

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

**Matrixmetalloproteinasen und Cathepsine in der  
Kollagendegradierung im abdominellen Aortenaneurysma**

**Veronika Julia Klaus**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen

Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Jaroslav Pelisek

2. apl. Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker

Die Dissertation wurde am 15.11.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.02.2019 angenommen.

# INHALT

---

1	Einleitung.....	1
1.1	Klinische Aspekte des Abdominellen Aortenaneurysmas.....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.1.3	Klinische Präsentation und Diagnostik.....	2
1.1.4	Risikofaktoren.....	2
1.1.5	Therapie.....	3
1.2	Pathophysiologie des Abdominellen Aortenaneurysmas.....	5
1.2.1	Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.....	5
1.2.2	Inflammation und Veränderung der zellulären Zusammensetzung.....	6
1.2.3	Biomechanik.....	7
1.3	Matrixmetalloproteinasen.....	8
1.3.1	Klassifikation und Struktur.....	8
1.3.2	Expression und Aktivität.....	9
1.3.3	Physiologische und pathologische Funktionen.....	10
1.3.4	Matrixmetalloproteinasen im Abdominellen Aortenaneurysma.....	11
1.4	Cathepsine.....	12
1.4.1	Klassifikation und Struktur.....	12
1.4.2	Expression und Aktivität.....	13
1.4.3	Funktionen.....	14
1.4.4	Cathepsine im Abdominellen Aortenaneurysma.....	14
1.5	Zielsetzungen der Doktorarbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Patienten und Probengewinnung.....	17
2.1.1	Aneurysma.....	17
2.1.2	Kontrollen.....	17
2.2	Aufbereitung und Lagerung der Gewebeproben.....	18
2.3	Expressionsuntersuchungen auf mRNA-Ebene.....	18
2.3.1	RNA-Extraktion.....	18
2.3.2	cDNA-Synthese.....	18

2.3.3	PCR .....	19
2.4	Expressionsuntersuchungen auf Proteinebene .....	22
2.4.1	Proteinextraktion .....	22
2.4.2	ELISA.....	23
2.5	Statistische Auswertung .....	24
3	Ergebnisse .....	24
4	Diskussion .....	25
4.1	Wie unterscheidet sich die Expression von MMPs, TIMPs, Cathepsinen und Cystatin C auf mRNA- und Protein-Ebene zwischen AAA und Kontrollen? .....	25
4.2	Welche Zellen in der Gefäßwand des AAAs exprimieren MMPs, TIMPs, Cathepsine und Cystatin C? .....	28
4.3	Gibt es Zusammenhänge zwischen der Expression der untersuchten Proteasen und den Kollagenen Typ I und III beziehungsweise deren Abbauprodukten in der Aortenwand?.....	29
4.4	Klinische Anwendungen .....	31
4.4.1	MMPs und Cathepsine in der Diagnostik .....	31
4.4.2	Therapie: Proteaseinhibitoren.....	32
5	Zusammenfassung der Veröffentlichungen.....	36
5.1	Association of Matrix Metalloproteinase Levels with Collagen Degradation in the Context of Abdominal Aortic Aneurysm.....	36
5.2	Cathepsin S is associated with degradation of collagen I in abdominal aortic aneurysm .....	37
6	Danksagung .....	39
7	Literaturverzeichnis .....	40
8	Appendix .....	50
	Publikation I .....	51
	Publikation II .....	61

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 KLINISCHE ASPEKTE DES ABDOMINELLEN AORTENANEURYSMAS

### 1.1.1 Definition

Der Begriff „Aneurysma“ entstammt dem Altgriechischen und bedeutet Aufweitung. Es wird das Aneurysma verum (echtes Aneurysma) vom Aneurysma spurium (falsches Aneurysma) unterschieden. Ein echtes Aneurysma ist durch eine Aussackung aller drei Wandschichten des Gefäßes gekennzeichnet und durch eine Erweiterung des Gefäßdurchmessers um das mindestens 1,5-fache definiert. In der Aneurysmamorphanologie lassen sich fusiforme (spindelförmige), sakkiforme (sackförmige) Aneurysmen und Mischformen unterscheiden. Der physiologische Durchmesser der Aorta abdominalis beim Erwachsenen beträgt etwa 2,0 cm, ab einem Gefäßdurchmesser von 3,0 cm spricht man von einem Aneurysma.

### 1.1.2 Epidemiologie

Nach den Daten der Global Burden of Disease Study betrug im Jahre 1990 die altersstandardisierte Mortalität weltweit 3,3 pro 100.000 Individuen für ein Aortenaneurysma, zwanzig Jahre später war eine Abnahme auf 2,9 zu beobachten (Lozano, Naghavi et al. 2012). In Westeuropa lag die Mortalität jedoch mit 7,69 (1990) bzw. 7,68 (2010) wesentlich höher (Sampson, Norman et al. 2014).

In der Literatur wird die Prävalenz eines abdominellen Aortenaneurysmas (AAA) zwischen 1% und 12,7% angegeben (Stather, Sidloff et al. 2014). Das Statistische Bundesamt gibt für das Jahr 2016 für Deutschland folgende nach DRG (Diagnosis Related Groups) verschlüsselten Fallzahlen an: rupturiertes AAA (ICD-10: I71.3) 2091 Patienten (männlich: 1675, weiblich: 416), AAA ohne Angabe einer Ruptur: (I71.4) 14162 Patienten (männlich: 12132, weiblich: 2030). Insgesamt verstarben 2016 in Deutschland 2850 Patienten an einem Aortenaneurysma oder einer Aortendissektion (I71) (Statistisches Bundesamt 2017).

Für ein rupturiertes Aortenaneurysma geht man von einer Letalität von über 80% aus, wobei rund ein Drittel der Patienten schon vor der Hospitalisierung verstirbt (Reimerink, van der Laan et al. 2013). Angesichts dieser schlechten Prognose, wird ein Ultraschallscreening für Männer ab 65 Jahren empfohlen und ist seit Juni 2017 Teil des Leistungskataloges der gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland

(Bundesministerium für Gesundheit 2016). In der Literatur wird von einer Risikoreduktion von circa 40% gesprochen (Eckstein, Bockler et al. 2009, Ali, Fitzpatrick-Lewis et al. 2016).

### **1.1.3 Klinische Präsentation und Diagnostik**

In den meisten Fällen ist die Erkrankung an einem Aortenaneurysma symptomlos. Wird das Aneurysma symptomatisch, können Rücken-, Abdominal- und Flankenschmerzen auftreten. Selten kann durch Kompression der Ureteren Harnstau verursacht werden. Auch die Nierenfunktion kann durch Minderperfusion der Aa. renales beeinträchtigt werden. Vereinzelt führen Aneurysmen mit intraluminalen Abscheidungsthrombus zu Embolien in die Beinarterien. Im Falle der Ruptur eines abdominalen Aortenaneurysmas ist die Klinik aus akutem Abdomen und hämorrhagischem Schock führend (Sakalihan, Limet et al. 2005). In der klinischen Untersuchung lässt sich bei schlankeren Patienten unter Umständen ein pulsierender abdominaler Tumor tasten.

Mittel der Wahl zur Diagnosestellung des abdominalen Aortenaneurysmas ist eine abdominale Ultraschalluntersuchung, mit der sich dessen Durchmesser bestimmen und ein intraluminaler Thrombus nachweisen lässt. Diese Untersuchung stellt eine einfache Möglichkeit zu Screening und Verlaufsbeobachtung dar. Zur Operationsplanung und genaueren Diagnostik ist eine CT-Angiographie oder eine MRT-Untersuchung hilfreich (Debus, Heidemann et al. 2018).

### **1.1.4 Risikofaktoren**

Die Risikofaktoren für ein AAA überschneiden sich zum Teil mit den Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose und assoziierter Erkrankungen. Führend sind dabei Alter, männliches Geschlecht, Nikotinabusus und kardiovaskuläre Erkrankungen. Interessanterweise stellt eine Erkrankung an Diabetes mellitus einen protektiven Faktor dar (Eckstein, Bockler et al. 2009, Guirguis-Blake, Beil et al. 2014).

Ein Aortenaneurysma kann auch im Rahmen von hereditären Syndromen entstehen. Zu erwähnen sind dabei das Marfan-Syndrom, das mit einer autosomal-dominanten Mutation im Fibrillin-Gen einhergeht, und das Ehler-Danlos-Syndrom, dessen Unterformen sich durch verschiedene Störungen der Kollagensynthese auszeichnen. Charakteristisch ist dabei das frühe Erkrankungsalter der Betroffenen. In seltenen Fällen kann sich ein AAA auch auf dem Boden einer Vaskulitis (Takayasu-Arteriitis)

oder Infektionserkrankung (z.B. Mesaortitis luica) bilden (Sakalihasan, Limet et al. 2005).

### 1.1.5 Therapie

Während bei asymptomatischen Aneurysmen mit geringem Durchmesser (3 - 5,4 cm) eine Verlaufskontrolle ausreichend ist, ist nach den aktuellen Leitlinien bei Aneurysmen ab 5,5 cm eine Therapie indiziert. Unabhängig vom absoluten Aneurysmadurchmesser sind das Auftreten von Symptomen und eine Zunahme des Durchmessers  $> 1$  cm/Jahr weitere Therapieindikationen. Bei Frauen ist eine entsprechende Therapie schon ab einem Durchmesser von 5,0 cm angezeigt (Filardo, Powell et al. 2015, Debus, Heidemann et al. 2018).

Neben Lifestylemodifikationen, wie Bewegung, Ernährungsoptimierung und Verzicht auf Rauchen, ist bei AAA-Patienten auch eine medikamentöse Therapie indiziert. So reduzieren Statine (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) die perioperative Mortalität nach vaskulären Eingriffen, werden aber auch langfristig empfohlen (McNally, Agle et al. 2010). Belege, dass eine medikamentöse Therapie die Wachstumsrate eines AAAs moduliert, fehlen, jedoch sind kardiale und andere vaskuläre Komorbiditäten, wie beispielsweise pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit), keine Seltenheit bei AAA-Patienten. Daher profitieren entsprechende Patienten von einer Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern und antihypertensiven Medikamenten (Debus, Heidemann et al. 2018).

Neben der Vermeidung, beziehungsweise Therapie von Risikofaktoren gibt es in der Behandlung des AAA zwei Möglichkeiten. Zum einen ist ein operativer Ersatz der erweiterten Aorta möglich, zum anderen existiert eine endovaskuläre Therapieoption.

Bei der offenen Aneurysma-Reparatur (OAR) wird das Aneurysma über einen transabdominellen oder retroperitonealen Zugang dargestellt und nach dem Abklemmen der Aorta das Aneurysma eröffnet. Der betroffene Abschnitt der Aorta wird durch eine Prothese aus Dacron oder PTFE (Polytetrafluorethen) ersetzt und mit einem Teil des Aneurysmasacks übernäht. Je nach Konfiguration des Aneurysmas kann eine Rohrprothese oder bei Mitbeteiligung der Iliakalararterien eine Y-Prothese gewählt werden.

Alternativ kann das Aneurysma auch durch eine über einen Katheter eingebrachte Stentprothese ausgeschaltet werden. Diese Methode wird als endovascular aortic

repair (EVAR) bezeichnet. Die Prothese besteht aus einem selbst-expandierenden Stentgerüst, das mit einem Gewebe abgedichtet ist. Dabei wird der Stent proximal und distal des Aneurysmas durch Widerhaken in der Aorta verankert, um eine ausreichende Dichtigkeit zu gewährleisten. Voraussetzung dafür ist, dass die Morphologie des Aneurysmas eine Versorgung mit einem solchen Stentgraft zulässt.

Die Entscheidung für eines der beiden Therapieverfahren muss individuell getroffen werden. So profitieren beispielsweise Patienten mit eingeschränkter Operabilität vom weniger invasiven EVAR-Verfahren (Rückert, Hanack et al. 2014). Insgesamt ergaben randomisierte-kontrollierte Studien eine geringere 30-Tage-Mortalität [OR (Odds ratio) = 0,34], kürzere Krankenhausaufenthalte und eine geringere Häufigkeit von Myokardinfarkten (OR = 0,74) bei elektiver endovaskulärer Therapie (Thomas, Hulten et al. 2014). Jedoch war die Rate an Reinterventionen bei EVAR höher. In der Langzeitbeobachtung zeigten sich für beide Verfahren keine Unterschiede in der Mortalität mehr (Debus, Heidemann et al. 2018). Auch im Falle einer Ruptur zeigt sich die endovaskuläre Therapie mit einer Mortalitätsrate von 29.9% im Vergleich zu 40.8% der offenen Operation überlegen (Zhang, Feng et al. 2016).

Die häufigsten Komplikationen bei der Therapie von AAAs sind kardiovaskuläre Ereignisse und eine Verschlechterung der Nierenfunktion. So weisen Patienten sowohl nach OAR als auch nach EVAR ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte auf. Die Häufigkeit von nephrologischen Komplikationen ist bei beiden Verfahren vergleichbar, auch wenn die Ursachen von Dissektion oder Embolien der Aa. renales über Verlegung des Ostiums der Arterien durch einen Stent, das intraoperative Abklemmen der Aorta, bis zur Nierenschädigung durch Kontrastmittelexposition reichen. Zudem kann durch Verlegung oder Ligatur der A. mesenterica inferior eine ischämische Kolitis verursacht werden. Eine spinale Ischämie, durch Ausschaltung der segmentalen rückenmarksversorgenden Arterien, ist bei infrarenalen Aneurysmen selten. Weitere Komplikationen stellen Infektion, Fistelbildung oder Leckagen der prothetischen Materialien dar. Verfahrensunabhängige Komplikation ist die Entstehung einer Narbenhernie bei offener Operation. Bei EVAR sind die Ausbildung von Endoleaks, die eine mangelhafte Ausschaltung der Aneurysmaperfusion darstellen, gefürchtet. Außerdem können sich Hämatome, arteriovenöse Fisteln oder ein Aneurysma spurium an der meist inguinalen Punktionsstelle bilden (Maldonado, Rockman et al. 2004, Kleinspehn, Heidemann et al. 2015, Moghadamyeghaneh, Sgroi et al. 2016).

## **1.2 PATHOPHYSIOLOGIE DES ABDOMINELLEN AORTENANEURYSMAS**

Ätiologisch werden für das AAA sowohl eine genetische Prädisposition als auch das Einwirken verschiedener Umweltfaktoren in Betracht gezogen. Kennzeichen der Entstehung des AAA sind eine Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, der Zellen in der Gefäßwand, eine Entzündungsreaktion, eine erhöhte Proteasenaktivität und biomechanische Faktoren. Diese Veränderungen existieren natürlich parallel zueinander und bedingen sich gegenseitig. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten werden sie hier jedoch getrennt besprochen.

### **1.2.1 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix**

Gefäßwände lassen sich histologisch in drei Schichten einteilen: Tunica intima, media und adventitia. Während die Tunica intima in der Pathophysiologie der Atherosklerose eine große Rolle spielt, sind die Veränderungen im AAA vor allem in der Tunica media zu suchen. In der Tunica media finden sich neben Kollagenfibrillen zirkulär angeordnete Lamellen aus Elastin, dazwischen liegen glatte Muskelzellen, die durch Kontraktion die Elastinlamellen unter Vorspannung setzen.

