteuert. Durch Interaktion mit Heparan-Sulfat-Proteoglykanen steuert ADAM 12 sowohl die Adhäsion von Fibro- und Myoblasten, als auch von diversen Tumorzelllinien (*Iba K. et al. 2000*). Erhöhte Konzentrationen von ADAM 12 wurden in Mamma- und Kolon-Karzinomen, sowie in Glioblastomen festgestellt (*Seals D.F. et al. 2003*). ADAM 12 spaltet eine Vielzahl von Bestandteilen der ECM, darunter Kollagen Typ IV, Gelatin und Fibronectin. Diese Tatsache kann bei der Invasion und Metastasierung von malignen Tumoren von Bedeutung sein (*Klein T. et al. 2011, Mochizuki S. et al. 2007*).

#### **1.4.6 ADAM 15**

ADAM 15, auch Metagirdin genannt, liegt als 85 kDa großes reifes Enzym vor und wird in zahlreichen menschlichen Geweben, unter anderem Herz, Gehirn und Lunge exprimiert (*Klein T. et al. 2011, Krätschmar J. et al. 1996*). ADAM 15 wurde ebenfalls in glatten Muskelzellen (SMC) der menschlichen Aorta nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch, dass ADAM 15 nicht in SMCs gesunder Gefäße exprimiert wird. Vielmehr kommt es im Rahmen der Atherogenese zu einer Überexpression von ADAM 15. Möglicherweise beeinflusst ADAM 15 die Bildung einer Neo-Intima (*Herren et al. 1997, Klein T. et al. 2011*). In Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur (HUVECs) wurde ADAM 15 ebenfalls detektiert, allerdings ohne ADAM 15 an dieser Stelle eine konkrete Funktion zuordnen zu können. In atherosklerotischen Gefäßen von Primaten wurde ADAM 15 in makrophagenreichen Regionen und Intimazellen immunhistochemisch nachgewiesen (*Herren B. et al. 1997*). Aktuelle Studien konnten belegen, dass in Anwesenheit von ADAM 15 Endothelien eine höhere Permeabilität für Neutrophile aufweisen (*Sun C. et al. 2010*). Neben ADAM 10 und 12, besitzt auch ADAM 15 die Fähigkeit zur ECM-Degradierung durch Spaltung von Kollagen

IV und Gelatin (Klein T. et al. 2011, Martin J. et al. 2002). ADAM 15 beinhaltet, als bisher einziges Mitglied der Familie der ADAMs, die RGD-Sequenz (Arginin – Glycin – Asparagin), welche üblicherweise nur bei den verwandten Snake-Venom-Disintegrins (SVMPs) vorliegt. Im Zusammenhang mit ADAM 15 wurden pathologische Neovaskularisationsprozesse beschrieben. Untermauert wurde diese Beobachtung durch die Tatsache, dass bei ADAM-15-defizienten Mäusen das Wachstum von implantierten Tumorzellen stark verlangsamt schien (Blobel C.P. 2005, Horiuchi K. et al. 2003). Neben ADAM 10, wurden auch erhöhte Konzentrationen von ADAM 15 im Gelenkknorpel, von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten, gefunden (Chubinskaya S. et al. 2001). Ferner wurde ADAM 15 in Lungen-, Mamma-, Ovarial-, Prostata- und Magen-Karzinomen nachgewiesen. Jedoch mit bislang inkonsistenten Ergebnissen im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge zwischen Expression von ADAM 15 und dem Stadium oder der Differenzierung dieser Tumoren (Mochizuki S. et al. 2007).

#### **1.4.7 ADAM 17**

Eines der meist beschriebenen Mitglieder der Familie der ADAMs ist zweifelsohne ADAM 17, besser bekannt unter dem Namen TACE (tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme). ADAM 17 ist, neben ADAM 10, in der Lage membrangebundenen TNF- $\alpha$  durch Shedding freizusetzen. Bei TNF- $\alpha$  handelt es sich um ein ausschlaggebendes pro-inflammatorisches Enzym. Es verwundert daher nicht, dass im Rahmen inflammatorischer Prozesse eine Zunahme der Expression von ADAM 17 zu beobachten ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass ADAM 17 auch für die Prozessierung der TNF- $\alpha$ -Rezeptoren p55 und p75 verantwortlich ist. Bei rheumatoider Arthritis konnte ADAM 17 ebenfalls in erhöhten Konzentrationen detektiert werden (Reddy P. et al. 2000, Seals D.F. et al. 2003). Im Rahmen von Studien an ADAM-17-knock-out Fibroblasten aus Mäuseembryonen konnte zudem belegt werden, dass ADAM 17 unter anderem für die Aktivierung von TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), Amphiregulin, HB-EGF und Epiregulin verantwortlich ist. Dabei handelt es sich um EGFR-Liganden, welche als membrangebundene Vorstufen entstehen und durch Abspalten der Ektodomäne in ihrer aktiven Form freigesetzt werden (Sahin U. et al. 2004). Es gibt Anhaltspunkte, dass diese und weitere EGFR-Liganden an der Atherogenese beteiligt sind, zumal auf SMCs atherosklerotischer Gefäßareale EGFR nachgewiesen wurde (Dreux A.C. et al. 2006). Des Weiteren ist ADAM 17 für das Shedding von IL-1-Rezeptor verantwortlich, da in ADAM-17-defizienten Fibroblasten kein Shedding dieses Rezeptors stattfand (Reddy P. et al. 2000). Zudem ist ADAM 17 in den Vorgang des Sheddings von IL-6-Rezeptor und HER4 involviert. HER4 hat als Rezeptor-Tyrosinkinase strukturelle Ähnlichkeit mit EGFR und wird ebenfalls von EGFR-Liganden wie HB-EGF, Betacellulin und Epiregulin stimuliert. HER4 ist maßgeblich an der Entwicklung des Nerven-

und Kreislaufsystems beteiligt, konnte jedoch auch in Tumoren der Mamma nachgewiesen werden (Seals D.F. et al. 2003). Außerdem wurde eine erhöhte Expression von ADAM 17 in Ovarial-, Nieren-, Colon- und Prostata-Karzinomen detektiert (Mochizuki S. et al. 2007). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass ADAM 17 in das Shedding von CSF-1-Rezeptor (colony-stimulating-1-factor-receptor) involviert ist, welcher Proliferation und Differenzierung von monozytären Phagozyten moduliert (Rovida E. et al. 2001). Zudem gibt es Anhaltspunkte, dass ADAM 17 eine der wichtigsten Sheddases von L-Selectin ist. Das Adhäsionsmolekül L-Selectin wird auf der Zelloberfläche von Neutrophilen exprimiert und vermittelt deren Durchtritt durch vaskuläres Endothel, um zu Inflammationsherden und lymphatischen Organen gelangen zu können (Klein T. et al. 2011, Wang Y. et al. 2010). Neben ADAM 10, ist ADAM 17 ebenfalls als  $\alpha$ -Sekretase an der Prozessierung des neuroprotektiven  $\alpha$ -Amyloids beteiligt (Klein T. et al. 2011, Seals D.F. et al. 2003).

In Anknüpfung an das Thema der vorliegenden Dissertation, erschien im Jahre 2004 eine Studie, welche sich mit der Expression von ADAM 17 in humanen infrarenalen AAA befasste. Dabei konnten vor allem in der Transitionszone erhöhte ADAM-17-Konzentrationen festgestellt werden. Die Expressionsrate war in AAA signifikant höher als in gesunden oder atherosklerotischen Arterien. Zudem korrelierten die Expressionsraten von TNF- $\alpha$ - und ADAM-17-mRNA (Sato H. et al. 2004).

#### **1.4.8 Tissue Inhibitor of Metalloprotease (TIMPs)**

Bei der Expressionsanalyse von Enzymen sind stets zwei wesentliche Aspekte im Hinblick auf die Aktivität des nachzuweisenden Enzyms zu beachten. Zum einen stellt sich die Frage nach dem Aktivierungsmechanismus des Enzyms. Zum anderen muss das Vorliegen von Inhibitoren in Betracht gezogen werden.

Es sind vier TIMPs bekannt, welche vordergründig als physiologische Inhibitoren der MMPs erforscht wurden. TIMP 1 ist der wichtigste Inhibitor sämtlicher MMPs, es besitzen jedoch alle TIMPs grundsätzlich die Fähigkeit, MMPs zu binden. Es handelt sich um relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 21-28 kDa (Edwards D.R. et al. 2008). Die Grundstruktur von TIMP 1 und 2 ist weitestgehend erforscht und es gibt Anhaltspunkte für einen ähnlichen strukturellen Aufbau von TIMP 3 und 4. Die Sekundärstruktur der TIMPs besteht aus sechs Schleifen, welche über Disulfidbrücken untereinander vernetzt sind. Ein Molekül besteht aus einer N- und C-terminalen Domäne mit jeweils drei Schleifen. Die N-terminale Domäne ist dabei für die Inhibition von MMPs verantwortlich. Dabei kommt es zu einer Chelatbildung mit dem Zink-Ion der MMPs. Die Funktion der kleineren C-terminalen Domäne ist noch nicht vollständig aufgeklärt, vermutlich vermittelt sie eine zusätzliche Interaktion mit dem gebundenen Protein. Im Rahmen von Studien an ADAM 10, welches sowohl von TIMP 1 als auch 3 inhibiert wird, stellte sich heraus, dass isolierte N-terminale

Domänen keine effektive Inhibition bewirken können. Während TIMP 1, 2 und 4 als lösliche Proteine vorliegen, ist TIMP 3 an die ECM gebunden (*Edwards D.R. et al. 2008, Lee M.-H., et al. 2007, Yu W.-H. et al. 2000*). Neben der Bindung an Glykosaminoglykane der ECM, welche vermutlich auf basischen Eigenschaften von TIMP 3 beruht, besitzt TIMP 3 als weitere Besonderheit die Fähigkeit, das Shedding von L-Selectin und IL-6-Rezeptoren zu unterbinden (*Yu W.-H. et al. 2000*).

TIMP 3 hat sich bislang als wichtigster Inhibitor der ADAMs erwiesen. Jedoch konnte bisher nur für einen kleinen Teil der ADAMs eine klare Zuordnung zu einem Inhibitor gezeigt werden. ADAM 10, 12, 17, 28 und 33 werden durch TIMP 3 inhibiert. ADAM 10 wird zusätzlich von TIMP 1 inhibiert. Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Inhibierung von ADAM 12 durch TIMP 2. ADAM 8, 9 und 19 werden nicht durch TIMPs inhibiert. Für ADAM 15 liegen bislang keine Ergebnisse vor (*Edwards D.R., et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009, Shiomi T. et al. 2010*).



## 1.5 Aufgabenstellung

Inflammatorische Prozesse, insbesondere die proteolytische Zersetzung der Gefäßwand, tragen maßgeblich zur Entstehung und Ruptur abdominaler Aortenaneurysmen (AAA) bei. Das Augenmerk der Forschung lag bislang überwiegend auf der Untersuchung der Matrixmetalloproteasen (MMPs) und deren Rolle in der Entstehung und Progression von AAA, woraus eine Anzahl detaillierter Studien hervorging. Die Familie der ADAMs (a Disintegrin and Metalloprotease) stellt eine weitere Untergruppe der Familie der Metalloproteasen dar, welcher auch die MMPs angehören. ADAMs wurden jedoch bislang im AAA nur begrenzt untersucht. Durch die strukturell mit den MMPs verwandte Metalloproteasedomäne besitzen ADAMs ebenfalls proteolytische Eigenschaften. Des Weiteren lieferten Forschungsergebnisse der letzten Jahre interessante Hinweise auf eine Beteiligung einiger ADAMs an der Regulation inflammatorischer Prozesse. Derzeit ist lediglich eine Arbeit bekannt, welche sich mit der Expression eines Mitglieds der ADAM-Familie, nämlich ADAM 17, in AAA beschäftigt. Dies gab Anlass zur Durchführung einer dezidierten wissenschaftlichen Studie. Dabei wurden ADAMs mit proteolytischer Funktion (ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17), sowie TIMP 1 und 3 analysiert.

In vorliegender Dissertation sollen folgende Aspekte erörtert werden:

- Werden ADAMs in AAA exprimiert?
- Werden ADAMs auch in gesunden Aorten exprimiert?
- Welche Zellen innerhalb der Gefäßwand exprimieren ADAMs?
- Gibt es Unterschiede in der Expression von ADAMs zwischen AAA und Kontrollaorten?
- Wie verhält sich die Expression von Inhibitoren und ADAMs zueinander?
- Gibt es Unterschiede des Verhältnisses ADAM versus Inhibitor zwischen AAA und Kontrollgefäßen?
- Haben strukturelle Merkmale der Aorten oder Serum- und Vitalwerte der Donatoren Einfluss auf die Expression von ADAMs?

Nachfolgende Methoden kamen zum Einsatz:

- Histologische Färbungen zur Charakterisierung der AAA
- Immunhistochemische Untersuchung zur Lokalisationsanalyse
- qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR) und Westernblot zur quantitativen Expressionsanalyse

## 2 Methoden

### 2.1 Chemikalien und Geräte

Acrylamid/Bis-Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Agarose peqGOLD universal	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Antikörper-Diluent	DAKO, Dänemark
APAAP-Kit Mouse	DAKO, Dänemark
<ul style="list-style-type: none"> <li>- APAAP-Immunkomplex</li> <li>- Sekundärintikörper</li> <li>- Substrat-Puffer</li> <li>- Chromogen Red</li> <li>- Chromogen Red 2</li> <li>- Chromogen Red 3</li> <li>- Levamisole</li> </ul>	
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector Laboratories Inc., USA
Blot-Apparatur	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
cDNA Synthesis Kit RevertAid, K1622	Fermentas GmbH, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reaction Buffer</li> <li>- RNase Inhibitor</li> <li>- 10 mM dNTP-Mix</li> <li>- M-MuIV RT</li> <li>- Oligo dT18-Primer</li> </ul>	
Citronensäure-Monohydrat	Merck Chemicals, Deutschland
Color Video Camera MC 3255	Sony, Japan
Deckgläser SuperFrost Plus	Menzel GmbH, Deutschland
DNA-Leiter peqGOLD 50bp	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
dNTP-Set peqGOLD	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
ECL-Lösung SuperSignal West Pico	Thermo Scientific, USA
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Eindeckgerät Promounter RCM 2000	Medite GmbH, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Entwicklermaschine CAT SRX-101A	Konica Minolta, Deutschland
Eosin, 1%	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Essigsäure	Merck Chemicals, Deutschland
Ethanol vergällt, 70%	Institut für Pathologie
Ethanol vergällt, 96%	Institut für Pathologie



Ethanol, 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Etidiumbromid 0,5 mg/ml	Roche GmbH, Deutschland
Formalin, 4%	Institut für Pathologie
Fuchsin S, Säurefuchsin	Chroma, Waldeck GmbH, Deutschland
Fuchsin, basisch	Chroma, Waldeck GmbH, Deutschland
Gel-Kammer mini-sub cell GT	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Glass Plate 1,5mm	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Glykogen	Roche GmbH, Deutschland
High Pure RNA Paraffin Kit	Roche GmbH, Deutschland
- Tissue Lysis Buffer	
- Proteinkinase K	
- Binding Buffer	
- Wash Buffer I	
- Wash Buffer II	
- DNase I	
- DNase Incubation Buffer	
- Elution Buffer	
- High Pure Filter Tubes	
- Collection Tubes	
iQ5 real-time PCR-Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Isopropanol	Institut für Pathologie
LSAB-Kit Rabbit/Mouse	DAKO, Dänemark
- biotinylierte sekundär Antikörper	
- HRP Puffer	
- Steptavidin-Peroxidase	
- DAB-Chromogen	
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Deutschland
Mastermix KAPA SYBR	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Mayers Häkalaun	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Medical X-Ray Film	Fujifilm, Deutschland
Mikroskop Axioplan 2	Karl-Zeiss Lichtmikroskopie, Deutschland
Mikrotom HM335E	Microm international, Deutschland
Mikrotomklingen	Feather, Japan
Natriumacetat	Merck Chemicals, Deutschland
Natriumchlorid (zur Analyse)	Merck Chemicals, Deutschland
Natronlauge 2N	Merck Chemicals, Deutschland
Natronlauge 40%	Merck Chemicals, Deutschland
PCR-Wasser double processed	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Photometer Asys Expert Plus	Biochrom Ltd., UK
Pikrinsäure	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Poly-L-Lysine Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
PowerSupply	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Protease Typ XXIV, bakteriell	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Proteinkinase K	Roche GmbH, Deutschland
Proteinmarker III peqGOLD	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH, Deutschland
Reactionbuffer Y, 10fach	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Resorcin-Fuchsin	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
RNAse ZAP	Invitrogen, USA
Salzsäure, 25%	Merck Chemicals, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Serum Ziege	Vector Laboratories Inc., USA
Short Plate	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Stratagene Eagle Eye II Imaging System	Pegasus System Inc., USA
Taq-DNA-Polymerase, SAWADY "Hot"	peqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
- „Hot“ Taq-DANN-Polymerase	
- Reaktionspuffer Y	
- Reaktionspuffer S	
- Encancer Souttion P	
- Verdünnungspuffer	
- 25 mM Magnesiumchlorid	
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
Trans-Blot SD	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Trizma-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Vortex-Rüttler	IKA Werke GmbH, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck Chemicals, Deutschland
Weigert's Eisenhämalaun, Reagenz A	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Weigert's Eisenhämalaun, Reagenz B	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Xylencyanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Xylol	Institut für Pathologie
Zentrifuge	Eppendorf AG, Deutschland

## **2.2 Untersuchungsmaterial**

Es wurden insgesamt 38 Präparate untersucht. Von 20 Patienten (17 männlich, 3 weiblich) wurden im Rahmen der operativen Sanierung eines infrarenalen abdominalen Aortenaneurysmas (AAA) Gewebeproben aus dem Aneurysmasack entnommen. Die Präparate wurden zunächst in Formalin fixiert und nach 24 Stunden in Paraffin gegossen. Weitere acht Präparate wurden zur Durchführung eines Westernblots direkt nach Entnahme ohne Formalinbehandlung eingefroren. Alle Patienten hatten sich mit der wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Gewebeproben einverstanden erklärt. Als Negativkontrollen dienten Präparate der infrarenalen Aorta von zehn Personen, welche keine makroskopischen atherosklerotischen Veränderungen aufwiesen. Diese konnten mit Hilfe des Instituts für Rechtsmedizin München bezogen werden. Die Studie wurde nach den Richtlinien der Declaration of Helsinki der World Medical Association (WHO) durchgeführt.

## **2.3 Histologie und Immunhistochemie**

### **2.3.1 Anfertigung der Schnitte**

Von den Paraffinblöcken wurden 2 µm breite Schnitte angefertigt, welche mit Hilfe von Polylysinkleber auf beschichtete Objektträger (SuperFrost, Firma Menzel, Deutschland) aufgezogen und zwei Tage bei 56°C inkubiert wurden.

### **2.3.2 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) diente der primären Plaquecharakterisierung. Dabei können Zellularität und Infiltrate beurteilt werden. Zellkerne erscheinen blau, Zytoplasma und Teile extrazellulären Gewebes rosa. Die Färbung erfolgte nach einem histologischen Standardprotokoll des Institutes für Pathologie. Die trockenen Schnitte wurden dreimal 5 Minuten in Xylol entparaffiniert, danach in der absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol – Ethanol 96% – Ethanol 70%) je zweimal drei Minuten lang inkubiert und anschließend in destilliertes Wasser überführt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation in Mayers Hämalaun. Danach wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und in Leitungswasser übertragen. Nach diesem Vorgang, der auch als „Bläuen“ bezeichnet wird, erscheinen Zellkerne blau. Anschließend folgte eine einminütige Inkubation in 2%-igem Eosin, angesäuert mit Essigsäure. Im Anschluss erneutes Spülen in destilliertem Wasser und Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70% – Ethanol 96% – Isopropanol). Schließlich wurden die Schnittpräparate in Xylol überführt und eingedeckt.

### 2.3.3 Elastica-van-Gieson-Färbung

Die Elastica-van-Gieson-Färbung (EvG) diene ebenfalls der Charakterisierung. Insbesondere Kollagen- und Elastin-Anteile können gut beurteilt werden. Zellkerne und Elastin werden schwarz, Kollagenfasern rot und Muskelfasern, Fibrin und Zytoplasma gelb dargestellt.

Die Entparaffinierung erfolgte zunächst zweimal 5 Minuten in Xylol und absteigender Alkoholreihe (Isopropanol – Ethanol 96% – Ethanol 70%). Anschließend wurden die Gewebeschnitte 15 Minuten mit einer Resorcinlösung behandelt. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser, kurze Inkubation mit 96%igem Alkohol. Die Kernfärbung wurde durch ein fünfminütiges Einbringen der Schnitte in eine Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert erreicht. Dann wurden die Präparate 10 Minuten warm gewässert und zur Zytoplasmafärbung 5 Minuten lang in Pikrofuchsinlösung überführt. Nach kurzer Befeuchtung mit destilliertem Wasser folgte wiederum eine kurze Behandlung mit 96%igem Alkohol. Abschließend wurden die Schnitte, wie vorbeschrieben, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (70% Ethanol – 96% Ethanol – Isopropanol), in Xylol überführt und eingedeckt.

### 2.3.4 Vorbehandlung

Die Schnitte wurden nach Inkubation zunächst zweimal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und daraufhin zweimal 5 Minuten mit Isopropanol und jeweils 5 Minuten mit 96%- und 70%igem Alkohol behandelt. Anschließend wurden die Präparate in destilliertes Wasser überführt.

Jeweils zwei Schnitte pro Präparat wurden direkt mit Hämalaun-Eosin und Elastica-van-Gieson gefärbt.

Unter Formalinbehandlung kommt es häufig zu einer Maskierung antigener Strukturen durch sich ausbildende Quervernetzungen zwischen Proteinen. Daher ist vor der immunhistochemischen Färbung eine spezielle Vorbehandlung erforderlich. Man bezeichnet diesen Zwischenschritt als Antigen- bzw. Epitop-Demaskierung. Dabei handelt es sich um einen kurzzeitigen enzymatischen Verdau unter Wärmeeinwirkung. Es kommen unter anderem Citratpuffer (pH 6; 2,1 g Citrat-Monohydrat auf 1000 ml Aqua dest.) oder EDTA-Puffer (pH 8; 1,116 g EDTA auf 3000 ml Aqua dest.) zum Einsatz. Zur Wärmebehandlung stehen Mirkowellenöfen oder Schnellkochtöpfe zur Auswahl. Im Folgenden wurde sich für den Schnellkochtopf entschieden.

Alternativ zum Kochen im Schnellkochtopf können die Schnitte einer 20-minütigen Proteasebehandlung unterzogen werden (5 µg Protease XXII + 5 ml TRIS-Puffer).

Nach der Vorbehandlung wurden alle Schnitte dreimal mit TRIS-Gebrauchslösung gespült. Dabei handelt es sich um 10-fach verdünnten TRIS-Puffer (pH 6; 60,5 g Trizma-Base auf 700 ml Aqua dest.).

### **2.3.5 LSAB-Methode**

Eine von zwei gängigen Methoden zur immunhistochemischen Untersuchung von Gewebe ist die LSAB-Methode (Labelled-Streptavidin-Biotin). Die LSAB-Methode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin. Hierzu wurde ein Kit der Firma DAKO verwendet.

Da die am Ende folgende Farbreaktion durch eine an Streptavidin gebundene Peroxidase katalysiert wird, muss nach der Vorbehandlung im Schnellkochtopf zunächst die gewebeeigene Peroxidase gesättigt werden. Dies erfolgte mittels 15-minütiger Behandlung mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Während des im Folgenden beschriebenen Prozesses wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer gelagert. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte jeweils dreimal eine Spülung mit TRIS-Gebrauchslösung.

Zunächst wurden die Objektträger eine Stunde lang mit 100 µl einer Lösung aus Primärantikörper und Antikörper-Diluent bedeckt. Danach wurden sie 25 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und weitere 25 Minuten mit Streptavidin-Peroxidase behandelt. Schließlich wurde Diaminobenzidin (DAB) in HRP-Puffer gelöst (1:50) und davon jeweils 100 µl auf die Objektträger pipettiert. Dabei kommt es zu einer, durch Horse-Raddish-Peroxidase (HRP) katalysierten Farbreaktion, welche bereits nach wenigen Minuten mit dem bloßen Auge erkennbar ist. Nach erfolgter Farbreaktion wurden die Objektträger nochmals mit TRIS-Puffer gespült und mit Hämalaun-Eosin gegengefärbt.

### **2.3.6 APAAP-Methode**

Bei dieser Methode kam ein Kit der Firma DAKO zu Anwendung. Zur Inkubation wurden die Schnitte stets in einer feuchten Kammer gelagert und zwischen den einzelnen Arbeitsschritten jeweils dreimal mit TRIS-Lösung gespült.

Die Farbreaktion am Ende der APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) wird durch Alkalische Phosphatase (AP) katalysiert. Hierbei wurden auch zunächst Primärantikörper und ein entsprechender Sekundärantikörper aufgetragen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem APAAP-Immunkomplex, welcher aus antikörpergebundener AP besteht, welche im nachfolgenden Schritt zur Farbreaktion führt.

Zunächst wurden die Schnitte eine Stunde lang mit 100 µl einer Lösung aus Primärantikörper und Antikörper-Diluent inkubiert. Danach folgten 25 Minuten Inkubation mit dem Sekundärantikörper und 25 Minuten Inkubation mit dem APAAP-Immunkomplex. Schließlich wurde aus Chromogen Red und AP-Substart-Puffer eine Färbelösung hergestellt, mit der die

Schnitte 15 Minuten behandelt wurden. Nach der Farbreaktion folgte ebenfalls die Gegenfärbung mit Hämalaun-Eosin.

### 2.3.7 Färbungen zur Charakterisierung der aneurysmalen Gefäßwand

Neben routinemäßig angefertigten Hämalaun-Eosin- und Elastica-van-Gieson-Färbungen, wurden immunhistochemische Färbemethoden durchgeführt, welche in nachfolgender Tabelle aufgelistet sind. Die Inkubationszeit betrug stets 60 Minuten.

Antikörper	Verdünnung	Tierart	Vorbereitung und Methode	Hersteller
CD3	1:400	Kaninchen, polyklonal	Schnellkochtopf mit Citrat; LSAB	DAKO
CD20	1:500	Maus, monoklonal	Schnellkochtopf mit Citrat; LSAB	DAKO
CD68	1:2000	Maus, monoklonal	Schnellkochtopf mit Citrat; LSAB	DAKO
smooth-muscle- Actin (smA)	1:200	Maus, monoklonal	Schnellkochtopf mit Citrat; APAAP	DAKO
von-Willebrand- Faktor (vWF)	1:500	Maus, monoklonal	Protease; APAAP	DAKO

**Tabelle 2:** Primärantikörper für immunhistochemische Klassifizierung

### 2.3.8 Spezifische immunhistochemische Färbungen

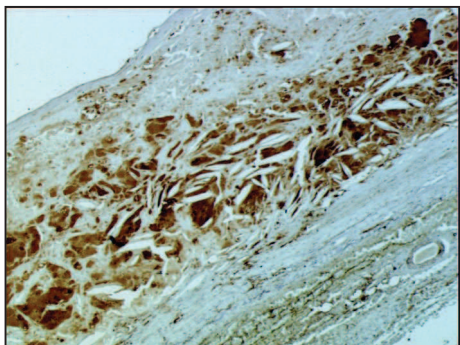
Zur Beurteilung der Expression von ADAM 8, 10, 15, 17 und TIMP 1, 3 wurde zunächst nach geeigneten Antikörpern gesucht. Bezüglich der Optimierung wird auf Kapitel 3.2 verwiesen. Diese Färbungen dienen der weiteren Charakterisierung der pathologisch veränderten Gefäßwand und der Identifizierung von im AAA vorhandenen Zelltypen. Nachfolgende Tabelle beinhaltet eine Zusammenschau der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Tierart	Vorbehandlung und Methode	Hersteller
ADAM 8	1:25	Ziege, polyklonal	Schnellkochtopf mit Citratpuffer, LSAB	R&D Systems
ADAM 10	1:30	Kaninchen, polyklonal	Schnellkochtopf mit Citratpuffer, LSAB	abcam
ADAM 15	1:50	Maus, monoklonal	Schnellkochtopf mit Citratpuffer, LSAB	R&D Systems
ADAM 17	1:800	Kaninchen, polyklonal	Schnellkochtopf mit Citratpuffer, LSAB	R&D Systems
TIMP 1	1:100	Kaninchen, polyklonal	Schnellkochtopf mit Citratpuffer, LSAB	Lab Vision
TIMP 3	1:100	Maus, monoklonal	Schnellkochtopf mit Citratpuffer, LSAB	abcam

**Tabelle 3:** Primärantikörper für spezifische Immunhistochemie

### 2.3.9 Klassifizierung und Auswertung der histologischen Präparate

Im Anschluss wurden die Präparate lichtmikroskopisch ausgewertet (Axioplan 2, Carl-Zeiss, Institut für Pathologie TU München). Es folgte stets eine Reevaluation durch den erfahrenen Untersucher Herrn PD Dr. Pelisek. Bei unklaren Ergebnissen wurde zudem der Rat der Pathologin Frau Dr. Rudelius einbezogen. Bei der Mikroskopie wurden 25-, 100- und 200-fache Vergrößerungen eingesetzt. Alle abgebildeten histologischen Fotos sind nochmals 2,5-fach durch die verwendete Kamera vergrößert. Bei den Standardfärbungen zur Klassifikation wurden Zellularität und Grad der Verkalkung, sowie Gehalt an SMCs, Elastin, Kollagen, Infiltraten, Makrophagen und Neogefäßen beurteilt. Anschließend wurde die Intensität der Expression der untersuchten ADAMs und TIMPs in ECs, SMCs, Infiltraten und Neogefäßen beurteilt. Dabei wurden folgende Abstufungsgrade samt Zwischenstufen gewählt: (-) keine Färbung, positive Färbung von einigen (+), den meisten (++) oder allen (+++) untersuchten Zellarten. Im Falle einer starken Abweichung der Expression/Färbung zwischen den einzelnen Präparaten oder auch innerhalb eines Präparates, wurde (+/+++) vergeben.



**Abbildung 7:** Beispiel einer unspezifischen Färbung im Bereich des Atheroms, 62,5-fach vergrößert, anti-TIMP 1

In Bereichen des Atheroms und der fibrösen Kappe kam es, unabhängig von der Auswahl des Primärantikörpers, häufig zu einer unspezifischen Färbung (Abb. 7). Diese Färbung wurde in die Auswertung nicht einbezogen. Von ausgewählten Präparaten wurden Fotos angefertigt, welche in Kapitel 3 abgebildet sind.

Die Abstufungsgrade der lichtmikroskopischen Auswertung wurden in Zahlen von 0 bis 3 umgewandelt, um Mittelwerte für AAA (n=20) und Kontrollen (n=10) errechnen zu können. Bei der Realisierung einer graphischen Darstellung (Kapitel 3.4) in Säulendiagrammen wurde eine fixe 100%-Marke definiert, welche die in allen Gruppen und Kriterien höchste erreichte durchschnittliche Expression darstellt.



## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe eines, speziell zur Anwendung an formalinfixierten Proben vorgesehenen, Kits der Firma Roche.