Die primäre Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM) im AAA ist eine Degradierung und Fragmentierung von Elastin, was in einem insgesamt erhöhten Kollagenanteil in aneurysmatischer Aorta im Vergleich zu gesunder Aorta resultiert (He and Roach 1994). Der Verlust an elastischen Fasern führt zur Verringerung der Elastizität der Gefäßwand und geht mit einer Vergrößerung des Aortendurchmessers bei gleichzeitiger Ausdünnung der Tunica media einher (Ghorpade and Baxter 1996). Reaktiv kommt es zur vermehrten Synthese von Kollagen, was jedoch die Versteifung des Gefäßes zur Folge hat. Für die Ruptur eines Aneurysmas werden final die Veränderungen in der Kollagenzusammensetzung und die Kollagen Degradierung verantwortlich gemacht (Dobrin and Mrkvicka 1994). In der Aorta kommen überwiegend die fibrillären Kollagene Typ I und III vor, die der Gefäßwand ihre mechanische Stabilität verleihen. Das physiologische Verhältnis von Typ I zu III ist 3:1 (Ghorpade and Baxter 1996). Im AAA ist der Umsatz an Kollagen akzeleriert, sowohl Produktion als auch Degeneration sind vermehrt. So lassen sich sowohl erhöhte Kollagensynthesemarker nachweisen, insbesondere für Kollagen Typ III, als auch eine Erhöhung von Degenerationsprodukten (Satta, Juvonen et al. 1995, Bode, Soini et al. 2000, Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007). Auch die Gruppe der Proteoglykane ist in die Pathophysiologie des AAAs involviert, wobei hier deren Eigenschaften wie



Immunmodulation, Aktivierung oder Inhibierung von Proteasen und Binden von Wachstumsfaktoren zu erwähnen sind (Ueda, Yoshimura et al. 2015).

### **1.2.2 Inflammation und Veränderung der zellulären Zusammensetzung**

Die Bildung eines Aortenaneurysmas ist mit einer Entzündungsreaktion vergesellschaftet. Dabei wirken beispielsweise Elastinfragmente in der Aortenwand chemotaktisch auf Leukozyten (Hance, Tataria et al. 2002). Die Infiltrate im AAA bestehen überwiegend aus Makrophagen und Lymphozyten, darunter insbesondere CD4-positive T-Zellen, aber auch B-Zellen (Koch, Haines et al. 1990, Reeps, Pelisek et al. 2009). Auch Mastzellen, die insbesondere mit Neovaskularisationen assoziiert sind, und neutrophile Granulozyten, die sich häufig im intraluminalen Thrombus eines Aneurysmas befinden, sind nachweisbar (Fontaine, Jacob et al. 2002, Eliason, Hannawa et al. 2005, Mayranpaa, Trosien et al. 2009).

Makrophagen sezernieren verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor), IL-6 (Interleukin) und IL-1 $\beta$ , und fungieren als antigenpräsentierende Zellen für das adaptive Immunsystem. Gleichzeitig werden sie wiederum durch von CD4-positiven T-Zellen sezerniertes INF- $\gamma$  (Interferon) aktiviert. So entsteht ein positiver Feedbackmechanismus, der die Entzündung unterhält. (Dale, Ruhlman et al. 2015) Zusätzlich scheint eine Dysregulation innerhalb der Immunantwort in der Aneurysmaentstehung eine Rolle zu spielen. In der physiologischen Immunantwort ist bei der Begrenzung und Beendigung einer Entzündungsreaktion die Umwandlung von Th17-Zellen (T-Helfer Zellen Typ 17) in Typ 1 regulatorische T-Zellen (Tr1), unter anderem durch einen Shift von der Produktion von IL-17 zu antiinflammatorischem IL-10 essentiell (Gagliani, Amezcua Vesely et al. 2015). Regulatorische T-Zellen schützen vor der Aneurysmaentstehung, bei AAA-Patienten sind sie jedoch reduziert (Ait-Oufella, Wang et al. 2013, Zhou, Wu et al. 2015). Im Gegensatz dazu sind proinflammatorische Th17-Zellen vermehrt (Wang, Green et al. 2018). Das von Th17-Zellen sezernierte IL-17 scheint für die Entwicklung eines Aneurysmas sogar essentiell zu sein (Sharma, Lu et al. 2012).

Die bei der Entzündungsreaktion ausgeschütteten Zytokine, als auch die Aktivierung der Makrophagen durch Matrixbestandteile, haben die Sekretion von Proteasen zur Folge. Dies führt wiederum zur Alteration und zum Abbau der ECM.

Die größte und wichtigste Zellgruppe in der Aortenwand sind vaskuläre glatte Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMCs). Ihre physiologischen

Funktionen sind ihre Fähigkeit zur Kontraktion und die Synthese der ECM. Daher wird vereinfacht ein kontraktiler und ein synthetischer Phänotyp unterschieden. Für die VSMCs im AAA wird eine Imbalance zwischen der Ausschüttung von Zytokinen, Immunmodulatoren und Proteasen und der Produktion von Matrixbestandteilen postuliert (Curci 2009). VSMCs aus Aortenaneurysmen zeichnen sich durch eine erhöhte Fähigkeit zur Migration und Freisetzung verschiedener proteolytischer Enzyme und somit zur Degradation von Elastin aus, welche sowohl synergistisch als auch unabhängig von der Anwesenheit inflammatorischer Infiltrate besteht (Goodall, Porter et al. 2002, Airhart, Brownstein et al. 2014). Somit tragen sie substantiell zum Verlust der Integrität der Aortenwand im Aneurysma bei. Im weiteren Verlauf ist das Aortenaneurysma durch einen zunehmenden Verlust an VSMCs gekennzeichnet (Lopez-Candales, Holmes et al. 1997). Dabei spielt eine durch Entzündungsmediatoren und durch T-Zell-Interaktionen über den Fas/FasL-Signalweg getriggerte Apoptose eine Rolle (Geng, Wu et al. 1996, Henderson, Geng et al. 1999). Auch ROS (reactive oxygen species), die durch Entzündungsprozesse freigesetzt werden, sind im AAA erhöht und verursachen die Aktivierung von Proteasen und induzieren Apoptose in VSMCs (Li, Dietz et al. 1997, Miller, Sharp et al. 2002).

Die Entstehung von neuen Vasa vasorum innerhalb der Aortenwand ist ein weiteres Charakteristikum des AAA (Holmes, Liao et al. 1995, Thompson, Jones et al. 1996). Histologische Analysen beschreiben eine Assoziation mit den entzündlichen Infiltraten, als auch die Expression von Proteasen durch Endothelzellen und perivaskuläre glatte Muskelzellen (Reeps, Pelisek et al. 2009).

### **1.2.3 Biomechanik**

Die Stabilität der gesunden Aortenwand ist nicht nur durch eine intakte extrazelluläre Matrix und gesunde Zellen des Gewebes bedingt, sondern auch durch die mechanischen Einflüsse aus dem Blutkreislauf gegeben. Die Alteration der Zusammensetzung von ECM und zellulären Bestandteilen und die Ausdünnung der Tunica media im AAA führen zu einer Schwächung der Wand, so dass diese immer weiter dilatieren kann. Mechanische Untersuchungen ergaben, dass das Aneurysmagewebe durch den Verlust an elastischen Fasern und die vermehrte Synthese an kollagenen Fasern eine höhere Steifigkeit als gesundes Gewebe aufweist (Vande Geest, Sacks et al. 2006). Auch die Zerreißfestigkeit ist maßgeblich reduziert. Die Ruptur eines Aneurysmas tritt dann auf, wenn lokal die Wandspannung die

Festigkeit des Gewebes überschreitet (Maier, Gee et al. 2010). Das Gewebe eines rupturierten AAAs zeichnet sich durch eine geringere Festigkeit als nicht rupturierte AAAs aus (Di Martino, Bohra et al. 2006).

Ein Grund für die verringerte Zerreißfestigkeit ist eine Störung in der Architektur der Mikrofibrillen. Physiologisch bilden Kollagenfibrillen in der Adventitia ein maschenartiges, lockeres Netz, was zwar eine gewisse Aufweitung des Gefäßes erlaubt, aber eine übermäßige Dehnung verhindert. Lindemann et al. beschreiben für das AAA den Verlust der Differenzierung in der Kollagenanordnung zwischen Media und Adventitia. Die Fibrillen sind überwiegend parallel angeordnet und es fehlt die netzartige Verbindung (Lindeman, Ashcroft et al. 2010). Dadurch können einwirkende Kräfte nicht mehr effektiv verteilt werden.

### **1.3 MATRIXMETALLOPROTEINASEN**

#### **1.3.1 Klassifikation und Struktur**

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zählen zur Familie der Zinkendoproteasen, charakterisiert durch eine Zink-bindende Domäne. MMPs zeichnen sich dadurch aus, dass sie verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix spalten können. Entsprechend ihrer Affinität zu unterschiedlichen Substraten lassen sie sich in mehrere Gruppen einteilen (Birkedal-Hansen, Moore et al. 1993, Nagase, Visse et al. 2006, Raffetto and Khalil 2008). Kollagenasen (MMP-1,-8,-13) sind in der Lage intaktes fibrilläres Kollagen zu spalten, während Gelatinasen (MMP-2,-9) nur bereits denaturiertes Kollagen (Gelatin) abbauen. Stromelysine (MMP-3, -7,-10) zeichnen sich durch eine relativ breite Substratspezifität aus. Einige MMPs sind Transmembranproteine (MMP-14,-15,-16,-24) oder Proteine mit Glycosylinositolphosphatidyl-Anker (MMP-17,-25), daher werden sie als Membrane-Type-MMPs (MT-MMPs) bezeichnet. Außerdem existieren noch andere MMPs, darunter MMP-12, auch als Metalloelastase oder auch Makrophagenelastase bezeichnet, die insbesondere von Makrophagen exprimiert wird und unter anderem Elastin spaltet.

Für die Funktion der MMPs – die Hydrolyse von Proteinen – ist das Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ ) entscheidend. Durch das Zink-Ion wird ein  $H_2O$ -Molekül polarisiert, wodurch ein  $OH^-$ -Ion entsteht, das wiederum die Peptidbindung des Substrates spaltet (Rassow, Hauser et al. 2008). Die Prodomäne des Enzyms, die ein Cystein-Switch-Motiv enthält, fungiert als Inhibitor der katalytischen Funktion. Die Aktivierung erfolgt durch enzymatische

Abspaltung der Prodomäne, durch ihre Oxidation durch beispielsweise ROS oder durch Strukturänderung durch Denaturierung des Proteins durch Hitze oder Säure (Yamamoto, Murphy et al. 2015).

Als natürliche Inhibitoren der MMPs gelten, neben dem Plasmaprotein  $\alpha_2$ -Makroglobulin, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs) (Nagase, Visse et al. 2006). Beim Menschen sind vier solche Inhibitoren bekannt, TIMP 1-4. TIMPs bilden nicht-kovalente 1:1 Komplexe mit MMPs. Die Molekülstruktur der TIMPs ist dabei entscheidend für ihre Funktion, da sie ihnen ermöglicht das aktive Zentrum der MMPs zu verdecken und mit dem Zink-Ion der MMPs einen Chelatkomplex zu bilden, der das für die Hydrolyse der Substrate notwendige H<sub>2</sub>O-Molekül verdrängt (Gomis-Rüth, Maskos et al. 1997). Zwar inhibieren alle vier TIMPs alle bekannten MMPs, allerdings weist TIMP-1 eine geringere Affinität zu den membrangebundenen MMP-14, -16, -19, -24 auf. TIMP-2 und -3 sind im Vergleich zu TIMP-1 schwächere Inhibitoren für MMP-3 und -7. TIMP-3 zeichnet sich dadurch aus, auch verschiedene ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) und ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) zu inhibieren (Nagase, Visse et al. 2006).

### 1.3.2 Expression und Aktivität

Viele Pathologien, bei denen Matrixmetalloproteinasen eine Rolle spielen, sind unter anderem durch eine überschießende Expression der proteolytischen Enzyme bedingt. Physiologisch unterliegt die Expression von MMPs einer komplexen Regulation auf Transkriptions-, Translations- und posttranslationaler Ebene, um deren Aktivität auf einem niedrigen Niveau zu halten (Fanjul-Fernandez, Folgueras et al. 2010).

Die Gene der einzelnen MMPs besitzen ähnliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion, so dass sie oft gemeinsam exprimiert oder unterdrückt werden. Die Stimuli für die Transkription von MMPs sind Hormone, Zell-Zell-Kontakte, Zell-ECM-Kontakte, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren (Chase & Newby 2003, Fanjul-Fernandez, Folgueras et al. 2010). Beispielsweise besitzt MMP-9 eine NF $\kappa$ B(nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)-Bindestelle in der Promoterregion, worüber proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , eine erhöhte Expression bewirken (Sanceau, Boyd et al. 2002).

Posttranslationale Mechanismen beeinflussen die Aktivität der MMPs. So werden sekretorische MMPs in einer pro-Form sezerniert, während membranständige MT-MMPs bereits intrazellulär durch Proproteinkonvertasen wie Furin aktiviert werden

(Kang, Nagase et al. 2002). Sekretorische MMPs werden unter anderem wiederum durch MT-MMPs aktiviert. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung von pro-MMP-2, das an einen Komplex aus MT1-MMP und TIMP-2 bindet, um dann von einem weiteren MT1-MMP Molekül aktiviert zu werden (Will, Atkinson et al. 1996). Weiterhin können ROS und Plasminaktivatoren, wie uPA (Urokinase) und tPA (tissue plasminogen activator), MMPs in ihre aktive Form überführen (Rajagopalan, Meng et al. 1996). Zudem führt die Bindung an ECM-Komponenten zu einer autokatalytischen Aktivierung, wie es für die Bindung von proMMP-2 an Elastin und von proMMP-9 an Gelatin gezeigt wurde (Emonard and Hornebeck 1997, Bannikov, Karelina et al. 2002). Proteoglykane können die Aktivität von MMPs modulieren. Samukange et al. demonstrierten für MMP-7, dass Heparin die Aktivität erhöht und das Molekül stabilisiert, während Cholesterolsulfat gegenteilige Effekte hat (Samukange, Yasukawa et al. 2014). Die Lokalisation der MMPs im Extrazellulärraum beeinflusst ebenfalls ihre Funktion. So führt die Bindung von MMP-1 an Integrin  $\alpha 2$  zu einer zellnahen Spaltung von Kollagen I und ermöglicht somit eine Migration der Zelle (Dumin, Dickeson et al. 2001).

### **1.3.3 Physiologische und pathologische Funktionen**

Matrixmetalloproteinasen erfüllen physiologisch wichtige Funktionen in der Entwicklung und Gewebemöostase. Sie spielen eine wichtige Rolle im Wachstum und im Umbau von Knochen sowie in der Angiogenese (Paiva and Granjeiro 2014, Laurenzana, Fibbi et al. 2015). Auch die Wundheilung ist ein klassisches Beispiel für ihre physiologische Funktion. MMPs sind dabei für die Reepithelialisierung und Bildung und Abbau von Granulationsgewebe notwendig (Martins, Caley et al. 2013).

Eine Entzündung ist ein physiologischer Prozess als Reaktion auf verschiedene exogene oder endogene Stressoren. Die obengenannte Wundheilung ist beispielsweise immer mit einer Inflammation verknüpft. Verschiedene Pathologien und pathophysiologische Prozesse fußen oft auf einer überschießenden Entzündungsreaktion. Funktionell ist bei MMPs dabei nicht nur die Degradation von ECM von Bedeutung, sondern auch die Freisetzung pro-inflammatorischer Faktoren. Beispielsweise wird TNF- $\alpha$  durch MMP-7 in seine lösliche Form überführt und durch MMP-13 aktiviert (Haro, Crawford et al. 2000, Vandenbroucke, Dejonckheere et al. 2013). MMPs können jedoch auch anti-inflammatorische Prozesse vermitteln. So wird IL-1 $\beta$  durch MMPs aktiviert aber auch degradiert (Ito, Mukaiyama et al. 1996,

Schonbeck, Mach et al. 1998). Durch die Degradierung von Zellverbindungsproteinen, wie Okkludin, das in Tight-junctions vorkommt, wird die Extravasation von Entzündungszellen und Plasmabestandteilen erleichtert (Reijerkerk, Kooij et al. 2006).