RNA ist deutlich instabiler als DNA. Es wird davon ausgegangen, dass es während der Formalinfixierung zu einer partiellen Degradierung der RNA durch körpereigene, noch aktive, RNAsen kommt (*Mizuno T. et al. 1998*). Daher ist bei der Arbeit mit formalinfixiertem Gewebe darauf zu achten, Fragmente einer maximalen Länge von 150 bp zu verwenden. Zudem entstehen im Rahmen der Fixierung Cross-linkings und Anlagerungen von Methylgruppen, wodurch eine Isolierung und alle folgenden Arbeitsschritte zusätzlich erschwert werden. Im Jahre 2001 wurde erfolgreich der Versuch unternommen, mit kleinen RNA-Fragmenten zu arbeiten (*Specht K. et al. 2001*). Dabei wurde aus formalinfixiertem Gewebe RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine PCR verwendet. Es konnte im Rahmen einer ausführlichen Untersuchung gezeigt werden, dass die verbleibenden RNA-Fragmente, nach beginnender Degradierung durch körpereigene RNAsen, dennoch für eine qRT-PCR ausreichend sind. Überdies stellte sich heraus, dass auch bei einer bis zu 20-stündigen Formalinfixierung der Präparate, noch eine qRT-PCR möglich ist. Es sollte jedoch darauf geachtet werden, dass die Proben nach Entnahme innerhalb von maximal zwei Stunden mit Formalin behandelt werden.

Die RNA-Isolierung erfolgte unter RNase-freien Bedingungen (RNase-Zap). Zunächst wurden von jedem Paraffinblock zwei 10 µm dicke Schnitte in ein steriles Eppendorfröhrchen überführt und in Xylol 5 Minuten zum Zweck der Paraffinextraktion inkubiert. Vorab ist es wichtig, die Paraffinmenge auf dem Block mit dem Skalpell zu reduzieren. Es folgten zwei Rehydratationsschritte mit Ethanol absolut. Danach wurde das überschüssige Ethanol verworfen und die Proben bei 55°C getrocknet. Zur Resuspendierung wurden im folgenden Schritt Lysepuffer (Kit), 10%iges SDS und Proteinkinase K (Kit) zugegeben, die Proben erneut über Nacht inkubiert und am nächsten Tag nochmals mit Proteinkinase K behandelt, um das Gewebe vollständig aufzulösen. Nun wurden die Proben mit Binding Buffer (Kit) und Ethanol absolut versetzt, in Filterröhrchen überführt und in Sammelröhrchen eingesetzt. Es folgten mehrere Schritte des Waschens (Washing Buffer, Kit) und Abzentrifugierens. Am Ende der Prozedur wurde das Sammelröhrchen entfernt und das Filterröhrchen in ein steriles Eppendorfröhrchen eingesetzt. Die Proben wurden nun mit Elution Buffer (Kit) inkubiert und abzentrifugiert, wobei die RNA in sterilen Eppendorfröhrchen aufgefangen wurde. Es folgte ein 45-minütiger DNase Verdau (Kit) bei 37°C. Zur Aufreinigung der RNA wurden die Proben erneut mit Proteinkinase K behandelt und in mehreren Schritten gewaschen. Die aufgereinigte RNA wurde wieder in einem sterilen Eppendorfröhrchen

aufgefangen. Am Ende des letzten Schrittes, der Fällung, erhält man ein reines RNA-Pellet. Um unter anderem DNA und Salze zu entfernen, wurden die Proben mit reinem Ethanol, Natrium-Acetat (3 M; pH 4,5) und Glykogen inkubiert. Schließlich wurde der Überstand abzentrifugiert, das Pellet in 70%igem Ethanol gelöst, erneut abzentrifugiert und schließlich in 20 µl PCR-Wasser resuspendiert. Es folgte die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes. Danach wurden die Proben bei -70°C eingefroren.

### **2.4.2 cDNA-Synthese**

Nach der photometrischen Bestimmung des RNA-Gehaltes, wurde 1 µg RNA auf einen Ansatz von 20 µl in cDNA umgesetzt. Dabei kam das RevertAid-Kit K1622 der Firma Fermentas zur Anwendung. Zunächst wurden die Proben bei 65°C mit dT18-Primern (Kit) versetzt. Danach wurden 8 µl Ansatz, bestehend aus Puffer, RNase-Inhibitor, dNTPs und M-MLV zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 43°C, wurde die Reaktion bei 70°C gestoppt. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren.

### **2.4.3 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)**

Mittels PCR können in kürzester Zeit kleine DNA- oder cDNA-Mengen vervielfältigt werden. Dabei kann nicht nur das Vorliegen eines bestimmten Genes, sondern auch die Expression des gesuchten Genes nachgewiesen werden, da es sich bei der verwendeten cDNA um eine Abschrift der RNA handelt.

Zur Optimierung der Primer wurde zunächst eine klassische PCR mit DNA gestartet. Dabei wurde folgender Ansatz (50 µl) verwendet:

- 33 µl PCR-Wasser
- 5 µl taq-Polymerase-Puffer (Puffer Y, peqLab Deutschland)
- 5 µl dNTPs (peqLab, Deutschland)
- 0,25 µl taq-Polymerase (peqLab, Deutschland)
- 1µl Primer forward (5'-3'), 1 µl Primer reverse (3'-5')
- 2 µl DNA.

Da bei der PCR-Optimierung mit DNA-Abschriften gearbeitet wird und die Ergebnisse mit der späteren Expressionanalyse auf mRNA-Ebene (cDNA) übereinstimmen müssen, wurde bei der Auswahl der Primer darauf geachtet, dass das gesamte Produkt innerhalb der transkribierten Region, dem sogenannten Exon, liegt.

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf Deutschland):

Nach der Initialisierung bei 95°C für 5 Minuten, folgten weitere 40 Zyklen:

- 30 Sekunden bei 95°C Denaturierung
- 30 Sekunden bei 55 bis 62°C Annealing
- 30 Sekunden bei 72°C Amplifikation

Am Ende der Zyklen 5 Minuten bei 72°C und Abkühlung auf 4°C.

#### 2.4.4 Elektrophorese

Das fertige Produkt wurde zur optischen Darstellung auf ein 2%iges Agarose-Gel, bestehend aus 2 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer (pH 8; 10,8 g Trizma-Base; 5,5 g Borsäure; 0,4 ml 0,5 M EDTA auf 1000 ml Aqua dest.) aufgetragen. Zur optischen Darstellung der Produktgrößen wurde in eine Tasche ein Marker aufgetragen (DNA-Leiter, peqGold 50 bp). Die Elektrophorese-Kammer wurde ebenfalls mit TBE-Puffer befüllt. Je nach Größe der Gele, entsprechend 8 oder 20 Spuren, wurde eine Spannung von 80 oder 100 V für eine Stunde angelegt. Wurde ein Gel geteilt, sprich mit zwei Spurenzeilen versehen, halbierte sich die Zeitdauer entsprechend. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidium-Bromid-Zusatz (0,5 µg/ml) im Gel markiert. Dabei entspricht die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmentlänge. Kürzere Fragmente wandern somit schneller. Unter einer UV-Lampe wurden im Anschluss die Ethidium-Bromid-markierten Banden fotografiert. Fotografien zur Primer-Optimierung sind in Kapitel 3.5 abgebildet.

Nachfolgende Tabelle zeigt die zur Optimierung verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz (22 bp)	T (°C)
GAPDH-F1	GAGTAAGACCCCTGGACCACCA	64,0
GAPDH-F2	CAGTGCCAACGTGTCAGTGGTG	64,0
GAPDH-F3	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC	64,0
GAPDH-R1	GGACTGAGTGTGGCAGGGACTC	65,8
GAPDH-R2	TGTAGCCCAGGATGCCCTTGAG	64,0
GAPDH-R3	TCCATGGTGGTGAAGACGCCAG	64,0
ADAM 8-F1	CTTTATGGAAAGGGCTATGTGG	58,4
ADAM 8-F3	CCCAGCTTTGTGTGTGTTAAG	58,4
ADAM 8-R1	AATAAAAGCTTTCAGCCCTGCT	56,5
ADAM 9-F1	CATCGGGTTCCAGAACTTTAG	58,4
ADAM 9-F2	TAGCGACTGGTTTTGGACTTAGA	58,4
ADAM 9-F3	TCAGAGGATTGCTGCATTTAGA	56,5
ADAM 9-R1	ATTACCACAGGAGGGAGCACTA	60,3

ADAM 9-R2	GATGTGCTCAAARGAGAGCTG	58,4
ADAM 9-R3	CTCCACATTTTCAGAGGCTCTTT	58,4
ADAM 10-F1	AGGGAAGAAAATGCAAATGAT	54,7
ADAM 10-F2	GTGTACGTGTGCCAGTTCTGAT	60,3
ADAM 10-F3	ACCCTACAAATCCTTTCCGTTT	56,5
ADAM 10-R1	AGTCTGAATCATCCCGACACTT	58,4
ADAM 10-R2	ACAAGTTGATGGGTCCATTTT	56,4
ADAM 10-R3	CATCAAATCTCGGTCTGTGAA	56,5
ADAM 12-F1	CTGGGATCTGCTTTGAGAGAGT	60,3
ADAM 12-F3	AGACAACCGAGAGTTTCAGAGG	60,3
ADAM 12-F4	CCTTAGATCTGGCATGTTAGCC	60,3
ADAM 12-F5	AGACAACCGAGAGTTTCAGAGG	60,3
ADAM 12-R1	CCTCCTTGACACTGGATTTTTT	58,4
ADAM 12-R2	CTCCTTGACACTGGATTTTTTCC	58,4
ADAM 12-R3	CCGAATGTTTCAGTGGTCTGTAA	58,4
ADAM 12-R4	ATCAAACCTCTCCTGGCTCTCTG	60,3
ADAM 12-R5	CCGAATGTTTCAGTGGTCTGTAA	58,4
ADAM 15-F1	GTACACACTCAGAAGCCACCAG	60,3
ADAM 15-F2	CGGGAATCTGTACACACTCAGA	60,3
ADAM 15-F3	ACAGTGCCTCGCTCTACCTCT	62,1
ADAM 15-F4	GACAGTGCCTCGCTCTACCTC	64,0
ADAM 15-F5	CATTATTTTCGCGAATCCAAGAT	54,7
ADAM 15-R1	ACCAACTCCACAGTCTTGGTCT	60,3
ADAM 15-R3	CTTCAGTCATGGTAGGGGACTC	62,1
ADAM 15-R4	CTTCAGTCATGGTAGGGGACTC	62,1
ADAM 15-R5	TCTGGTGGCTTCTGAGTGTGTA	60,3
ADAM 17-F1	GAGAACCACCTGAAGAGCTTGT	60,3
ADAM 17-F2	TGTATCCCATAGCTGTGAGTGG	60,3
ADAM 17-F3	TGCTCCCAAAGGGTTAGTAGA	58,4
ADAM 17-F7	GGGACATAATTTTGGAGCAGAA	56,5
ADAM 17-F8	CAAGTCATTTGAGGATCTCACG	58,4
ADAM 17-F9	GAACGCAGCAATAAAGTTTGTG	56,5
ADAM 17-R1	CGATGATCRGCTACCACCAATA	58,4
ADAM 17-R2	TTTATTGCTGCGTTCTTGAAAA	52,8

ADAM 17-R7	CCACTCACAGCTATGGGATACA	60,3
ADAM 17-R8	TCTTTGCTGTCAACACGATTCT	56,5
ADAM 17-R9	AGCAGGTGTCGTTGTTTCAGATA	58,4
TIMP 1-F1	TGGCATCCTGTTGTTGCTGTGG	62,1
TIMP 1-F2	GCGGATACTTCCACAGGTCCCA	64,0
TIMP 1-F3	GAAAAGGGCTTCCAGTCCCGTC	64,0
TIMP 1-R1	ATTCAGGCTATCTGGGACCGCA	62,1
TIMP 1-R2	AAGCTCAGGCTGTTCCAGGGAG	64,0
TIMP 1-R3	ACTTGGCCCTGATGACGAGGTC	64,0
TIMP 3-F1	TAGTTTTTGCTTTGGGGGTAGA	56,5
TIMP 3-F2	CTTCCCAGATGATGACAATGAA	56,5
TIMP 3-F3	TTGAAATTCTGAACACCGTCAG	56,5
TIMP 3-R1	TCTCTCCATCACTTCTGGGTTT	58,4
TIMP 3-R2	ACCCCATATGACAGCATAGACC	60,3
TIMP 3-R3	TAAGCCAGGAAGGCAGTTAAAG	58,4

**Tabelle 4:** Zur Optimierung verwendete Primer

Nach Optimierung und Auswertung der einzelnen PCR-Ergebnisse, wurden die am besten zur Durchführung der qRT-PCR geeigneten Primer ausgewählt (Tab. 5):

<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverse</b>	<b>Fragment (bp)</b>
GAPDH-F2	GAPDH-R2	122
ADAM 8-F3	ADAM 8-R1	127
ADAM 9-F3	ADAM 9-R3	123
ADAM 10-F3	ADAM 10-R3	120
ADAM 12-F4	ADAM 12-R4	124
ADAM 15-F4	ADAM 15-R4	100
ADAM 17-F7	ADAM 17-R7	105
TIMP 1-F3	TIMP 1-R1	92
TIMP 3-F2	TIMP 3-R2	93

**Tabelle 5:** Primer für qRT-PCR

### 2.4.5 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Im Gegensatz zur klassischen PCR, ermöglicht dieses Verfahren eine Quantifizierung und somit eine Gegenüberstellung verschiedener Expressionsgrade. Dieses Verfahren basiert auf der Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes. Am Ende eines jeden Laufes, welcher aus mehreren Zyklen besteht, wird anhand des Fluoreszenzsignals eine Quantifizierung der in der exponentiellen Phase entstandenen Produkte vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der Amplifikation, bestehend aus drei Phasen, ist eine Quantifizierung sinnvoll möglich.

Zur Durchführung der qRT-PCR kam der iQ5 real-time Cycler von Biorad zum Einsatz. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR-Green verwendet. Bei dessen Einlagerung (Interkalieren) in doppelsträngige DNA kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Die Reaktionen wurden in 96-well-Platten der Firma Sarstedt durchgeführt und mit einer eigens dafür vorgesehenen Klebefolie (Sarstedt) versiegelt.

Folgender Ansatz (25 µl) wurde verwendet:

- 9,5 µl PCR-Wasser
- 12,5 µl SYBR-Green-MasterMix (peqLab)
- 0,5 µl Primer forward (5'-3'), 0,5 µl Primer reverse (3'-5')
- 2 µl cDNA

Nach der Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 5 Minuten, folgten weitere 40 Zyklen:

- 30 Sekunden bei 95°C Denaturierung
- 30 Sekunden bei 55 bis 62°C Annealing
- 30 Sekunden bei 72°C Amplifikation

Nachdem im Rahmen der qRT-PCR keine absolute, sondern lediglich eine relative Quantifizierung möglich ist, ist die Mitbestimmung eines Referenzgens obligat. Hierzu diente das GAPDH-Gen. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym der Glykolyse und wird somit in jeder Körperzelle exprimiert.

Die Auswertung erfolgte in den exponentiellen Phasen der Läufe. Der Beginn der exponentiellen Phase wird durch den CP-Wert (Crossing point) beschrieben. Dieser Wert spezifiziert den ersten Zyklus, in welchem es zu einem signifikanten Fluoreszenzanstieg über den regulären Hintergrundwert hinaus kommt.

Mittels folgender Berechnung konnten nun Expressionen zueinander in Relation gesetzt werden:

$$\Delta CP = CP (\text{Zielgen}) - CP (\text{GAPDH})$$

$$\text{Ratio (Expressionunterschied)} = 2^{-\Delta CP}$$

## **2.4.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 15. Ergebnisse wurden bei einem P-Wert  $< 0,05$  als signifikant bezeichnet. Für den Vergleich von AAA und Kontrollen wurde zunächst mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests für eine Stichprobe geprüft, ob es sich um eine Normalverteilung handelt. Normalverteilte stetige Stichproben wurden anschließend mit dem Student'schen T-Test für zwei unabhängige Variablen untereinander verglichen. Nicht-parametrische Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert und nominale Variablen mit dem Fisher's-exact-Test untersucht. Zur Feststellung kausaler Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen, wurden entweder der Pearson-Korrelationskoeffizient (Normalverteilung) oder der Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient (nicht-parameterische Variablen) angewandt.

## **2.5 Westernblot**

### **2.5.1 Proteinextrahierung**

Acht AAA-Präparate konnten direkt nach der Entnahme im Rahmen der operativen Sanierung eingefroren werden. Aus diesen wurde Protein extrahiert. Dazu wurden die Präparate zunächst zerkleinert, mit Flüssigstickstoff überschichtet und mit dem Mörser zerstoßen. Die zerkleinerten Präparate wurden daraufhin in Reaktionsgefäße übertragen, mit 200  $\mu$ l Lysepuffer versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach weiteren 30 Minuten bei 4°C wurde mit 15.000 g abzentrifugiert und der Überstand, das Proteinextrakt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde photometrisch, anhand von verschiedenen Verdünnungsstufen mit BSA (Bovine Serum Albumin), die Proteinkonzentration bestimmt und die fertigen Proteinextrakte bei -20°C eingefroren. Der Westernblot wurde mit einer Proteinmenge von 50  $\mu$ g durchgeführt.

### **2.5.2 Zusammensetzung der Gele**

Es kamen, je nach Größe der nachzuweisenden Proteine, zwei verschiedene Trenngele zum Einsatz. Dabei wurden die genannten Reagenzien der Reihe nach pipettiert und zum Schluss die Polymerisation mit TEMED gestartet.

In der Gel-Kammer wurden zunächst die Trenngele gegossen und mit 100%igem Ethanol überschichtet. Nach 20 Minuten wurde die Überschichtungslösung abgegossen, um die Sammelgele zu gießen. Hierbei wurden Käbme zur Formung der Taschen eingesetzt. Nach weiteren 20 Minuten wurden die Gele in die mit Puffer befüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt.



7,5%iges Trenngel für ADAM 8, 10, 15, 17, bzw. 10%iges Trenngel für TIMP 1 und 3:

- 4,9 ml bzw. 4,1 ml Aqua dest.
- 2,5 ml 1,5M Tris-Cl (pH 8,8)
- 2,5 ml bzw. 3,3 ml Acrylamid 30%
- 100 µl SDS 10% in Aqua dest.
- 50 µl APS 10% in Aqua dest.
- 5 µl TEMED

5%iges Sammelgel:

- 2,75 ml Aqua dest.
- 1,25 ml 1,5M 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

### **2.5.3 Aufbereitung der Proben**

Während der Polymerisation der Gele wurden die Proben vorbereitet und, je nach Proteingehalt, mit Lysepuffer auf 15 µl aufgefüllt. Nachdem 15µl zweifach Ladepuffer (3,25 ml Aqua dest.; 3,00ml Glycerin 30%; 2,00 ml SDS; 0,5 ml Bromphenolblau; 1,25 ml 0,5 M Tris-Cl pH 6,8) zugegeben wurden, folgte die Aufbereitung im Thermomixer (5 Minuten bei 95°C) zur Streckung der Proteine. Bis zur Befüllung der Gele wurden die fertigen Proben auf Eis gelagert.

### **2.5.4 Elektrophorese**

Bei der Elektrophorese werden Lysate aus Gewebe anhand der Größe der enthaltenen Proteine aufgetrennt. In diesem Fall spricht man von einer SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese). SDS ist unter anderem Bestandteil des Elektrophoresepuffers (3 g Trizma-Base; 144 g Glycerin; 10 g SDS auf 1000 ml Aqua dest.). Bei SDS handelt es sich um ein stark negativ geladenes Detergenz, welches die Fähigkeit besitzt, sich an Proteine anzuhängen und somit eine konstant negative Ladung zu gewährleisten.

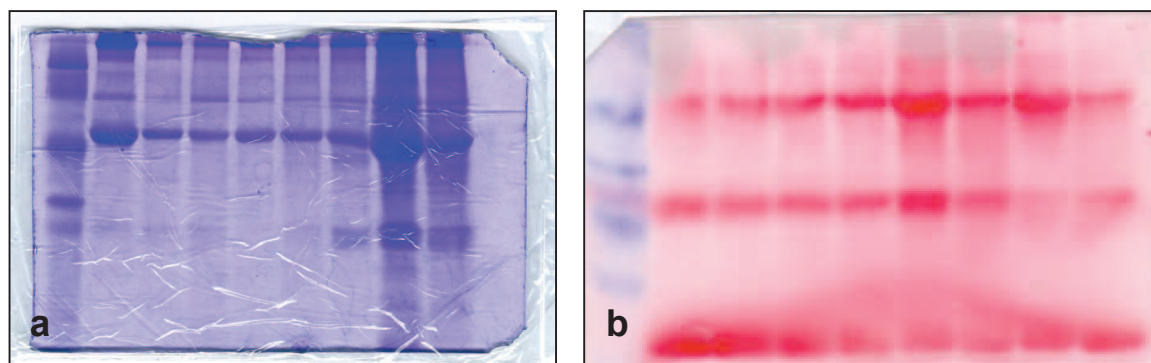
Die Auftrennung erfolgte zunächst mit 100 V für 20 Minuten und danach mit 200 V für mindestens 40 Minuten. Dabei fokussieren sich die Proteine zunächst innerhalb des Sammelgels, um danach, entlang der angelegten Spannung, das Trenngel zu

durchwandern. Die Dauer der Auftrennung wurde anhand des mitlaufenden Markers kontrolliert, abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine.

### 2.5.5 Transfer

Um die Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) zu übertragen, wurde das Semi-dry-Blot-Verfahren angewandt. Hierzu wurden zunächst Gele und mit Methanol benetzte PVDF-Membranen 15 Minuten mit Transferpuffer (3 g Trizma-Base; 14,4 g Glycine; 100 ml Transferpuffer; 100 ml Methanol auf 800 ml Millipore-Wasser) präinkubiert. Danach wurden die Gele und PVDF-Membranen zwischen ebenfalls in Transferpuffer getränkten Filterpapieren in die Transferkammer gegeben.

Die Übertragung dauerte 40 Minuten bei einer Spannung von 12 V, welche senkrecht zu Gel und PVDF-Membran angelegt wird.



**Abbildung 8:** Coomassie-Färbung (a) eines Gels und Ponceau-S-Färbung (b) einer Membran

Um die Proteinauftrennung zu kontrollieren, kann das Gel optional mit Coomassie Brilliant Blue (0,5 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml Methanol, 10 ml Ethansäure auf 40 ml Aqua dest.) gefärbt werden. (Abb. 8a) PVDF-Membranen können reversibel mit Ponceau-S-Lösung angefärbt werden (Abb. 8b). Dabei wird bei erfolgreicher Proteinübertragung auf die Membran eine rote Färbung sichtbar.

### 2.5.6 Immunreaktion

Um das unspezifische Binden der Primärantikörper an die PVDF-Membran zu verhindern, müssen die freien Bindungsstellen der Membran zunächst gesättigt werden. Dies geschieht durch die Behandlung mit Blocking-Puffer, der Tween, ein mildes Detergenz, enthält.

Zunächst wurden die Membranen 60 Minuten in Blocking-Puffer (50 µl Tween; 2,5 g Magermilchpulver; 5 ml 10fach-TBS-Puffer auf 45 ml Aqua dest.) unter Wippen inkubiert.

Danach wurde der Primärantikörper (Tab. 6) in 10 ml Blocking-Puffer gelöst und auf die Membran gegeben. Inkubation über Nacht im Kühlraum (4°C).

Antikörper	Verdünnung	Tierart	Hersteller
GAPDH	1:1000	Maus, monoklonal	abcam
ADAM 8	1:1000	Ziege, polyklonal	R&D Systems
ADAM 9	1:1000	Maus, monoklonal	abcam
ADAM 10	1:1000	Kaninchen, polyklonal	Abcam
ADAM 12	1:1000	Kaninchen, polyklonal	Abcam
ADAM 15	1:1000	Maus, monoklonal	R&D Systems
ADAM 17	1:1000	Kaninchen, polyklonal	R&D Systems
TIMP 1	1:1000	Kaninchen, polyklonal	Lab Vision
TIMP 3	1:1000	Maus, monoklonal	abcam

**Tabelle 6:** Primärantikörper für Westernblot

Nach der ersten Inkubation wurde dreimal 10 Minuten lang mit Waschpuffer (100 ml Tween, 10 ml 10fach-TBS-Puffer auf 90 ml Aqua dest.) gespült, um nichtgebundene Primärantikörper zu entfernen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit Sekundärantikörper bei Raumtemperatur, welcher wiederum in 10 ml Blocking-Puffer gelöst wurde.

Antikörper	Verdünnung	Tierart	Hersteller
Anti-Maus	1:5000	Ziege	Thermo Scientific
Anti-Kaninchen	1:5000	Ziege	Thermo Scientific
Anti-Ziege	1:1000	Esel	R&D Systems

**Tabelle 7:** Sekundärantikörper für Westernblot

Nach der abgeschlossenen Immunreaktion, wurde erneut dreimal 10 Minuten gewaschen.

## 2.5.7 Detektion

Zur Darstellung der Immunreaktion kam eine Luminol enthaltende Detektionslösung (ECL-Lösung, Thermo Scientific) zum Einsatz, welche aus zwei unmittelbar vor Gebrauch zu mischenden Komponenten besteht. Bei dieser Reaktion wird Luminol in einen vorübergehenden angeregten Zustand versetzt, wobei es zur Lichtemission kommt, welche wiederum zur Schwärzung eines Röntgenfilmes führt.

Die PVDF-Membranen wurden zunächst 5 Minuten mit der Detektionslösung inkubiert und danach, durch eine Folie geschützt, in eine Röntgenschatulle gegeben. Die Auswertung erfolgte in der Dunkelkammer.

Um die Methode zu überprüfen, wurde anschließend eine Kontrollreaktion mit GAPDH durchgeführt. Hierzu wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und das Procedere der Immunreaktion, wie bereits beschrieben, wiederholt.

## 3 Resultate

### 3.1 *Patientencharakterisierung*

Die untersuchten Präparate stammten von 20 Patienten (17 männlich, 3 weiblich), welche sich der operativen Sanierung eines infrarenalen abdominalen Aortenaneurysmas unterzogen hatten. Der Altersdurchschnitt lag bei  $67,7 \pm 12,6$  Jahren. Der mittlere Aortendurchmesser betrug  $7,2 \pm 1,9$  cm. 72% der Patienten litten an arteriellem Hypertonus, 55% waren Raucher respektive Ex-Raucher, bei 44% war eine Hyperlipidämie nachweisbar, bei 16% eine Hypercholesterinämie und lediglich 16% waren an Diabetes mellitus erkrankt. Jedoch war bei 50% der Patienten eine KHK und bei 38% eine pAVK bekannt. Einen Tag präoperativ erfolgte stets eine Blutentnahme, im Rahmen derer ein kleines Blutbild angefertigt und außerdem Serum-Kreatinin und hsCRP bestimmt wurden. Das hsCRP betrug durchschnittlich  $2,01 \pm 3,58$  mg/dl. Die Kreatininwerte zeigten sich unauffällig mit durchschnittlich  $1,00 \pm 0,24$  mg/dl.

Die zehn Kontrollpräparate, welche mit Hilfe des Institutes für Rechtsmedizin bezogen wurden, stammten von zwei weiblichen und acht männlichen Personen. Das Durchschnittsalter lag bei  $54,8 \pm 8,5$  Jahren. Alle verwendeten Kontrollpräparate zeigten keine makroskopisch sichtbaren atherosklerotischen Veränderungen der Aorta.

### 3.2 *Optimierung immunhistochemischer Antikörper*

Bei der Optimierung der Antikörper gegen ADAM 8, 10, 15 und 17 kamen sowohl AAA-Präparate, als auch anderweitiges Gewebe, entsprechend der Angabe des Herstellers, zum Einsatz. Gegen ADAM 9 und 12 waren während der Phase der immunhistochemischen Untersuchungen keine geeigneten Antikörper verfügbar. Zur Bestimmung einer angemessenen Verdünnung, wurden an AAA-Präparaten und, gemäß Herstellerangabe, geeigneten Kontrollpräparaten mehrere Vorbehandlungsmethoden und schrittweise verschiedene Verdünnungen ausgetestet. Am Ende der Prozedur wurden stets Negativkontrollen angefertigt, dabei erfolgten alle Schritte identisch des immunhistochemischen Vorgehens, jedoch ohne Primärantikörper. So konnte sichergestellt werden, dass die terminale Färbereaktion lediglich gegen die zu detektierenden Strukturen gerichtet ist.

Die zusammengefassten Angaben zu Verdünnung, Vorbehandlung und Hersteller sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Nachfolgende Tabelle spezifiziert die zur Optimierung verwendeten Kontrollpräparate:

Antikörper	Verdünnung	Kontrollpräparate	Hersteller
ADAM 8	1:25 - 1:200	Tonsille, formalin- und paraffinfixiert	R&D Systems
ADAM 10	1:30 - 1:500	Pellets aus Jurkat- und K562-Zellkulturen, formalin- und paraffinfixiert	abcam
ADAM 15	1:50 - 1:200	Mamma-Karzinom, formalin- und paraffinfixiert	R&D Systems
ADAM 17	1:200 - 1:800	Mamma-Karzinom, formalin- und paraffinfixiert	R&D Systems
TIMP 1	1:50 - 1:200	Mamma-Karzinom, formalin- und paraffinfixiert	Lab Vision
TIMP 3	1:50 - 1:200	Gehirn und Niere, formalin- und paraffinfixiert	abcam

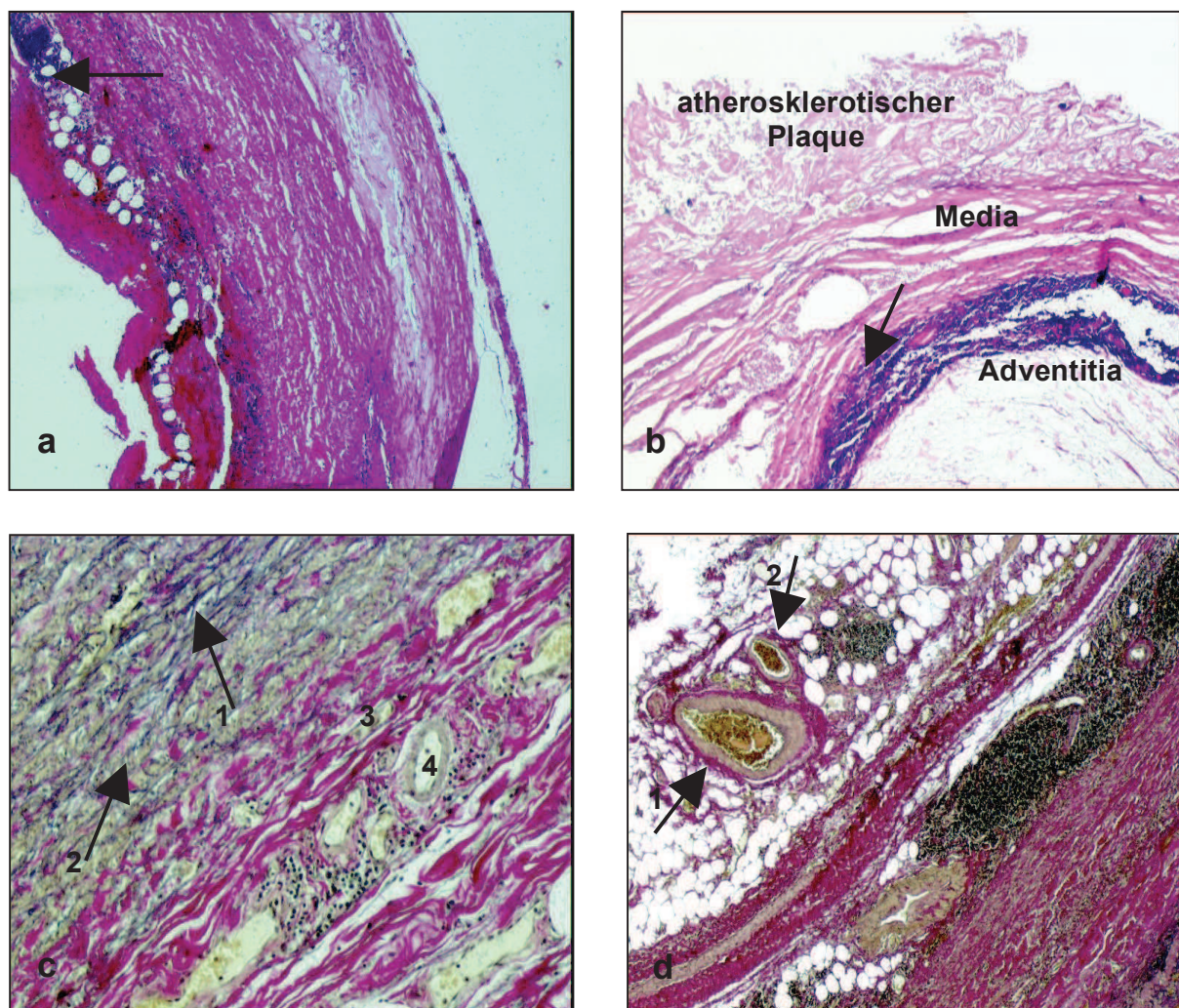
**Tabelle 8:** Kontrollpräparate zur Antikörperoptimierung an Kontrollpräparaten

### 3.3 Histologische Charakterisierung

Zur Beurteilung der Expressionslokalisation erfolgte zunächst eine allgemeine semiquantitative histologische Charakterisierung des Untersuchungsmaterials. Zu diesem Zweck kamen HE- und EvG-Färbungen zum Einsatz. Zur Objektivierung der Zelltypisierung dienten anti-CD68-, anti-vWF- und anti-smA-Färbungen. Dabei sollten zunächst Unterschiede der Zellzusammensetzung zwischen AAA-Präparaten und Kontrollen festgestellt werden. Ferner dienten diese Ergebnisse als Anhaltspunkt zur späteren Beurteilung der ADAM-spezifischen immunhistochemischen Untersuchung.