Interessanterweise haben TIMPs auch von der MMP-Inhibition unabhängige Funktionen. So fördern TIMP-1 und TIMP-2 das Zellwachstum, gleichzeitig aber auch in bestimmten Zellarten eine Zelldifferenzierung. Ein Einfluss auf die Angiogenese ist ebenfalls beschrieben worden (Brew and Nagase 2010).

Exemplarisch wird im folgenden Abschnitt die Beteiligung von Matrixmetalloproteinasen in einigen Pathologien erläutert. Eine Überexpression trägt unter anderem zum Weiterbestehen chronischer Wunden bei (Caley, Martins et al. 2015). Zudem sind sie in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wie Psoriasis oder Rheumatoider Arthritis, involviert (Mezentsev, Nikolaev et al. 2014, Burrage, Mix et al. 2006). Weiterhin tragen MMPs auf verschiedensten Ebenen zur Progression maligner Tumoren bei, indem sie die Angiogenese, eine Entzündungsreaktion, die Unterdrückung apoptotischer Signale vermitteln und durch Abräumung extrazellulärer Matrix und Lösung von Zell-Zell-Kontakten den Weg zur Metastasierung ebnet (Egeblad and Werb 2002, Yadav, Puri et al. 2014). Auch in der Atherosklerose sind MMPs ein etablierter pathogenetischer Faktor, was die Bildung atherosklerotischer Plaques als auch die Plaqueruptur betrifft (Dollery and Libby 2006, Newby 2008).

#### **1.3.4 Matrixmetalloproteinasen im Abdominellen Aortenaneurysma**

Wie bereits erläutert findet sich im AAA eine alterierte ECM. MMPs sind dabei zu einem großen Teil an diesen Veränderungen beteiligt. Es konnte eine Überexpression verschiedener MMPs im AAA nachgewiesen werden. Dabei fanden sich sowohl Proteasen mit elastolytischen Eigenschaften, wie MMP-2, -9 und -12, als auch Gelatinasen (MMP-2, -9) und Kollagenasen (MMP-1, -8) (Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007, Annabi, Shedid et al. 2002, Elmore, Keister et al. 1998, Freestone, Turner et al. 1995, Sakalihan, Delvenne et al. 1996, Wilson, Schwalbe et al. 2005). Damit kann durch das Zusammenwirken dieser Enzyme der Großteil der ECM der Aortenwand degradiert werden.

Eine Entzündungsreaktion ist ebenfalls ein Charakteristikum des AAAs. Immunhistochemisch zeigen sich Entzündungszellen und Makrophagen im AAA positiv für zahlreiche MMPs (Reeps, Pelisek et al. 2009). Makrophagen sezernieren

bei Kontakt mit Kollagen MMP-9, bei Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und PDGF (platelet-derived growth factor) auch MMP-12 und MT1-MMP (Chase & Newby 2003, Galt, Lindemann et al. 2001). Durch den Kontakt mit T-Zellen wird die Expression von MMP-1, -3, -8 und -11 erhöht (Malik, Greenfield et al. 1996). Unstimulierte glatte Muskelzellen sezernieren MMP-2. Eine Aktivierung durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welche durch Makrophagen sezerniert werden, ruft auch die Freisetzung von MMP-3 und -9 hervor. MMPs können durch MT-MMP-1 aktiviert werden, welches von VSMCs und auch Makrophagen exprimiert wird. Zudem sezernieren VSMCs tPA und uPA, die Plasmin aktivieren, das selbst die Fähigkeit zur Degradation der ECM besitzt und auch proMMPs aktiviert (Kadoglou and Liapis 2004, Curci 2009, Airhart, Brownstein et al. 2014). Auch Neovaskularisationen, wie sie charakteristischerweise im AAA entstehen, stellen eine Quelle von MMPs dar (Reeps, Pelisek et al. 2009). Gleichzeitig ermöglichen MMPs durch den lokalen Abbau der ECM überhaupt eine Angiogenese (Laurenzana, Fibbi et al. 2015).

Die fundamentale Rolle von MMPs in der Pathogenese von AAAs wurde in Tierversuchen nachgewiesen. So bildeten MMP-9- oder MMP-2-defiziente Mäuse keine Aortenaneurysmen aus (Pyo, Lee et al. 2000, Longo, Xiong et al. 2002). Longo et al. fanden eine geringere Aneurysmabildung bei MMP-12-defizienten Mäusen mit CaCl<sub>2</sub>-induzierten Aneurysmen, während Pyo et. al im Elastase-induzierten Modell bei MMP-12-knockout-Mäusen weiterhin ausgeprägte Aneurysmen beobachteten (Pyo, Lee et al. 2000, Longo, Buda et al. 2005).

## **1.4 CATHEPSINE**

### **1.4.1 Klassifikation und Struktur**

Cathepsine sind Proteasen, die durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zur Familie der Papain-ähnlichen Enzyme gehören. Die meisten Cathepsine (B, C, F, H, K, L, O, S, V, X) sind Cysteinproteasen, die sich durch die Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum auszeichnen. Cathepsin A und G sind Serinproteasen, Cathepsin D und E Aspartatproteasen. Überwiegend sind sie Endoproteasen. Mit Ausnahme von Cathepsin C sind Cathepsine monomere Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 30 kDa. Sie bestehen aus zwei Subdomänen in deren Mitte sich ein Spalt mit dem aktiven Zentrum befindet (Novinec and Lenarcic 2013). Bei Cysteinproteasen wird durch das ebenfalls im aktiven Zentrum befindliche Histidin das Proton der SH-Gruppe

des Cystein abgespalten. Das Schwefel-Atom kann nun an den Kohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung binden und somit die Hydrolyse ermöglichen. Ebenso wirkt auch die OH-Gruppe der Serinproteasen in Zusammenspiel mit einem Histidin. Bei den Aspartatproteasen wird durch zwei Aspartatreste ein Wassermolekül polarisiert, welches dann eine Peptidbindung hydrolysieren kann (Rassow, Hauser et al. 2008).

Endogene Inhibitoren für Cathepsine sind Cystatine und Thyropine. Es entsteht eine enge, jedoch reversible Bindung zur Protease (Hall, Håkansson et al. 1995, Turk, Stoka et al. 2012).

#### **1.4.2 Expression und Aktivität**

Als für den Zellhaushalt wichtige Gene, besitzen die Cathepsingene keine TATA-Box, sondern werden konstitutiv exprimiert. Die Transkription wird unter anderem über die Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie reguliert, für die auch die meisten MMP-Gene Bindungsstellen enthalten (Cheng, Huang et al. 2011, Hahne, Okuducu et al. 2011).

Die Präsenz von Entzündungsmediatoren führt zur vermehrten Ausschüttung von Cathepsine. IL-13 induziert beispielsweise die Cathepsine B, L, S, H und K, während Cathepsin S auch durch INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermehrt freigesetzt wird (Sukhova, Shi et al. 1998, Zheng, Zhu et al. 2000, Caglic, Repnik et al. 2013). Für IL-4 ist eine erhöhte Cathepsin L Sekretion beschrieben (Van Den Berg, Aten et al. 2002).

Die Aktivität von Cathepsinen wird durch ihre Sekretion als Zymogene reguliert. Dabei verdeckt eine Prodomäne das aktive Zentrum (Sivaraman, Lalumiere et al. 1999). Bei niedrigem pH oder in der Anwesenheit von Glykosaminoglykanen (GAGs) kann es zur autokatalytischen Aktivierung kommen (Mach, Mort et al. 1994, Caglic, Pungercar et al. 2007). Zudem können Cathepsine auch durch andere Proteasen aktiviert werden (Nishimura, Kawabata et al. 1988). Ursprünglich sind Cathepsine als lysosomale Proteine beschrieben, allerdings sind sie nicht auf ein intrazelluläres Vorkommen beschränkt. Die Aktivität der Cathepsine ist jedoch stark von der lokalen Protonenkonzentration abhängig, zudem benötigen die meisten von ihnen reduzierende Bedingungen. So ist der optimale pH wie im Lysosom leicht sauer, während ein neutraler pH-Wert zu irreversibler Inaktivierung führt (Turk, Bieth Joseph et al. 1995). Eine Ausnahme stellt Cathepsin S dar, das auch bei neutralem pH-Wert aktiv ist (Kirschke, Wiederanders et al. 1989). Die Aktivität der Cathepsine ist vom Vorhandensein verschiedener Glykosaminoglykane abhängig. Diese können ihre Aktivität sowohl behindern, als auch verstärken. Chondroitinsulfat beispielsweise



verstärkt die Kollagenolyse durch Cathepsin K, während es Cathepsin S und L am Abbau von Kollagen hindert (Li, Yasuda et al. 2004).

Cathepsine können auch extrazellulär aktiv sein, da sie von einer Stabilisierung durch GAGs profitieren und somit der pH-abhängigen Deaktivierung besser widerstehen können (Almeida, Nantes et al. 2001). In bestimmten pathologischen Situationen, wie es für Krebsleiden oder Arthritis beschrieben ist, kann auch extrazellulär ein saures Milieu herrschen, was die Aktivität der Cathepsine weiter fördert (Konttinen, Mandelin et al. 2002, Gatenby, Gawlinski et al. 2006). Zudem sind sie relativ resistent gegen oxidativen Stress (Godat, Hervé-Grépinet et al. 2008).

### **1.4.3 Funktionen**

Intrazelluläre Funktionen der Cathepsine sind neben Verdauung lysosomaler Inhalte beispielsweise die Induktion der Apoptose und die Mitwirkung an der Zellzykluskontrolle (Turk, Stoka et al. 2012, Brojatsch, Lima et al. 2015). Zudem sind Cathepsine für die Antigenprozessierung für die MHC(major histocompatibility complex)-II-abhängige Präsentation in Antigenpräsentierenden Zellen notwendig, und damit wichtiger Bestandteil einer Immunantwort (Hsing and Rudensky 2005).

Cathepsine zeigen unterschiedliche Fähigkeiten die extrazelluläre Matrix zu degradieren. Cathepsin B, F, K, L, S und V wirken elastolytisch, während Cathepsin B, K, L und S Kollagene hydrolysieren können. Cathepsin K besitzt dabei die höchste Aktivität (Chapman, Riese et al. 1997, Turk, Turk et al. 2002). Physiologisch ist beispielsweise Cathepsin K an der Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption beteiligt (Gruber 2015). Auch vermitteln Cathepsine die Aktivierung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, sowie die Hormonfreisetzung beispielsweise in der Schilddrüse. Ihnen wird eine Rolle in verschiedenen Pathologien zugeordnet, wie Tumorerkrankungen, rheumatoider Arthritis oder Atherosklerose (Turk, Stoka et al. 2012). Inaktivierende Mutationen im Cathepsin K Gen führen zur Pyknodysostose, während Mutationen in verschiedenen Cystatin-Varianten zu einer cerebralen Amyloid Angiopathie oder einer progressiven Myklonusepilepsie führen können (Palsdottir, Abrahamson et al. 1988, Gelb, Shi et al. 1996, Pennacchio, Lehesjoki et al. 1996).

### **1.4.4 Cathepsine im Abdominellen Aortenaneurysma**

Wie MMPs sind auch Cathepsine in der Pathogenese des AAAs involviert. Ihren Beitrag leisten sie dabei nicht nur im Abbau von ECM, auch die Beteiligung an

Apoptose und Neovaskularisationen wird vermutet (Qin, Cao et al. 2013, Sukhova & Shi 2006, Wang, Tang et al. 2013).

Dies wurde bereits für einige Cathepsine in vivo untersucht. Für die Cathepsine K und L zeigte sich im Elastase-induzierten Mausmodell eine verminderte Aneurysmabildung beim Fehlen der Proteasen (Sun, Sukhova et al. 2011, Sun, Sukhova et al. 2012). Analog zeigte sich bei Cystatin-C-Mangel eine Zunahme der Aneurysmen im Angiotensin II induzierten Modell und eine Abnahme bei Cathepsin-S-Defizienz (Sukhova, Wang et al. 2005, Qin, Cao et al. 2012).

In Untersuchungen aus humanen AAA-Läsionen wurde eine vermehrte Expression von Cathepsin B, K, L und S festgestellt (Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007, Lohoefer, Reeps et al. 2014). Auch im Serum der Patienten waren die Cathepsin S und L Spiegel erhöht (Lv, Lindholt et al. 2012, Lv, Lindholt et al. 2013). Histopathologische Analysen zeigten eine vermehrte Expression sowohl in VSMCs, Makrophagen als auch in Infiltraten, sowie Vasa vasorum (Lohoefer, Reeps et al. 2012). Die Sekretion von Cathepsinen wird dabei durch inflammatorische Prozesse stimuliert, beispielsweise führen TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  zur vermehrten Expression von Cathepsinen in Makrophagen, VSMCs und Endothelzellen (Wang, Tang et al. 2013).

Da das AAA durch einen Verlust an glatten Muskelzellen gekennzeichnet ist, liegt die Vermutung nahe, dass dies unter anderem auf die Cathepsin-vermittelte Apoptose zurückzuführen ist (Qin, Cao et al. 2013). Auch an einem weiteren Merkmal des AAAs, der Angiogenese innerhalb der Gefäßwand der Aorta, scheinen Cathepsine beteiligt zu sein (Shi, Sukhova et al. 2003).

Ein weiterer Aspekt in der Beteiligung von Cathepsinen and der Aneurysmaentstehung ist die verminderte Synthese von Cystatin C. Die Balance aus Protease und Inhibitor ist dabei zu Gunsten der Proteolyse verschoben. In einigen Studien wurden sogar erniedrigte Werte für Cystatin C gefunden (Shi, Sukhova et al. 1999).

## 1.5 ZIELSETZUNGEN DER DOKTORARBEIT

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Rolle von relevanten Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12) und Cathepsinen (B, D, K, L, S) in der Kollagen Degradierung im abdominalen Aortenaneurysma zu beleuchten.

Folgende Fragestellungen sollten dabei beantwortet werden:

1. Wie unterscheidet sich die Expression von MMPs, TIMPs, Cathepsinen und Cystatin C auf mRNA- und Protein-Ebene zwischen AAA und Kontrollen?
2. Welche Zellen in der Gefäßwand des AAAs exprimieren MMPs, TIMPs, Cathepsine und Cystatin C?
3. Gibt es Zusammenhänge zwischen der Expression der untersuchten Proteasen und den Kollagenen Typ I und III beziehungsweise deren Abbauprodukten in der Aortenwand?

Aus der experimentellen Arbeit gingen zwei Publikationen hervor. Erstere mit dem Titel „*Association of Matrix Metalloproteinase Levels with Collagen Degradation in the Context of Abdominal Aortic Aneurysm*“ präsentiert die Ergebnisse der Untersuchung von Matrixmetalloproteinasen, während die zweite mit dem Titel „*Cathepsin S is associated with degradation of collagen I in abdominal aortic aneurysm*“ den Fokus auf Cathepsine legt.

1. Klaus, V., Schmies, F., Reeps, C., Trenner, M., Matevossian, E., Eckstein, H. H., Pelisek, J. (2017) Association of MMP levels with collagen degradation in the context of AAA. *EJVES*, 53(4):549-558.
2. Klaus, V., Schmies, F., Reeps, C., Trenner, M., Geisbüsch, S., Lohoefer, F., Eckstein, H. H., Pelisek, J. (2018) Cathepsin B and S are associated with the degraded product of collagen I in abdominal aortic aneurysm. *VASA*, 47(4):285-293.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

---

### **2.1 PATIENTEN UND PROBENGEWINNUNG**

#### **2.1.1 Aneurysma**

Die Gewebeproben aus aneurysmatischen Aorten wurden im Zeitraum 06.02.2012 – 27.07.2014 in der Abteilung für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie im Klinikum rechts der Isar gesammelt. Dabei gaben alle Patienten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die Studie wurde nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und vom lokalen Ethikkomitee genehmigt (Votum 2799/10 und 507/16S). Die Proben wurden während eines Eingriffs zur offen-chirurgischen Aneurysmareparatur (OAR) entnommen.