Zunächst wurde bei den AAA-Präparaten mittels HE-Färbung die Gesamtzellularität und Infiltratmenge bestimmt. Mit Hilfe der EvG-Färbung konnten insbesondere Kollagen- und Elastingehalt sowie SMC-Gehalt beurteilt werden (Abb. 9). Die AAA-Präparate zeigten, im Vergleich zu den Kontrollgefäßen, eine deutliche aufgelockerte Wandstruktur, welche mit einem Mangel an gesunden SMCs einhergeht (Abb. 9c). Zudem kommt es zu einem Elastizitätsverlust, welcher sich in einem verringerten Anteil elastischer Fasern widerspiegelt. Außerdem wiesen die AAA-Präparate, insbesondere zwischen Media und Adventitia, breite Infiltratsäume (Abb. 9a,b) auf. In Media und Adventitia der AAAs befanden sich zudem reife und unreife Neogefäße. Infiltrate und Neogefäße liegen in gesunden Aorten nicht vor. Abzugrenzen von Neogefäßen sind Vasa vasorum, welche sich physiologischerweise jedoch ausschließlich in der Adventitia befinden. Ausgeprägte Neogefäßbildung, innerhalb der Media und an der Grenze zur Adventitia, geht mit einer Einwanderung inflammatorischer Zellen einher. Anhand des Gehaltes an SMCs in den Neogefäßen, konnten frische von älteren Neogefäßen (Abb. 9d) unterschieden werden (Abb. 9). Tabelle 9 zeigt einen Überblick der Klassifizierung.



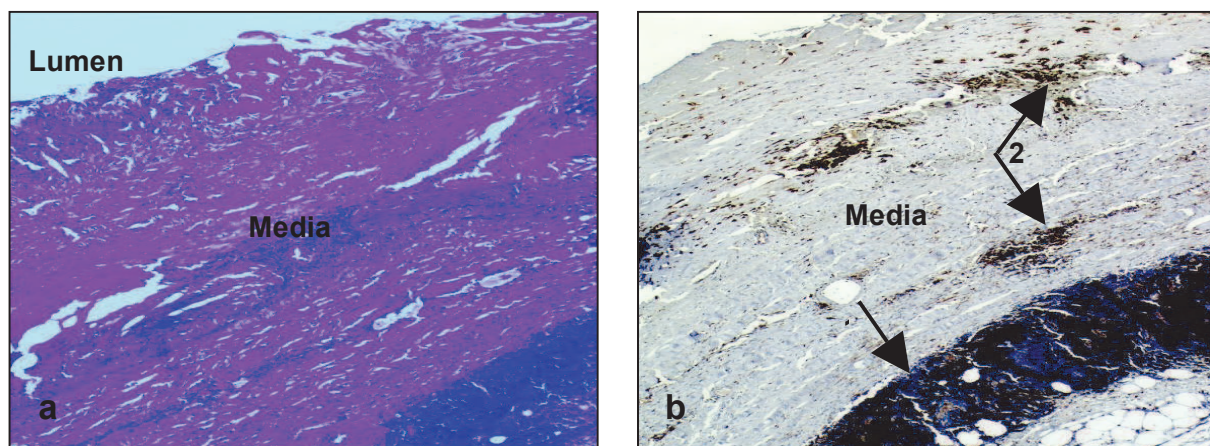


**Abbildung 9:** Beispiele von Standardfärbungen *a, b*) HE 62,5-fach vergrößert, Infiltrate (Pfeil, blau), *c*) EvG 250-fach vergrößert, Elastin (Pfeil 1, schwarz), SMCs (Pfeil 2, gelb), Kollagen (3, rot), Neogefäß (4), *d*) EvG 250-fach vergrößert, reifes Neogefäß (Pfeil 1 mit SMCs) und unreifes Neogefäß (Pfeil 2)

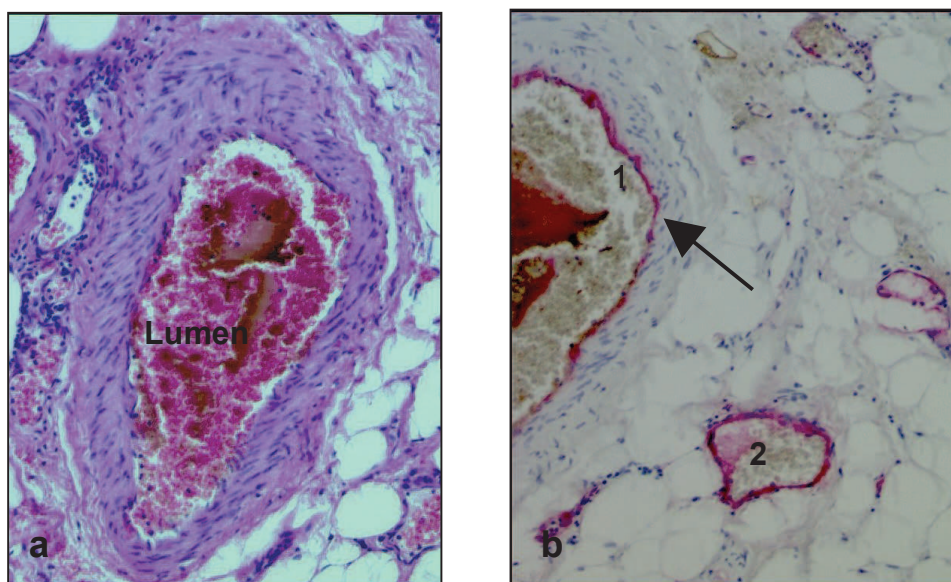
Alle Färbungen wurden auf konsekutiven Schnitten (Abb. 10, 11) angewandt, um die zelluläre Zusammensetzung der aneurysmatischen Aortenwand erfassen zu können. Anti-CD68 diente dem Nachweis von Makrophagen, dem überwiegenden Bestandteil der Infiltratsäume. Mit anti-CD68 konnten auch Schaumzellen angefärbt werden, welche sich in der atherosklerotisch veränderten Intima und Media befinden. Dabei handelt es sich um lipidbeladene Makrophagen.

Mithilfe von anti-vWF wurden Endothelzellen dargestellt. Diese Methode hilft insbesondere bei der Beurteilung von Neogefäßen, welche vor allem im Bereich der Adventitia zu finden sind (Abb. 11). Im Bereich der atherosklerotisch veränderten Intima sind jedoch in der Regel keine Endothelzellen mehr nachweisbar.



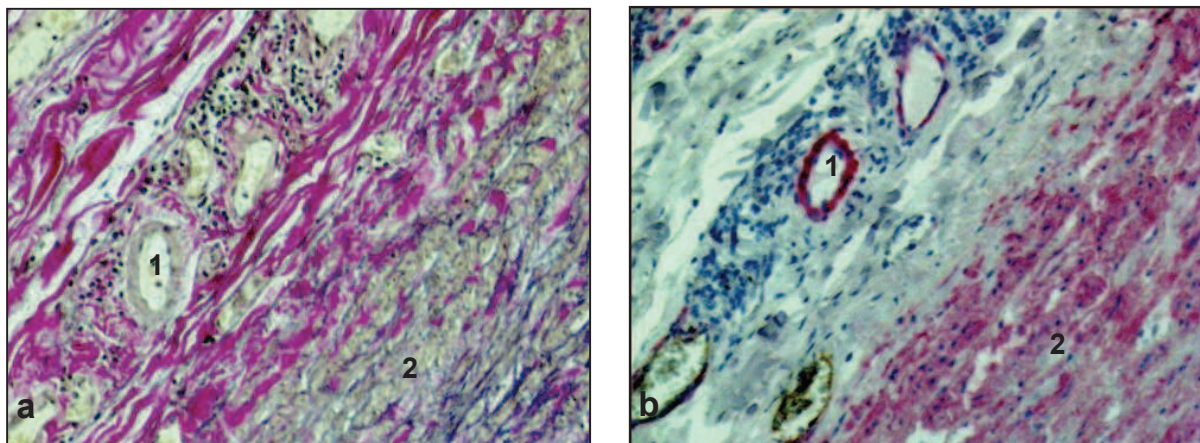


**Abbildung 10:** Beispiele von konsekutiven Schnitten, Übersichtsbilder  
 a) HE und b) anti-CD68, 62,5-fach vergrößert, Infiltratsaum (Pfeil 1, blau) zwischen Media und Adventitia mit b) überwiegendem Makrophagen-Anteil (schwarz) und weiteren Makrophagen-Einlagerungen (Pfeile 2) in der Media



**Abbildung 11:** Beispiele von konsekutiven Schnitten  
 a) HE, 500-fach vergrößert, reifes Neugefäß mit quer und längs angeschnittenen SMCs und b) anti-vWF, 500-fach vergrößert, reifes Neugefäß (1) mit SMCs und angefärbtem Endothel (Pfeil, rot) und unreife Neugefäße (2) mit angefärbtem Endothel (rot), jedoch ohne SMCs

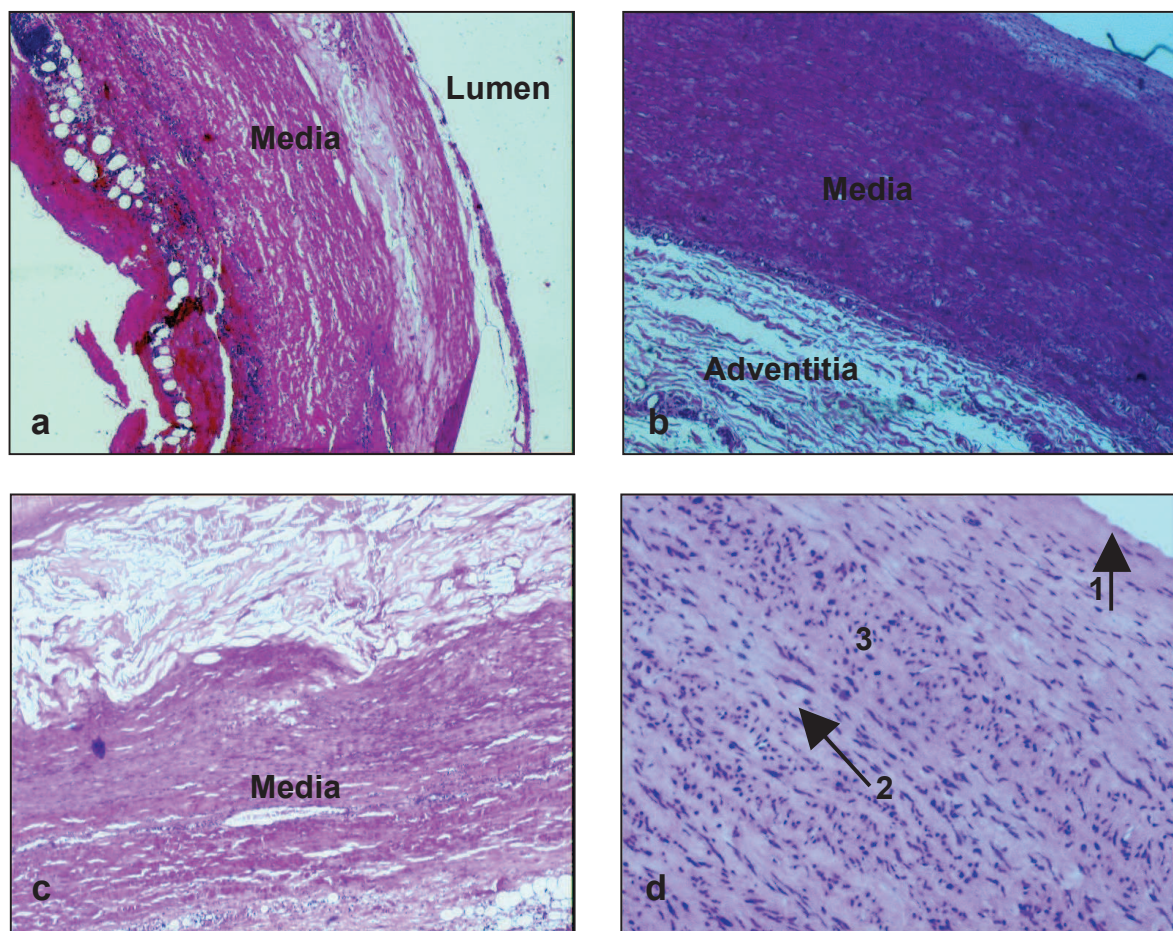
Anti-smA diente der Darstellung glatter Muskelzellen, welche sich hauptsächlich in der Media befinden. Reife Neugefäße enthalten ebenfalls glatte Muskelzellen, entsprechend einer Media (Abb. 12). Den meisten Neugefäßen fehlt jedoch diese stabilisierende Schicht glatter Muskelzellen.



**Abbildung 12:** Beispiele von konsekutiven Schnitten  
 a) EvG und b) anti-smA, 250-fach vergrößert, Neogefäße (1) in der Adventitia (linke Bildhälfte) und SMC (2) in der Media (rechte Bildhälfte). SMC (2) in a) gelb und in b) rot angefärbt, ebenso wie SMC des reifen Neogefäßes (1) in b)

Entsprechend wurde im Anschluss mit den Kontrollpräparaten verfahren. Aus einem ursprünglich größeren Kollektiv wurden lediglich zehn Präparate ausgewählt, welche in ihren histologischen Kriterien als identisch anzusehen waren. Dabei handelte es sich um Aortenpräparate von Patienten aus einem Alterskollektiv über 40 Jahre, welche keine Zeichen atherosklerotischer Degeneration der Aorta aufwiesen. Zunächst wurde bei Sichtung der Aorten die Auswahl der Kontrollpräparate nach makroskopischen Aspekten getroffen. Im Anschluss erfolgte eine histologische Untersuchung. Abbildung 13 zeigt die Gegenüberstellung eines AAAs (a, c) und einer Kontrollaorta (b, d). In der Kontrollaorta findet sich eine deutliche kompaktere Media und eine Adventitia, frei von Neogefäßen und Infiltraten. Die Media des AAAs hingegen ist aufgelockert und weist deutlich weniger stabilisierende SMCs auf. Im Vergleich zum AAA, weist die Kontrollaorta eine homogene Intima auf, welche mit einem Saum von Endothelzellen bedeckt ist. In der Adventitia der Kontrollaorta lassen sich zarte Gefäße erkennen. Dabei handelt es sich um Vasa vasorum, welche physiologischerweise in der Adventitia gesunder großer Gefäße auftreten.





**Abbildung 13:** Gegenüberstellung von AAA und gesunden Aorten  
*a, c*) AAA und *b, d*) gesunde Aorta HE, 62,5-fach vergrößert (*a*), 250-fach (*b, c*) und 500-fach vergrößert (*d*), in der gesunden Aorta findet sich eine deutliche kompaktere Media und eine Adventitia mit angeschnittenen Vasa vasorum, Media und Adventitia jedoch frei von Neogefäßen und Infiltraten, die Intima der gesunden Aorta zeigt sich deutlich homogener, in Abbildung *d*) kommen ECs (Pfeil 1) und längsangeschnittene SMCs (Pfeil 2) zur Darstellung, (3) zeigt eine Region querangeschnittener SMCs.

Tabelle 9 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der semiquantitativen histologischen Charakterisierung der AAA-Präparate. Bezüglich der Vorgehensweise der Auswertung wird auf den Methodenteil verwiesen (Kapitel 2).

Es wurden drei Intensitätsklassen mit Zwischenstufen vergeben: (-) keine Färbung, positive Färbung von einigen (+), den meisten (++) oder allen (+++) untersuchten Zellarten. Im Falle einer starken Abweichung der Färbung zwischen den einzelnen Präparaten oder auch innerhalb eines Präparates wurde (+/+++) vergeben. Nachdem die Ergebnisse der Kontrollen weitgehend identisch waren und das Bild einer gesunden, altersentsprechenden Aorta widerspiegeln, wurden die Werte zusammengefasst. Bei den Kontrollaorten waren zum Teil Vasa vasorum mit angeschnitten (Abb. 13b), welche physiologischerweise der Blutversorgung großer Gefäße dienen und daher kein pathologisches Korrelat darstellen.

Patient	Zellularität*	SMC	Elastin	Kollagen	Infiltrate	Makrophagen	Neogefäße	Verkalkung
1	++	+	-/+	++	+++	+	+++	+++
2	++	-/+	-/+	++	++	+++	++	++
3	+	+/-	+/-	+	+/-	+++	+/-	-
4	+++	+	++	+++	+++	+ (+++)	+++	+++
5	+++	+	+/-	+++	+++	+ (+++)	+++	+++
6	+++	++	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-
7	+++	+/-	+	+	+++	+++	+++	+/-
8	+++	+	+	++	++	+	+	++
9	+++	+/-	-	+	++	+++	+++	++
10	++	+	+	+++	+++	+	+	++
11	+++	+++	+++	+++	+++	+/-	++	-
12	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	-
13	+++	+++	+++	+	-	+/-	+++	-
14	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+++	+++
15	+++	+/-	+/-	+	++	+	++	-
16	++	+/-	+++	+	+/-	+/-	+	-
17	++	+/-	+++	++	+	+	+ (+/-)	+
18	++	+ (+/-)	++	+++	+	+	++	-
19	+++	+/-	+/-	+++	+	+/-	+/-	-
20	++	+++	+	+	+++	+++	+++	-
21-30**	+++	+++	+++	+++	-	-	-***	-

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der semiquantitativen histologischen Charakterisierung  
\* gesamte Zelldichte, inkl. Infiltrate, \*\* gleiche Ergebnisse für alle Kontrollen (21-30),  
\*\*\* bei großen Gefäßen finden sich Vasa vasorum, ohne pathologischen Wert

### 3.4 Immunhistochemische Untersuchung

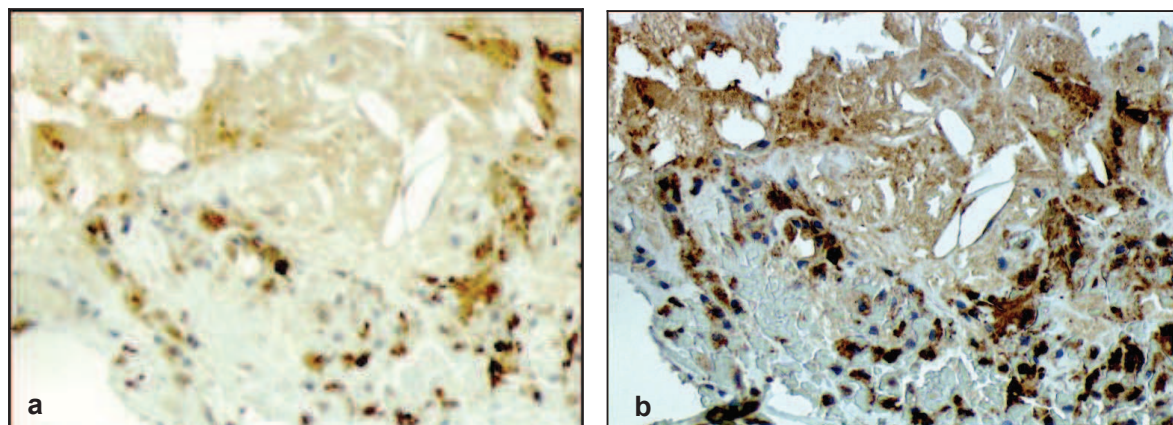
Nach bereits beschriebenen Kriterien (Kapitel 3.3), wurde die Lokalisation der Expression von ADAMs und TIMPs begutachtet.

Selbstverständlich lassen die Intensitäten der Färbung nur bedingt Rückschlüsse auf die Stärke der Expression zu. Eine quantitative Einschätzung erfolgte daher mittels qRT-PCR. Vielmehr ging es darum, ADAMs und TIMPs in ihren Expressionseigenschaften untereinander zu vergleichen und dabei die Expression einzelner Zellgruppen gegenüberzustellen. Es sei darauf verwiesen, dass nachfolgende Ergebnisse keine quantitative Messung, wie beispielsweise durch die qRT-PCR ersetzt werden können, sondern lediglich eine grobe Abschätzung darstellen. Mit diesem Wissen sind auch die nachfolgenden Säulendiagramme zu betrachten.

#### 3.4.1 Analyse der Expressionsmuster

Die Skalierung der beigefügten Diagramme beruht auf einer Umrechnung der Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung. Die immunhistochemischen Färbungen der folgenden Aufnahmen stellen sich bräunlich dar. Aufgrund der Gegenfärbung mit HE erscheinen Zellkerne blau. Insbesondere bei nicht immunhistochemisch angefärbten Zellkernen ist die blaue Gegenfärbung gut zu erkennen.

Es wurde auf gesonderte Aufnahmen von Makrophagen verzichtet, da diese größtenteils in kleinen verstreuten Gruppierungen auftreten und im Gesamtbild zu betrachten sind. Abbildung 14 zeigt stellvertretend ein Beispiel einer deutlichen Makrophagen-Ansammlung und die zugehörige Kontrollfärbung mit anti-CD-68.



**Abbildung 14:** a) anti-ADAM 15, b) anti-CD-68, 250-fach und 500-fach vergrößert



Wie bereits in Kapitel 2.3.9 erläutert, wurden Färbungen im Bereich des Atheroms (Abb.14) nicht in die Bewertung der Expression einbezogen.

Ebenfalls gingen Endothelzellen (EC) des Lumens nicht in die Bewertung mit ein. Für ADAM 15 und 17 waren positiv angefärbte Endothelzellen nachweisbar (Abb. 15), wenn auch nur in wenigen Fällen. Insgesamt waren in den untersuchten Präparaten die Endothelzellen rarefiziert. Das lässt sich sowohl durch Fixierungsartefakte, als auch durch den atherosklerotischen Wandumbau und das Vorliegen des intraluminalen Thrombus erklären, siehe Kapitel 1.3.1.



**Abbildung 15:** angefärbte ECs (Pfeil), anti-ADAM-17-Färbung, 500-fach vergrößert

ADAM 8 war immunhistochemisch nur schwach nachzuweisen. Die stärkste Expression zeigte sich in Makrophagen. In stark infiltrierten Bereichen fanden sich nur vereinzelt positive Zellen. Ähnlich verhielt sich ADAM 10. Auch hier zeigte sich die stärkste Expression in Makrophagen. SMCs färbten sich, verglichen mit den übrigen ADAMs, nur schwach an. Im Vergleich zu AAA-Präparaten, stellten sich die SMCs der Kontrollen in einer ähnlichen Intensität dar.

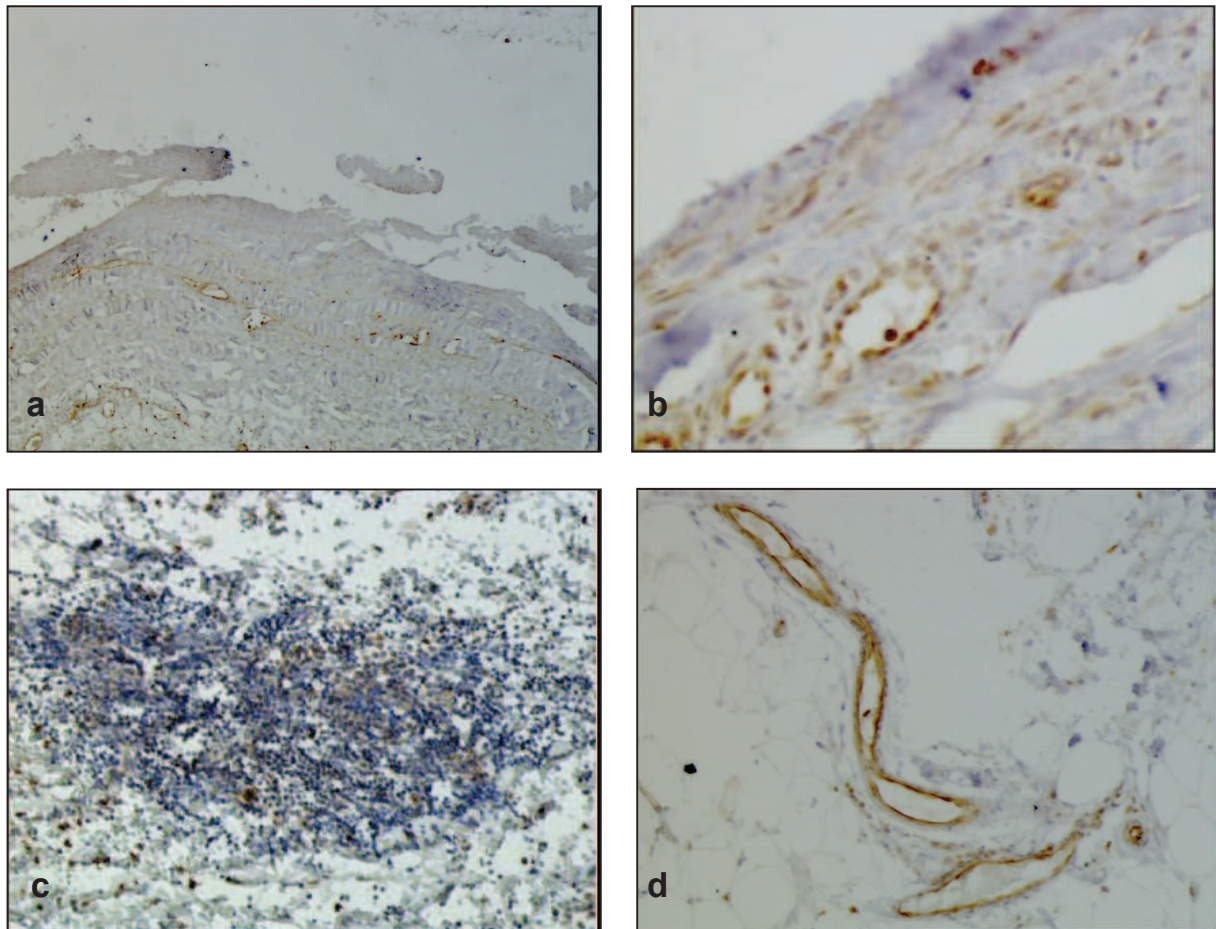
Im Gegensatz dazu, wies ADAM 15 in allen Kategorien deutliche Färbungen auf. Auffallend starke optische Signale zeigte ADAM 17. Bei Betrachtung der Infiltrate imponierte eine deutlich intensivere Färbung als bei den übrigen ADAMs. Auch in der Kategorie Neogefäße wies ADAM 17 eine der stärksten Färbungen auf. TIMP 1 zeigte ebenfalls in Infiltraten und Makrophagen die größten Farbintensitäten. TIMP 3 hingegen war insgesamt nur schwach immunhistochemisch zu detektieren. Lediglich die Makrophagen zeigten eine deutliche Expression. Allerdings fiel bei der Analyse der semiquantitativen Auswertung von TIMP 3 eine deutliche Fluktuation zwischen den einzelnen Präparaten auf, welche bei allen anderen

immunhistochemisch untersuchten Markern wesentlich schwächer ausfiel. Genannte Fluktuation bezieht sich auf die Ergebnisse für Makrophagen und Infiltrate.

Im Folgenden finden sich repräsentative Fotografien der immunhistochemisch untersuchten ADAMs und TIMPs. Des Weiteren werden, mit Hilfe von Säulendiagrammen, die Ergebnisse der einzelnen Kategorien dargestellt. Es sei darauf verwiesen, dass nachfolgende Diagramme keine absoluten Werte darstellen, sondern lediglich eine Visualisierung der semiquantitativen Auswertung der Immunhistochemie verwirklichen.

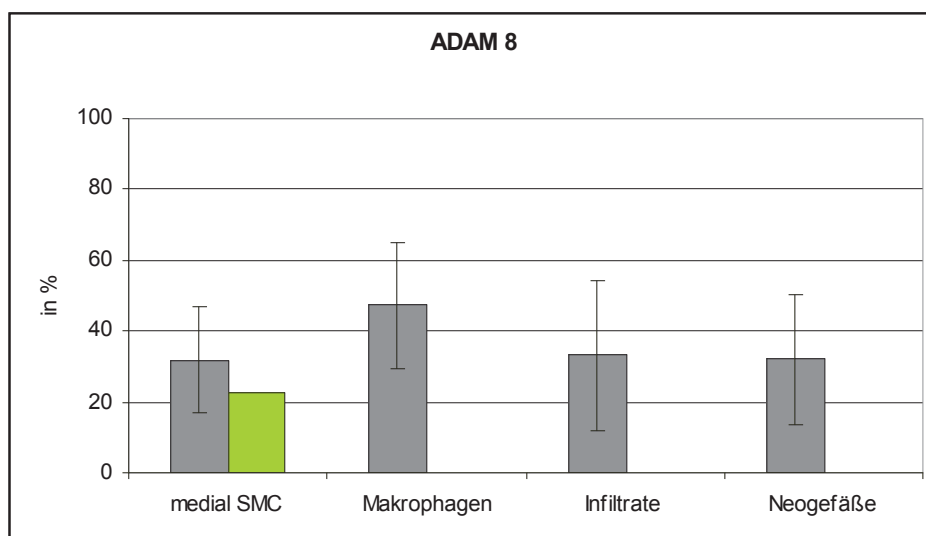


### 3.4.1.1 ADAM 8



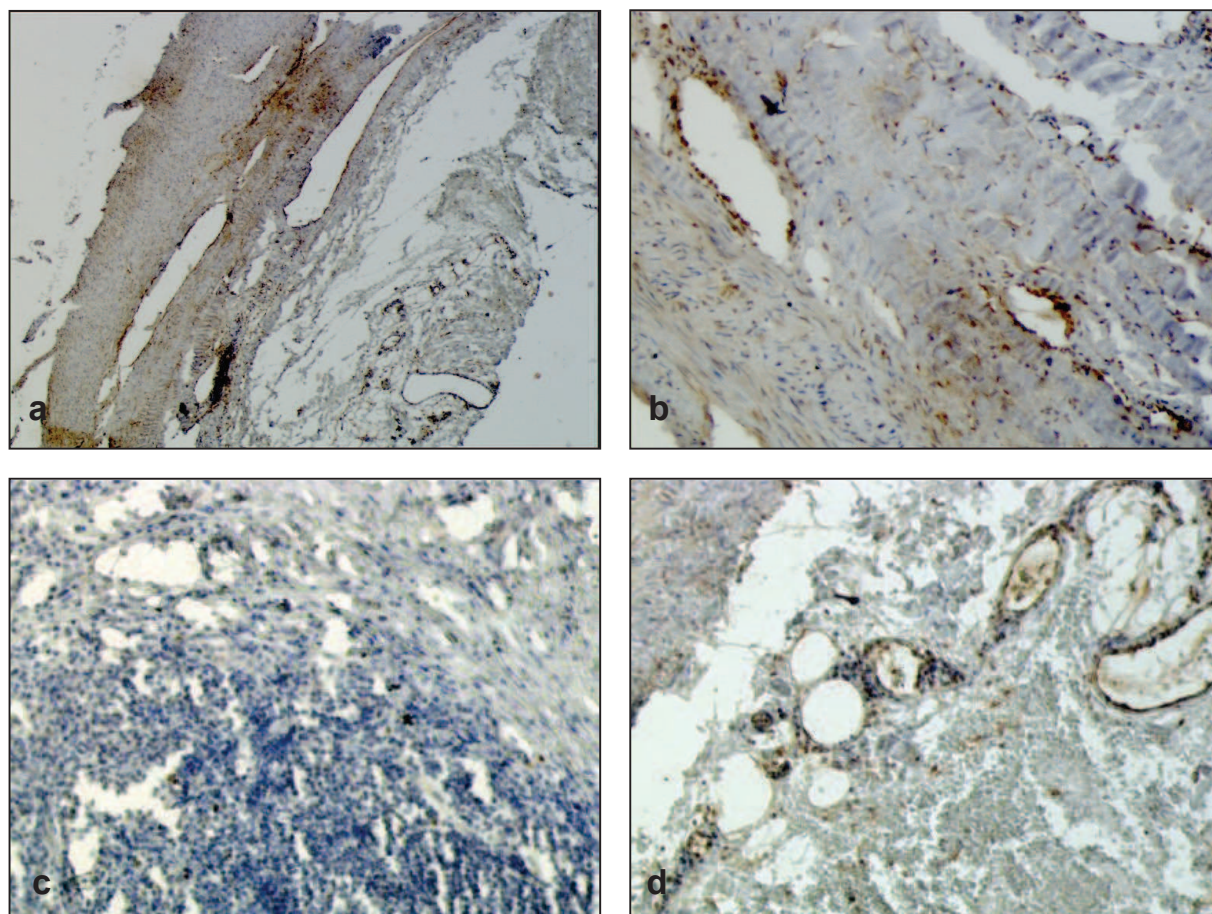
**Abbildung 16:** Expression von **ADAM 8**

a) Übersichtsaufnahme, 62,5-fach vergrößert, b) deutliche Färbung von SMCs (spindelförmig), ebenfalls Neugefäße abgebildet, 500-fach vergrößert c) wenige angefarbte Zellen in einem Infiltrat (blau) 250-fach vergrößert, d) deutlich angefarbte Neugefäße in der Adventitia, 250-fach vergrößert



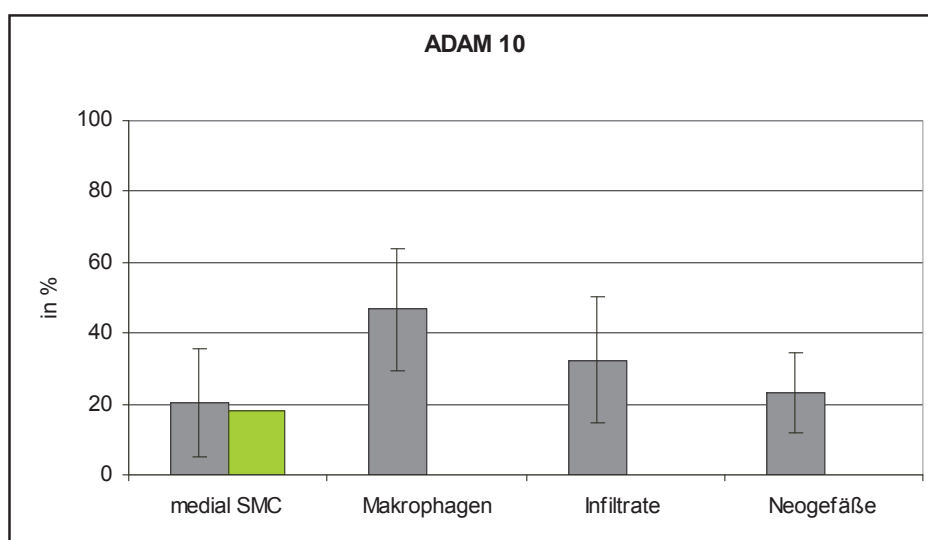
**Abbildung 17:** Expressionslokalisationen von **ADAM 8**, Kontrollen in grün dargestellt (in den Kontrollgefäßen befanden sich weder Infiltrate noch Neugefäße, physiologisch vorhandene Vasa vasorum wurden nicht gewertet), Standardabweichung eingezeichnet, Skala: Umrechnung aus Mittelwerten der semiquantitativen Auswertung (- bis +++) mit einer fixen 100%-Marke

### 3.4.1.2 ADAM 10



**Abbildung 18:** Expression von **ADAM 10**

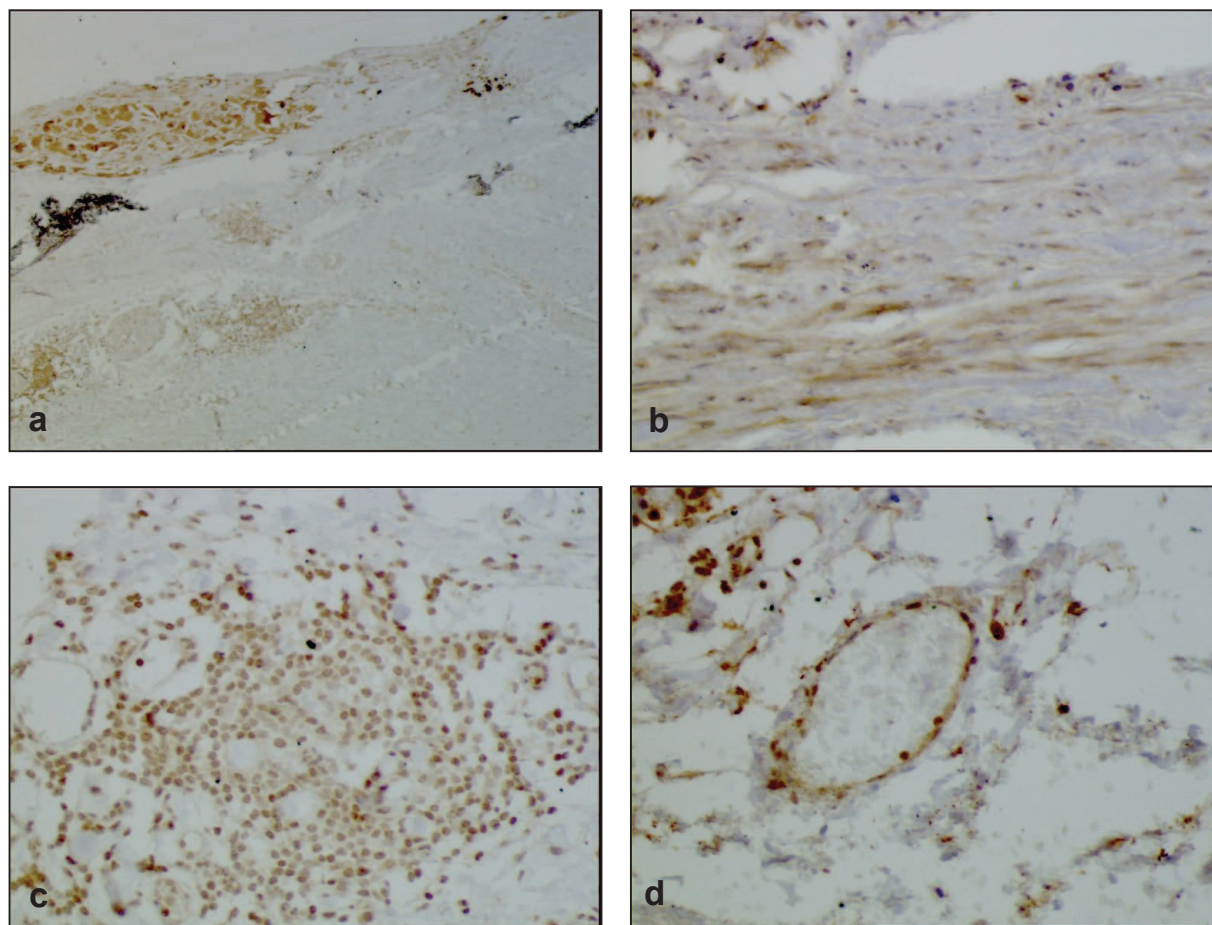
a) Übersichtsaufnahme, 62,5-fach vergrößert, b) deutlich gefärbte SMCs (v.a. links unten) und Neugefäße, teilweise mit Infiltraten in Endothelnähe, 250-fach vergrößert c) Infiltrat (blau) mit vereinzelt angefärbten Zellen, 250-fach vergrößert d) mäßig angefärbte Neugefäße in der Adventitia und angefärbtes Infiltrat (rechts oben), 250-fach vergrößert



**Abbildung 19:** Expressionslokalisationen von **ADAM 10** (siehe Kommentar Abb.17)

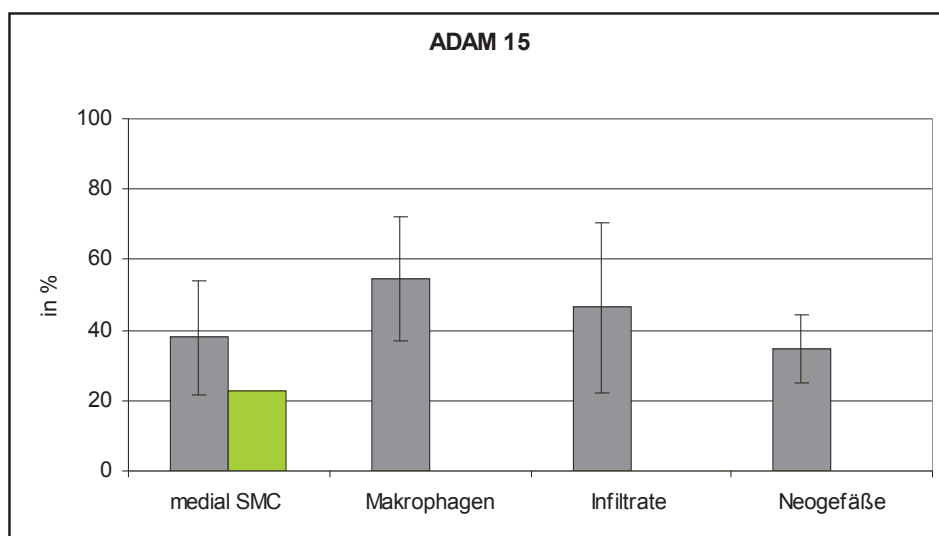


### 3.4.1.3 ADAM 15



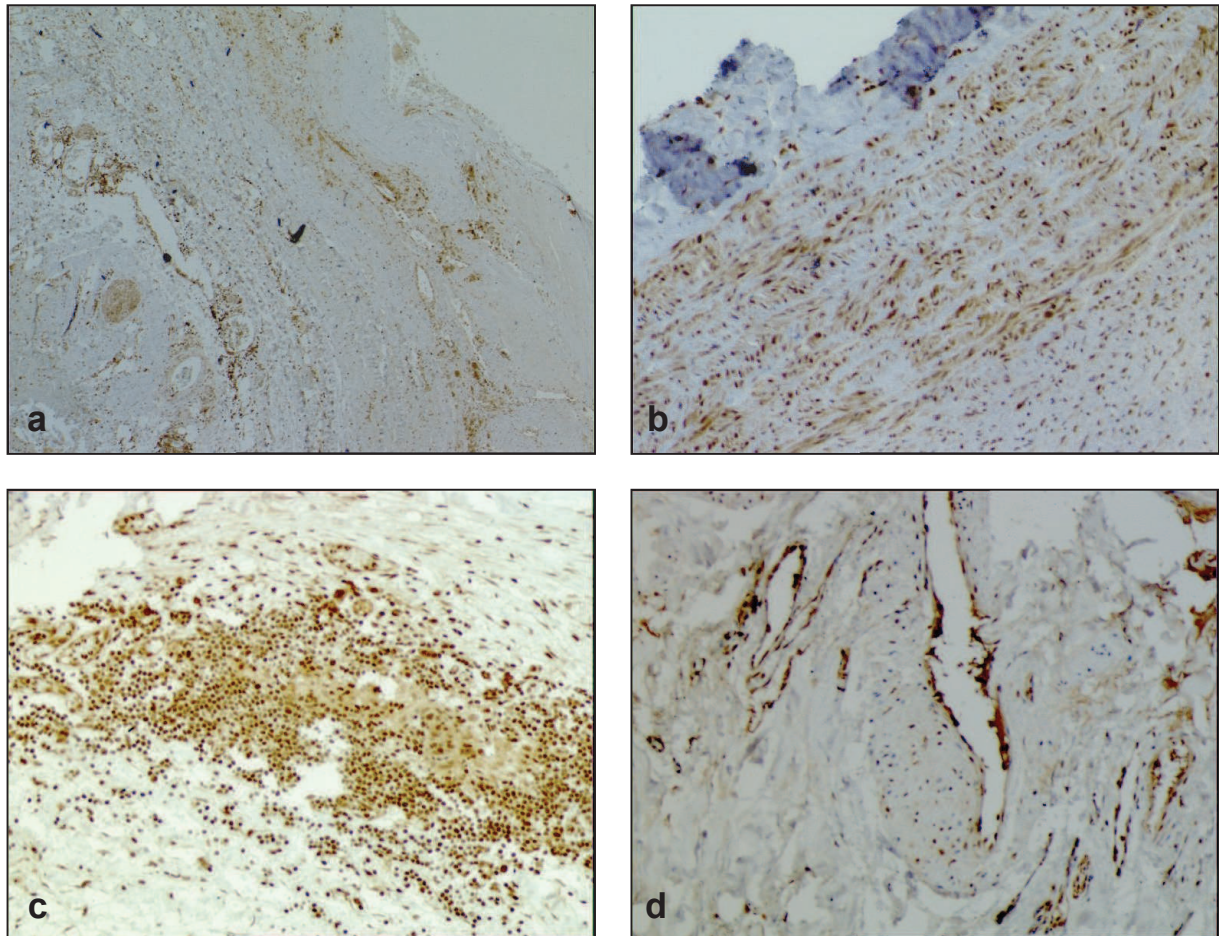
**Abbildung 20:** Expression von **ADAM 15**

a) Übersichtsaufnahme, 62,5-fach vergrößert, b) SMCs, 500-fach vergrößert, c) Infiltrat mit mäßiger Färbung aller Zellen, 500-fach vergrößert d) Neogefäß in der Adventitia und Färbung von umliegenden Makrophagen, 500-fach vergrößert



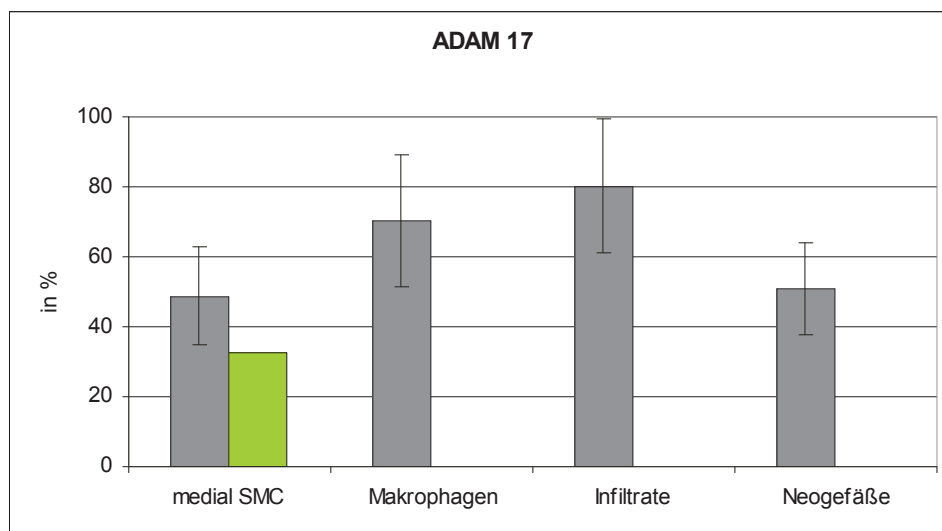
**Abbildung 21:** Expressionslokalisationen von **ADAM 15** (siehe Kommentar Abb.17)

### 3.4.1.4 ADAM 17



**Abbildung 22:** Expression von **ADAM 17**

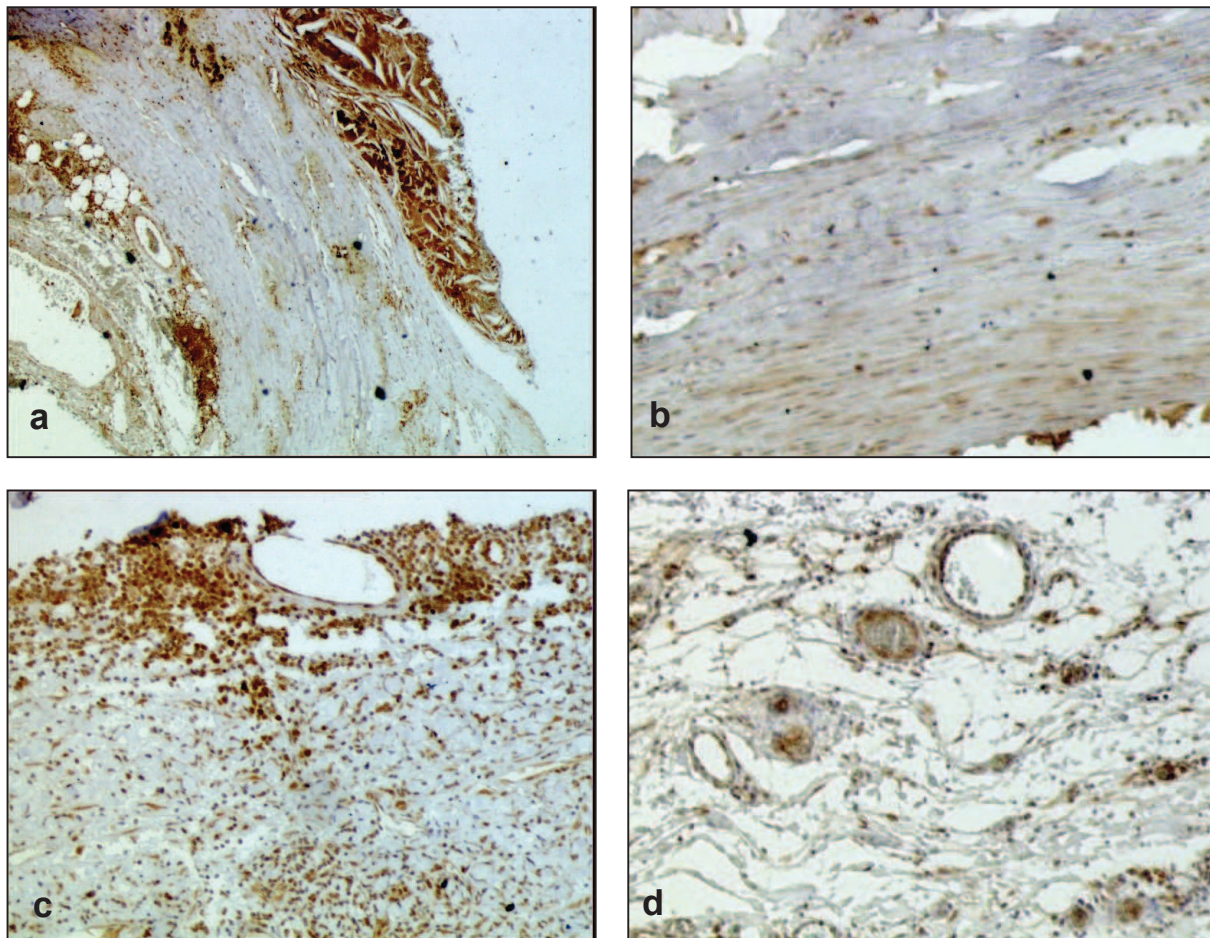
a) Übersichtsaufnahme, 62,5-fach vergrößert, b) kräftig angefärbte SMCs, 250-fach vergrößert, c) Infiltrat mit deutlicher Färbung aller Zellen, 250-fach vergrößert, d) zahlreiche Neogefäße mit kräftiger Färbung, mittig großes reifes Neogefäß, 250-fach vergrößert



**Abbildung 23:** Expressionslokalisationen von **ADAM 17** (siehe Kommentar Abb.17)

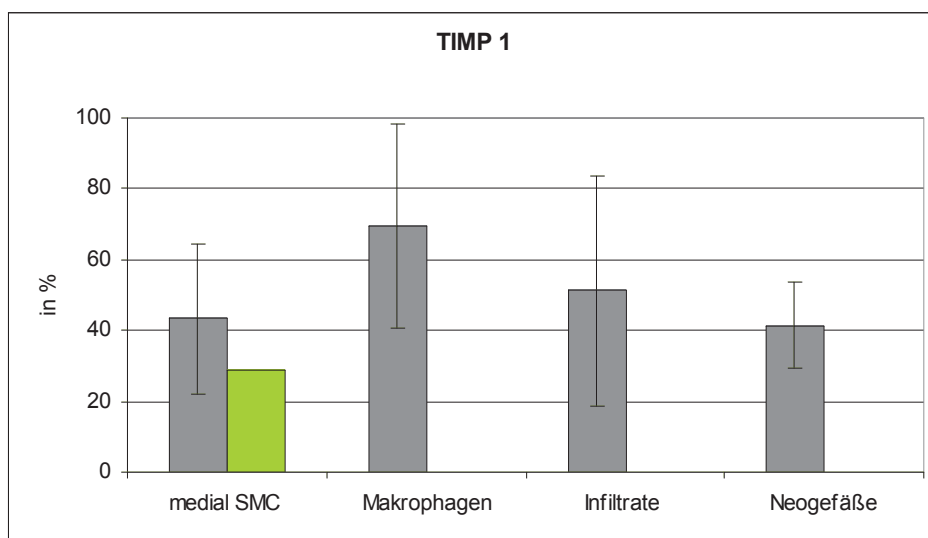


### 3.4.1.5 TIMP 1



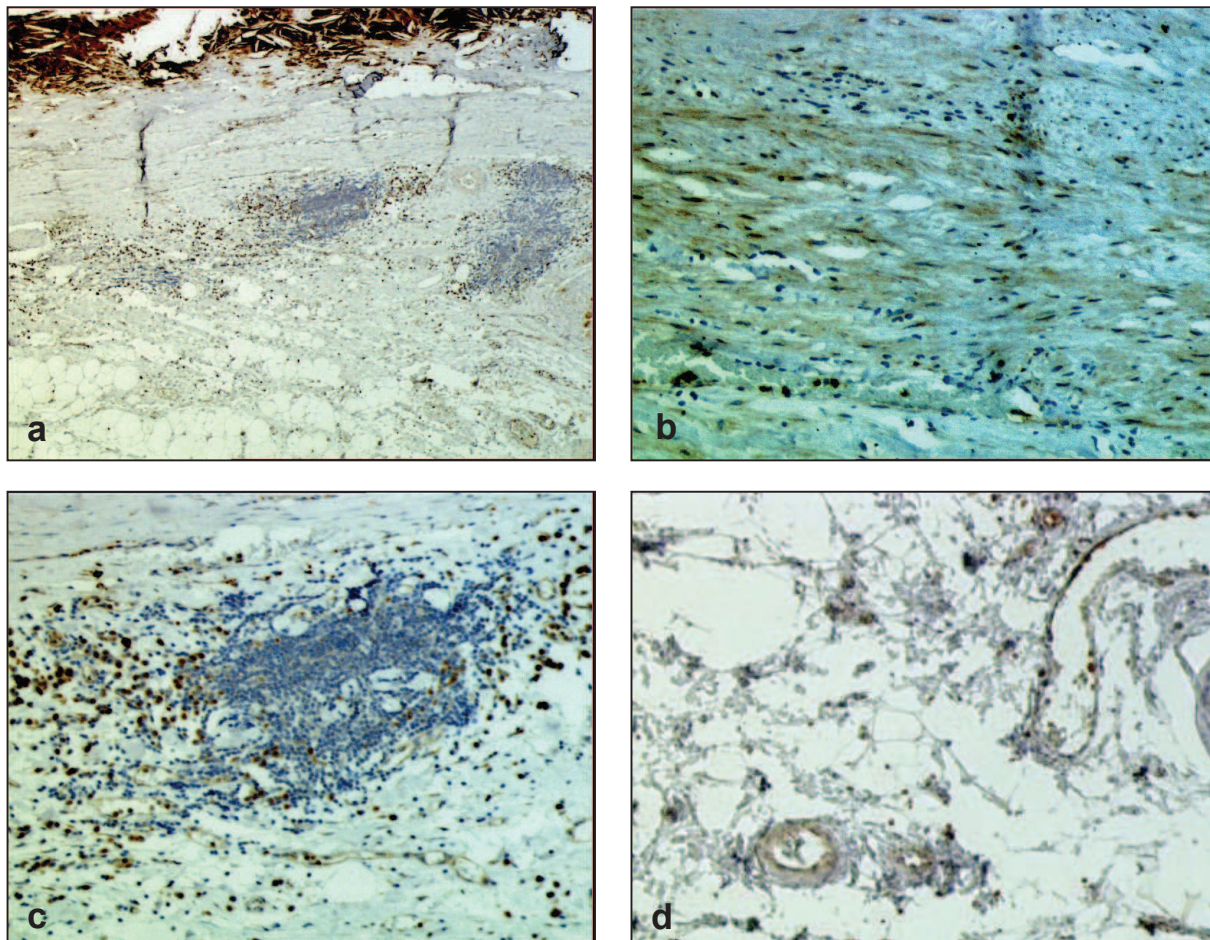
**Abbildung 24:** Expression von **TIMP 1**

a) Übersichtsaufnahme mit angefärbtem Atherom – geht nicht in die Bewertung ein, 62,5-fach vergrößert, b) stark angefärbte SMCs, 250-fach vergrößert, c) Infiltrat mit starker Färbung aller Zellen und Neugefäß, 250-fach vergrößert, d) mäßig angefärbte Neugefäße in der Adventitia, umgeben von diffusen Infiltraten, 250-fach vergrößert



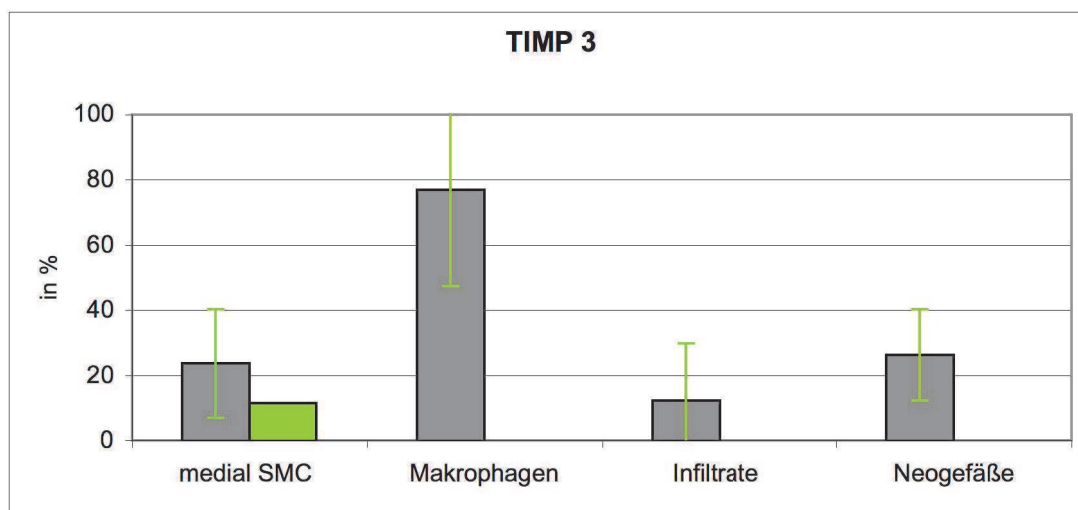
**Abbildung 25:** Expressionslokalisationen von **TIMP 1** (siehe Kommentar Abb.17)

### 3.4.1.6 TIMP 3



**Abbildung 26:** Expression von **TIMP 3**

a) Übersichtsaufnahme, 62,5-fach vergrößert, b) deutliche Färbung aller SMCs, 250-fach vergrößert, c) Infiltrat mit Färbung weniger Zellen, 250-fach vergrößert, d) leicht angefärbte Neugefäße in der Adventitia, 250-fach vergrößert

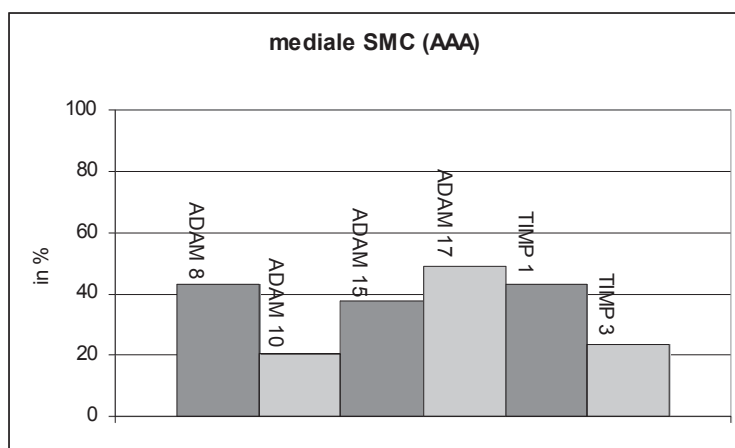


**Abbildung 27:** Expressionslokalisationen von **TIMP 3** (siehe Kommentar Abb.17)



### 3.4.2 Gegenüberstellung der Expressionsmuster

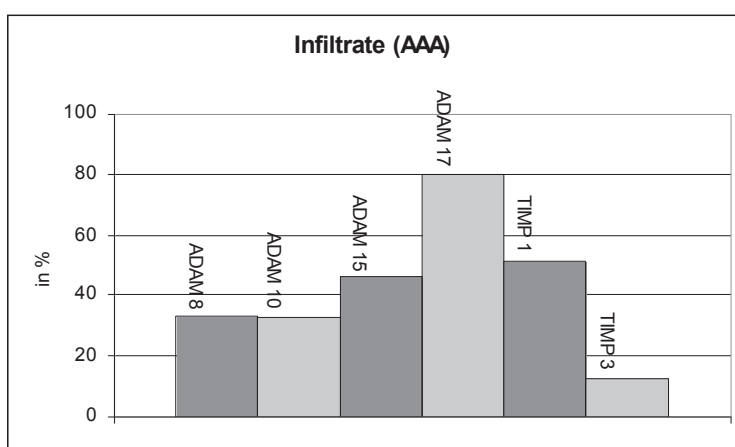
Nachfolgend sollen die Expressionsmuster der ADAMs und TIMPs verglichen werden. Erneut sei drauf verwiesen, dass nachfolgende Grafiken keine absoluten Werte enthalten und lediglich der Veranschaulichung immunhistochemischer Abstufungen dienen. Zusammenfassend zeigten alle untersuchten Marker eine deutliche Färbung der SMCs, mit Ausnahme von ADAM 10 und TIMP 3, welche sich schwächer darstellten (Abb. 28).