Insgesamt wurden 40 Patienten mit AAA für die Untersuchungen eingeschlossen. Dabei waren 34 Patienten männlich, was einem Anteil von 85% entspricht. Das mediane Alter betrug 67 Jahre mit einer Spanne von 40 – 86 Jahren. Der mittlere Durchmesser des Aneurysmas, mittels CT- oder Ultraschallbildgebung bestimmt, betrug  $51 \pm 7$  mm Standardabweichung für die weibliche Subgruppe und  $70 \pm 19$  mm für die männliche Subgruppe. Der Anteil der Patienten, die sich mit rupturiertem Aortenaneurysma präsentierten, betrug 23,1% ( $n = 9$ ).

Mit 81,1% waren arterielle Hypertonie und mit 40,5% Hyperlipidämie die häufigsten Begleiterkrankungen. Zudem litten 25,0% der Studienteilnehmer unter chronischer Niereninsuffizienz, 16,2% an koronarer Herzkrankheit und 10,8% an peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Bei jeweils 5,4% waren Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus diagnostiziert worden. Nikotinabusus als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines AAA war bei 32,4% der Patienten zu finden. 75,0% der Patienten mit AAA standen unter thrombozytenaggregationshemmender Medikation mit Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel, 65,0% nahmen Betablocker, 52,5% ACE-Inhibitoren, 45,0% Diuretika und 55,0% Statine ein.

#### **2.1.2 Kontrollen**

Die Kontrollproben stammten von Organspendern, die in der Abteilung für Allgemeinchirurgie des Klinikums rechts der Isar zum Zwecke der Organentnahme für Nierentransplantationen operiert wurden. Die Kontrollgruppe bestand aus 9

Individuen, wovon 7 männlichen Geschlechts waren. Das mediane Alter betrug 53 Jahre mit einer Spannweite von 15 bis 62 Jahren.

Für die Auswertung der Versuche wurden die Kontrollen teilweise nach Alter und Geschlecht gematcht. Damit verringerte sich die Gruppengröße auf 5 Individuen mit 4 männlichen Patienten und einer weiblichen Patientin. In diesem Falle betrug das mediane Alter 57 Jahre.

## **2.2 AUFBEREITUNG UND LAGERUNG DER GEWEBEPROBEN**

Unmittelbar postoperativ wurde das entnommene Aortengewebe für unterschiedliche Untersuchungsmethoden aufgeteilt und entsprechend konserviert. Ein Teil wurde für histologische und immunhistochemische Untersuchungen nach einer Fixation in Formalinlösung in Paraffin eingebettet. Ein weiterer Teil wurde unbehandelt mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, um über Frischgewebe für biologische Untersuchungen zu verfügen.

## **2.3 EXPRESSIONSUNTERSUCHUNGEN AUF MRNA-EBENE**

### **2.3.1 RNA-Extraktion**

Zur Quantifizierung von messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) wurde zunächst RNA aus den gefrorenen Gewebeproben extrahiert. Dabei wurden 20 mg des Frischgewebes mit flüssigem Stickstoff gefroren und dann mechanisch zerkleinert. Um eine adäquate Homogenisierung zu erreichen, wurde dieser Schritt wiederholt. Die eigentliche RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll. Das zerkleinerte Gewebe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube mit einem Lysepuffer suspendiert und mit einer Proteinase verdaut. In mehreren Zentrifugationszyklen wurden enthaltene Nukleinsäuren auf einer Silica Membran gesammelt. Enthaltene Spuren von DNA wurden mit einer DNase gespalten und nach weiteren Zentrifugationsschritten wurde die RNA in RNA-freies Wasser herausgelöst. Es resultierten 60  $\mu\text{l}$  RNA-Suspension je Probe, deren Konzentration mit Nanodrop 2000c (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) photometrisch bestimmt wurde. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.2 cDNA-Synthese**

Aus der extrahierten RNA wurde anschließend cDNA (complementary DNA) synthetisiert, um sie in eine für die Amplifikation mittels PCR (Polymerase-Chain-

Reaction) geeignete Form zu überführen. Dazu wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fisher Scientific) verwendet. 11 µl des aufgetauten RNA-Extraktes wurden mit Pufferlösung, RNase Inhibitor, dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate), dT<sub>18</sub>-Primer und einer Reversen Transkriptase versetzt, um 20 µl cDNA zu erhalten. Durch die Verwendung des Oligo-dT-Primers wurde nur die mRNA, nicht jedoch enthaltene nichtkodierende RNAs transkribiert. Die cDNA-Synthese wurde für jede Probe dreimal durchgeführt um ausreichend Material für die PCR-Analysen zur Verfügung zu haben. Die cDNA-Suspensionen wurden bei -20°C gelagert.

### **2.3.3 PCR**

#### ***2.3.3.1 Allgemeine Prinzipien***

Um die Expression der zu untersuchenden Gene zu quantifizieren, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Prinzipiell besteht eine PCR aus drei Schritten. Zunächst werden die beide Stränge des zu amplifizierenden DNA Templates durch Hitze getrennt (Denaturierung). Dann lagern sich bei Annealing-Temperatur die zugesetzten Primer entsprechend der Sequenz an die vorher durch Hitze getrennten DNA Stränge an, zusammen mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Annealing). Ein zur Vorlage komplementärer DNA Strang wird synthetisiert (Amplifikation). Dazu müssen entsprechend Desoxyribonukleotide als Substrat der DNA-Polymerase zugesetzt werden. Dieser Vorgang wird über mehrere Zyklen wiederholt. Im Falle der qPCR enthält der Reaktionsansatz einen Farbstoff, der bei Bindung an doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzsignal emittiert, was eine Quantifizierung der Menge an DNA erlaubt.

#### ***2.3.3.2 Verwendete Materialien***

Es wurden Qiagen QuantiTect Primer Assays verwendet (Tabelle 1). Puffer, DNA Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphate und Fluoreszenzfarbstoff waren im QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) bereits vorgemischt. Pro Ansatz wurden 2,0 µl cDNA, 2,0 µl Primer mit 8,5 µl Wasser und 12,5 µl SYBR Green-Mix verwendet. Dabei wurde auf Eis gearbeitet um eine Denaturierung der DNA zu verhindern. Die Proben wurden in 96-Well Platten pipettiert, dabei wurde jede Probe doppelt gemessen und auch eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Die RT-PCR wurde mit dem StepOnePlus Real-Time PCR System (Fisher Scientific) durchgeführt.

Steuerung und Auswertung erfolgte mit der StepOnePlus Software v.2.3 (Fisher Scientific).

**Tabelle 1: Verwendete Primer in der RT-PCR für Quantifizierung auf mRNA-Ebene**

Gen	Primer	Länge des Amplikons	Katalognummer
<b><i>Matrixmetalloproteinasen und Inhibitoren</i></b>			
<b>MMP-1</b>	Hs_MMP1_1_SG QuantiTect Primer Assay	103 bp	QT00014581
<b>MMP-2</b>	Hs_MMP2_1_SG QuantiTect Primer Assay	95 bp	QT00088396
<b>MMP-3</b>	Hs_MMP3_1_SG QuantiTect Primer Assay	84 bp	QT00060025
<b>MMP-7</b>	Hs_MMP7_1_SG QuantiTect Primer Assay	109 bp	QT00001456
<b>MMP-8</b>	Hs_MMP8_1_SG QuantiTect Primer Assay	119 bp	QT00029820
<b>MMP-9</b>	Hs_MMP9_1_SG QuantiTect Primer Assay	115 bp	QT00040040
<b>MMP-12</b>	Hs_MMP12_1_SG QuantiTect Primer Assay	131 bp	QT01004472
<b>TIMP-1</b>	Hs_TIMP1_1_SG QuantiTect Primer Assay	115 bp	QT00084168
<b>TIMP-2</b>	Hs_TIMP2_1_SG QuantiTect Primer Assay	92 bp	QT00017759
<b><i>Cathepsine und Inhibitoren</i></b>			
<b>Cath B</b>	Hs_CTSB_1_SG QuantiTect Primer Assay	134 bp	QT00088641
<b>Cath D</b>	Hs_CTSD_1_SG QuantiTect Primer Assay	137 bp	QT00020391
<b>Cath K</b>	Hs_CTSK_1_SG QuantiTect Primer Assay	105 bp	QT00093856
<b>Cath L</b>	Hs_CTLS_1_SG QuantiTect Primer Assay	70 bp	QT01664978
<b>Cath S</b>	Hs_CTSS_1_SG QuantiTect Primer Assay	87 bp	QT00040404
<b>Cys C</b>	Hs_CST3_1_SG QuantiTect Primer Assay	92 bp	QT00046438
<b><i>Referenzgene</i></b>			
<b>GAPDH</b>	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay	95 bp	QT00079247
<b>ACTB</b>	Hs_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay	146 bp	QT00095431
<b><i>Zellmarker</i></b>			
<b>MSR-1</b>	Hs_MSR1_1_SG QuantiTect Primer Assay	91 bp	QT00064141
<b>CD3</b>	Hs_CD3D_1_SG QuantiTect Primer Assay	72 bp	QT00998214
<b>CD45</b>	Hs_PTPRC_1_SG QuantiTect Primer Assay	108 bp	QT00028791
<b>VCAM</b>	Hs_VCAM1_1_SG QuantiTect Primer Assay	106 bp	QT00018347
<b>SMTN</b>	Hs_SMTN_1_SG QuantiTect Primer Assay	132 bp	QT00026677
<b>COL1A2</b>	Hs_COL1A2_1_SG QuantiTect Primer Assay	148 bp	QT00072058
<b>MYH10</b>	Hs_MYH10_1_SG QuantiTect Primer Assay	72 bp	QT00005117
<b>MYH11</b>	Hs_MYH11_1_SG QuantiTect Primer Assay	130 bp	QT00069391

### 2.3.3.3 Konfiguration

Das PCR System wurde folgendermaßen konfiguriert: Zunächst wurden die Proben 5 Minuten auf 95°C erhitzt, woran sich 45 Amplifizierungszyklen anschlossen. Abschließend wurde eine Schmelzkurve der Amplifikationsprodukte bestimmt. Jeder der 45 Zyklen bestand aus einer 10 Sekunden andauernden Denaturierungsphase bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 60°C und Amplifikation für 10 Sekunden bei 72°C, sowie einem letzten 15-sekündigen Erhitzungsschritt, der Primerdimere eliminierte. Ob sich bei dem jeweiligen Primer Dimere bildeten, wurde vor dem Versuch getestet und auch die optimale Temperatur zur Verhinderung der Dimere bestimmt (Tabelle 2). Anhand der Schmelzkurve ließ sich auf die Reinheit der amplifizierten DNA schließen, da die Schmelztemperatur je nach Länge und GC(Guanin-Cytosin)-Gehalt charakteristisch ist.

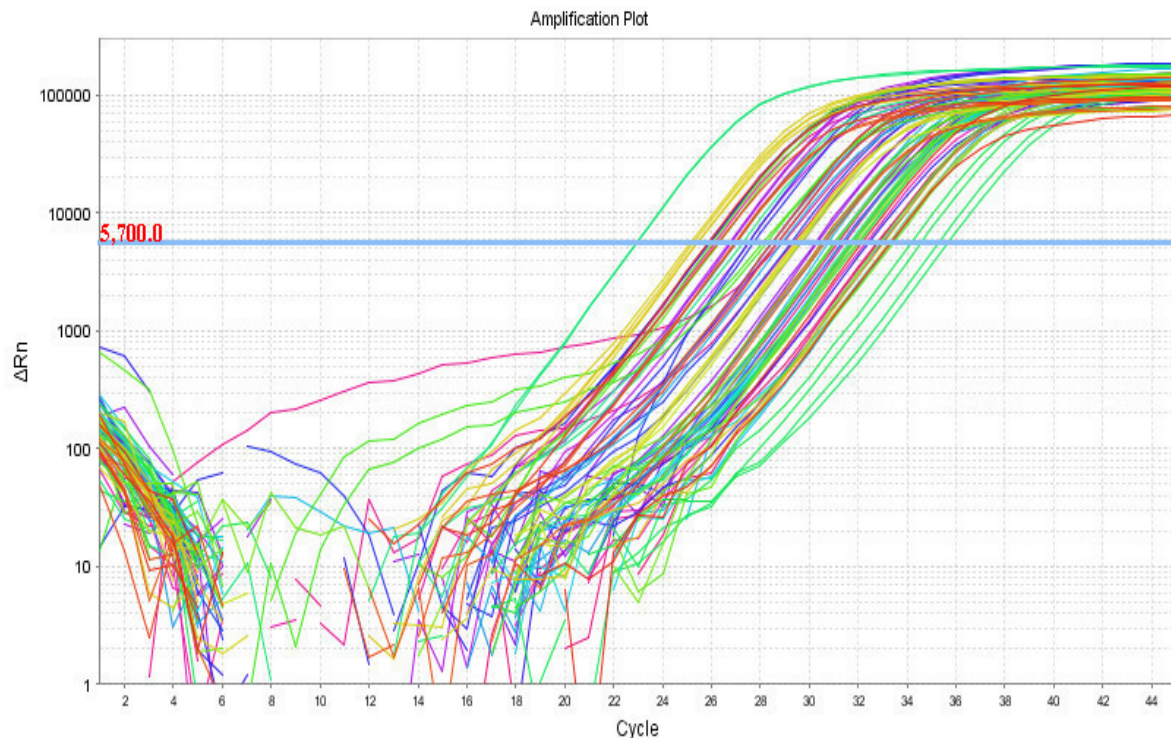
**Tabelle 2: Temperatur zur Vermeidung von Primerdimeren**

Temperatur	Primer
75°C	TIMP-2, VCAM-1
76°C	MMP-7, MYH 10
77°C	MMP-2, MMP-9, TIMP-1, CATH B, CATH D, CATH K, CATH L, CATH S, CYST C, GAPDH, CD3, CD45, MSR-1, MYH11
79°C	ACTB
81°C	Col I
85°C	SMTH

### 2.3.3.4 Auswertung

In der Auswertung wurde zunächst der Schwellenwert ( $C_T$ -Wert) für das emittierte Lichtsignal bestimmt, der den Amplifikationszyklus benennt, in dem die exponentielle Amplifikation beginnt. Dabei wurde jeweils die Differenz  $\Delta C_t$  der Expression des Zielgens, beispielsweise MMPs oder Cathepsine, zur GAPDH(Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Expression innerhalb einer Probe bestimmt. Die n-fache Expression in Bezug auf GAPDH erhielt man nun durch Berechnung von  $2^{-\Delta C_t}$ . Der Bezug auf GAPDH oder ACTB ( $\beta$ -Actin) ermöglicht eine Normalisierung bei unterschiedlicher cDNA Menge in den einzelnen Gewebeextrakten, da GAPDH und ACTB als Housekeeping-Gene in Zellen überwiegend konstant exprimiert werden.





**Abbildung 1: Amplifikationskurve der MMP-9 mRNA: logarithmische Darstellung der Stärke des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Schwellenwert 5700. Abbildung erzeugt mit StepOnePlus v 2.3.**

## 2.4 EXPRESSIONSUNTERSUCHUNGEN AUF PROTEINEBENE

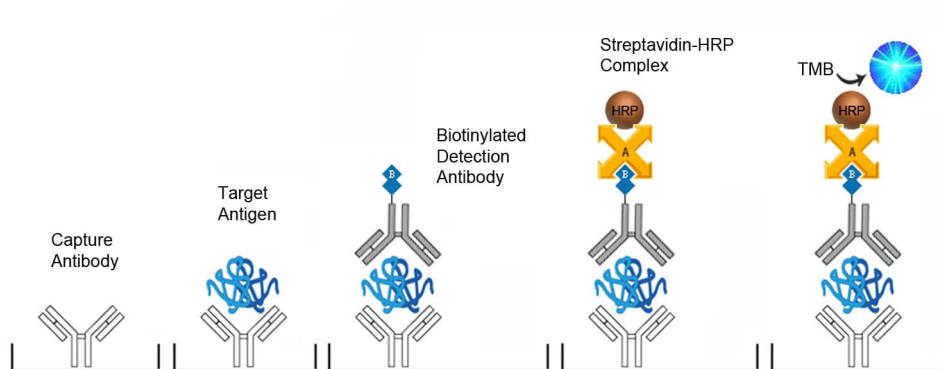
### 2.4.1 Proteinextraktion

Zur quantitativen Untersuchung der Expression von Matrixmetalloproteinasen und Cathepsinen, sowie degradierten und intakten Kollagenen, wurde zunächst ein Proteinextrakt aus dem gefrorenen Gewebe gewonnen. Dazu wurden 200-300 mg Gewebe homogenisiert, wie methodisch bereits für die mRNA-Extraktion beschrieben. Anschließend wurde es in 200-300  $\mu\text{l}$  Tissue Extraction Reagent I (Fisher Scientific) suspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C wurde der Proteinextrakt als Überstand gewonnen. Im Anschluss wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll die Proteinkonzentration bestimmt, um daraufhin Aliquots mit einer Proteinkonzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  herzustellen. Die Lagerung der gewonnenen Proteinextrakte erfolgte bei -20°C.

## 2.4.2 ELISA

### 2.4.2.1 Allgemeine Prinzipien

Beim ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) wird das nachzuweisende Protein an spezifische Antikörper gebunden und durch die Intensität eines Substratfarbstoffs anhand einer Standardproteinkonzentration die absolute Menge bestimmt. Beim hier verwendeten Sandwich-ELISA ist ein Antikörper an den Boden des Wells gebunden. Daran bindet das Antigen, an das wiederum ein biotinylierter Antikörper bindet. An den Biotinrest bindet im nächsten Schritt ein Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase)-Komplex, der TMB (Tetramethylbenzidin) als chromogenes Substrat umsetzt. Photometrisch lässt sich nun die enthaltene Proteinmenge quantitativ bestimmen.



**Abbildung 2: Prinzip des Sandwich ELISAs**

(Quelle: [https://www.lsbio.com/image2/human-mmp12-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f21899/255792\\_1927613.jpg](https://www.lsbio.com/image2/human-mmp12-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f21899/255792_1927613.jpg))

### 2.4.2.2 Verwendete Materialien

Für die ELISA-Experimente wurden Kits verschiedener Hersteller verwendet (Tabelle 3). Dabei wurde jeweils nach dem Versuchsprotokoll des Herstellers vorgegangen und die adäquate Probenmenge sorgfältig ausgetestet. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und jedes Experiment enthielt zur Quantifizierung eine Standardkurve aus rekombinantem Protein.

**Tabelle 3: Verwendete ELISA-Kits**

Protein	Hersteller	Katalognummer
MMP-1	Abcam	Ab100604
MMP-2	Abcam	Ab100606
MMP-3	R&D Systems	DMP300
MMP-7	Abcam	Ab100608
MMP-8	Abcam	Ab100609
MMP-9	Abcam	Ab100610
MMP-12	LSBio	LS-F2781
TIMP-1	Abcam	Ab100652

<b>TIMP-2</b>	Abcam	Ab100653
<b>GAPDH quantitativ</b>	LSBio	LS-F11503
<b>Cath D</b>	abcam	Ab119586
<b>Cath B</b>	abcam	Ab119584
<b>Cath S</b>	abcam	Ab155427
<b>Cystatin C</b>	abcam	Ab119589
<b>CTX III</b>	Wuxi donglin Sci&tech developepoment	DL-CTXIII-Hu
<b>Col I</b>	antikoerper-online, Aachen, Deutschland	
<b>CTX I</b>	antikoerper-online, Aachen, Deutschland	
<b>Col 3</b>	abbexa	Abx151126

### 2.4.2.3 Auswertung

Die photometrisch gemessenen Werte für die optische Dichte wurden anhand einer Standardkurve ausgewertet. Dabei wurde eine Polynomformel für die Standardkurve bestimmt mit der die Werte für die Proteinmenge berechnet werden konnten. Sowohl eine relative Expression in Bezug auf GAPDH als auch eine absolute Quantifizierung in ng/mg Gesamtprotein waren somit möglich.

## 2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik Software SPSS (IBM, Chicago, IL, USA) v. 20. Um zwischen normalverteilten und nicht-normalverteilten Stichproben zu unterscheiden, wurde der Einstichproben-Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Für die Ergebnisse der PCR und der ELISAs mit Spezifität für MMPs zeigte sich eine große Heterogenität innerhalb der Proben und keine Normalverteilung, so dass nicht-parametrische Tests verwendet wurden. Um Unterschiede zwischen Aneurysma und Kontrolle zu beurteilen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und Korrelationen wurden mit Spearmans Rangkorrelation analysiert. Die Ergebnisse der ELISAs für Cathepsine wiesen eine Normalverteilung auf, daher wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt. Für alle Korrelationsanalysen erfolgte eine Korrektur nach Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995). Das Signifikanzniveau war  $p < 0,05$ .

## 3 ERGEBNISSE

Auf eine Aufzählung der Resultate der Experimente wird hier verzichtet, da diese bereits in den beiden Publikationen veröffentlicht und auch graphisch aufbereitet wurden. Diese sind im Anhang der Dissertation zu finden.

## 4 DISKUSSION

---

Die Arbeiten dieser Dissertation sollen den Stellenwert von Matrixmetalloproteinasen und Cathepsinen im abdominellen Aortenaneurysma insbesondere in Bezug auf die Degradierung von Kollagen I und III beleuchten, da sie als die wichtigsten kollagenen Fasern für die Stabilität der Gefäßwand verantwortlich sind. Zwar sind beide Enzymgruppen bereits in verschiedenen Studien ausführlich untersucht worden, umfassende Expressionsanalysen, die sowohl die Transkription als auch die Translation in Betracht ziehen, fehlen jedoch. Somit ist die Frage, inwiefern und welche dieser Proteasen tatsächlich eine maßgebliche Rolle in AAA spielen, immer noch nicht zufriedenstellend beantwortet.

### **4.1 WIE UNTERSCHIEDET SICH DIE EXPRESSION VON MMPs, TIMPs, CATHEPSINEN UND CYSTATIN C AUF mRNA- UND PROTEIN-EBENE ZWISCHEN AAA UND KONTROLLEN?**

Matrixmetalloproteinasen werden als wichtiger pathogenetischer Faktor in der Entstehung und Progression des Aortenaneurysmas angesehen. In der bestehenden Literatur sind die Ergebnisse teilweise bezüglich der Frage, welche MMPs im AAA vermehrt exprimiert werden, heterogen. Gleichzeitig wurden unterschiedliche Methoden zum Nachweis der MMPs verwendet (Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007, Annabi, Shedid et al. 2002, Aziz & Kuivaniemi 2007, Kadoglou & Liapis 2004).

In den hier zugrundeliegenden Experimenten fanden sich auf mRNA- und Proteinebene für MMPs unterschiedliche Expressionsmuster. So waren MMP-3, MMP-9, MMP-12 und TIMP-1 auf mRNA-Ebene im AAA erhöht. Auf Proteinebene konnten dagegen erhöhtes MMP-8, MMP-9, MMP-12 und TIMP-1 festgestellt werden. Somit war die Expression von MMP-9 und MMP-12 und TIMP-1 sowohl als mRNA als auch als Protein signifikant erhöht.

Zu den am besten untersuchten Proteasen im AAA gehört die Gelatinase MMP-9, welche in mRNA- und Proteinform erhöht nachgewiesen werden konnte. Ihre katalytische Aktivität richtet sich gegen extrazelluläre Matrixbestandteile, einschließlich denaturiertem Kollagen. Eine Vielzahl von Untersuchungen fand ebenfalls erhöhte mRNA-, Protein-, und Aktivitätswerte (Sakalihasan, Delvenne et al. 1996, Elmore, Keister et al. 1998, Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007). Im

Mausmodell erwies sich MMP-9 als essentiell für die Entstehung eines Aneurysmas (Longo, Xiong et al. 2002, Pyo, Lee et al. 2000).

Überraschenderweise fanden sich in den hier durchgeführten Untersuchungen keine signifikant erhöhten Werte für MMP-2. MMP-2 wird vor allem durch die glatten Muskelzellen der Aortenwand exprimiert (Crowther, Goodall et al. 2000, Crowther, Goodall et al. 2000). MMP-2 kann sowohl Kollagen als auch Elastin degradieren. Dabei entstehen Elastinfragmente, welche wiederum chemotaktisch auf Makrophagen wirken. Diese bedingen wiederum einen Shift in der MMP-Expression in den VSMCs zu vermehrter MMP-9 Synthese (Airhart, Brownstein et al. 2014). Daher wird MMP-2 insbesondere in der frühen Entstehung des AAAs ein Beitrag zugeschrieben (Freestone, Turner et al. 1995). Im fortgeschrittenen Aneurysma sind glatte Muskelzellen, die die größte Quelle für MMP-2 darstellten, durch Apoptose vermindert (Henderson, Geng et al. 1999). Es handelte sich bei den Proben für diese Experimente um bereits fortgeschrittene AAAs, so dass eventuell MMP-2 auf Grund der bereits verminderten VSMCs Zellzahl sekundär nicht mehr erhöht war.

MMP-8 war auf Proteinebene im AAA erhöht. Neben MMP-1 und MMP-13 ist die Kollagenase MMP-8 für den Kollagenabbau unabdingbar, da sie intakte Kollagenfibrillen erst für die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 zugänglich macht (Van Doren 2015). Die Lokalisation der Protease scheint unter anderem auf mesenchymale Zellen der Adventitia konzentriert zu sein (Wilson, Schwalbe et al. 2005). Auch MMP-3, welche unter anderem regulatorische Funktion besitzt und die Expression anderer MMPs modulieren kann, kann einen Beitrag in der Ausbildung des Aneurysmas leisten (Silence, Lupu et al. 2001). In der vorliegenden Studie war MMP-3 nur auf mRNA-Ebene erhöht.

Die Elastase MMP-12 war in diesen Untersuchungen das Enzym mit den höchsten absoluten Expressionsleveln. Auch bei Curci et al. fand sich MMP-12 vielfach erhöht im AAA. Dabei konnte histologisch eine enge Beziehung zu Elastinfragmenten festgestellt werden (Curci, Liao et al. 1998).

In den durchgeführten Versuchen wurde vermehrt TIMP-1 nachgewiesen, wie es auch in der Literatur durch Annabi et al. beschrieben wird (Annabi, Shedid et al. 2002). Andere Untersuchungen fanden jedoch keine erhöhte TIMP-1 Expression im Gewebe (Petersen, Wagberg et al. 2002, Nishimura, Ikebuchi et al. 2003, Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007). Pathogenetisch ist das Verhältnis von Protease und Inhibitor

ausschlaggebend, welches im AAA aus dem Gleichgewicht geraten ist (Nishimura, Ikebuchi et al. 2003). Während die Expression von TIMP-1 über das gesamte Aortengewebe verteilt ist, ist die Ausschüttung von MMP-9 auf die makrophagenreichen Infiltrate konzentriert. Lokal wird also die inhibitorische Kapazität überschritten. TIMP-2 dagegen wird durch VSMCs konstitutiv exprimiert und ist neben seiner inhibitorischen Wirkung am Aktivierungsprozess von MMP-2 beteiligt (Will, Atkinson et al. 1996, Kadoglou and Liapis 2004). In den hier zugrunde liegenden Experimenten fand sich für TIMP-2 kein Unterschied zwischen AAA und Kontrollen.

Insgesamt sind unsere Ergebnisse somit zu einem großen Teil mit der bestehenden Literatur vergleichbar. Insbesondere MMP-8, MMP-9 und MMP-12 scheinen im AAA bedeutend zu sein.

Als eine weitere Gruppe potenter Proteasen wurden auch Cathepsine untersucht. Auch diesen wird mittlerweile eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese des AAA zugesprochen (Qin, Cao et al. 2013, Sukhova & Shi 2006, Wang, Tang et al. 2013).

Im AAA wurden erhöhte mRNA-Konzentrationen für Cathepsin B, D, L, S gemessen, auf Proteinebene waren Cathepsin B und S erhöht. Damit besteht nur eine teilweise Übereinstimmung mit früheren Resultaten aus derselben Arbeitsgruppe. In einer früheren Veröffentlichung fanden sich signifikant erhöhte mRNA-Werte für Cathepsin B und L (Lohoefer, Reeps et al. 2014). Diese Diskrepanzen könnten dadurch bedingt sein, dass in der vorangehenden Studie die RNA aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe isoliert wurde, hier jedoch gefrorenes Gewebe verwendet wurde. Die Ergebnisse von Abdul-Hussien et al. konnten für Cathepsin L und S auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Diese Gruppe hatte zudem signifikante erhöhte Werte für Cathepsin K, L und S im Western Blot gefunden. Damit besteht immerhin für Cathepsin S eine Übereinstimmung für eine Quantifizierung auf Proteinebene (Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007). Abisi et al. quantifizierten die Cathepsin-Expression im AAA ebenfalls mittels ELISA, allerdings verglichen sie Patienten mit AAA und Leriche-Syndrom (Abisi, Burnand et al. 2007). Die fehlende Übereinstimmung im Expressionsmuster könnte also in der Wahl der Kontrollgruppe liegen.

Während mit den MMPs gemeinsam auch die Expression des Inhibitors TIMP-1 im AAA hochreguliert ist, ist die Beziehung zwischen Cathepsinen und Cystatin C eine andere. Hier konnte zwar kein signifikanter Unterschied zwischen Aneurysma und Kontrollen festgestellt werden, andere Arbeitsgruppen fanden jedoch erniedrigte

Cystatin C Konzentrationen (Shi, Sukhova et al. 1999, Lindholt, Erlandsen et al. 2002). Damit lässt sich vermuten, dass die Auswirkungen von Cathepsinen auf die Aneurysmaentstehung auch durch ihre verminderte Inaktivierung durch den Inhibitor Cystatin C bedingt sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen also insbesondere Cathepsin B und S als relevante Cathepsine im AAA dar.

Unerwarteter Weise bestand keine Korrelation zwischen der Expression auf mRNA- und Proteinebene, sowohl unter den untersuchten MMPs als auch unter den Cathepsinen. Zwar waren einige Proteasen gleichzeitig auf mRNA- und Proteinebene erhöht, eine signifikante Korrelation bestand jedoch nicht. Diese scheinbare Diskrepanz ist der Tatsache zu schulden, dass die Bestimmung der mRNA oder Proteinkonzentration immer nur eine Momentaufnahme darstellt. Die Halbwertszeiten für mRNA und Protein können sich jedoch stark unterscheiden. Sie hängen von verschiedensten Faktoren ab, wie bereits in den Kapiteln 1.3.2. und 1.4.2 erläutert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine vermehrte mRNA-Expression nicht unbedingt mit einem vermehrten Vorhandensein eines Proteins zusammenhängt. Auch spielt für ein Enzym noch die Aktivität eine Rolle, welche starker Regulierung unterliegt. Das bedeutet folglich, dass die Untersuchungen auf Proteinebene vorzuziehen sind, da sie eher ein Bild der proteolytischen Situation widerspiegeln.