**Abbildung 28:** Überblick SMC Immunhistochemie

Skala: Umrechnung aus Mittelwerten der semiquantitativen Auswertung (- bis +++) mit einer fixen 100%-Marke

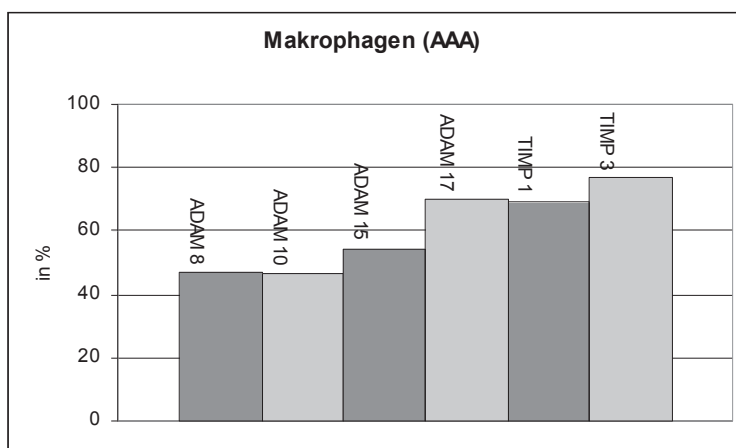
Bei der Auswertung der Infiltrate, wies ADAM 17 mit Abstand die stärkste Färbung auf. ADAM 8 und 10 zeigten nur vereinzelte positive Färbungen. Bei TIMP 3 stellten sich die Infiltrate insgesamt am schwächsten dar (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Überblick Infiltrate Immunhistochemie, (siehe Kommentar Abb. 28)

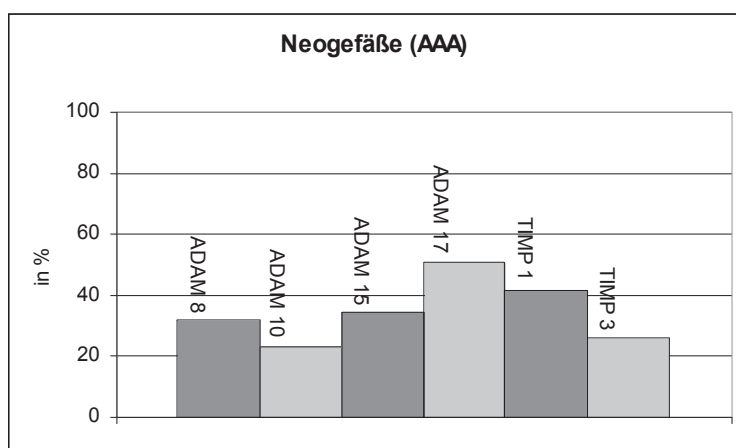
In der Kategorie Makrophagen konnten für alle Marker deutliche bis starke Signale verzeichnet werden (Abb. 30).





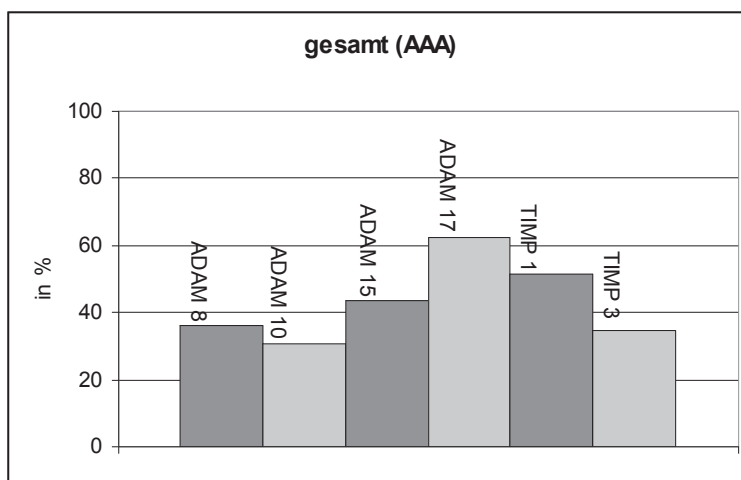
**Abbildung 30:** Überblick Makrophagen Immunhistochemie, (siehe Kommentar Abb. 28)

Die Auswertung der Neogefäße zeigte gleichmäßig deutliche, wenn auch weniger starke, Farbintensitäten (Abb. 31).

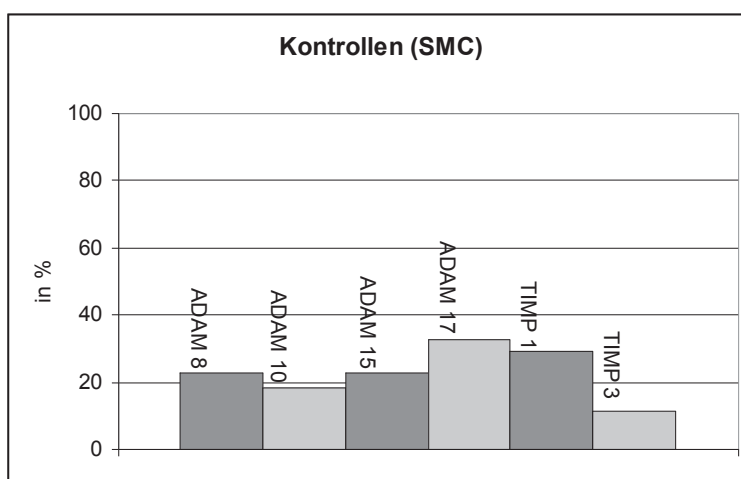


**Abbildung 31:** Überblick Neogefäße Immunhistochemie, Skala (siehe Kommentar Abb. 28)

Insgesamt wies ADAM 17 bei der lichtmikroskopischen Auswertung die stärksten optischen Signale auf. Abbildung 32 zeigt die graphische Aufarbeitung der Gesamtexpression.

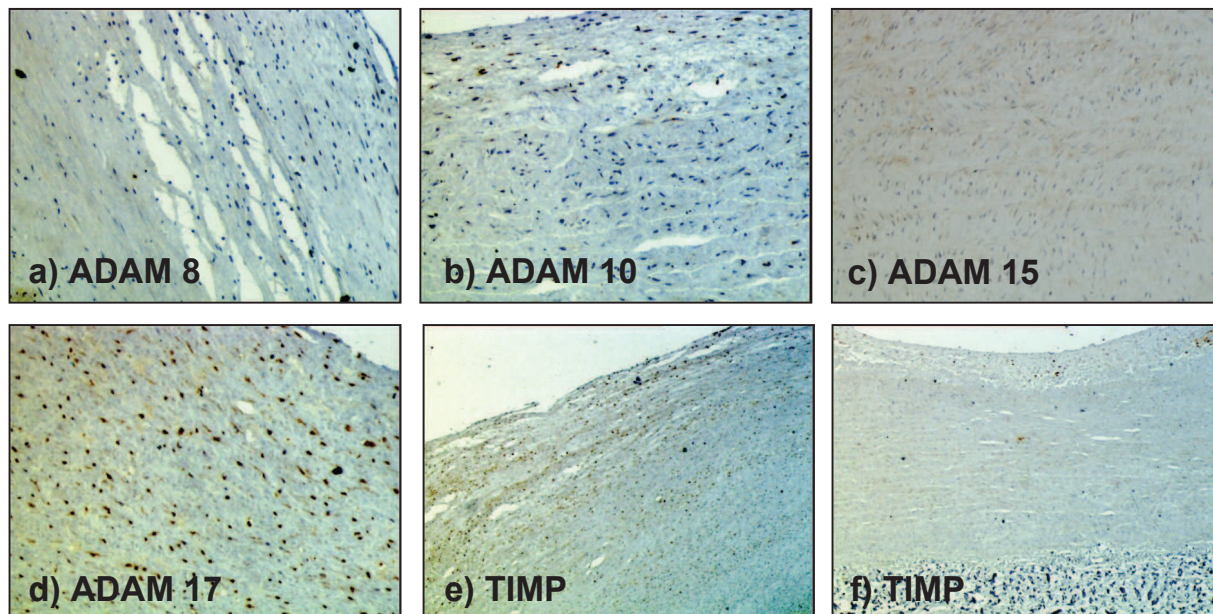


**Abbildung 32:** Gesamtübersicht Immunhistochemie AAA, (siehe Kommentar Abb. 28)



**Abbildung 33:** Gesamtübersicht Immunhistochemie Kontrollen, (siehe Kommentar Abb. 28)

Die Färbungen der Kontrollen waren insgesamt schwächer als die der AAA-Präparate (Abb. 32 und 33). Ein immunhistochemischer Expressionsnachweis zeigte sich nur in den SMCs (Abb. 34). Dabei wiesen meist lediglich die Zellkerne der SMCs eine Färbung auf. Die Abbildungen 34c und d (ADAM 15 und 17) zeigen außerdem SMCs mit bräunlich angefärbtem Zytoplasma. Infiltrate und Makrophagen waren in den Kontrollpräparaten nicht vorhanden, da diese Korrelate der pathologischen Veränderung darstellen. Gleiches gilt für Neogefäße, welche keinesfalls mit physiologisch auftretenden Vasa vasorum gleichzusetzen sind. Insgesamt zeigten die Kontrollpräparate, wie bereits vorbeschrieben, ein deutlich homogeneres Bild mit einer kompakten Media bestehend aus vitalen SMCs.

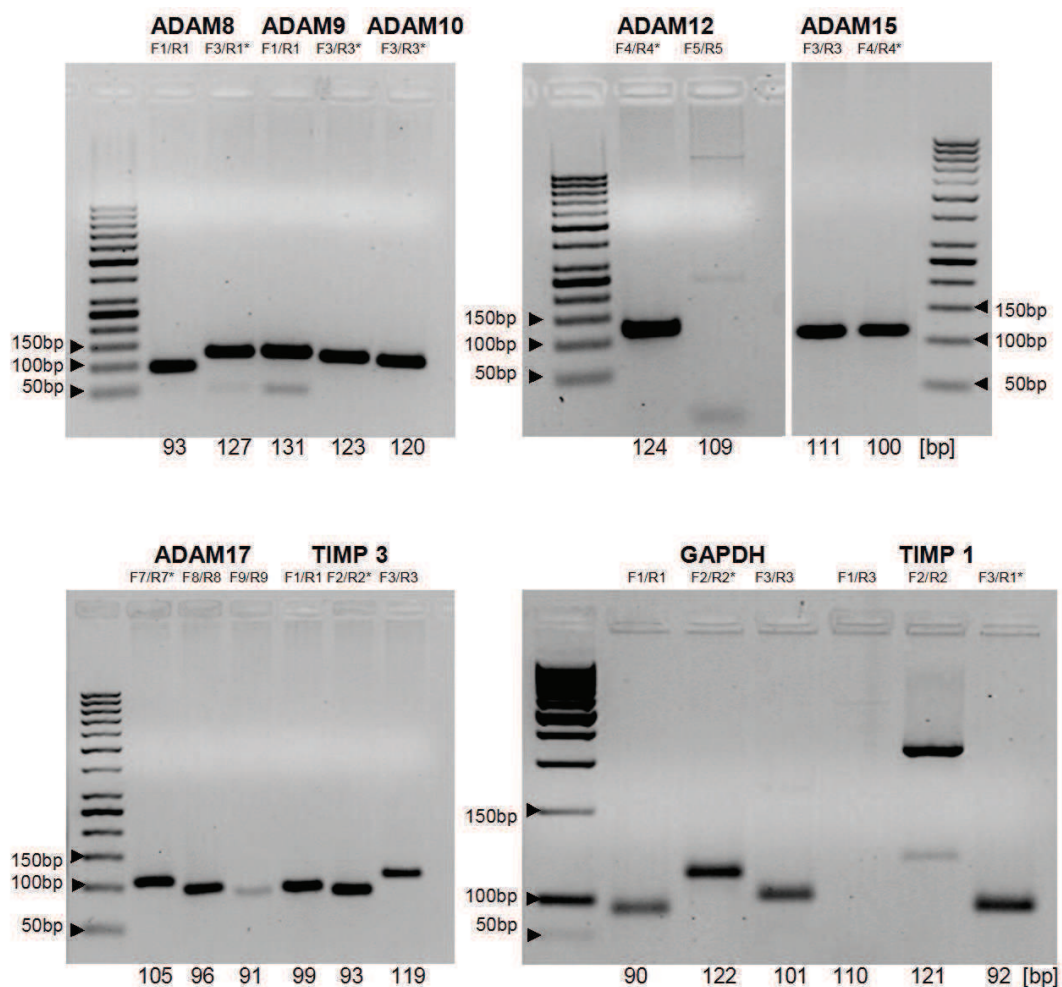


**Abbildung 34:** Kontrollpräparate, *a-d*) 250-fach vergrößert, *e) und f)* 62,5-fach vergrößert, Zellkerne (braun) von SMCs bei den 250-fachen Vergrößerungen gut sichtbar, in *c)* auch Zytoplasma von SMCs angefärbt

### **3.5 Primeroptimierung für die qRT-PCR**

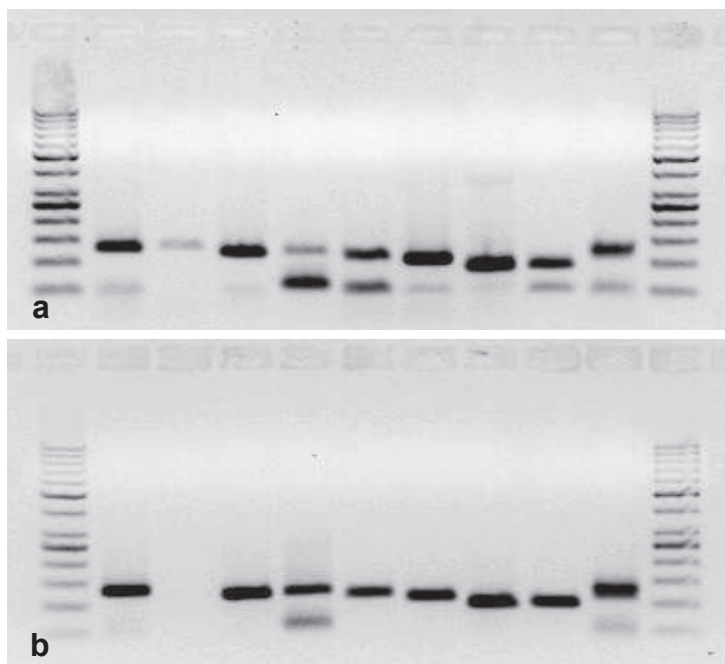
Im Rahmen der qRT-PCR kann die Expression auf RNA-Ebene quantifiziert werden. Die Hintergründe zur Durchführung der qRT-PCR wurden bereits in Kapitel 2.4 erläutert. Es mussten zunächst passende Primerpaare gefunden werden. Bezüglich der Vorgehensweise der Optimierung wird ebenfalls auf Kapitel 2.4 verwiesen. Die nachfolgenden Grafiken zeigen Ausschnitte von Gelelektrophoresen der PCR-Produkte. Die Optimierung fand zunächst an DNA-Proben statt, um sicherzugehen, dass nur eine einzelne und eindeutig zu erwartende Bande erscheint. Sie wurde später mit DNA-freien cDNA-Proben verifiziert (Abb. 37). Die Fragmentlängen der Endprodukte sind Abbildung 35 zu entnehmen. Aufgrund von Strangbrüchen durch die Formalinfixierung wurden möglichst kleine Fragmente von maximal 150 bp verwendet.

Zunächst wurden für jedes Enzym drei Primerpaare designt. Dabei wurde zum einen auf die Größe des Produktes geachtet, zum anderen musste sichergestellt werden, dass das Produkt in seiner Gänze auf nur einem Exon liegt. Bei Bedarf wurden weitere Primerpaare ausgewählt. Die endgültigen Primerpaare sind Tabelle 5 zu entnehmen. Abbildung 35 zeigt während der Primeroptimierung entstandene Gelelektrophoresen. Die Primerpaare bestehen aus forward- (F) und reverse- (R) Primern und sind fortlaufend nummeriert.



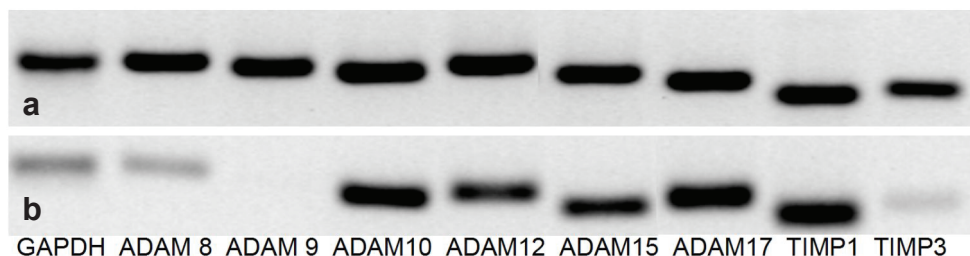
**Abbildung 35:** Primeroptimierung für qRT-PCR, endgültige Primerpaare sind mit (\*) gekennzeichnet  
 PCR-Konditionen: 2 µl DNA, 40 Zyklen, 95°C 30 Sekunden, 60°C 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden,  
 DNA-Leiter 50 bp

Für alle Primerpaare wurde zunächst mit einer Annealing-Temperatur von 60°C begonnen, welche ungefähr der primerspezifischen Schmelztemperatur entsprach. Später folgte noch eine Gegenüberstellung der endgültigen Primer bei 55 und 60°C. Dabei zeigte ADAM 9 bei 55°C das bessere Ergebnis (Abb. 36). GAPDH hatte die höchste Schmelztemperatur, für beide verwendeten Primer war 64°C seitens des Herstellers angegeben, daher wurde für GAPDH die Annealing-Temperatur auf 62°C erhöht.



**Abbildung 36:** Primeroptimierung bei 55 und 60°C

Reihenfolge: ADAM 8 (Spur 1), 9 (Spur 2), 10 (Spur 3), 12 (Spur 4), 15 (Spur 5), 17 (Spur 6), TIMP 1 (Spur 7), 3 (Spur 8), GAPDH (Spur 9); ADAM 9 zeigt als einziger Marker bei 55°C bessere Ergebnisse; PCR-Konditionen: 2 µl cDNA, 40 Zyklen, 95°C 30 Sekunden, 55°C (a) bzw. 60°C (b) 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden, DNA-Leiter 50 bp (Bildrand rechts und links)



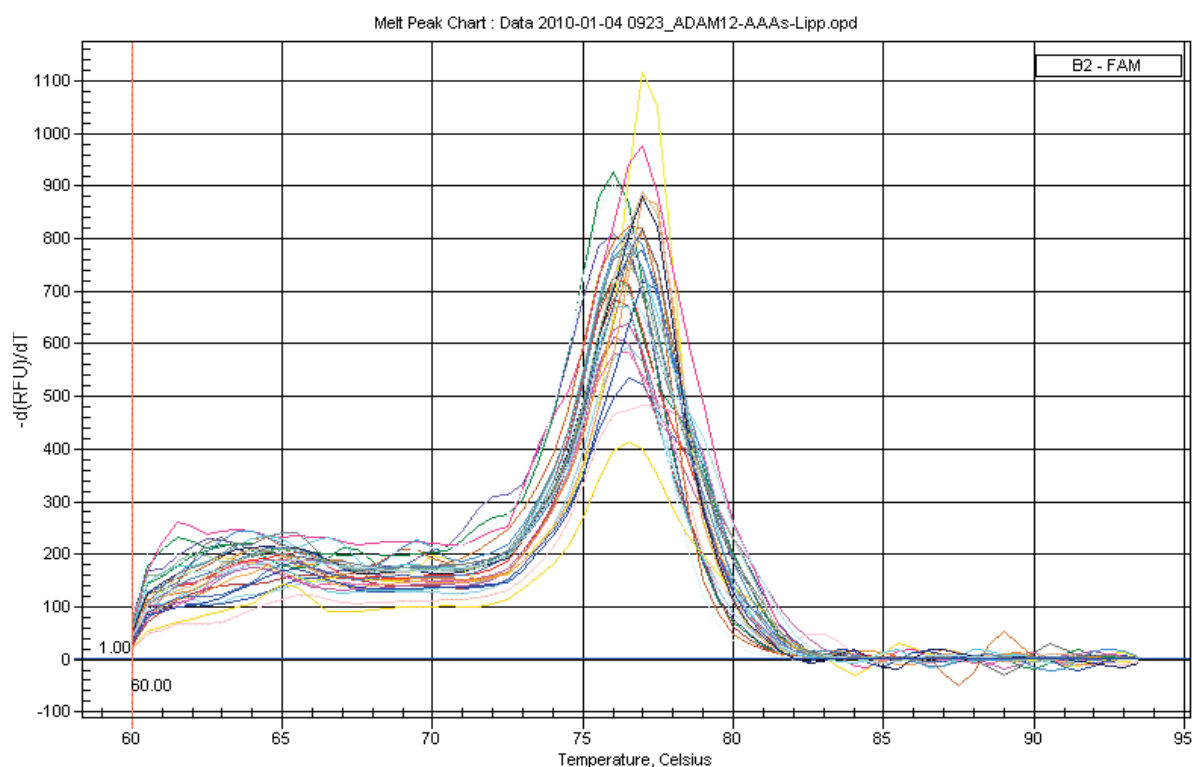
**Abbildung 37:** Primeroptimierung mit DNA (a) und cDNA (b)

PCR-Konditionen: 2 µl cDNA, 40 Zyklen, 95°C 30 Sekunden, 55 bzw. 60°C 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden, DNA-Leiter 50 bp



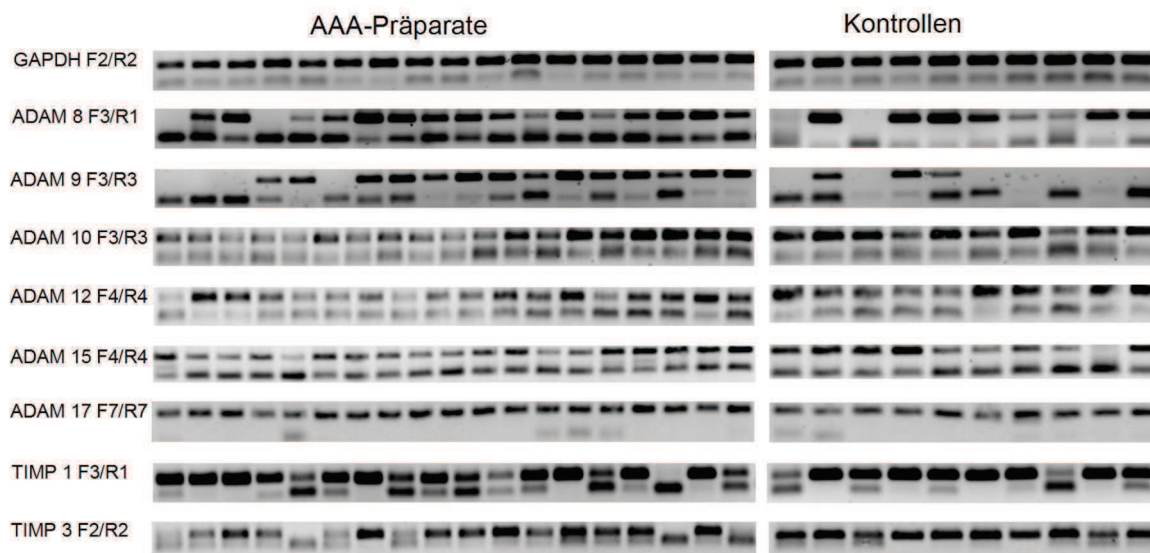
### 3.6 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Nach der Primeroptimierung folgte die qRT-PCR mit SYBR-Green, einem in die DNA bzw. cDNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff. Zur Normalisierung der Ergebnisse und Überprüfung der zu erwartenden Verdopplung der Fluoreszenz, wurden bei jedem Durchlauf 5 und 10 ng DNA aufgetragen. Exemplarisch wird nachfolgend die Schmelzkurve von ADAM 12 aus AAA-Präparaten gezeigt (Abb. 38). Die farbigen Graphen kodieren jeweils eine Probe.



**Abbildung 38:** Schmelzkurve von ADAM 12

Abbildung 39 zeigt Ausschnitte der Produkte der qRT-PCR mit SYBR-Green. Bei den sichtbaren zusätzlichen Banden handelt es sich nicht um Primerdimere, sondern vielmehr um unspezifische Abbauprodukte (siehe Kapitel 4.4.2).



**Abbildung 39:** qRT-PCR mit SYBR-Green, 2  $\mu$ l cDNA, 40 Zyklen, 95°C 30 Sekunden, 55 - 62°C 30 Sekunden, 72°C 30 Sekunden

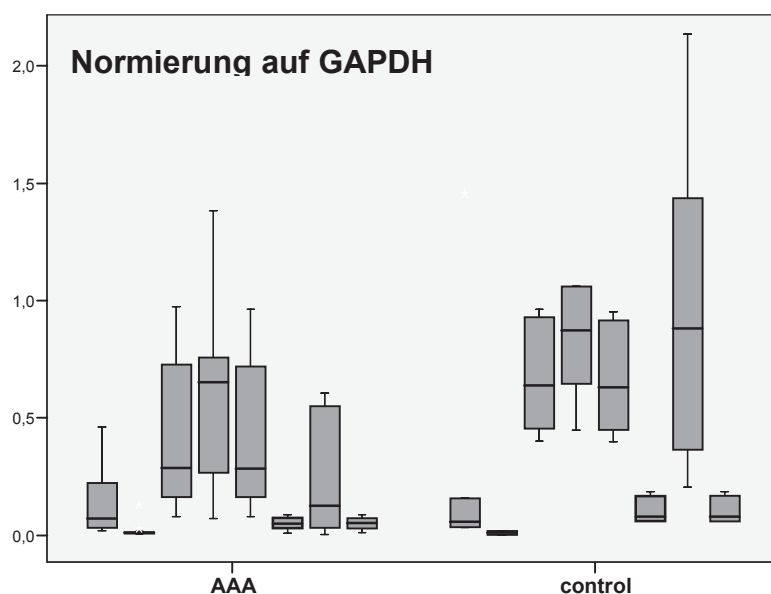
### 3.6.1 Normierung der qRT-PCR-Ergebnisse auf GAPDH

Zunächst erfolgte eine Gegenüberstellung der Ergebnisse jeder einzelnen Probe zu GAPDH. Dabei wurde während der exponentiellen Phase der Zyklus festgehalten, ab dem ein signifikanter Fluoreszenzanstieg zu beobachten ist. Desto eher ein solcher Anstieg festgestellt werden kann, desto mehr Genmaterial ist somit vorhanden. Nachdem es sich bei diesem Messverfahren nicht um die Aufzeichnung absoluter Werte handelt, ist eine Gegenüberstellung zu einem Referenzgen obligat, in diesem Fall GAPDH. Ebenso können die Ergebnisse anderer Marker mit Hilfe folgender Formel miteinander verglichen werden:

$$\Delta CP = CP (\text{Zielgen}) - CP (\text{Referenzgen})$$

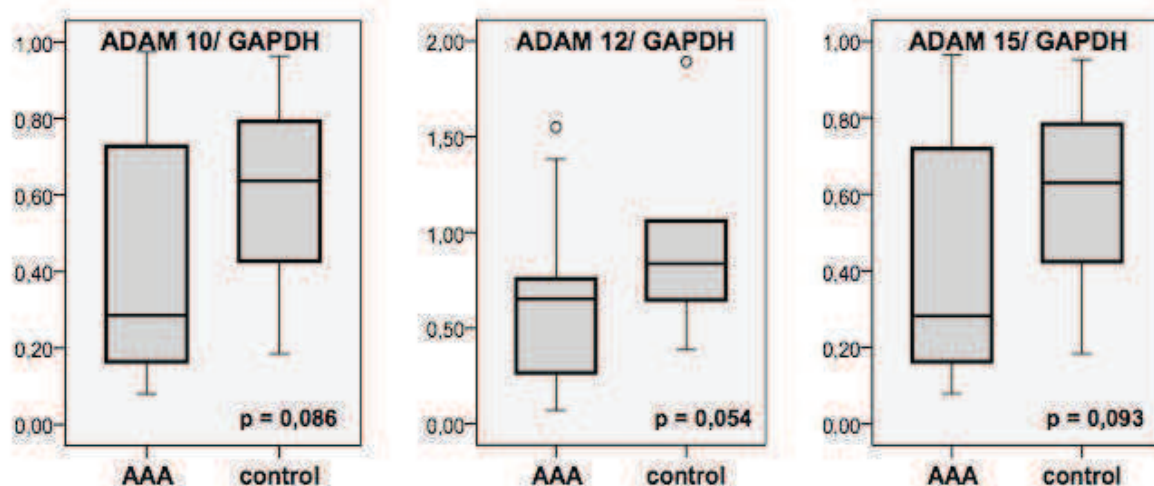
$$\text{Ratio (Expressionunterschied)} = 2^{-\Delta CP}$$

Eine genaue Erörterung des Vorgehens bei der Expressionsanalyse findet sich in Kapitel 2.4.5. Nachfolgende Grafik zeigt eine Zusammenschau aller Marker normiert auf GAPDH.



**Abbildung 40:** Normierung auf GAPDH, Reihenfolge: ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, TIMP 1, 3, Gegenüberstellung der qRT-PCR Ergebnisse, jeweils normiert auf GAPDH, Y-Achse: relative Expression

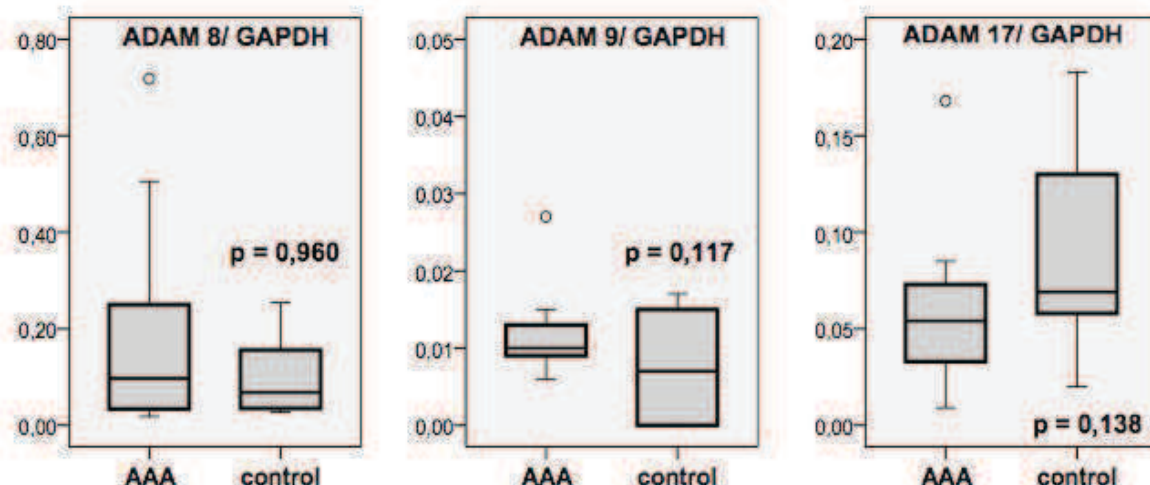
Die Gegenüberstellung aller untersuchten Marker zeigt tendenziell eine stärkere Expression in den Kontrollen. Eine besonders starke Expression wiesen ADAM 10, 12, 15 und TIMP 1 auf. In einigen Fällen (ADAM 12) überstieg die Expression sogar die Expression des Referenzgens GAPDH (> 1,00).