#### **4.2 WELCHE ZELLEN IN DER GEFÄßWAND DES AAAS EXPRIMIEREN MMPs, TIMPs, CATHEPSINE UND CYSTATIN C?**

Histologisch findet sich im AAA eine reduzierte Zahl glatter Muskelzellen, zudem treten inflammatorische Infiltrate und Neovaskularisationen auf. Im folgenden Abschnitt werden die Zusammenhänge zwischen der veränderten zellulären Zusammensetzung und der Expression von MMPs und Cathepsinen diskutiert.

Es zeigten sich positive Korrelationen zwischen der mRNA von MMP-1, MMP-2 und MMP-9 mit Kollagen Typ I mRNA als Marker für VSMCs vom synthetischen Phänotyp. Zudem waren auch Cathepsin B, D, L und Cystatin C mit diesen Zellen assoziiert. Unstimulierte glatte Muskelzellen sezernieren MMP-2. Eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welche durch Makrophagen sezerniert werden, ruft auch die Freisetzung von MMP-3 und -9 hervor. MMPs können durch MT-MMP-1 aktiviert werden, welches durch VSMCs produziert wird. Zudem sezernieren VSMCs

tPA und uPA, die Plasmin aktivieren, das selbst die Fähigkeit zur Degradation der ECM besitzt und auch proMMPs aktiviert (Kadoglou and Liapis 2004, Curci 2009, Airhart, Brownstein et al. 2014). In histopathologischen Untersuchungen konnten in VSMCs die Cathepsine B, D, K, L, S und Cystatin C nachgewiesen werden (Lohoefer, Reeps et al. 2012). Die Stimulation von VSMCs mit IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  führt zur Cathepsin S Sekretion (Sukhova, Shi et al. 1998).

Makrophagen zeigten sich in immunhistochemischen Färbungen als positiv für eine Vielzahl von Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12, -13) (Reeps, Pelisek et al. 2009). Sie sind insbesondere die dominierende Quelle von MMP-9 und MMP-12 (Newby 2005). Auch in diesen Experimenten wurden Korrelationen zu MMP-3, MMP-9, MMP-12 und Cathepsin S gefunden.

MMP-9 und Cathepsin S waren mit CD-45-positiven Zellen assoziiert, MMP-9 auch mit T-Zellen. Dies zeigte sich auch histopathologisch, wobei dabei noch weitere MMPs und Cathepsine identifiziert werden konnten (Reeps, Pelisek et al. 2009, Lohoefer, Reeps et al. 2012). Innerhalb der inflammatorischen Infiltrate werden überwiegend MMP-1, -3 und 9 sowie die Cathepsine B, D, K, L, S exprimiert. Plasmazellen und T-Zellen sind eine Quelle von MMP-8, erstere exprimieren auch MMP-13.

Die Endothelzellen der Neovaskularisationen im AAA exprimieren ebenfalls eine breite Palette an MMPs und scheinen so auch an der Proteolyse der Tunica media beteiligt zu sein (Reeps, Pelisek et al. 2009). Auf mRNA-Ebene fand sich hier lediglich eine Korrelation mit MMP-9.

### **4.3 GIBT ES ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DER EXPRESSION DER UNTERSUCHTEN PROTEASEN UND DEN KOLLAGENEN TYP I UND III BEZIEHUNGSWEISE DEREN ABBAUPRODUKTEN IN DER AORTENWAND?**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt an Kollagen Typ I und Kollagen Typ III untersucht. Dies sind die wichtigsten fibrillären Kollagene der Gefäßwand. Um einen Überblick über die Degradierungssituation zu erhalten, wurden zudem die Carboxyterminalen-Crosslinks (CTX) bestimmt, welche die Fragmente der Kollagenfasern nach Proteolyse darstellen. Dabei kann ebenfalls nach Typ I und III unterschieden werden. Im Aneurysma zeigte sich ein stark verminderter Gehalt an Kollagen Typ I, während Kollagen Typ III 5-fach erhöht war. Relativ zum intakten Kollagen Typ I war CTX I im AAA erhöht, während degradiertes Kollagen III relativ



erniedrigt war. Zusammenfassend bedeutet dies, dass eine vermehrte Degradierung von Kollagen Typ I bei insuffizienter Neusynthese besteht. Für Kollagen Typ III ist die Situation anders: Der vermehrte Gehalt im Aneurysma kann zum einen durch eine verminderte Degradierung, worauf das erniedrigte CTX III/Col III Verhältnis hinweist, als auch durch eine erhöhte Neusynthese entstehen. So konnten Bode et al. eine vermehrte Kollagen Typ III Synthese feststellen (Bode, Soini et al. 2000). Im Einklang mit Wilson et al. fand sich auf Proteinebene erhöhtes MMP-8 (Wilson, Schwalbe et al. 2005). Diese Kollagenase besitzt eine 20-mal höhere Affinität zu Kollagen Typ I als zu Typ III und könnte somit zur veränderten Kollagenzusammensetzung im AAA beitragen. Da MMP-8 die Fähigkeit besitzt intaktes, fibrilläres Kollagen zu spalten und dadurch für die Degradierung durch Gelatinasen zugänglich zu machen, scheint es ein essentielles Enzym in der Pathogenese des AAA zu sein.

Es zeigte sich auch eine positive Korrelation zwischen Cathepsin S und CTX I, sowie eine negative Korrelation zwischen Cathepsin S und Kollagen Typ I, was auch diesem Enzym eine wichtige Rolle im veränderten Kollagenhaushalt im Aortenaneurysma zuweist. In vitro ist für Cathepsin S bei 37°C eine starke kollagenolytische Aktivität nachgewiesen, allerdings inhibiert die Zugabe von Chondroitinsulfat diese Aktivität (Li, Yasuda et al. 2004). Auch Panwar et al. konnten nur eine geringe mechanische Destabilisierung von mit Cathepsin S bei 28°C inkubierten Kollagen Typ I Fasern nachweisen (Panwar, Du et al. 2013). Inwiefern Cathepsin S unter den pathologischen Umständen im AAA Kollagen degradieren kann, bleibt jedoch noch zu klären. Es ist aber auch eine indirekte Wirkung von Cathepsin S auf die Kollagenolyse denkbar. Cathepsin-S-knockout Mäuse mit Aneurysma wiesen geringere MMP-2, MMP-9 und Cathepsin K Level als entsprechende Wildtyp Mäuse auf (Qin, Cao et al. 2012). Cathepsin S könnte also über eine Induktion von MMP-2 und -9 den Kollagenabbau fördern.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Proteasen aus der Familie der MMPs und Cathepsine im AAA vermehrt exprimiert werden. Diese stehen in Zusammenhang mit Entzündungszellen und den von ihnen ausgeschütteten Mediatoren aber auch Neovaskularisationen, die beide typisch für das AAA sind. Die Kollagenzusammensetzung in der Aortenwand ist alteriert. Dazu legen die Korrelationen mit MMP-8 und Cathepsin S eine Beteiligung dieser Proteasen an den Veränderungen nahe.

Im folgenden Abschnitt wird noch auf die mögliche Anwendung dieser Erkenntnisse im diagnostischen und therapeutischen Kontext eingegangen.

## **4.4 KLINISCHE ANWENDUNGEN**

### **4.4.1 MMPs und Cathepsine in der Diagnostik**

#### ***4.4.1.1 Biomarker***

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, werden im Gewebe eines Aortenaneurysmas vermehrt MMPs und Cathepsine exprimiert (Abdul-Hussien, Soekhoe et al. 2007, Annabi, Shedid et al. 2002, Elmore, Keister et al. 1998, Lohoefer, Reeps et al. 2014). Dieser Zustand kann sich auch im Serum eines Patienten widerspiegeln. Daher wurden in zahlreichen Studien adäquate Biomarker für das Vorhandensein oder die Prognose eines AAAs evaluiert. Dabei ist MMP-9 am besten etabliert, in Metaanalysen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MMP-9-Spiegel im Serum von Aneurysmapatienten, ebenso für den Inhibitor TIMP-1. Eine Korrelation mit dem Durchmesser fand sich allerdings nicht (Stather, Sidloff et al. 2014). Jedoch ist der MMP-9 Spiegel für ein Screening auf ein AAA ungeeignet, da Sensitivität und Spezifität sehr niedrig sind (Affirul, Azim et al. 2013). Eine kleine Studie konnte jedoch eine sehr gute Sensitivität und Spezifität für die Diagnostik eines Endoleaks nach EVAR nachweisen (Hellenthal, Ten Bosch et al. 2012). Cathepsin S und L sind im Serum von Aneurysmapatienten erhöht und es besteht eine positive Korrelation zum Aortendurchmesser. Analog ist Cystatin C erniedrigt und korreliert negativ mit dem Aneurysmadurchmesser und der jährlichen Wachstumsrate (Lindholt, Erlandsen et al. 2002, Lv, Lindholt et al. 2012, Lv, Lindholt et al. 2013). In der Routinediagnostik konnte sich bisher keiner dieser Biomarker etablieren.

#### ***4.4.1.2 Bildgebung***

Die Morphologie eines Aneurysmas lässt sich mittels Computertomographie relativ unkompliziert darstellen. Auch die metabolische Aktivität im Aneurysma kann im FDG-PET (Fluorodesoxyglucose-Positronenemissionstomographie) dargestellt werden. Klinische Studien zeigten bis dato widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Prädiktion der Expansion des Aneurysmas und der korrelierenden Symptomatik oder Entzündungsaktivität (Reeps, Essler et al. 2008, Kotze, Groves et al. 2011). Mittels einer die Proteaseaktivität abbildenden Methode könnten diese Parameter genauer darstellbar sein. Immerhin konnten Wilson et al. in Gewebeproben zeigen, dass die

MMP-8 und MMP-9 Aktivität am Ort der Ruptur eines Aneurysmas erhöht ist (Wilson, Anderton et al. 2006). Im Tiermodell kam bereits der Tracer RP805, der spezifisch an aktivierte MMPs bindet und mit  $^{99m}\text{Tc}$  markiert ist, in der SPECT (single photon emission computed tomography) Bildgebung zum Einsatz. Es konnte eine Korrelation zwischen MMP-Aktivität und Tracer-Uptake gemessen werden (Golestani, Razavian et al. 2015). In der Weiterentwicklung entstand der Tracer RPYM1, dessen Struktur auf einem Hydroxamat-enthaltendem MMP-Inhibitor basiert und der auch mit  $^{99m}\text{Tc}$  markiert ist (Toczek, Ye et al. 2017). Die klinische Evaluation zur Anwendung am Menschen steht noch aus, könnte aber eine vielversprechende Methode zur nichtinvasiven Darstellung der Proteaseaktivität im Aneurysma darstellen. Parallel dazu wurden auch Tracer für die PET-Bildgebung entwickelt. Das zugrundeliegende Prinzip ist dabei die Kopplung eines MMP-Inhibitors mit radioaktivem Fluor, das bei Zerfall ein Positron freisetzt. Erste in-vivo-Tests wurden bereits durchgeführt, jedoch noch nicht in einem Modell für das AAA (Breyholz, Wagner et al. 2010, Matusiak, Castelli et al. 2015).

Auch Bildgebungsmethoden um die Aktivität von Cathepsinen darzustellen wurden bereits entwickelt. Beispielsweise beschrieben Chen et. al eine Sonde, die durch Cathepsin B aktiviert wird, und mittels FMT (fluorescence-mediated tomography) visualisiert wird. Dadurch konnten sie die Cathepsin B Aktivität in atherosklerotischen Plaques darstellen (Chen, Tung et al. 2002). Auch ein Tracer um die Aktivität von Cathepsinen mittels PET-CT darzustellen wurde vorgestellt und im Tiermodell zur Darstellung von Tumoren angewandt (Ren, Blum et al. 2011). Untersuchungen zur Bildgebung des AAAs mittels dieser Methoden fehlen zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings noch.

#### **4.4.2 Therapie: Proteaseinhibitoren**

Momentan besteht die Therapie des AAAs in der Vermeidung von Risikofaktoren und der Rekonstruktion der Aorta ab einem Durchmesser  $\geq 5.5$  cm. Die Progression eines diagnostizierten AAAs zu verhindern oder sogar eine Regression zu erreichen und somit die operative Therapie zu vermeiden ist bisher nicht gelungen. Eine Reihe von klinischen Studien untersuchte bereits die Auswirkung verschiedener Medikamente auf die Wachstumsrate des Aneurysmas. Dabei konnte sich bisher jedoch keine eindeutige therapeutische Option hervortun (Kokje, Hamming et al. 2015). Im

folgenden Abschnitt wird die Inhibition der Proteaseaktivität im AAA als mögliche Therapieoption beschrieben.

#### ***4.4.2.1 Doxycyclin***

Doxycyclin ist ein relativ unselektiver Proteaseinhibitor. Klinisch findet die Substanz vor allem als Antibiotikum Anwendung. Doxycyclin inhibiert MMPs, in dem es an das Zink-Ion im aktiven Zentrum bindet (Aziz and Kuivaniemi 2007).

Im Tierversuch konnten mehrere Autoren zeigen, dass durch eine Doxycyclintherapie die Ausbildung eines induzierten Aneurysmas vermindert wurde. Auch die MMP-9 Aktivität war erniedrigt (Petrinec, Liao et al. 1996, Curci, Petrinec et al. 1998, Kaito, Urayama et al. 2003). Xie et. al konnten keinen Einfluss auf bereits durch Angiotensin-II etablierte Aneurysmen nachweisen, während Yu et al. im Elastase-induzierten Aneurysma eine Regression beobachteten (Xie, Lu et al. 2012, Yu, Chen et al. 2017).

2001 konnte in einer kleinen klinischen Studie ein inhibitorischer Effekt durch Doxycyclin auf die Aneurysmawachstumsrate festgestellt werden (Mosorin, Juvonen et al. 2001). Baxter et. al konnten in einer prospektiven Studie einen signifikanten Abfall von MMP-9 Spiegeln im Serum nach 6 Monaten Doxycyclin feststellen (Baxter, Pearce et al. 2002). Eine aktuelle Studie derselben Arbeitsgruppe untersucht die Wachstumsraten von Aneurysmen unter der Gabe von 100mg Doxycyclin zweimal täglich. Die Dauer der Studie ist auf 2 Jahre ausgelegt, erste Ergebnisse werden 2019 erwartet (Baxter, Pearce et al. 2002, Baxter, Matsumura et al. 2016). Zu einem gegenteiligen Ergebnis kam eine niederländische Studie bei 286 Patienten, die 18-Monate lang einmal täglich 100 mg Doxycyclin erhielten. Es war keine Verlangsamung der Wachstumsrate festzustellen, sondern sogar ein vermehrtes Aneurysmawachstum (Meijer, Stijnen et al. 2013).

Die weitere Evaluation von Doxycyclin als Proteaseinhibitor steht also noch aus. Es bleibt zu diskutieren, inwiefern die antibiotische Wirkung von Doxycyclin einen Einfluss auf das Aneurysma hat, da eine Chlamydieninfektion zu den Hypothesen der Pathogenese zählt.

#### ***4.4.2.2 Spezifische Inhibitoren***

Seit über 20 Jahren wird an der Entwicklung spezifischer Proteaseinhibitoren geforscht. Dabei wird überwiegend auf sogenannte „small molecules“ gesetzt. Das sind niedermolekulare Substanzen, die in den meisten Fällen das aktive Zentrum der

MMPs besetzen. An der Ratte konnte eine verminderte Aneurysmabildung im Elastase-induzierten Aneurysma durch unselektive MMP-Inhibition mit RS 132908 nachgewiesen werden (Moore, Liao et al. 1999). RS 132908 ist ein Hydroxamatsäurederivat, das direkt das aktive Zentrum von MMPs inhibieren kann. Ebenso zeigte sich Batimastat im Tiermodell erfolgreich (Bigatel, Elmore et al. 1999). Jedoch erwiesen sich diese Inhibitoren in Phase II Studien als toxisch, was unter anderem auf die Inhibition von MMP-1 zurückgeführt wird. Auch in der Krebstherapie war große Hoffnung auf MMP-Inhibitoren gesetzt worden, aufgrund schwerer systemischer Nebenwirkungen konnten sich diese Substanzen jedoch nicht etablieren (Winer, Adams et al. 2018).