**Abbildung 41:** Gegenüberstellung von qRT-PCR-Ergebnissen, jeweils normiert auf GAPDH, Y-Achse: relative Expression

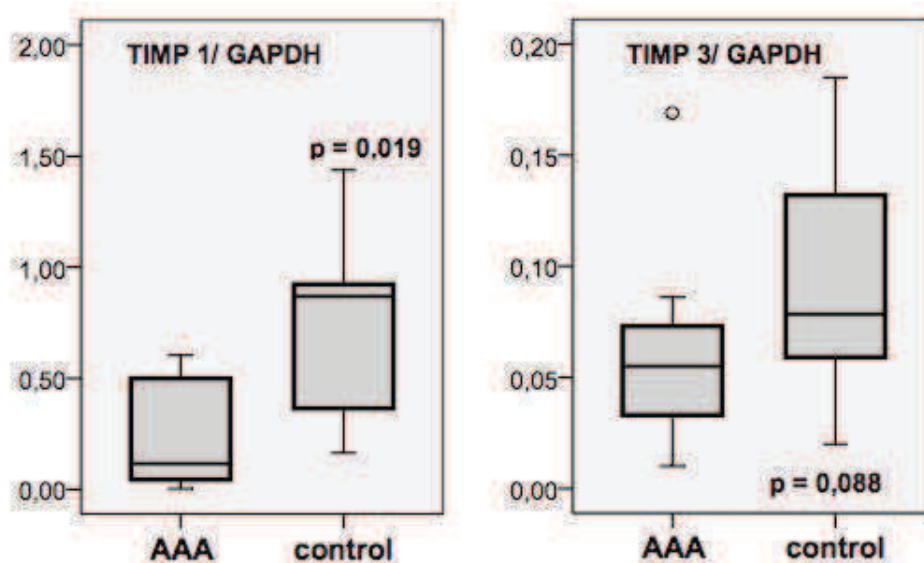
Die Expression in den Kontrollen war für ADAM 10 1,5-fach, für ADAM 12 1,3-fach und für ADAM 15 wiederum 1,5-fach stärker als in den AAA-Präparaten (Abb. 41). In jedem Fall war ADAM 12 von allen ADAMs am stärksten exprimiert.

ADAM 8, 9 und 17 wiesen deutlich schwächere Expressionen auf (Abb. 42).



**Abbildung 42:** Gegenüberstellung von qRT-PCR-Ergebnissen, jeweils normiert auf GAPDH, Y-Achse: relative Expression

Die Expressionsunterschiede zwischen AAA-Präparaten und Kontrollen waren nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Im Vergleich zu ADAM 12, welches die stärkste Expression unter den ADAMs aufwies, waren ADAM 8, 9 und 17 ungefähr 5-fach, 47-fach und 13-fach schwächer exprimiert. ADAM 17 war in den Kontrollen 1,2-fach stärker exprimiert, als in den AAA-Präparaten.



**Abbildung 43:** Gegenüberstellung von qRT-PCR-Ergebnissen, jeweils normiert auf GAPDH, Y-Achse: relative Expression

TIMP 1 war 11-fach stärker exprimiert als TIMP 3. Die Expressionsunterschiede zwischen Kontrollen und AAA-Präparaten waren für TIMP 3 nicht signifikant, für TIMP 1 hingegen deutlich signifikant ( $p < 0,05$ ). TIMP 1 und 3 waren in den Kontrollen 1,3-fach stärker exprimiert (Abb. 43).

### 3.6.2 Normierung der qRT-PCR-Ergebnisse auf TIMP 1 und 3

Einige ADAMs werden durch TIMPs inhibiert. Nachdem dadurch die Aktivität der exprimierten ADAMs inhibiert oder zumindest reduziert wird, erfolgte eine Normierung der PCR-Ergebnisse auf die relevanten TIMPs (Abb. 44 und 45).

ADAM 10 wird durch TIMP 1 und 3 inhibiert, ADAM 12 und 17 hingegen nur von TIMP 3. ADAM 8 und 9 werden nicht durch TIMPs inhibiert. Bislang sind noch keine Inhibitoren für ADAM 15 untersucht. (Edwards DR, et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009). Nachdem ADAM 15 jedoch eine starke Expression aufgewiesen hatte, wurden die Ergebnisse im Folgenden sowohl auf TIMP 1, als auch auf TIMP 3 und beide TIMPs zugleich normiert.

Zunächst wurden auch hier alle Einzelergebnisse der entsprechenden ADAMs auf das Einzelergebnis des Inhibitors normiert.

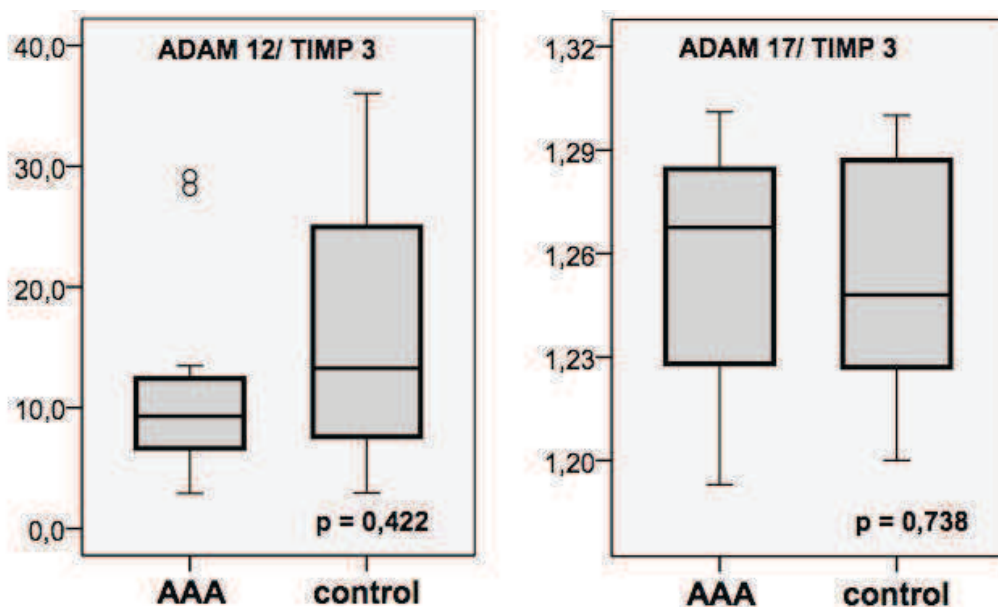
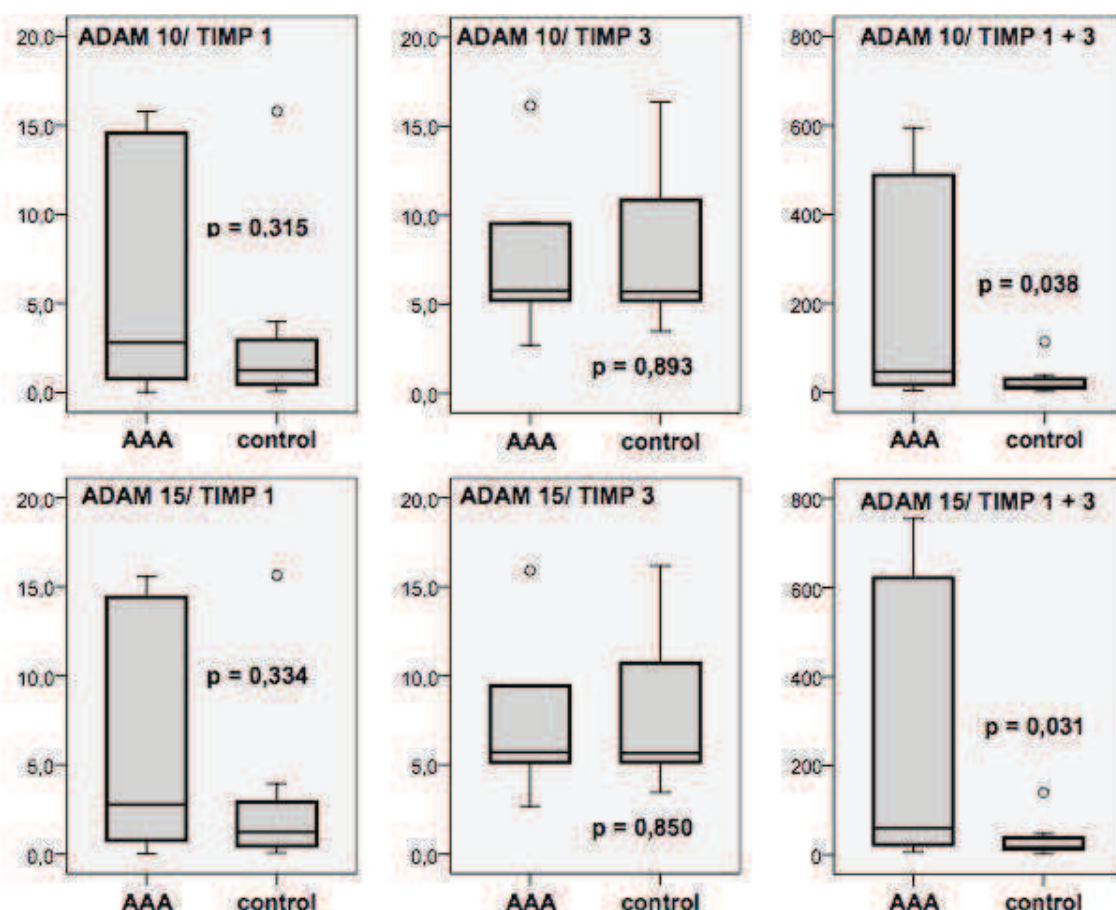


Abbildung 44: Normalisierung auf Inhibitor TIMP 3, Y-Achse: relative Expression



**Abbildung 45:** ADAM 10 und 15 auf TIMP 1 und 3 einzeln (linke und mittlere Bildhälfte) und auf beide Inhibitoren gemeinsam normiert (rechte Bildhälfte), Y-Achse: relative Expression

Die Normierungen von ADAM 12 und 17 auf TIMP 3 waren nicht signifikant ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls konnten bei der Gegenüberstellung von ADAM 10 und 15 zu TIMP 1 oder 3 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, obgleich sich die Werte der Normierung auf TIMP 1 bei den AAA-Präparaten deutlich von den Werten der Kontrollen abhoben. Bei der Normierung auf TIMP 1 war ADAM 10 in den AAA im Mittel 12,6-fach und ADAM 15 12,8-fach stärker exprimiert als in den Kontrollen.

Die Ergebnisse der Normierung auf TIMP 1 und 3 unterschieden sich hingegen signifikant ( $p < 0,05$ ) zwischen AAA-Präparaten und Kontrollen. Somit war bei dieser Normierung ADAM 10 in den AAA-Präparaten 22,5-fach und ADAM 15 22,8-fach stärker exprimiert.

### 3.6.3 Korrelationen

Bei der Auswertung mit SPSS wurden diverse Korrelationsanalysen anhand der qRT-PCR-Ergebnisse und Serum-Markern oder histologischen Klassifikationen durchgeführt. Dabei wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem immunhistologisch festgestellten SMC-Gehalt und der Expression von ADAM 10, 12, 15, 17 und TIMP 3 festgestellt ( $r = 0,486$ ;



0,511; 0,478; 0,589; 0,590;  $p < 0,05$ ). Zwischen den weiteren histologisch beurteilten Strukturen und der Expression von ADAMs oder TIMPs, konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden.

Es konnten weiterhin eine signifikant positive Korrelation zwischen ADAM 17 oder TIMP 3 ( $r = 0,471$ ;  $0,586$ ;  $p < 0,05$ ) und eine signifikant negative Korrelation zwischen TIMP 1 und dem CRP-Spiegel ( $r = -0,572$ ;  $p = 0,26$ ) verzeichnet werden.

Weiterhin wurden alle ADAMs und TIMPs untereinander auf Korrelationen untersucht (Tab. 10). Dabei wurde festgestellt, dass sowohl ADAM 10, 12, 15 und 17, als auch TIMP 3 hoch signifikant miteinander und untereinander korrelieren ( $r > 0,700$ ;  $p < 0,001$ ). ADAM 8 korreliert lediglich mit ADAM 10 und 15 ( $p < 0,05$ ). Für ADAM 9 konnten positive Korrelationen mit ADAM 10, 12 und 15 festgestellt werden ( $p < 0,05$ ). Allerdings konnte zwischen keinem Vertreter der ADAMs und TIMP 1 eine signifikante Korrelation beobachtet werden.

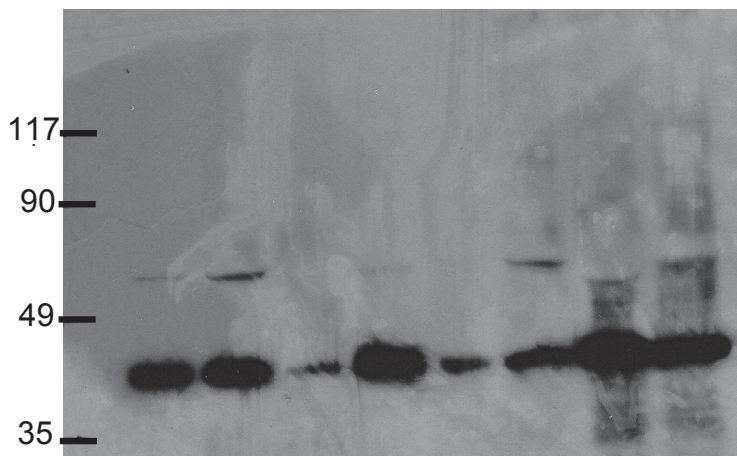
	ADAM 8	ADAM 9	ADAM 10	ADAM 12	ADAM 15	ADAM 17	TIMP 1	TIMP 3
ADAM 8		-	0,593*	-	0,629**	-	-	-
ADAM 9			+	0,517*	+	+ (?)	-	+
ADAM 10				0,868***	0,826***	0,798***	-	0,708***
ADAM 12					0,834***	0,657**	-	0,797***
ADAM 15						0,708***	-	0,802***
ADAM 17								0,893***
TIMP 1								-
TIMP 3								

**Tabelle 10:** Signifikanzniveau der Korrelationen,

\* signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* sehr signifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* hoch signifikant ( $p < 0,001$ )

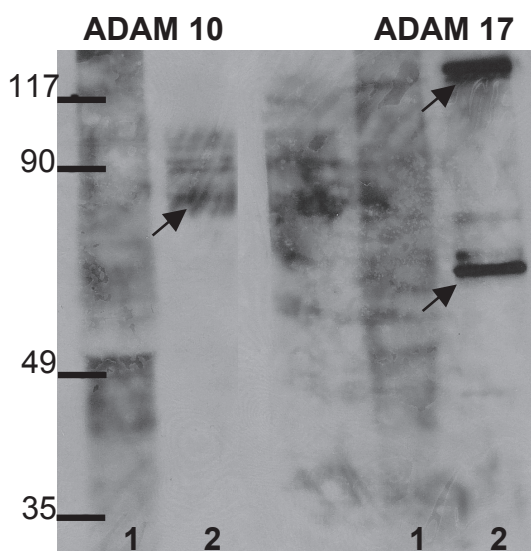
### 3.7 Westernblot

Mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens sollte, neben dem RNA-Nachweis mittels qRT-PCR, ein weiterer Expressionsnachweis auf Proteinebene erbracht werden. Zunächst wurde GAPDH als Kontrollprotein optimiert.



**Abbildung 46:** Nachweis von GAPDH in AAA-Präparaten

GAPDH besteht aus vier Untereinheiten von 30-40 kDa. Wie seitens des Herstellers beschrieben, zeigten sich deutliche Banden im Bereich von ca. 40 kDa (Abb. 46). Weiterhin waren für ADAM 10 und 17 Jurkat-Zellen als Positivkontrolle angegeben.

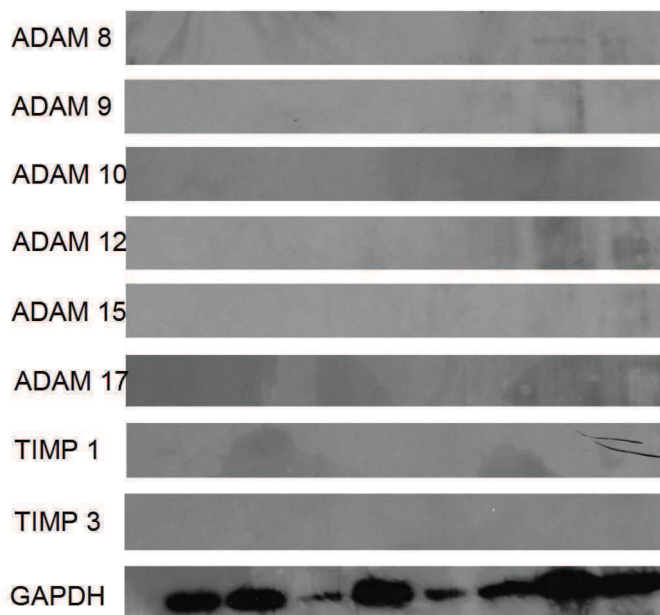


**Abbildung 47:** AAA-Proben (Bahn 1) und Jurkat-Zellkultur (Bahn 2)

Im Westernblot mit Jurkat-Zellen (Abb. 47, Bahn 2) fanden sich, ebenfalls übereinstimmend mit den Angaben des Herstellers, Banden im Bereich von ca. 80 kDa für ADAM 10 und im

Bereich von ca. 80 und 130 kDa für ADAM 17. Die AAA-Proben zeigten keine verwertbaren Banden.

Trotz ausgedehnter Optimierungsversuche, wobei sowohl Antikörperkonzentrationen, als auch Entwicklungszeiten und Entwicklerkonzentrationen variiert wurden, konnten weder für ADAMs, noch für TIMPs, zufriedenstellende Ergebnisse mit AAA-Proben erzielt werden (Abb. 48).



**Abbildung 48:** Übersicht Westernblot

## 4 Diskussion

### 4.1 Patientencharakterisierung

Das Durchschnittsalter des in der Klinik für Gefäßchirurgie operierten Patientenkollektivs ( $n = 20$ ) betrug  $67,7 \pm 12,6$  Jahre und entsprach somit dem bundesweiten Durchschnittsalter aller operativ versorgten AAA-Patienten (*Eckstein H.-H. et al, 2007*). Die Prävalenz des AAA ist unter der männlichen Bevölkerung sechsmal höher als unter der weiblichen Bevölkerung (*Gussmann A. et al., 2008*). Mit 17 männlichen und drei weiblichen Gewebedonatoren entsprach unser Patientenkollektiv der epidemiologischen Geschlechtsverteilung. Risikofaktoren und Komorbiditäten der Patienten deckten sich ebenfalls mit den Daten groß angelegter Studien (*Baumgartner I. et al, 2008; Gussmann A. et al, 2008*). Der mittlere Aortendurchmesser betrug  $7,2 \pm 1,9$  cm. Ab einem Durchmesser von 5,5 cm wird eine Sanierung des AAAs empfohlen (*Lederle F.A., 2009*), nachdem andernfalls von einem jährlichen Rupturrisiko von über 20% auszugehen ist (*Brewster D.C. et al., 2003*). Insgesamt kann das ausgewählte Patientenkollektiv somit als repräsentativ betrachtet werden.

Im Hinblick auf die Altersgruppe und in Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den Kontrollgefäßen um nicht atherosklerotisch verändertes Material handeln sollte, bestand eine nicht unerhebliche Schwierigkeit der vorliegenden Studie in der Beschaffung geeigneter Kontrollpräparate. Dies spiegelt sich in den abweichenden Altersdurchschnitten der Patientenkollektive wieder. Während das Durchschnittsalter der AAA-Patienten bei  $67,7 \pm 12,6$  Jahren lag, waren die Kontrollpersonen im Durchschnitt deutlich jünger ( $54,8 \pm 8,5$  Jahre).

Leider war es weder mit Hilfe des Institutes für Pathologie der TU München, noch mit Hilfe des Institutes für Rechtsmedizin der LMU München möglich, Kontrollpräparate von Personen einer entsprechenden höheren Altersgruppe zu finden. Daher wurde beschlossen, Donatoren ab einem Mindestalter von 40 Jahren in die Studie einzubeziehen. Entsprechend wurden während gerichtsmedizinischen Sektionen 10 Personen ausgewählt.

Hintergrund der beschriebenen Problematik ist die Tatsache, dass innerhalb der altersentsprechenden Kontrollgruppe bereits häufig Vorstufen der Atherosklerose und somit eine Verkalkung der Aorta vorliegen. Nachdem Atherosklerose zu einem nicht unerheblichem Teil zur Aneurysmabildung beiträgt, musste selbstverständlich auf atherosklerotisch veränderte Präparate verzichtet werden (*Guo D.-C. et al. 2006, Kaschira E. et al. 2009, Shimizu K. et al. 2006*). Im Rahmen einer aus den 80er Jahren stammenden, in großem Stil angelegten Autopsiestudie an 2.200 männlichen Verstorbenen wurde nachgewiesen, dass bei 55% aller Obduzierten im Alter von 55 bis 64 Jahren fortgeschrittene atherosklerotische Veränderungen vorliegen – mit zunehmender Tendenz

bei steigendem Lebensalter. So lag bei den 65- bis 74-Jährigen bereits in 66% der Fälle eine fortgeschrittene Atherosklerose vor. Leichte und mäßige Veränderungen sind bereits bei knapp der Hälfte aller unter 55-jährigen Obduzierten nachweisbar (*Auerbach O. et al. 1980*). Eine ultraschallgestützte Studie an 4.206 männlichen und weiblichen beschwerdefreien Freiwilligen untermauert diese Ergebnisse, wobei jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen Männern und Frauen zu Tage kommt. In dieser Studienpopulation wiesen knapp 40% der 50- bis 59-jährigen und ca. 50% der 60 bis 70-jährigen Männer atherosklerosetypische Veränderungen auf. Die weiblichen Studienteilnehmer zeigten hingegen in der erstgenannten Altersgruppe mit unter 20% zunächst eine deutlich geringere Rate atherosklerotischer Veränderungen. In der zweiten Altersgruppe erreichen sie jedoch mit knapp 40% annähernd die Rate der altersentsprechenden männlichen Studienteilnehmer (*Kröger K. et al. 1999*).

## **4.2 Histologische Charakterisierung**

Die histologische Charakterisierung der AAA-Präparate und der Kontrollgefäße wurde durch die erfahrenen Untersucher Herrn PD Dr. Pelisek und Frau Dr. Rudelius validiert. Zur genauen Charakterisierung der Gefäße wurden Makrophagen, T- und B-Zellen, glatte Muskelzellen (SMCs), Endothelzellen und Neogefäße mittels geeigneter Antikörper identifiziert. Entsprechende Färbemethoden und eine zusammenfassende Tabelle der semiquantitativen Auswertung finden sich in Kapitel 3.3.

Ein Großteil der AAA-Präparate wies eine deutliche bis starke Akkumulation von Infiltraten auf. In den Kontrollgefäßen hingegen wurden keine Infiltrate detektiert. Inflammatorische Zellen waren häufig im Bereich von Neovaskularisationen lokalisiert, sie stellen ein pathomorphologisches Korrelat des AAAs dar. Diese Ergebnisse waren im Einklang mit bereits veröffentlichten Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass entzündliche Prozesse sowohl zur Entstehung, als auch zur Ruptur von AAA beitragen (*Guo D.C. et al. 2006, Herron G.S. et al. 1991, Nordon I.M. et al. 2011*).

Weiterhin kommt es, im Rahmen der Entzündung, zu einer Schwächung und somit Rupturgefährdung der Aortenwand, welche mit einem Verlust von SMCs und elastischen Fasern einhergeht (*Guo D.C. et al. 2006*). Dieses Postulat konnte ebenfalls anhand unserer histologischen Studien nachvollzogen werden.

Neovaskularisationen treten in gesunden Gefäßen nicht auf und waren auch in den untersuchten Kontrollgefäßen nicht nachzuweisen. Abzugrenzen von Neogefäßen sind die Vasa vasorum, welche physiologischerweise in der Adventitia großer Arterien zu finden sind und der Blutversorgung exzentrisch gelegener Wandanteile dienen (*Kate ten G.L. et al. 2010*). Neogefäße zeigten sich in den AAA-Präparaten insbesondere in tieferen Schichten



der Media und waren häufig von Infiltraten umgeben. Aktuelle Studien an atherosklerotischen Gefäßen sehen in Neogefäßeinsprossungen Risikofaktoren für Plaqueruptur und -einblutung (*Kate ten G.L. et al. 2010*). Es wird angenommen, dass diese pathologischen Neovaskularisationen aus den Vasa vasorum der Adventitia hervorgehen. So ist davon auszugehen, dass Makrophagen und andere inflammatorische Zellen über Neogefäße in die Arterienwand einwandern und dort proteolytische und pro-angiogenetische Enzyme sezernieren. Neovaskularisationen können somit als Anzeichen inflammatorischer Aktivität gewertet werden (*Herrmann J. et al. 2006, Kate ten G.L. et al. 2010*).

### **4.3 Interpretation der Ergebnisse**

In den nachfolgenden Abschnitten werden zunächst die Expressionsdaten der untersuchten ADAMs relevanten Publikationen gegenübergestellt. Mit einer Ausnahme beziehen sich alle zitierten Publikationen auf Atherosklerose, da lediglich für ADAM 17 eine Studie an AAA vorliegt. Abschließend sollen die Einzelergebnisse verglichen und gegeneinander gewertet werden.

Insgesamt waren drei ADAMs (10, 12, und 15) deutlich stärker exprimiert als die übrigen untersuchten ADAMs. Mit Ausnahme von ADAM 8 waren alle Expressionen in den AAA nicht signifikant schwächer als in den Kontrollen. ADAM 10, 12, 15 und 17 korrelierten untereinander. ADAM 8 und 9 korrelierten hingegen nur teilweise mit den restlichen untersuchten ADAMs, was ein Indiz für eine abweichende Expressionsregulation sein kann. Zudem werden ADAM 8 und 9 nicht durch TIMPs inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*).

#### **4.3.1 ADAM 8**

Im Rahmen der qRT-PCR wies ADAM 8 als einziges untersuchtes Enzym eine nicht signifikant stärkere Expression in den AAA als in den Kontrollen auf. Im Gegensatz dazu zeigte ADAM 8 in der histologischen Auswertung insgesamt eine nur schwache Färbung und war schwerpunktmäßig in Makrophagen nachweisbar. SMCs und Neogefäße zeigten sich ebenfalls positiv. Es ist bekannt, dass ADAM 8 durch kein TIMP inhibiert wird (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Unsere Korrelationsanalyse ergab ebenfalls keine Korrelation von ADAM 8 zu TIMP 1 oder 3. Die Expression von ADAM 8 korrelierte lediglich mit der von ADAM 10 und 15 ( $p < 0,05$ ). ADAM 8 ist bislang nur marginal im Hinblick auf Atherosklerose untersucht. Es liegt aktuell eine Studie vor, welche ADAM 8 in atherosklerotischen Läsionen beschreibt. Insgesamt konnte in besagter Studie übereinstimmend mit unseren Ergebnissen eine vermehrte ADAM-8-mRNA-Expression in

atherosklerotischen Gefäßen, darunter auch Aorten, nachgewiesen werden. Es wurde zudem gezeigt, dass ADAM 8 unabhängig von anderen Atherosklerose-Risikofaktoren exprimiert wird. Dabei wurden bei der immunhistochemischen Auswertung, analog zu unseren Ergebnissen, ebenfalls hauptsächlich Makrophagen und zusätzlich SMCs als Expressionsorte beschrieben. Endothelzellen (ECs) zeigten keine Färbung (*Levula M. et al. 2009*). Diese Aussage ist aufgrund unserer Daten jedoch nur bedingt nachvollziehbar, da sich in unseren Präparaten nur wenige luminale ECs fanden, welche dann jedoch keine Färbung aufwiesen. Interessanterweise kam der gleiche Antikörper-Klon der Firma R&D-Systems zum Einsatz, von dem auch wir Gebrauch gemacht hatten.

Insgesamt stützen unsere Ergebnisse die Thesen von Levula und Kollegen, welche insbesondere in der atherosklerotischen Aorta bis zu 10fach erhöhte ADAM-8-Konzentrationen nachgewiesen haben (*Levula M. et al. 2009*). Allerdings konnten wir keine derart starken Expressionsunterschiede feststellen.

#### 4.3.2 ADAM 9

Unter allen untersuchten ADAMs war ADAM 9 insgesamt am schwächsten in AAA und Kontrollen exprimiert. Die Expression in den Kontrollen war tendenziell stärker als in den AAA, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In Anbetracht der Tatsache, dass sich die Expression auf mRNA-Ebene extrem schwach zeigte und zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung kein geeigneter Antikörper verfügbar war, liegt für ADAM 9 keine immunhistochemische Auswertung vor. Genau wie ADAM 8 wird ADAM 9 ebenfalls von keinem TIMP inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Ebenfalls zeigten sich keine Korrelationen zur Expression von TIMP 1 und 3, jedoch zu ADAM 10, 12 und 17 ( $p < 0,05$ ). Es liegen aktuell zwei Studien vor, welche ADAM 9 im Zusammenhang mit Atherosklerose untersuchen. Oksala und Kollegen fanden im Rahmen der Tampere Vascular Study eine erhöhte Expression von ADAM 9, neben ADAM 15 und 17, in von fortgeschrittener Atherosklerose betroffenen Gefäßen. Als Kontrollgewebe wurden atherosklerosefreie A.-thoracica-interna-Präparate verwendet, welche von KHK-Patienten während einer Bypass-Operation entnommen wurden. Es wurden atherosklerotische Carotiden, Aorten und Femoralgefäße mittels qRT-PCR untersucht. Hierbei zeigte ADAM 9 eine um das 1,7-fache und damit signifikant erhöhte Expression in atherosklerotischen Aorten (*Oksala N. et al. 2009*). Durch das verwendete Kontrollgewebe lassen sich die abweichenden Ergebnisse zu vorliegender Studie möglicherweise erklären.

Es ist bekannt, dass es von ADAM 9 (84 kDa) eine kleinere, sekretorische Form (47 kDa) gibt, welche als aktive Form gilt (*Klein T. et al. 2011*). Zudem stellte sich heraus, dass alle untersuchten ADAMs zum überwiegenden Teil in ihrer aktiven Form in atherosklerotischem Gewebe vorliegen (*Oksala N. et al. 2009*). Nachdem wir keinen Nachweis mittels

Westernblot erbringen konnten, entziehen sich letztgenannte Daten einem Vergleich. Eine ältere Studie untersuchte ebenfalls ADAM 9 in atherosklerotischem Gewebe, allerdings lediglich an Carotis-Präparaten. Unter Verwendung von atherosklerosefreien A.-thyroidea-Präparaten als Kontrollen, ergab sich aus der qRT-PCR eine 6-fach erhöhte Expression von ADAM 9 (*Al-Fakhri N. et al. 2003*).

Was die PCR-Ergebnisse von Oksala et al. angeht, konnten wir keinen entsprechenden Expressionsunterschied feststellen. Im Gegensatz zu den Studien von Oksala und Al-Fakhri et al., wurden in unserer Studie Aorten zur Kontrolle verwendet. Somit sind Kontrollpräparate und Endergebnisse mit den Daten unserer Studie nicht direkt vergleichbar. Aktuell findet sich keine Studie, welche sich mit der Rolle von ADAM 9 in der Aneurysmaerkrankung befasst.

### 4.3.3 ADAM 10

ADAM 10 zeigte neben ADAM 12 und 15 eine starke Expression auf mRNA-Ebene. Die Expression in den Kontrollen war vergleichbar mit derer in den AAA ( $p > 0,05$ ). ADAM 10 wird durch TIMP 1 und 3 inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Die Korrelationsanalyse von ADAM 10 zu TIMP 1 oder 3 brachte keine signifikante Korrelation zu Tage, jedoch zeigte die Normierung von ADAM 10 auf TIMP 1 und 3 eine durchschnittlich 22,5-fach signifikant ( $p < 0,05$ ) stärkere relative Expression in den AAA im Vergleich zu den Kontrollaorten. Die Expression von ADAM 10 korrelierte hoch-signifikant mit der Expression von ADAM 12, 15, 17 und TIMP 3 ( $p < 0,001$ ). Bei der immunhistochemischen Untersuchung zeigte ADAM 10 die stärkste Expression in Makrophagen. Bisher existiert keine Studie, welche die Expression von ADAM 10 in atherosklerotischen Gefäßen oder Aortenaneurysmen umfassend analysiert und sich somit für einen Vergleich mit unseren Ergebnissen anbietet. Allerdings gibt es Hinweise, dass ADAM 10 Angiogenese und Neogefäßbildung im Rahmen der Atherosklerose reguliert (*Claesson-Welsh L. 2010, Donners M.M. et al. 2010*). Es wurden, im Vergleich zu gesunden Gefäßen, erhöhte Konzentrationen von ADAM 10 in rupturierten atherosklerotischen Plaques nachgewiesen (*Donners M.M. et al. 2010*). Weiterhin ist ADAM 10 in der Lage, Kollagen IV zu degradieren, welches ein wesentlicher Bestandteil der vaskulären Basalmembran ist (*Claesson-Welsh L. 2010, Mochizuki S. et al. 2007, Seals D.F. et al. 2003*). Außerdem prozessiert ADAM 10, ebenso wie ADAM 17, TNF- $\alpha$  (*Arduise C. et al. 2008*). Des Weiteren ist ADAM 10 an der Aktivierung von HB-EGF beteiligt (*Sahin U. et al. 2004*).

Auf die Rolle von HB-EGF und TNF- $\alpha$  in AAAs wird in Abschnitt 4.3.6. näher eingegangen.

#### 4.3.4 ADAM 12

Normiert auf GAPDH zeigte ADAM 12 die stärkste Expression unter den untersuchten ADAMs. Die Expression in den Kontrollen war stärker, jedoch nicht signifikant höher, als in den AAA-Präparaten ( $p > 0,05$ ). ADAM 12 wird generell von TIMP 3 inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Die Normierung von ADAM 12 auf TIMP 3 brachte jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen AAA und Kontrollorten zu Tage. Die Expression von ADAM 12 korrelierte hingegen hoch signifikant mit der Expression von ADAM 12, 15, 17 und TIMP 3 ( $p < 0,001$ ). Nachdem zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung kein geeigneter Antikörper verfügbar war, liegen hierzu keine Daten vor. In einer Studie von Barbara Herren konnte ADAM 12 jedoch in kultivierten SMCs nachgewiesen werden (*Herren B. 2002*).

Ebenso wie für ADAM 10 sind bislang keine umfassenden Studien zu der Beteiligung von ADAM 12 an Atherosklerose, oder der Aneurysmaerkrankung publiziert. Es gibt einige Anhaltspunkte, dass ADAM 12 ebenfalls am Shedding von HB-EGF und somit an der Atherogenese beteiligt sein könnte (*Raab G. et al. 1997*). Möglicherweise trägt ADAM 12 durch HB-EGF-Shedding zu kardialen Umbauprozessen (Remodeling) und somit der Ausbildung einer Herzinsuffizienz bei (*Klein T. et al. 2011*). Interessant in Anbetracht der Aneurysmaforschung ist die Tatsache, dass ADAM 12, neben ADAM 10 und 15, in der Lage ist, Kollagen IV und weitere ECM-Bestandteile, wie Proteoglykane, zu degradieren (*Claesson-Welsh L. 2010, Herren B. 2002, Klein T. et al. 2011*). Atherosklerose versteht sich als entzündlicher Prozess, welcher durch eine Vielzahl von Enzymen reguliert wird. Darunter befinden sich auch Adhäsionsmoleküle, welche die Leukozytenmigration steuern. ADAM 12 ist neben anderen ADAMs in der Lage, Adhäsionsmoleküle zu prozessieren und freizusetzen (*Herren B. 2002*).

Aufgrund der Tatsache, dass ADAM 12 in einer sekretorischen Form existiert, kann es in Körperflüssigkeiten wie Urin und Serum nachgewiesen werden. ADAM 12 könnte somit nach weiterführender Erforschung als potenzieller Biomarker, beispielsweise zur Überwachung der AAA-Progression, genutzt werden (*Klein T. et al. 2011*).

#### 4.3.5 ADAM 15

Neben ADAM 10 und 12 wies ADAM 15 eine starke Expression in der Normierung auf GAPDH auf. Wiederum war die Expression in den Kontrollen nicht signifikant stärker ( $p > 0,05$ ). Bislang wurden für ADAM 15 keine Inhibitoren untersucht (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Aufgrund der starken Expression haben wir uns jedoch entschieden, eine Normierung gegen TIMP 1 oder 3, sowie TIMP 1 und 3 durchzuführen, da es sich bei diesen um die bislang bekannten Inhibitoren der ADAMs

handelt. Lediglich die Normierung gegen TIMP 1 und 3 erbrachte signifikante Unterschiede, wobei ADAM 15 nach dieser Normierung 22,8-fach stärker in den AAAs exprimiert wurde ( $p < 0,05$ ). Die Expression von ADAM 15 korreliert hoch signifikant mit ADAM 10, 12, 17 und TIMP 3 ( $p < 0,001$ ). Immunhistologisch war ADAM 15 sowohl in SMCs, Infiltraten und Makrophagen, als auch in ECs, deutlich zu detektieren. Oksala et al. wiesen ADAM 15, unter Benutzung desselben Antikörper-Klons, der auch bei unseren Untersuchungen zum Einsatz kam, ebenfalls in genannten Zellarten nach (Oksala N. et al. 2009). Es liegen Studien von Herren und Kollegen vor, welche sich mit der Expression von ADAM 15 in atherosklerotischem Gewebe beschäftigen. Hierbei wurde ADAM 15 immunhistochemisch in sich entwickelnden atherosklerotischen Läsionen der thorakalen Aorta von Primaten (*Macaca nemestrina*) nach cholerstrinreicher Diät nachgewiesen, jedoch nicht in gesunden thorakalen Aorten der gleichen Spezies. Dabei zeigten sich vor allem im Makrophagen-tragenden Atherom starke Färbungen (Herren B. et al. 1997, Herren\* B. et al. 1997). Unsere histologischen Ergebnisse hingegen zeigen, dass auch SMCs ADAM 15 exprimieren. Zudem konnten wir ADAM 15 ebenfalls in SMCs der Kontrollgefäße immunhistochemisch nachweisen, wenn auch schwächer als in den AAAs. Ein möglicher Grund für das Abweichen unserer Ergebnisse von Herren et al. sind die unterschiedlichen Spezies angehörigen Gewebendonatoren. Zudem kamen auch unterschiedliche Primärantikörper zum Einsatz. Weiterhin besteht das Problem, dass Ergebnisse aus atherosklerotischem Gewebe möglicherweise nicht exakt auf das AAA übertragen werden können. Zudem stammten die Proben von Herren et al. aus der thorakalen und nicht aus der abdominalen Aorta. Die Pathologien dieser Aortenabschnitte sind jedoch nicht eins zu eins miteinander zu vergleichen. Im Falle des thorakalen Aneurysma wird beispielsweise von einer abweichenden, nicht atherosklerotisch bedingten, Pathogenese ausgegangen. Außerdem unterscheiden sich thorakale und abdominale Aortenabschnitte in ihrer embryologischen Abstammung (Pannu H. et al. 2006).

Bei weiteren Untersuchungen von Herren et al. kamen, im Gegensatz zu unserer Studie, Kulturen von menschlichen aortalen SMCs und Zellkulturen von menschlichen Nabelschnur-ECs (HUVECs) zum Einsatz. Der Nachweis erfolgte unter anderem mittels PCR. Dabei wurde ADAM 15 in kultivierten SMCs, sowie in HUVECs nachgewiesen (Herren B. et al. 1997, Herren\* B. et al. 1997). Diese Ergebnisse lassen sich aufgrund des unterschiedlichen Untersuchungsmaterials schwer auf unsere PCR-Ergebnisse übertragen. Jedoch beweisen sie die Expression von ADAM 15 in SMCs. Oksala und Kollegen publizierten hingegen zum Vergleich geeignete PCR-Ergebnisse von atherosklerotischen Aorten. Allerdings wurden hierbei atherosklerosefreie A.-thoracica-interna-Präparate zur Kontrolle verwendet. ADAM 15 zeigte eine 2,7-fache und damit signifikant erhöhte Expression in atherosklerotischen Aorten (Oksala N. et al. 2009). Auch hier gilt es, wie bereits in Kapitel 4.3.2. erörtert, zu beachten,

dass Oksala et al. ein Kontrollgefäß verwendeten, welches nicht der Lokalisation der untersuchten Läsion entspricht und zudem nicht mit unseren Kontrollgefäßen vergleichbar ist. Allerdings stimmt die Tendenz der ADAMs untereinander, wobei ADAM 15 stärker als ADAM 9 und 17 exprimiert wird, mit unseren Ergebnissen überein. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass ADAM 15, neben ADAM 10 und 12, in der Lage ist, die ECM durch Spaltung von Kollagen IV und Gelatin zu degradieren (*Klein T. et al. 2011, Martin J. et al. 2002*). Neben anderen Mitgliedern der Familie der ADAMs trägt auch ADAM 15 zur vaskulären Leukozyten-Adhäsion bei (*Herren B. 2002*). Neuere Studien beschäftigen sich ebenfalls mit der Rolle von ADAM 15 in inflammatorischen Prozessen. ADAM 15 wird, wie auch in unseren immunhistochemischen Untersuchungen nachvollziehbar, von ECs exprimiert und trägt zu der Rekrutierung entzündlicher Zellen und der Degradierung der Gefäßwand bei. Zudem wird die endotheliale Expression von ADAM 15 mit einer gesteigerten Plättchen-Aggregations-Neigung in Zusammenhang gebracht. Durch ADAM 15 stimulierte Blutplättchen werden in ihren aktiven Zustand versetzt und rekrutieren so weitere Plättchen. Diese sezernieren potenziell pro-inflammatorische Stoffe, worin ein weiterer möglicher Aspekt der Rolle von ADAM 15 in der Atherogenese und AAA-Formation zu sehen ist (*Charrier-Hisamuddin L. et al. 2008*).

#### **4.3.6 ADAM 17**

ADAM 17 war insgesamt deutlich schwächer exprimiert als ADAM 10, 12 und 15. Die Expression in den Kontrollen war zwar stärker als in den AAA-Präparaten, jedoch ohne signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$ ). ADAM 17 wird durch TIMP 3 inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Allerdings erbrachte die Normierung auf TIMP 3 keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen AAA und Kontrollen ( $p > 0,05$ ). Die Expression von ADAM 17 korrelierte hoch signifikant mit ADAM 10, 12, 15 und TIMP 3 ( $p < 0,001$ ). In der Korrelation zu TIMP 3 liegt ein möglicher Grund für die fehlenden Expressionsunterschiede bei Normierung auf TIMP 3. Immunhistochemisch zeigte ADAM 17 in allen Zelltypen (SMCs, Infiltrate, Makrophagen und Neogefäße) die stärkste Färbungsintensität verglichen mit ADAM 8, 10, 15. Ebenfalls zeigte ADAM 17 Färbungen in ECs. Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung steht somit im deutlichen Widerspruch zu der Auswertung der qRT-PCR. Nachdem die Immunhistochemie sich nicht für quantitative Aussagen, sondern lediglich zur Lokalisationsanalyse eignet, sollte man den PCR-Ergebnissen mehr Beachtung schenken. Eine Erörterung der eingesetzten Methoden folgt im nächsten Kapitel. Bislang existiert eine Studie, welche ADAM 17 im Zusammenhang mit dem AAA untersucht. Außerdem ist ADAM 17, neben ADAM 15, das im Zusammenhang mit Atherosklerose am besten untersuchte Mitglied der ADAM-Familie. Satoh und Kollegen verglichen die Expression von ADAM 17 in AAA und Kontrollaaorten, sowie die Expression in



Transitionszone und Aneurysmasack (*Satoh H. et al. 2004*). Im Einklang mit unseren immunhistochemischen Resultaten zeigte ADAM 17 in dieser Studie eine starke Expression in Makrophagen. Satoh et al. untersuchten zudem parallel die Expression von TNF- $\alpha$ , einem Substrat von ADAM 17. Abweichend von unseren Ergebnissen konnten Satoh und Kollegen ADAM 17 in signifikant höherer Konzentration in AAA nachweisen. Die Kontrollorten stammten von fünf Patienten mit einem Durchschnittsalter von  $46 \pm 4$  Jahren. Die Proben der AAA waren während operativen Eingriffen an der infrarenalen Aorta von 19 Patienten mit einem Durchschnittsalter von  $72 \pm 6$  Jahren entnommen worden. Dabei wurden Präparate aus Aneurysmasack und Transitionszone asserviert. Im Rahmen unseres breit angelegten Studienkonzeptes wurden generell nur Präparate aus dem Aneurysmasack untersucht. Zudem kamen in unserer Studie mehr Kontrollpräparate ( $n = 10$ ) zum Einsatz, welche sich dem Alter der AAA-Patienten besser angleichen als in besagter Studie. Möglicherweise liegt in der jüngeren und kleineren Kontrollgruppe ein Grund für das stärkere Auseinanderweichen der Ergebnisse von AAA und Kontrollen bei Satoh und Kollegen. Bei der Gegenüberstellung der Expression von ADAM 17 in Transitionszone und Aneurysmasack, konnten Satoh und Kollegen eine signifikant höhere Expression in der Transitionszone verzeichnen (*Satoh H. et al. 2004*).

In einer aktuellen Studie von Oksala und Kollegen zeigte ADAM 17 in atherosklerotischen Aorten eine stärkere Expression als in Kontrollgefäßen. Wie bereits in den Absätzen 4.3.2 und 4.3.5 erörtert, kamen hierzu atherosklerosefreie A.-thoracica-interna-Präparate zum Einsatz, wodurch sich ein direkter Vergleich mit unseren Daten verbietet. Die Gründe wurden ebenfalls in Kapitel 4.3.2 und 4.3.5 dargelegt. Die Relationen der Expression von ADAM 9, 15 und 17 zueinander stimmen jedoch mit unseren Ergebnissen überein, wobei ADAM 17 deutlich schwächer als ADAM 15 exprimiert wird. Weiterhin konnten Oksala et al. mittels Westernblot nachweisen, dass ADAM 17 in atherosklerotischem Gewebe in seiner katalytisch aktiven Form vorliegt (*Oksala et al. 2009*).

Neben ADAM 17 wurde TNF- $\alpha$  ebenfalls primär in Makrophagen detektiert (*Satoh et al. 2004*). ADAM 17 ist, wie ADAM 10, an der Freisetzung von TNF- $\alpha$  in atherosklerotischen Plaques maßgeblich beteiligt (*Arduise C. et al. 2008, Herren G. 2005*). ADAM 17 wird in zellreichen und zellarmen bzw. azellulären Zonen des Plaques exprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Gegenwart von ADAM 17 vermehrt TNF- $\alpha$  prozessiert wird. ADAM 17 ist im Vergleich zu anderen relevanten ADAMs (e.g. ADAM 10) der potenteste TNF- $\alpha$ -Aktivator (*Canault M. et al. 2007*). Neben TNF- $\alpha$  aktiviert ADAM 17 weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche in inflammatorische Prozesse der Atherogenese involviert sind. Beispielsweise kann ADAM 17 durch das Shedding von L-Selectin die Leukozytenadhäsion an Gefäßwänden unterstützen (*Oksala et al. 2009*). Zudem regt ADAM 17 die intravasale Angiogenese an (*Satoh H. et al. 2004*). Neogefäße wiederum tragen zur

Schwächung der Gefäßwand bei, indem sie inflammatorische und proteolytische Prozesse unterhalten (*Michel J.B. et al. 2011*).

Ein weiterer Fokus der Atherogenese liegt auf der Funktion von SMCs, welche neben ECM-Komponenten auch pro-inflammatorische Stoffe (e.g. Zytokine) sezernieren (*Orr A.W. et al. 2010*). HB-EGF stimuliert vaskuläre SMCs im Rahmen der Atherogenese (*Ohtsu H. et al. 2006*). ADAM 17 ist neben ADAM 10 für die Aktivierung des EGF-Rezeptor-Liganden HB-EGF verantwortlich (*Sahin U. et al, 2004*).

### 4.3.7 TIMP 1 und 3

TIMP 1 wies in den Kontrollen eine signifikant höhere Expression als in den AAA ( $p < 0,05$ ) auf und war insgesamt deutlich stärker exprimiert als TIMP 3. Die Expression von TIMP 3 in AAA und Kontrollen war vergleichbar und korrelierte zudem mit ADAM 10, 12, 15, 17. Wahrscheinlich wird TIMP 3 entsprechend der genannten ADAMs reguliert, was diese Korrelation bedingt. ADAM 10, 12 und 17 werden erwiesenermaßen von TIMP 3 inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*), was als ein weiterer Grund für diese Korrelation zu sehen ist. Für ADAM 15 ist bislang kein Inhibitor untersucht. Jedoch könnte man aufgrund der Korrelationsanalyse eine Inhibition zumindest durch TIMP 1 vermuten. Nachdem TIMP 1 nicht mit ADAM 10, 12, 15 und 17, sowie TIMP 3 korrelierte, ist davon auszugehen, dass die Expression von TIMP 1 anderweitig und somit unabhängig von ADAMs reguliert wird. ADAM 10 wird neben TIMP 3 auch durch TIMP 1 inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Die Normierung auf TIMP 1 erbrachte eine 12,6-fach stärkere Expression, jedoch nicht signifikant. Allein die Normierungen auf TIMP 1 und 3 zeigten für ADAM 10 und 15 signifikante Werte. In beiden Fällen wiesen jedoch die Ergebnisse der Normierung auf TIMP 1 stärkere Kontraste auf. Aufgrund dieser Werte und der Korrelationsuntersuchung lässt sich die Hypothese formulieren, dass es sich bei TIMP 1, im Gegensatz zu TIMP 3, in der Pathologie des AAAs um den potenteren Inhibitor handelt. Allerdings bedarf diese Hypothese in jedem Fall weiterer experimenteller Untermauerung. TIMP 1 ist bislang insbesondere als Inhibitor der MMPs untersucht. Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte in vorhergehenden Untersuchungen ebenfalls eine verringerte Expression von TIMPs in AAA nachgewiesen werden. Das Verhältnis von MMPs zu TIMPs in AAA-Präparaten zeigte sich, analog zu unseren Ergebnissen im Hinblick auf ADAMs, ebenfalls zugunsten der MMPs verschoben (*Reeps C. et al., 2009*). Es gibt zudem Hinweise, dass genetische Polymorphismen, welche zu einer Downregulation von TIMP 1 führen, mit der Ausbildung von AAAs einhergehen (*Ogata T. et al. 2005*). Interessanterweise stellte sich heraus, dass TIMP 1 zwar der Aneurysmabildung entgegenwirkt, jedoch die Atherogenese begünstigen kann (*Silence J. et al. 2002*). TIMP 1 wurde in unseren histologischen Untersuchungen insbesondere in Markophagen und Infiltraten nachgewiesen.

Im Gegensatz zu TIMP 1 ist TIMP 3 an die ECM gebunden (Yu W.-H. et al, 2000). Histologisch war TIMP 3 insgesamt schwach in SMCs, Infiltraten und Neogefäßen detektierbar. Die stärkste Färbung zeigten Makrophagen in einigen Präparaten. Eine neuere Studie beschreibt den Zusammenhang zwischen TIMP-3-Expression und Diabetes mellitus Typ II. Cardellini und Kollegen konnten belegen, dass in atherosklerotischen Carotis-Präparaten von Diabetikern die Expression von TIMP 3 signifikant reduziert ist, wobei ADAM 17 und MMP-9 in Relation überexprimiert sind. Die restlichen TIMPs hingegen werden unabhängig von der Erkrankung an Diabetes mellitus Typ II exprimiert. Histologisch konnten Cardellini et al. TIMP 3 ebenfalls in SMCs und Makrophagen nachweisen (Cardellini M et al. 2009).

#### **4.4 Erörterung der Methoden**

Nach der Erörterung der Ergebnisse sollen abschließend die Methoden diskutiert werden. Auch bei korrekter Durchführung ist es essentiell die Limitierungen der angewandten Methoden zu kennen, um die gewonnenen Ergebnisse deuten zu können. Durchführung und Resultate der in nachfolgendem Abschnitt erörterten Methoden wurden bereits in den Kapiteln 2 und 3 eingehend beschrieben.

##### **4.4.1 Immunhistochemische Untersuchung**

Die immunhistochemische Untersuchung ist ein wertvolles Mittel zur qualitativen Beurteilung von Lokalisation und Expression. Jedoch kann diese Methode keinesfalls eine quantitative Untersuchung, beispielsweise mittels PCR, in Aussagekraft und Stichhaltigkeit ersetzen. Zum einen können während einer mikroskopischen Untersuchung nur grobe Abstufungen unterschieden werden, wobei die Ergebnisse von der Erfahrung des Untersuchers abhängig sind. Zum anderen ergeben sich durch die Qualität, Sensitivität und Spezifität der verwendeten Antikörper zum Teil erhebliche Schwankungen. Dies untermauert auch die Tatsache, dass die für ein befriedigendes Ergebnis benötigten Konzentrationen zum Teil deutlich voneinander abwichen. Die Färbungsprofile der einzelnen untersuchten ADAMs und TIMPs unterschieden sich zum Teil erheblich in Intensität und zellulärer Lokalisation. Bei ADAM 15, 17, TIMP 1 und 3 zeigte sich eine starke, diffuse Färbung des atherosklerotischen Plaques. Wenn auch im Bereich des Atheroms Schaumzellen lokalisiert sind, welche aus Makrophagen hervorgehen (CD-68-positiv), wurde diese Färbung nicht in die Auswertung mit einbezogen, da das Atherom hauptsächlich aus nekrotischem Material besteht (Fettbrei, Cholesterinkristalle, Zelltrümmer und Fibrin) (Baretton G.B. et al. 2004, Tanasković I. et al.

2010). Es wurde daher von einer diffusen unspezifischen Farbreaktion ausgegangen, welche nicht zellbezogen und somit der Lokalisationsanalyse nicht dienlich ist.

#### **4.4.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)**

Ergänzend zur Immunhistochemie wurde eine quantitative Expressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Dabei wird indirekt das Vorhandensein entsprechender RNA nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um mRNA (messenger-RNA), welche während der Transkription von der DNA „abgeschrieben“ wird, um als Vorlage zur Proteinbiosynthese zu dienen. Mit Hilfe der qRT-PCR mit cDNA, einem zur RNA komplementären DNA-Strang, kann somit, neben der Expression des Genes, auch seine „biologische Relevanz“ für die Zelle nachgewiesen werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die qRT-PCR einen direkten Proteinnachweis mittels Westernblot nicht gänzlich ersetzen kann. Die Optimierung der PCR wurde zunächst mit DNA begonnen und später, unter optimalen Bedingungen und mit ausgewählten Primern, mit cDNA weitergeführt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit DNA trat bei der Elektrophorese der amplifizierten cDNA eine zweite Bande auf (siehe Abbildungen Kapitel 3.6). Diese zweite Bande lag dicht bei der ersten Bande (Abb. 39), was gegen das Vorliegen von Primer-Dimeren spricht, zumal diese bereits bei den Vorversuchen mit DNA aufgetreten wären. Höchstwahrscheinlich handelt es sich in diesem Fall um RNA-Spaltprodukte, welche vermutlich im Rahmen der Formalinfixierung entstanden sind. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, dass es bereits im Rahmen der Aneurysmaerkrankung zu einer Degradierung der RNA kam.

Abgesehen von ADAM 8 war die Expression aller untersuchten ADAMs und TIMPs in den Kontrollen stärker als in den AAA-Präparaten. Nachdem wir feststellen konnten, dass die Expression der ADAMs mit dem Gehalt an SMCs korreliert, lässt sich dieses Phänomen möglicherweise durch den Untergang glatter Muskelzellen im Rahmen der Aneurysmaerkrankung erklären.

#### **4.4.3 Westernblot**

Im Gegensatz zur qRT-PCR mit cDNA kann mit Hilfe des Westernblots das tatsächliche Genprodukt, das fertige Protein, direkt nachgewiesen werden. Leider konnten wir diesen Nachweis nicht erbringen. Es war lediglich möglich, das Verfahren erfolgreich an nicht-formalinfixierten AAA-Präparaten und Kontrollen durchzuführen und GAPDH als Kontrollprotein zu etablieren. Diverse Versuche ADAMs und TIMPs zu detektieren scheiterten jedoch. Als mögliche Ursache für das Misslingen des Westernblots muss zunächst die Eignung des Untersuchungsmaterials angezweifelt werden. Für die Eignung des Untersuchungsmaterials spricht jedoch die Tatsache, dass GAPDH jeder Zeit

nachgewiesen werden konnte. Zudem wurden im Rahmen des gleichen Versuchsaufbaus, an denselben Präparaten, durch ein anderes Mitglied der Arbeitsgruppe (cand. med. Fabian Lohöfer) erfolgreich Cathepsine mittels Westernblot detektiert. Bei den Cathepsinen handelt es sich jedoch im Gegensatz zu den ADAMs um intrazellulär exprimierte Proteine (e.g. lysosomal), welche dadurch möglicherweise besser vor dem Abbau durch gewebsansässige Proteasen geschützt sind (*Nomura T. et al. 2005*).

Nachdem Untersuchungsmaterial und Vorgehensweise als adäquat zu betrachten sind, kann das Scheitern der Versuche möglicherweise auch in der Eignung der verwendeten Antikörper begründet sein. Gemäß den Angaben der Hersteller waren alle Antikörper, die für den Expressionsnachweis von ADAMs und TIMPs von der Arbeitsgruppe genutzt wurden, grundsätzlich für Westernblot vorgesehen. Für ADAM 10 und 17 waren von Seiten des Herstellers Jurkat-Zellen als Positivkontrollen vorgegeben. Wir konnten den Nachweis von ADAM 10 und 17 mit Hilfe einer Jurkat-Zellkultur ebenfalls nachvollziehen.

Eine definitive Ursache für das Misslingen des Westernblots kann letztendlich nicht festgestellt werden. Abschließend ist anzumerken, dass bislang keine Publikation vorliegt, die einen Nachweis von ADAMs mittels Westernblot in atherosklerotischen Gefäßen beschreibt.

#### **4.5 Schlussfolgerung und Zukunftsperspektive**

Generell liegt die Vermutung nahe, dass ADAMs, unabhängig von der Pathogenese von Atherosklerose und Aneurysmen, eine wichtige Rolle in der Funktion der menschlichen Aorta spielen.

Die vorliegenden Daten lassen in Gegenüberstellung zu relevanten Studien die Annahme zu, dass ADAMs an der Entstehung und dem Fortschreiten der Aneurysmaerkrankung beteiligt sein können. Es gibt hierzu verschiedene Anhaltspunkte:

- Alle untersuchten ADAMs wirken pro-inflammatorisch und besitzen proteolytische Eigenschaften.
- Für einige ADAMs (ADAM 10 und 17) ist bekannt, dass sie die Neoangiogenese unterstützen.
- Der Gehalt an Neogefäßen korreliert mit dem Verlust elastischer Fasern und dem Leukozytengehalt – somit sind Neogefäße als pathomorphologisches Korrelat für eine fortschreitende Wandschwächung zu sehen (*Michel J.B. et al. 2011*).
- Weiterhin besitzen ADAMs die Fähigkeit – wie für ADAM 10, 12 und 15 bereits nachgewiesen – ECM zu degradieren und so ebenfalls die Gefäßwand zu schwächen (*Klein T. et al. 2011*).

Alle genannten Fakten können zu fortschreitender Wandinstabilität und Ruptur beitragen. Über den Stellenwert der ADAMs im Gesamtbild der Aneurysmaerkrankung lässt sich derzeit nur schwer eine Aussage treffen, da es sich bei der AAA-Formation, wie auch bei der Atherogenese, um einen multifaktoriellen Prozess handelt. Im Rahmen der Forschung an MMPs, welche ebenfalls der Familie der Metalloproteasen angehören, ergaben sich Hinweise im Rahmen experimenteller Studien, dass eine Inhibition von MMPs das Fortschreiten der Aneurysmaerkrankung unterbinden kann (*Reeps C. et al. 2009; Thompson R.W. et al. 1999*). Weiterhin sollte man jedoch generell bedenken, dass neben genetischen und molekularbiologischen Faktoren auch mechanische Einflüsse eine fortschreitende Dilatation und drohende Ruptur bedingen können (*Satoh H. et al. 2004*).

Bislang ist nur ADAM 17 in Bezug auf das AAA erforscht. Dabei wurde im Gegensatz zu unserer Studie, welche einen Gesamtüberblick über die Rolle proteolytisch aktiver ADAMs im AAA geben soll, die Expression in Transitionszone und Aneurysmasack verglichen. Es zeigte sich eine höhere Expression in der Transitionszone (*Satoh H. et al. 2004*). Daher wäre es interessant, diesen Vergleich ebenfalls für die restlichen proteolytisch aktiven ADAMs anzustrengen.

Unsere Studienergebnisse machen jedoch auch deutlich, dass es möglicherweise weniger gut erforschte ADAMs gibt (e.g. ADAM 8, 10, 12), die in der Pathogenese des AAAs und der Atherosklerose relevanter als ADAM 17 sein könnten. Man sollte sich zudem vor Augen führen, dass eine starke Expression nicht zwingend mit einer starken biologischen Aktivität einhergehen muss. Einer starken Expression kann auch eine ebenso starke Inhibition gegenüberstehen.

Neben ADAM 17 liegen für ADAM 15 zahlreiche Studien zur Atherogenese vor. ADAM 15 zeigte insgesamt und auch in Relation zu TIMP 1 und 3 eine starke Expression. ADAM 15 sollte somit auch in Hinblick auf das AAA eingehender erforscht werden. Für ADAM 8 und 9 liegen erst wenige Daten zu Atherosklerose vor. Bei vergleichsweise schwacher Expression besteht für ADAM 8 und 9 jedoch die Besonderheit, dass sie weitestgehend unabhängig von ADAM 10, 12, 15, 17, sowie TIMP 1 und 3 reguliert werden. Zudem werden sie nicht durch TIMPs inhibiert (*Edwards D.R. et al. 2008, Klein T. et al. 2011, Murphy G. 2009*). Es wäre daher von Interesse, auch ADAM 8 und 9 eingehender in atherosklerotischen und aneurysmatischen Gefäßen zu erforschen und beispielsweise mögliche Inhibitoren und weitere Substrate zu finden.

Erschwert wurde die vergleichende Literaturrecherche dadurch, dass sich, mit einer Ausnahme, sämtliche relevanten Studien auf Atherosklerose bezogen, was einen direkten Vergleich mit unseren gewonnenen Daten nicht bedingungslos zulässt. Die Aneurysmaerkrankung ist als eigenständige Entität von der Atherosklerose abzugrenzen, obwohl Atherosklerose als ein Ausgangspunkt der Entwicklung eines AAAs angesehen wird



(Guo D.-C. et al. 2006, Kaschina E. et al. 2009, Shimizu K. et al. 2006). Zudem ist in jedem Fall die Herkunft der Kontrollen zu berücksichtigen, bevor ein direkter Vergleich von Studiendaten angestrengt wird. Die Gegenüberstellung unserer Daten und der Daten von Satoh, Oksala, Herren und Al-Fakhri et al. zeigte, dass Alter und Spezies der Spender, Herkunft der Kontrollgefäße, sowie Isolation von Zellen in Zellkulturen zu einer starken Fluktuation der Ergebnisse führen. Wünschenswert wäre es, um die Rolle der ADAMs bei Aneurysmaerkrankung und Atherosklerose weiter zu eruieren, zusätzliche vergleichende Daten zu kreieren, welche sich auf einheitliche Kontrollmaterialien beziehen. Es sollte bedacht werden, dass eine abweichende Lokalisation von Proben und Kontrollen die Aussagekraft einer Studie einschränken kann, da pathologische Prozesse verschiedener Gefäßregionen voneinander abweichen. Beispielsweise weist das thorakale Aneurysma eine andere Pathogenese als das abdominale Aneurysma auf (Pannu H. et al. 2006).