Spezifischere Substanzen, wie XL784, konnten im Tierversuch bereits eine Wirkung auf die Aneurysmaentwicklung zeigen. Zudem erwiesen sie sich im Menschen bereits als weniger toxisch als oben genannte Substanzen (Ennis, Jin et al. 2012). XL784 inhibiert ADAM 10 und 17, MMP-2,-9 und -13, jedoch nicht MMP-1 (Williams, Zhang et al. 2011). Die weitere klinische Evaluation steht noch aus.

Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung von Nanopartikeln, die den Inhibitor Batimastat enthalten und mit einem Anitelastinantikörper gekoppelt sind. Dabei erfolgt durch den Antikörper, der nur an degradiertes Elastin bindet, die Konzentration am Wirkungsort, wo dann der Inhibitor freigesetzt wird und die MMPs blockieren kann. So könnten die notwendige Dosis des Inhibitors verringert werden und systemische Nebenwirkungen verhindert werden (Nosoudi, Nahar-Gohad et al. 2015).

Eine andere Möglichkeit, die MMP-Aktivität zu bremsen, ist, die Expression schon vor der Translation zu unterbinden. Dies gelingt mittels siRNA (small interfering RNA), welche einen raschen Abbau von mRNA bedingt. Mittels dieses Mechanismus konnten Lakka et al. die MMP-Expression in Glioblastomzellen unterdrücken (Lakka, Gondi et al. 2005). Dieses Prinzip ließe sich auch auf das Aortenaneurysma übertragen.

Die Inhibition von Cathepsinen stellt ebenso einen Ansatzpunkt für die medikamentöse Therapie des AAAs dar. Die diesbezügliche Forschung steht im Vergleich zu den MMP-Inhibitoren noch am Anfang.

Der Cathepsin S Inhibitor LY3000328 konnte im CaCl<sub>2</sub>-induzierten Aneurysma in einem Mausmodell die Aneurysmaentstehung reduzieren (Jadhav, Schiffler et al. 2014). Die weitere Entwicklung für die klinische Anwendung ist geplant. Im Wirkmechanismus ist

nicht nur die Inhibition der Cathepsin S vermittelten ECM-Degradierung vorstellbar, auch eine Unterbindung der im AAA stattfindenden Inflammationsprozesse kann eine Rolle spielen. Im Tiermodell der Autoimmunerkrankung Sjögren-Syndrom konnte durch einen Cathepsin S Inhibitor die Präsentation von Autoantigenen und somit die Infiltration von Entzündungszellen gebremst werden (Saegusa, Ishimaru et al. 2002). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch im AAA wirken. Auch für andere Cathepsine gibt es mittlerweile spezifische Inhibitoren, allerdings fehlen Untersuchungen in Bezug auf ihre Wirkung auf das AAA. Beispielsweise findet sich der Cathepsin K Inhibitor Odanacatib für die Behandlung der postmenopausalen Osteoporose bereits in einer Phase III Studie (Bone, Dempster et al. 2015).

Die Erkenntnisse über den Beitrag der Proteasen an der Entstehung eines Aneurysmas haben bereits Entwicklungen für diagnostische oder therapeutische Zwecke nach sich gezogen. Im Moment sind diese jedoch noch weit von einer breiten klinischen Anwendung entfernt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHUNGEN

---

### 5.1 ASSOCIATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE LEVELS WITH COLLAGEN DEGRADATION IN THE CONTEXT OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM

In bisherigen Publikationen fehlte die Verknüpfung von Expressionsleveln von MMPs auf mRNA- und Proteinebene, und insbesondere deren Einfluss auf die Kollagen Degradation. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein Expressionsmuster für MMPs im abdominalen Aortenaneurysma auf beiden Ebenen zu erstellen. Gleichzeitig wurde das Vorkommen von Kollagenen als Zielstruktur für MMPs untersucht, um Zusammenhänge zwischen MMP-Expression und Degradation von Kollagenen aufzudecken.

Methodisch wurden dazu Gewebeproben von 40 Patienten, die an einem AAA litten, sowie 9 Kontrollproben auf die Expression von MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12 sowie TIMP-1 und -2 untersucht, zusätzlich auch Marker für das Vorkommen von Makrophagen, Leukozyten, T-Zellen, glatten Muskelzellen und die Ausbildung neuer Gefäße. Es wurde eine quantitative PCR zur Messung der Expression auf mRNA-Ebene angewandt. Die Expression auf Proteinebene wurde mittels ELISA untersucht, dabei wurden auch Kollagen I und III, sowie deren Degradationsprodukte CTX I und CTX III eingeschlossen. Zudem wurden die Proben immunhistochemisch und mittels Zymographie untersucht.

Es zeigte sich eine erhöhte Expression von MMP-3, -9 und -12 auf mRNA-Ebene und MMP-8, -9 und -12 auf Proteinebene. Verschiedene MMPs korrelierten mit dem Vorkommen von Makrophagen und glatten Muskelzellen. Im AAA war der Gehalt an intaktem Kollagen I halbiert, während der Gehalt an Kollagen III im Vergleich zu gesundem Gewebe beinahe fünffach erhöht war. Das degradierte Kollagen I war relativ zum intakten Kollagen I im AAA erhöht, während degradiertes Kollagen III relativ erniedrigt war.

Eine besondere Rolle lässt sich MMP-8, -9 und -12 zuweisen, welche vermehrt exprimiert wurden, MMP-8 allerdings nur auf Proteinebene, und deren Vorkommen mit Makrophagen als Entzündungszellen korrelierte. Das vermehrte Vorkommen von

Kollagen III im AAA könnte eine Gegenreaktion zur vermehrten Kollagen I Degradation darstellen.

An der Entstehung dieser Publikation war ich mit der Durchführung der Experimente zur Expression auf mRNA- und Proteinebene beteiligt. Die immunhistochemischen Analysen und die zymographischen Experimente führte mein Betreuer Prof. Dr. Pelisek durch. Die Auswertung der erhobenen Daten fand in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Pelisek statt. Das Manuskript erstellte ich, wobei Prof. Dr. Eckstein und Prof. Dr. Pelisek an der Finalisierung und Revision mitarbeiteten.

## **5.2 CATHEPSIN S IS ASSOCIATED WITH DEGRADATION OF COLLAGEN I IN ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM**

Zwar sind Cathepsine als Faktoren in der Pathogenese des AAA mittlerweile anerkannt, allerdings ist ihr exakte Rolle, insbesondere im Hinblick auf die Degradierung von Kollagenen noch unklar. Daher wurde in dieser Publikation besonderes Augenmerk auf die Korrelation von Cathepsinexpression und dem Vorkommen intakter und degradiertes Kollagene im AAA gelegt.

Es wurden dabei die Cathepsine B, D, K, L, S und Cystatin C, sowie Kollagen Typ I und III und deren Degradationsprodukte CTX I und CTX III in 37 Proben von AAA-Patienten und 9 Kontrollen untersucht. Die mRNA-Expression wurde via quantitativer Echtzeit-PCR und die Proteinexpression mittels ELISA analysiert. Zudem wurde die Expression verschiedener Zell-Marker auf mRNA-Ebene bestimmt.

Auf mRNA-Ebene zeigten sich Cathepsin B, D, L, S im AAA signifikant erhöht, auf Proteinebene lediglich Cathepsin B und S. Die Marker für Leukozyten und Makrophagen korrelierten mit Cathepsin S. Ebenso zeigte sich für Cathepsin S eine negative Korrelation mit intaktem Kollagen I und eine positive Korrelation mit degradiertem Kollagen I.

Daher kann eine besondere Rolle von Cathepsin S im Kollagenumsatz und somit in der Progression des AAA vermutet werden, da es im AAA vermehrt exprimiert wird und zusätzlich mit degradiertem Kollagen I korreliert. Auch die Beteiligung eines entzündlichen Geschehens an der Pathogenese des AAA wird durch die Korrelationen der Cathepsin Expression mit inflammatorischen Zellen unterstrichen.



Bei dieser Publikation führte ich die RNA-Extraktion aus den Proben durch, sowie die Quantifizierung der Zellmarker, während die Expressionsanalysen der Cathepsine auf mRNA-Ebene durch die Mitautorin Dr. Fadwa Schmies durchgeführt wurden. Ebenso untersuchte ich die Expression auf Proteinebene. Die Daten wertete ich mit Unterstützung von Prof. Dr. Pelisek aus. Das Manuskript erstellte ich in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Pelisek.

## 6 DANKSAGUNG

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben.

Zuallererst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Pelisek für die wirklich umfassende Betreuung und Unterstützung. Für methodische Probleme im Labor, inhaltliche Fragen oder bürokratische Hürden hatte er stets ein offenes Ohr und eine Lösung.

Auch bei Frau Renate Hegenloh möchte ich mich bedanken, denn ihre Gesellschaft und unsere Gespräche verkürzten so manche lange Inkubationszeit.

Ebenso bei Dr. Fadwa Schmies für das Einlernen im Labor und die Zusammenarbeit in der Entstehung der Publikationen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Eckstein als Direktor der Klinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie für die Möglichkeit zur Promotion in dieser Abteilung.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

- Abdul-Hussien, H., Soekhoe, R. G., Weber, E., von der Thusen, J. H., Kleemann, R., Mulder, A., van Bockel, J. H., Hanemaaijer, R., Lindeman, J. H. (2007). Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol*, 170(3), 809-817. doi:10.2353/ajpath.2007.060522
- Abisi, S., Burnand, K. G., Waltham, M., Humphries, J., Taylor, P. R., & Smith, A. (2007). Cysteine protease activity in the wall of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 46(6), 1260-1266. doi:10.1016/j.jvs.2007.08.015
- Affiril, C. A., Azim, I. M., Hanafiah, H., Nor Azmi, K., & Rozman, Z. (2013). MMP-9: biomarker for abdominal aneurysm. *Clin Ter*, 164(6), e479-483. doi:10.7417/CT.2013.1640
- Airhart, N., Brownstein, B. H., Cobb, J. P., Schierding, W., Arif, B., Ennis, T. L., Thompson, R. W., Curci, J. A. (2014). Smooth muscle cells from abdominal aortic aneurysms are unique and can independently and synergistically degrade insoluble elastin. *J Vasc Surg*, 60(4), 1033-1041; discussion 1041-1032. doi:10.1016/j.jvs.2013.07.097
- Ait-Oufella, H., Wang, Y., Herbin, O., Bourcier, S., Potteaux, S., Joffre, J., Loyer, X., Ponnuswamy, P., Esposito, B., Dalloz, M., Laurans, L., Tedgui, A., Mallat, Z. (2013). Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(10), 2374-2379. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301280
- Ali, M. U., Fitzpatrick-Lewis, D., Miller, J., Warren, R., Kenny, M., Sherifali, D., & Raina, P. (2016). Screening for abdominal aortic aneurysm in asymptomatic adults. *J Vasc Surg*, 64(6), 1855-1868. doi:10.1016/j.jvs.2016.05.101
- Almeida, P. C., Nantes, I. L., Chagas, J. R., Rizzi, C. C., Faljoni-Alario, A., Carmona, E., Juliano, L., Nader, H. B., Tersariol, I. L. (2001). Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem*, 276(2), 944-951. doi:10.1074/jbc.M003820200
- Annabi, B., Shedid, D., Ghosn, P., Kenigsberg, R. L., Desrosiers, R. R., Bojanowski, M. W., Beaulieu, E., Nassif, E., Moumdjian, R., Beliveau, R. (2002). Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 35(3), 539-546. doi:10.1067/mva.2002.121124
- Aziz, F., & Kuivaniemi, H. (2007). Role of matrix metalloproteinase inhibitors in preventing abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg*, 21(3), 392-401. doi:10.1016/j.avsg.2006.11.001
- Bannikov, G. A., Karelina, T. V., Collier, I. E., Marmer, B. L., & Goldberg, G. I. (2002). Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem*, 277(18), 16022-16027. doi:10.1074/jbc.M110931200
- Baxter, B. T., Matsumura, J., Curci, J., McBride, R., Blackwelder, W. C., Liu, X., Larson, L., Terrin, M. L. (2016). Non-invasive Treatment of Abdominal Aortic Aneurysm Clinical Trial (N-TA(3)CT): Design of a Phase IIb, placebo-controlled, double-blind, randomized clinical trial of doxycycline for the reduction of growth of small abdominal aortic aneurysm. *Contemp Clin Trials*, 48, 91-98. doi:10.1016/j.cct.2016.03.008
- Baxter, B. T., Pearce, W. H., Waltke, E. A., Littooy, F. N., Hallett, J. W., Jr., Kent, K. C., Upchurch, G.R. Jr., Chaikof, E.L., Mills, J.L., Fleckten, B., Longo, G.M., Lee, J.K., Thompson, R. W. (2002). Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (Phase II) multicenter study. *J Vasc Surg*, 36(1), 1-12. doi:10.1067/mva.2002.125018
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Bigatel, D. A., Elmore, J. R., Carey, D. J., Cizmeci-Smith, G., Franklin, D. P., & Youkey, J. R. (1999). The matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 limits expansion of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 29(1), 130-139. doi:10.1016/S0741-5214(99)70354-X
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Boddien, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., & Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4(2), 197-250. doi:10.1177/10454411930040020401
- Bode, M. K., Soini, Y., Melkko, J., Satta, J., Risteli, L., & Risteli, J. (2000). Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis. *J Vasc Surg*, 32(6), 1201-1207. doi:10.1067/mva.2000.109743
- Bone, H. G., Dempster, D. W., Eisman, J. A., Greenspan, S. L., McClung, M. R., Nakamura, T., Papapoulos, S., Shih, W.J., Rybak-Feiglin, A., Santora, A.C., Verbruggen, N., Leung, A.T., Lombardi, A. (2015). Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: development history and design and participant characteristics of LOFT, the Long-Term Odanacatib Fracture Trial. *Osteoporos Int*, 26(2), 699-712. doi:10.1007/s00198-014-2944-6