Eine wesentliche Limitierung des Vergleichs der ADAM-Expression in AAA und Kontrollen ist der Aspekt, dass die Expression von ADAMs nach unserer Datenlage mit dem Gehalt an SMCs korreliert. Es ist ebenso bekannt wie histologisch nachweisbar (Kapitel 3.3), dass die Aneurysmaerkrankung mit einem Verlust an SMCs einhergeht (Michel J.B. et al. 2011). Als möglicher Grund sollte in Erwägung gezogen werden, dass die Expression von ADAMs in SMCs bereits vor der anatomischen und klinischen Manifestation des AAAs vorliegen und somit bereits zu einem früheren Zeitpunkt die Entstehung von AAA beeinflussen kann. Tatsächlich wiesen unserer Kontrollpatienten, welche keine makroskopischen Korrelate der Atherosklerose oder des AAAs zeigten, mit Ausnahme von ADAM 9, eine stärkere ADAM-Expression auf. Bei einem Durchschnittsalter von 54,8 Jahren wäre es weiterhin interessant zu untersuchen, ob bereits jüngere Patienten eine Expression von ADAMs aufweisen und wie stark diese Expression ausfällt.

Um unsere Studiendaten als Grundlage für weitere Untersuchungen zu nutzen, wäre es ausschlaggebend einen direkten Expressionsnachweis der ADAMs in AAA und Kontrollorten zu etablieren. Beispielsweise durch einen direkten Proteinnachweis mittels Westernblot könnten die Ergebnisse der qRT-PCR unterstützt werden. Nachdem die Durchführung des Westernblots an Gewebeproben nicht möglich war, wäre zu erwägen, Zellkulturen von SMCs aus AAA und Kontrollorten anzulegen und erneut Westernblots durchzuführen.

Der Fokus weiterer Untersuchungen sollte auf der Aktivität der exprimierten ADAMs liegen. Dies kann beispielsweise mittels Zymographie erfolgen. Unsere Studie erbrachte Hinweise auf ein Ungleichgewicht zwischen Expression und Inhibition einiger ADAMs im AAA. Ausschlaggebend in der Pathogenese des AAAs ist unter Umständen nicht alleine die Expression der ADAMs, sondern deren verminderte Inhibition. Einige Studien weisen zudem

auf eine protektive Rolle von TIMP 1 in der AAA-Formation hin (*Ogata T. et al. 2005, Silence J. et al. 2002*).

Abschließend ist zu überlegen, welcher klinische Vorteil durch eine ausgedehnte Erforschung der Rolle der ADAMs zu erlangen wäre. Generell ist es wichtig und lebensrettend, potentiell letale Erkrankungen, wie das AAA, frühzeitig zu erkennen und zu therapieren. Sonographie (*Eckstein et al. 2009*) und CT sind erprobte Verfahren. Die Etablierung geeigneter Marker stellt einen weiteren Ansatzpunkt zur Früherkennung des AAAs dar. Die Diagnostik mit Markern erfordert in der Regel nur die Gewinnung geeigneter Körpersekrete und deren Untersuchung. Jedoch setzt die Markerbestimmung eine eingehende klinische Erforschung voraus, um die gewünschte Relevanz der zu bestimmenden Marker zu gewährleisten. Sollte die Etablierung von Markern gelingen, müsste weiterhin ein kosteneffizientes Verfahren zur Markerbestimmung entwickelt werden. Unter genannten Prämissen birgt die Markerbestimmung die Chance einer nicht-invasiven Diagnostik, möglicherweise sogar bevor sich anatomische Korrelate (e.g. fortschreitende Dilatation) manifestieren. Zudem könnte die Markerbestimmung eine Charakterisierung von Risikopatienten erlauben. Ein großer Nachteil der Markerbestimmung besteht hingegen darin, dass die zu untersuchenden Enzyme spezifisch für die Krankheit sein müssen und weitere Expressionsorte im Körper ausgeschlossen werden sollten. Alle untersuchten ADAMs werden jedoch ebenfalls im Rahmen entzündlicher und maligner Prozesse exprimiert (Kapitel 1.4.2 bis 1.4.7), wodurch ein spezifischer Nachweis nicht sicher gewährleistet ist. Zudem muss das Vorliegen des Markers in den zu untersuchenden Körpersekreten sichergestellt sein.

Die Frage nach der Eignung der ADAMs als Biomarker lässt sich nach dem heutigen Wissensstand nicht beantworten. Derzeit kann lediglich die Vermutung angestellt werden, dass ADAMs eine bislang unbekannte Funktion in der Aortenwand haben, jedoch möglicherweise an der Entstehung von AAA beteiligt sein können.

## 5 Zusammenfassung

Das abdominale Aortenaneurysma (AAA) ist eine häufige Erkrankung der älteren Population. Trotz verbesserter Therapieoptionen geht die Ruptur des AAAs nach wie vor mit hohen Mortalitätsraten einher. Bislang gilt ein Durchmesser von über 5,5 cm als ausschlaggebende Therapieindikation. Es ist bekannt, dass insbesondere entzündliche Vorgänge und die Degradierung der Gefäßwand durch Proteasen zu Aneurysmabildung und Ruptur beitragen. Dabei wird die extrazelluläre Matrix (ECM) der Aortenwand abgebaut. Der Gehalt an glatten Muskelzellen (SMCs) und elastischen Fasern reduziert sich dramatisch. Verschiedene Proteasen wurden bislang im AAA nachgewiesen. Die Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind derzeit die bekanntesten und am besten erforschten Vertreter. Die Rolle der ADAMs (A Disintegrin and Metalloprotease), welche wie MMPs der Familie der Metalloproteasen angehören, wurde hingegen bislang kaum untersucht. Es gibt jedoch bereits Hinweise auf die Beteiligung einzelner Mitglieder der Familie der ADAMs, e.g. ADAM 15 und 17, an der Atherogenese. Lediglich zu ADAM 17 liegt derzeit eine Studie vor, welche sich mit der Aneurysmaerkrankung befasst.

Ziel dieser Dissertation war daher die systematische Untersuchung proteolytisch aktiver ADAMs (ADAM 8, 9, 10, 12, 15 und 17) und deren Inhibitoren (TIMP 1 und 3) im AAA.

Zu diesem Zweck wurden Präparate von 20 Patienten während der operativen Sanierung eines AAAs entnommen und 10 Kontrollpräparaten gegenübergestellt. Es folgten eine histologische Charakterisierung und immunhistochemische Begutachtung der Präparate, sowie wie eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels SYBR-Green-basierter-qRT-PCR und auf Proteinebene mittels Westernblot an acht weiteren AAA-Präparaten.

Die untersuchten ADAMs und TIMPs waren immunhistochemisch in SMCs, Infiltraten, Markophagen und Neogefäßen nachweisbar. Die Expressionsanalyse der untersuchten ADAMs mittels PCR zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen AAAs und Kontrollen. Lediglich deren Inhibitor TIMP 1 wies eine signifikant schwächere Expression in den AAAs auf. Die Normierung der ADAMs gegen ihre Inhibitoren ergab hingegen eine signifikant erhöhte relative Expression von ADAM 10 und 15 im AAA. Signifikant positive Korrelationen konnten zwischen ADAM 10, 12, 15, 17 und TIMP 3, sowie dem Gehalt an SMCs beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden erstmalig sämtliche proteolytisch aktiven ADAMs parallel untersucht. Alle getesteten ADAMs waren im AAA, insbesondere in SMCs, nachweisbar. ADAMs scheinen somit eine Funktion in der gesunden Gefäßwand zu haben. Die vergleichsweise niedrige Expression der ADAMs im AAA lässt sich durch den Verlust von SMCs im Rahmen der Aneurysmaerkrankung erklären. Im AAA handelt es sich insgesamt vermutlich weniger um eine Überexpression der ADAMs, als um eine verminderte Inhibition

durch TIMPs. ADAMs können somit aufgrund ihrer Expression und ihrer enzymatischen Eigenschaften zur Entstehung und Progression des AAAs beitragen. Um jedoch den Stellenwert der ADAMs im Rahmen der Aneurysmaerkrankung einordnen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## 6 Literaturverzeichnis

- Al-Fakhri N., Wilhelm J., Hahn M., Heidt M., Hehrlein F.W., Endisch A.M., Hupp T., Chlerian S.M., Bobryshev J.V., Lord R.S.A., Katz N. Increased Expression of Disintegrin Metalloproteases ADAM-15 and ADAM-9 Following Upregulation of Integrins  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  in Atherosclerosis. *J Cell Biochem.* 89 (2003): 808-823
- Allenberg J.R., Schuhmacher H. Eckstein H.-H., Kallinowski F. Infrarenal abdominal aortic aneurysm: morphological classification as decision aid for therapeutic procedures. *Zentralblatt Chir.* 212 (1996): 721-726
- Arbeitskreis vaskulärer Ultraschall (AvU) der Deutschen Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin (DEGUM). Dokumentationsempfehlungen zur Qualitätssicherung in der vaskulären Ultraschalldiagnostik. 2004
- Arduise C., Abache T., Li L., Billard M., Chabanon A., Ludwig A., Mauduit P., Bocheix C., Rubinstein E., Le Naour F. Tetraspasmins regulate ADAM10-Mediated Cleavage of TNF- $\alpha$  and Epidermal Growth Factor. *J Immunol.* 181 (2008): 7002-7013
- Asakura M., Kitakaze M., Takashima S., Liao Y., Ishikura F., Yoshinaka T., Ohmoto H., Node K., Yoshino K., Ishiguro H., Asanuma H., Sanada S., Matsumura Y., Takeda H., Beppu S., Tada M., Hori M., Higashiyama S. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med.* 8 (2002): 20 - 21
- Auerbach O., Garfinkel L. Atherosclerosis and aneurysm of aorta in relation to smoking habits and age. *Chest.* 78 (1980): 805-809
- Baretton G.B., Kirkpatrick C.J., Bültmann B.D.: Gefäße. In: „Pathologie“. Böcker W., Denk H., Heitz Ph.U. Urban & Fischer, München/Jena. 2004: 481-504
- Baumgartner I., Hirsch A.T., Abola M.T., Cacoub P.P., Poldermans D., Steg P.G., Creager M.A., Bhatt D.L., Cardiovascular risk profile and outcome of patients with abdominal aortic aneurysms in out-patients with atherosclerosis: data from the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *J Vasc Surg.* 48 (2008): 808-814

- Blobel C.P. ADAMs: Key Components in EGFR Signalling and Development. *Nature*. 6 (2005): 32-43
- Böckler D., Lang W., Debus E.S., Flessenkämper I., Florek H.J., Noppeney T., Schmitz-Rixen T., Nöldecke S., Hupp T., Eckstein H.-H. Randomisierte Studien mit EBM-Level 1 beweisen es. Ein Screeningprogramm für abdominelle Aortenaneurysmen ist sinnvoll! *Gefäßchirurgie*. 14 (2009): 350-361
- Bräsen J.H., Niendorf A.: Atherosklerose – Formale Pathogenese, Klassifikation und funktionelle Bedeutung. *Pathologe*. 18 (1997): 218-227
- Brewster D.C., Cronenwett J.L., Hallett J.W., Johnston K.W., Krupski W.C., Matsumura J.S. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms: Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association of Vascular Surgery and Society of Vascular Surgery. *J Vasc Surg*. 37 (2003): 1106-1117
- Brown L.C., Powell J.T.: Risk Factors for Aneurysm Rupture in Patients Kept Under Ultrasound Surveillance. *Ann Surg*. 230 (1999): 289
- Canault M., Leroyer A.S., Peiretti F., Lesèche G., Tedgui A., Bonardo B., Alessi M.C., Boulanger C.M., Nalbonte G. Microparticles of Human Atherosclerotic Plaques Enhance the Shedding of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme/ADAM 17 Substrates, Tumor Necrosis Factor and Tumor Necrosis Factor Receptor-1. *Am J Pathol*. 171 (2007): 1713-1723
- Cardellini M., Menghini R., Martelli E., Casagrande V., Marino A., Rizza S., Porzio O., Mauriello A., Solini A., Ippoliti A., Lauro R., Folli F., Federici M. TIMP 3 is Reduced in Atherosclerotic Plaques from Subjects with Type 2 Diabetes and Increased by SirT1. *Diabetes*. 58 (2009): 2396-2401
- Chantry A., Gregson N.A., Glynn P. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterisation. *J Biol Chem*. 264 (1989): 21603-21607
- Charrier-Hisamuddin L., Laboisie C.L., Merlin D. ADAM 15: a metalloprotease that mediates inflammation. *FASEB J*. 22 (2008): 641-653



- Choke E., Cockerill G., Wilson W.R.W., Sayed S., Dawson J., Loftus I., Thompson M.M.: A Review of Biological Factors Implicated in Abdominal Aortic Aneurysm Rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 20 (2005): 227-244
- Chubinskaya S., Mikhail R, Deutsch A., Tindal M.H. ADAM 10 protein is present in human articular cartilage primarily in the membrane-bound form and is upregulated in osteoarthritis and in response to IL-1alpha in bovine nasal cartilage. *J Histochem Cytochem.* 49 (2001): 1165 – 1176
- Claesson-Welsh L. ADAM-mediated Shedding. A new Flavour in Angiogenesis Regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 11 (2010): 2087-2088
- Donners M.M., Wolfs I.M., Olieslagers S., Mohammadi-Motahhari Z., Tchaikovski V., Heeneman S., van Buul J.D., Caolo V., Molin D.G., Post M.J., Waltenberger J. A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 11 (2010): 2188-2195
- Dreux A.C., Lamb D.J., Modjtahedi H., Ferns G.A. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 186 (2006): 38 - 53
- Eckstein H.-H., Böckler D., Flessenkämper I., Schmitz-Rixen T., Debus S., Lang W. Ultraschall-Screening abdominalen Aortenaneurysmen. *Deutsches Ärzteblatt.* 41 (2009): 657-663
- Eckstein H.-H., Bruckner T. Heider P., Wolf O., Hank M., Niedermeier H.P., Noppeney T., Umscheid T., Wenk H. The relationship between volume and outcome following elective open repair of abdominal aortic aneurysms (AAA) in 131 German hospitals. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 34 (2007): 260-266
- Eckstein H.-H., Heider P., Wolf O., Hanke M. Gefäßchirurgie. In: „Chirurgie“. Siewert, J.R. Springer, Heidelberg, 2006: 434-491
- Edwards D.R., Handsley M.M., Pennington C.J. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 29 (2008): 258-289

- Eliason J.L., Upchurch G.L. Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Circulation*. 117 (2008) 1738-1744
- Foley S., Mogas A.K., Olivenstein R., Fiset P.O., Chakir J., Bourbeau J., Ernst P., Lemièrre C., Martin J.G., Hamid Q. Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma. *J Allergy Clinical Immunol*. 119 (2007): 863 -871
- Galis Z.S., Sukhova G.K., Lark M.W., Libby P. Increased expression of matrix metalloproteases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 94 (1994): 2493-2503
- Gilpin, B.J., Loechel, F., Mattei, M.G., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U.M.: A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin  $\alpha$ ) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem*. 273 (1998): 157-166
- Golledge J., Muller J., Daugherty A., Norman P.: Abdominal Aortic Aneurysm: Pathogenesis and Implications for Management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26 (2006): 2605-2613
- Gu L., Rutledge B., Fiorillo J., Ernst C., Grewal I., Flavell R., Gladue R., Rollins B. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leuc Biol*. 62 (1997): 577-580
- Guo D.-C, Papke C.L., He R., Milewicz D. M. Pathogenesis of Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Ann N Y Acad Sci*. 1085 (2006): 229-352
- Gussmann A., Kühn J., Weise U.: Leitlinien zum Bauchortenaneurysma und Beckenarterienaneurysma. In: Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (DGG). 2008
- Herren B. ADAM-mediated Shedding and Adhesion: a Vascular Perspective. *News Physiol Sci*. 17 (2002): 73-76
- Herren B\*, Raines E.W., Ross R. Three Putative Integrin Ligands Identified in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Ann N Y Acad Sci. Atherosclerosis IV*. 811 (1997): 498-505
- Herren B., Raines E.W., Ross R. Expression of disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo, *FASEB J*. 11 (1997): 173-180

- Herrmann J., Lerman L.O., Mukhopadhyay D., Napoli C., Lerman A. Angiogenesis and Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (2006): 1948-1957
- Herron G.S., Unemori E., Wong M., Rapp J.H., Hibbs M.H., Stoney R.J. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 11 (1991): 1667-1677
- Horiuchi K., Weskamp G., Lum L., Hammes H.-P., Cai H., Brodie T.A., Ludwig T., Chiusaroli R., Baron R., Preissner K.T., Manova K., Blobel C.P. Potential Role for ADAM15 in Pathological Neovascularization in Mice. *Mol Cellular Biol.* 23 (2003): 5614-5624
- Hotoda N., Koike H., Sasagawa N., Ishiura S. A secreted form of human ADAM 9 has an  $\alpha$ -secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun.* 293 (2002): 800-805
- Iba K., Albrechtsen R., Gilpin B., Frohlich C., Loechel F., Zolkiewska A., Ishiguro K., Kojima T., Liu W., Langford J.K., Sanderson R.D., Brakebusch C., Fassler R., Wewer U.M. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signalling events that lead to  $\beta$ 1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol.* 149 (2000): 1143-1156
- Ishikawa N., Daigo Y., Yasui W., Inai K., Nishimura H., Tsuchiya E., Kohno N., Nakamura Y. ADAM 8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res.* 10 (2006): 8363-8370
- Johnston K.W., Rutherford R.B., Tilson M.D., Shah D.M., Hollier L., Stanley J.C. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vas Surg.* 13 (1991): 452-458
- Kaschina E., Scholz H., Steckelings U.M., Sommerfeld M., Kemnitz U.R., Artuc M., Schmidt S., Unger T. Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components. *Atherosclerosis.* 205 (2009): 396-403

- Kate ten G.L., Sijbrands E.J.G, Valkema R., Cate ten F.J., Feinstein S.B., Steen van der A.F.W., Daemen M.J.A.P., Schinkel A.F.L. Molecular imaging of inflammation and intraplaque vasa vasorum: A step forward to identification of vulnerable plaques? *J Nucl Cardiol.* 17 (2010): 897-912
- Klein T., Bischoff R. Active Metalloproteases of the A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) Family: Biological Function and Structure. *J Proteome Res.* 10 (2011): 17-33
- Koba S., Hirano T. Dyslipidemia and atherosclerosis. *Nippon Rinsho.* 69 (2011): 138-143
- Kooten van C., Banchereau J. CD40 – CD40 ligand. *J Leuc Biol.* 67 (2000): 2-17
- Krätzschmar, J., Lum, L., Blobel, C.P. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem.* 271 (1996): 4593-4596
- Kröger K., Suckel A., Hirche H., Rudofsky G. Different prevalence of atherosclerotic lesions in males and females. *Vasc Med.* 4 (1999): 61-65
- Kronqvist P., Kawaguchi N., Albrechtstein R., Xu X., Schrøder H.D., Moghadaszadeh B., Nielsen F.C., Fröhlich C., Engvall E., Wewer U.M. ADAM12 Alleviates the Skeletal Muscle Pathology in mdx Dystrophic Mice. *Am J Path.* 161 (2002): 1535-1540
- Kuivaniemi H., Shibamura H., Arthur C., Berguer R., Cole C.W., Juvonen T., Kline R.A., Limet R., Mackean G., Norrgard O., Pals G., Powell J.T., Rainio P., Sakalihan N., van Vlijmen-van Keulen C., Verloes A., Tromp G. Familial aortic aneurysms: collection of 233 multiplex families. *J Vasc Surg.* 37 (2003): 340-345
- Lederle F.A. Abdominal Aortic Aneurysm. *Ann Intern Med.* ITC 5 (2009): 1-16
- Lee M.-H., Atkinson S., Murphy Gillian. Identification of the Extracellular Matrix (ECM) Binding Motifs of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases TIMP-3 and Effective Transfer to TIMP-1. *J Biol Chem.* 282 (2007): 6887-6898

- Levula M, Airla N, Oksala N, Hernesniemi JA, Pelto-Huikko M, Salenius JP, Zeitlin R, Järvinen O, Huovila AP, Nikkari ST, Jaakkola O, Ilveskoski E, Mikkelsen J, Perola M, Laaksonen R, Kytömäki L, Soini JT, Kähönen M, Parkkinen J, Karhunen PJ, Lehtimäki T. ADAM8 and its single nucleotide polymorphism 2662 T/G are associated with advanced atherosclerosis and fatal myocardial infarction: Tampere vascular study. *Ann Med.* 41 (2009): 497-507
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 420 (2002): 868-874
- Loechel F., Fox J.W., Murphy G., Albrechtstein R., Wewer U.M. ADAM 12-S Cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and Is Inhibited by TIMP-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 280 (2001): 421
- Lusis A.J. Atherosclerosis. *Nature.* 407 (2000): 233-241
- Martin J., Eynstone L.V., Davies M., Williams J.D., Steadman R. The role of ADAM 15 in glomerular mesangial cell migration. *J Biol Chem.* 277 (2002): 33683-33689
- Michel J.B., Martin-Ventura J.L., Egido J., Sakalihasan N., Treska V., Lindholt J., Allaire E., Thorsteinsdottir U., Cockerill G., Swedenborg J. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 90 (2011): 18-27
- Millichip M.I., Dallas D.J., Wu E., Dale S., McKie N. The metallo-disintegrin ADAM 10 from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 245 (1998): 594 - 598
- Mizuno T., Nagamura H., Iwamoto K.S., Ito T., Fukuhara T., Tokunaga M., Tokuoka S., Mabuchi K., Seyama T. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn Mol Pathol.* 7 (1998): 202-208
- Mochizuki S., Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Jpn Cancer Assoc.* 5 (2007): 621-628
- Murphy G. Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the "Sheddases". *Semin Cell Dev Biol.* 20 (2009): 138-145

- Nomura T., Katunuma N. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *J Med Invest.* 52 (2005): 1-9
- Nordon I.M., Hinchliffe R.J., Holt P.J., Thompson M.M., Loftus I.M. Should the role of EVAR be re-evaluated in light of the 10-year results of EVAR-1? *J Cardiovasc Surg.* 52 (2011): 179-187
- Nordon I.M., Hinchliffe R.J., Loftus I.M., Thompson M.M. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* 8 (2011): 92-102
- Ogata T., Shibamura H., Tromp G., Sinha M., Goddard K.A.B., Sakalihasan N., Limet R., MacKean G.L., Arthur C., Sueda T., Land S., Kuivaniemi H. Genetic analysis of polymorphism in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 14 (2005): 1036-1042
- Ohtsu H., Dempsey P.J., Frank G.D., Brailoiu E., Sadaharu H., Suzuki H., Nakashima H., Eguchi K., Eguchi S. ADAM 17 Mediates Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy Induced by Angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (2006): 133-137
- Oksala N., Levula M., Airla N., Pelto-Huikko M., Ortiz R.M., Järvinen O., Salenius J.P., Ozsait B., Komurcu-Bayrak E., Erginel-Unaltuna N., Huovila A.P., Kytömäki L., Soini J.T., Kähönen M., Karhunen P.J., Laaksonen R., Lehtimäki T. ADAM-9, ADAM-15, and ADAM-17 are upregulated in macrophages in advanced human atherosclerotic plaques in aorta and carotid and femoral arteries – Tampere vascular study. *Ann Med.* 41 (2009): 279-290
- Orr A.W., Hastings N.E., Blackmann B.R., Wamhoff B.R. Complex Regulation and Function of the Inflammatory Smooth Muscle Cell Phenotype in Atherosclerosis. *J Vasc Res.* 47 (2010): 168-180
- Pannu H., Avidan N., Tran-Fadulu V., Milewicz D.M. Genetic Basis of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections – Potential Relevance to Abdominal Aortic Aneurysms. *Ann N Y Sci.* 1085 (2006): 242-255



- Powell J.T. Abdominal aortic aneurysm: natural history of rupture. In: "Surgical and endovascular treatment of aortic aneurysms". Branchereau A., Jacobs M. EVC, Futura Publishing, New York. 2000: 11-18
- Raab G., Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochem Biophys Acta*. 1333 (1997): 179-199
- Raffetto J.D., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodelling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*. 75 (2008): 346-359
- Rakita D., Newatia A., Hines J.J., Siegel D.N., Friedman B. Spectre of CT-Findings in Rupture and Impending Rupture of Abdominal Aortic Aneurysms. *Radiographics*. 27 (2007): 497-507
- Reddy P., Slack J.L., Davis R., Cerrettii D.P., Kozlosky C.J., Blanton R.A., Shows D., Peschon J.J., Black R.A. Functional Analysis of the Domain Structure of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme. *J Biol Chem*. 257 (2000): 14608-14614
- Reed D., Reed C., Stemmermann G., Hayashi T. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation*. 85 (1992): 205-211
- Reeps C., Pelisek J., Seidl S., Schuster T., Zimmermann A., Kuehnl A., Eckstein H.-H. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology*. 76 (2009): 243-252
- Rooke J., Pan D., Xu T., Rubin G.M. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science*. 273 (1996): 1227-1231
- Rovida, E., Paccagnini, A., Del Rosso, M., Peschon, J., Dello Sbarba, P. TNF- $\alpha$ -converting enzyme cleaves the macrophage-colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol*. 166 (2001): 1583-1589
- Sahin U., Weskamp G., Kelly K., Zhou H.-M., Higashimiyama S., Peschon J., Hartmann D., Saftig P., Blobel C.P. Distinct roles for ADAM 10 and ADAM 17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*. 164 (2004): 769-779

- Sakalihasan N., Delvenne P., Nusgens B.V., Limet R., Lapiere C.M. Activated forms of MMP 2 and MMP 9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 24 (1996): 127-133
- Sakalihasan N., Limet R., Defawe O.D. Abdominal Aortic Aneurysm. *Lancet.* 365 (2005): 1577-1589
- Satoh H., Nakamura M., Satoh M., Nakajima T., Izumoto H., Maesawa C., Kawazoe, Masuda T., Hiramori K. Expression and localization of tumor necrosis factor- $\alpha$  and its converting enzyme in human abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci.* 106 (2004): 301- 306
- Schönbeck U., Sukhova G.K., Shimizu K., Mach F., Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 97 (2000): 7458-7463
- Schönbeck U., Sukhova G.K., Gerdes N., Libby P. T(H)2 predominant immune response prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol.* 161 (2002): 499-506
- Seals D.F., Courtneidge S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17 (2003): 7-30
- Shimizu K., Mitchell R.N., Libby P. Inflammation and Cellular Response in Abdominal Aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (2006): 987-994
- Shiomi T., Lemaitre V., D'Armiento J., Okada Y. Matrix metalloproteases, a disintegrin and metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int.* 60 (2010): 477-496
- Silence J., Collen D., Lijnen H.R. Reduced Atherosclerotic Plaque but Enhanced Aneurysm Formation in Mice with Inactivation of Tissue Inhibitor of Metalloprotease Gene. *Circ Res.* 90 (2002): 897-903
- Smith J.D., Trogan E., Ginsberg M., Grigaux C., Tian J., Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci.* 92 (1995): 8264-8268

- 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. *Am J Pathol.* 158 (2001): 419-429
- Stocker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Ruth F.X., McKay D.B., Bode W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-proteases. *Protein Sci.* 4 (1995): 823-840
- Sukhova G.K., Shi G.P. Do Cathepsins Play a Role in Abdominal Aortic Aneurysms Pathogenesis? *Ann N Y Acad Sci.* 1085 (2006): 161-169
- Sun C. Wu M.H., Guo M, Day M.L., Lee E.S., Yuan S.Y. ADAM15 regulates endothelial permeability and neutrophil migration via Src/ERK1/2 signalling. *Cardiovasc Res.* 87 (2010): 348-355
- Tagaki H., Manabe H., Kawai N., Goto S., Umemoto T. Circulating matrix metalloproteinase-9 concentrations and abdominal aortic aneurysm presence: a meta-analysis. *Interact Cardio Vasc Thorac Surg.* 9 (2009): 437-440
- Tanasković I., Mladenović-Mihailović A., Usaj-Knezević S., Stanković V., Aleksić A., Kastratović T., Aleksić A., Lazić Z., Mladenović-Bogdanović Z., Zivanović A., Djurić J., Jovčić U., Sorak M. Histochemical and immunohistochemical analysis of ruptured atherosclerotic abdominal aortic aneurysm wall. *Vojnosanit Pregl.* 67 (2010): 959-964
- Thompson R.W., Baxter B.T. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysm. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann N Y Acad Sci.* 878 (1999): 159-178
- Ugurluoglu A. Duplexsonographie der Aorta abdominalis und der viszeralen Arterien. In: „Duplexsonographie der Gefäße“ Katzenschlager R., Atteneder M., Hirschl M., Ugurluoglu A. Krause und Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, Gablitz (A). 2007, 33-46
- Vainas T., Lubbers T., Stassen F.R., Hengreen S.B., van Dieijen-Visser M.P., Bruggeman C.A., Kitslaar P.J., Schurink G.W. Serum C-reactive protein level is associated with abdominal aortic aneurysm size and may be produced by aneurysmal tissue. *Circulation.* 107 (2003): 1103-1105

- Vardulaki K.A., Walker N.M., Day N.E., Duffy S.W., Ashton H.A., Scott R.A. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 87 (2000): 195-200
- Verloes A., Sakalihan N., Koulischer L., Limet R. Aneurysm of the abdominal aorta: familial and genetic aspects in three hundred thirteen pedigrees. *J Vasc Surg.* 21 (1995): 646-655
- Wang Y., Zhang A.C., Ni Z., Herrera A., Walcheck B. ADAM17 activity and other mechanisms of soluble L-selectin production during death receptor-induced leukocyte apoptosis. *J Immunol.* 184 (2010): 4447-4454
- Yoshiyama K., Higuchi Y., Kataoka M., Matsuura K., Yamamoto S. CD156 (human ADAM8): expression, primary amino acid sequence, and gene location. *Genomics.* 41 (1997): 56 – 62
- Yu W.-H., Yu S.C., Meng Q., Brew K., Woessner J.F., Jr. TIMP-3 Bind to Sulfated Glycosaminoglycans of the Extracellular Matrix. *J Biol Chem.* 275 (2000): 31226-31232

## 7 Veröffentlichungen

Lipp C., Lohoefer F., Reeps C., Rudelius M., Baumann M., Heemann U., Eckstein H.-H., Pelisek J.  
Expression of a disintegrin and metalloprotease in human abdominal aortic aneurysm.  
J Vasc Res. 49 (2012): 198-206

Lohoefer F., Reeps C., Lipp C., Rudelius M., Zimmermann A., Ockert S., Eckstein H.-H., Pelisek J.  
Histopathological analysis of cellular localization of cathepsins in abdominal aortic aneurysm wall.  
Int J Exp Pathol. 93 (2012): 252-258

Lohoefer F., Reeps C., Lipp C., Rudelius M., Haertl F., Gurdan M., Eckstein H.-H., Pelisek J.  
Quantitative expression and cellular localization of cysteine and aspartic proteases in human abdominal aortic aneurysm.  
In Vorbereitung

## 8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Eckstein und Herrn PD Dr. Pelisek für die Überlassung dieses herausfordernden und spannenden Themas und die umfassende Betreuung.

Weiterhin danke ich Frau Renate Hegenloh und Herrn PD Dr. Pelisek für die versierte Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Laborversuche.

Ich erinnere mich gerne an die Stunden im Labor – es war eine lehrreiche und angenehme Zeit.

Ich möchte mich insbesondere bei Herrn PD Dr. Pelisek für Engagement und Zeiteinsatz bedanken – so fand ich während der Verfassung dieser Arbeit und der zugehörigen Publikation zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen und Kritik.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Keil vom Institut für Rechtsmedizin der LMU München, der mir die Gewinnung des Kontrollmaterials erleichtert hat.

Ich danke auch meinem Freund Felix, der mich zu jeder Zeit unterstützte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben.



Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen, als die angegebenen, Hilfsmittel verwendet habe.

München, Juli 2011