- Brew, K., & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), 55-71. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003
- Breyholz, H. J., Wagner, S., Faust, A., Riemann, B., Holtke, C., Hermann, S., Schober, O., Schafers, M., Kopka, K. (2010). Radiofluorinated pyrimidine-2,4,6-triones as molecular probes for noninvasive MMP-targeted imaging. *ChemMedChem*, 5(5), 777-789. doi:10.1002/cmdc.201000013
- Brojatsch, J., Lima, H., Jr., Palliser, D., Jacobson, L. S., Muehlbauer, S. M., Furtado, R., Goldman, D. L., Lisanti, M. P., Chandran, K. (2015). Distinct cathepsins control necrotic cell death mediated by pyroptosis inducers and lysosome-destabilizing agents. *Cell Cycle*, 14(7), 964-972. doi:10.4161/15384101.2014.991194
- Bundesministerium für Gesundheit (2016). Bekanntmachung eines Beschlusses des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Richtlinie Ultraschallscreening auf Bauchortenaneurysmen. *Bundesanzeiger, AT 17.02.2017 AT*.
- Burrage, P. S., Mix, K. S., & Brinckerhoff, C. E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 11, 529-543. doi:10.2741/1817
- Caglic, D., Pungercar, J. R., Pejler, G., Turk, V., & Turk, B. (2007). Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J Biol Chem*, 282(45), 33076-33085. doi:10.1074/jbc.M705761200
- Caglic, D., Repnik, U., Jedeszko, C., Kosec, G., Miniejew, C., Kindermann, M., Goldman, D. L., Lisanti, M. P., Turk, B. (2013). The proinflammatory cytokines interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha promote the expression and secretion of proteolytically active cathepsin S from human chondrocytes. *Biol Chem*, 394(2), 307-316. doi:10.1515/hsz-2012-0283
- Caley, M. P., Martins, V. L., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(4), 225-234. doi:10.1089/wound.2014.0581
- Chapman, H. A., Riese, R. J., & Shi, G. P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*, 59(1), 63-88. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.63+
- Chase, A. J., & Newby, A. C. (2003). Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res*, 40(4), 329-343. doi:10.1159/000072697
- Chen, J., Tung, C. H., Mahmood, U., Ntziachristos, V., Gyurko, R., Fishman, M. C., Huang, P. L., Weissleder, R. (2002). In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation*, 105(23), 2766-2771. doi:10.1161/01.cir.0000017860.20619.23
- Cheng, X. W., Huang, Z., Kuzuya, M., Okumura, K., & Murohara, T. (2011). Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vascular disease and its complications. *Hypertension*, 58(6), 978-986. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180935
- Crowther, M., Goodall, S., Jones, J. L., Bell, P. R., & Thompson, M. M. (2000). Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 32(3), 575-583. doi:10.1067/mva.2000.108010
- Crowther, M., Goodall, S., Jones, J. L., Bell, P. R., & Thompson, M. M. (2000). Localization of matrix metalloproteinase 2 within the aneurysmal and normal aortic wall. *Br J Surg*, 87(10), 1391-1400. doi:10.1046/j.1365-2168.2000.01554.x
- Curci, J. A. (2009). Digging in the "soil" of the aorta to understand the growth of abdominal aortic aneurysms. *Vascular*, 17 Suppl 1(Supplement 1), S21-29. doi:10.2310/6670.2008.00085
- Curci, J. A., Petrinec, D., Liao, S., Golub, L. M., & Thompson, R. W. (1998). Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: a comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J Vasc Surg*, 28(6), 1082-1093. doi:10.1016/S0741-5214(98)70035-7
- Curci, J. A., Liao, S., Huffman, M. D., Shapiro, S. D., & Thompson, R. W. (1998). Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 102(11), 1900-1910. doi:10.1172/JCI2182
- Dale, M. A., Ruhlman, M. K., & Baxter, B. T. (2015). Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(8), 1746-1755. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305269
- Debus, E. S., Heidemann, F., Gross-Fengels, W., Mahlmann, A., Muhl, E., Pfister, K., Roth, S., Stroszczynski, C., Walther, A., Weiss, N., Wilhelmi, M., Grundmann, R. T. (2018). Kurzfassung S3-Leitlinie zu Screening, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Bauchortenaneurysmas. *Gefäßschirurgie*. doi:10.1007/s00772-018-0435-3
- Di Martino, E. S., Bohra, A., Vande Geest, J. P., Gupta, N., Makaroun, M. S., & Vorp, D. A. (2006). Biomechanical properties of ruptured versus electively repaired abdominal aortic aneurysm wall tissue. *J Vasc Surg*, 43(3), 570-576; discussion 576. doi:10.1016/j.jvs.2005.10.072
- Dobrin, P. B., & Mrkvicka, R. (1994). Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc Surg*, 2(4), 484-488. doi:10.1177/096721099400200412

- Dollery, C. M., & Libby, P. (2006). Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res*, 69(3), 625-635. doi:10.1016/j.cardiores.2005.11.003
- Dumin, J. A., Dickeson, S. K., Stricker, T. P., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Roby, J. D., Santoro, S. A., & Parks, W. C. (2001). Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *J Biol Chem*, 276(31), 29368-29374. doi:10.1074/jbc.M104179200
- Eckstein, H. H., Bockler, D., Flessenkamper, I., Schmitz-Rixen, T., Debus, S., & Lang, W. (2009). Ultrasonographic screening for the detection of abdominal aortic aneurysms. *Dtsch Arztebl Int*, 106(41), 657-663. doi:10.3238/arztebl.2009.0657
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2(3), 161-174. doi:10.1038/nrc745
- Eliason, J. L., Hannawa, K. K., Ailawadi, G., Sinha, I., Ford, J. W., Deogracias, M. P., Roelofs, K. J., Woodrum, D. T., Ennis, T. L., Henke, P. K., Stanley, J. C., Thompson, R. W. Upchurch, G. R., Jr. (2005). Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation*, 112(2), 232-240. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.517391
- Elmore, J. R., Keister, B. F., Franklin, D. P., Youkey, J. R., & Carey, D. J. (1998). Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*, 12(3), 221-228. doi:10.1007/s100169900144
- Emonard, H., & Hornebeck, W. (1997). Binding of 92 kDa and 72 kDa Progelatinases to Insoluble Elastin Modulates Their Proteolytic Activation *Biological Chemistry* (Vol. 378, pp. 265). doi:10.1515/bchm.1997.378.3-4.265
- Ennis, T., Jin, J., Bartlett, S., Arif, B., Grapperhaus, K., & Curci, J. A. (2012). Effect of novel limited-spectrum MMP inhibitor XL784 in abdominal aortic aneurysms. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 17(4), 417-426. doi:10.1177/1074248412455695
- Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A. R., Cabrera, S., & Lopez-Otin, C. (2010). Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), 3-19. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.07.004
- Filardo, G., Powell, J. T., Martinez, M. A., & Ballard, D. J. (2015). Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD001835. doi:10.1002/14651858.CD001835.pub4
- Fontaine, V., Jacob, M.-P., Houard, X., Rossignol, P., Plissonnier, D., Angles-Cano, E., & Michel, J.-B. (2002). Involvement of the Mural Thrombus as a Site of Protease Release and Activation in Human Aortic Aneurysms. *Am J Pathol*, 161(5), 1701-1710. doi:10.1016/s0002-9440(10)64447-1
- Freestone, T., Turner, R. J., Coady, A., Higman, D. J., Greenhalgh, R. M., & Powell, J. T. (1995). Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(8), 1145-1151. doi:10.1161/01.atv.15.8.1145
- Gagliani, N., Amezcua Vesely, M. C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., de Zoete, M. R., Licona-Limon, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., Esplugues, E., Huber, S. Flavell, R. A. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*, 523(7559), 221-225. doi:10.1038/nature14452
- Galt, S. W., Lindemann, S., Medd, D., Allen, L. L., Kraiss, L. W., Harris, E. S., Prescott, S. M., McIntyre, T. M., Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A. (2001). Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res*, 89(6), 509-516. doi:10.1161/hh1801.096339
- Gatenby, R. A., Gawlinski, E. T., Gmitro, A. F., Kaylor, B., & Gillies, R. J. (2006). Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res*, 66(10), 5216-5223. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4193
- Gelb, B. D., Shi, G. P., Chapman, H. A., & Desnick, R. J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 273(5279), 1236-1238. doi:10.1126/science.273.5279.1236
- Geng, Y. J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K., & Libby, P. (1996). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(1), 19-27. doi:10.1161/atvb.16.1.19
- Ghorpade, A., & Baxter, B. T. (1996). Biochemistry and molecular regulation of matrix macromolecules in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci*, 800(1), 138-150. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb33305.x
- Guirguis-Blake, J.M., Beil T.L., Sun X., Senger C.A., Whitlock E.P. (2014) Primary care screening for abdominal aortic aneurysm: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Agency for Healthcare Research and Quality (US)*. doi:10.7326/M14-1204
- Godat, E., Hervé-Grépinet, V., Veillard, F., Lecaille, F., Belghazi, M., Brömme, D., & Lalmanach, G. (2008). Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide *Biological Chemistry* (Vol. 389, pp. 1123). doi:10.1515/BC.2008.109.

- Golestani, R., Razavian, M., Nie, L., Zhang, J., Jung, J. J., Ye, Y., de Roo, M., Hilgerink, K., Liu, C., Robinson, S. P., Sadeghi, M. M. (2015). Imaging vessel wall biology to predict outcome in abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Imaging*, 8(1). doi:10.1161/CIRCIMAGING.114.002471
- Gomis-Rüth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., Bode, W. (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*, 389(6646), 77-81. doi:10.1038/37995
- Goodall, S., Porter, K. E., Bell, P. R., & Thompson, M. M. (2002). Enhanced invasive properties exhibited by smooth muscle cells are associated with elevated production of MMP-2 in patients with aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 24(1), 72-80. doi:10.1053/ejvs.2002.1675
- Gruber, R. (2015). Molecular and cellular basis of bone resorption. *Wien Med Wochenschr*, 165(3-4), 48-53. doi:10.1007/s10354-014-0310-0
- Hahne, J. C., Okuducu, A. F., Fuchs, T., Florin, A., & Wernert, N. (2011). Identification of ETS-1 target genes in human fibroblasts. *Int J Oncol*, 38(6), 1645-1652. doi:10.3892/ijo.2011.981
- Hall, A., Håkansson, K., Mason, R. W., Grubb, A., & Abrahamson, M. (1995). Structural Basis for the Biological Specificity of Cystatin C. *Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 5115-5121. doi:10.1074/jbc.270.10.5115
- Hance, K. A., Tataria, M., Ziporin, S. J., Lee, J. K., & Thompson, R. W. (2002). Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: Role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *Journal of Vascular Surgery*, 35(2), 254-261. doi:10.1067/mva.2002.120382
- Haro, H., Crawford, H. C., Fingleton, B., Shinomiya, K., Spengler, D. M., & Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest*, 105(2), 143-150. doi:10.1172/JCI7091
- He, C. M., & Roach, M. R. (1994). The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 20(1), 6-13. doi:10.1016/0741-5214(94)90169-4
- Hellenthal, F. A., Ten Bosch, J. A., Pulinx, B., Wodzig, W. K., de Haan, M. W., Prins, M. H., Welten, R. J., Teijink, J. A., Schurink, G. W. (2012). Plasma levels of matrix metalloproteinase-9: a possible diagnostic marker of successful endovascular aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 43(2), 171-172. doi:10.1016/j.ejvs.2011.10.014
- Henderson, E. L., Geng, Y. J., Sukhova, G. K., Whittemore, A. D., Knox, J., & Libby, P. (1999). Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation*, 99(1), 96-104. doi:10.1161/circ.99.1.96
- Holmes, D. R., Liao, S., Parks, W. C., & Thompson, R. W. (1995). Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg*, 21(5), 761-771.
- Hsing, L. C., & Rudensky, A. Y. (2005). The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*, 207(1), 229-241. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x
- Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thøgersen, I. B., Enghild, J. J., Sasaguri, Y., Mori, Y. (1996). Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 271(25), 14657-14660. doi:10.1074/jbc.271.25.14657
- Jadhav, P. K., Schiffler, M. A., Gavardinas, K., Kim, E. J., Matthews, D. P., Staszak, M. A., Coffey, D. S., Shaw, B. W., Cassidy, K. C., Brier, R. A., Zhang, Y., Christie, R. M., Matter, W. F., Qing, K., Durbin, J. D., Wang, Y., Deng, G. G. (2014). Discovery of Cathepsin S Inhibitor LY3000328 for the Treatment of Abdominal Aortic Aneurysm. *ACS Med Chem Lett*, 5(10), 1138-1142. doi:10.1021/ml500283g
- Kadoglou, N. P., & Liapis, C. D. (2004). Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Med Res Opin*, 20(4), 419-432. doi:10.1185/030079904125003143
- Kaito, K., Urayama, H., & Watanabe, G. (2003). Doxycycline treatment in a model of early abdominal aortic aneurysm. *Surg Today*, 33(6), 426-433. doi:10.1007/s10595-002-2513-0
- Kang, T., Nagase, H., & Pei, D. (2002). Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res*, 62(3), 675-681.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., & Rinne, A. (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J*, 264(2), 467-473. doi:10.1042/bj2640467
- Kleinspehn, E., Heidemann, F., Behrendt, C. A., Kölbel, T., & Debus, E. S. (2015). Komplikationen nach Rekonstruktion der Aorta. *Der Chirurg*, 86(7), 626-632. doi:10.1007/s00104-015-0030-z
- Koch, A. E., Haines, G. K., Rizzo, R. J., Radosevich, J. A., Pope, R. M., Robinson, P. G., & Pearce, W. H. (1990). Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*, 137(5), 1199-1213.
- Kokje, V. B., Hamming, J. F., & Lindeman, J. H. (2015). Editor's Choice - Pharmaceutical Management of Small Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review of the Clinical Evidence. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 50(6), 702-713. doi:10.1016/j.ejvs.2015.08.010

- Konttinen, Y. T., Mandelin, J., Li, T. F., Salo, J., Lassus, J., Liljestrom, M., Hukkanen, M., Takagi, M., Virtanen, I., Santavirta, S. (2002). Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, *46*(4), 953-960. doi:10.1002/art.10185
- Kotze, C. W., Groves, A. M., Menezes, L. J., Harvey, R., Endozo, R., Kayani, I. A., Ell, P. J., Yusuf, S. W. (2011). What is the relationship between (1)(8)F-FDG aortic aneurysm uptake on PET/CT and future growth rate? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, *38*(8), 1493-1499. doi:10.1007/s00259-011-1799-8
- Lakka, S. S., Gondi, C. S., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M., Rao, V. H., Sioka, C., Rao, J. S. (2005). Specific interference of urokinase-type plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression induced by double-stranded RNA results in decreased invasion, tumor growth, and angiogenesis in gliomas. *J Biol Chem*, *280*(23), 21882-21892. doi:10.1074/jbc.M408520200
- Laurenzana, A., Fibbi, G., Margheri, F., Biagioni, A., Luciani, C., Del Rosso, M., & Chilla, A. (2015). Endothelial Progenitor Cells in Sprouting Angiogenesis: Proteases Pave the Way. *Curr Mol Med*, *15*(7), 606-620. doi:10.2174/1566524015666150831131214
- Li, P. F., Dietz, R., & von Harsdorf, R. (1997). Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett*, *404*(2-3), 249-252. doi:10.1016/s0014-5793(97)00093-8
- Li, Z., Yasuda, Y., Li, W., Bogoyo, M., Katz, N., Gordon, R. E., Fields, G. B., Bromme, D. (2004). Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, *279*(7), 5470-5479. doi:10.1074/jbc.M310349200
- Lindeman, J. H., Ashcroft, B. A., Beenakker, J. W., van Es, M., Koekkoek, N. B., Prins, F. A., Tielemans, J. F., Abdul-Hussien, H., Bank, R. A. Oosterkamp, T. H. (2010). Distinct defects in collagen microarchitecture underlie vessel-wall failure in advanced abdominal aneurysms and aneurysms in Marfan syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(2), 862-865. doi:10.1073/pnas.0910312107
- Lindholt, J. S., Erlandsen, E. J., & Henneberg, E. W. (2002). Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *BJS*, *88*(11), 1472-1475. doi:10.1046/j.0007-1323.2001.01911.x
- Lohoefer, F., Reeps, C., Lipp, C., Rudelius, M., Haertl, F., Matevossian, E., Zerneck, A., Eckstein, H. H., Pelisek, J. (2014). Quantitative expression and localization of cysteine and aspartic proteases in human abdominal aortic aneurysms. *Exp Mol Med*, *46*, e95. doi:10.1038/emmm.2014.20
- Lohoefer, F., Reeps, C., Lipp, C., Rudelius, M., Zimmermann, A., Ockert, S., Eckstein, H. H., Pelisek, J. (2012). Histopathological analysis of cellular localization of cathepsins in abdominal aortic aneurysm wall. *Int J Exp Pathol*, *93*(4), 252-258. doi:10.1111/j.1365-2613.2012.00819.x
- Longo, G. M., Buda, S. J., Fiotta, N., Xiong, W., Griener, T., Shapiro, S., & Baxter, B. T. (2005). MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery*, *137*(4), 457-462. doi:10.1016/j.surg.2004.12.004
- Longo, G. M., Xiong, W., Greiner, T. C., Zhao, Y., Fiotti, N., & Baxter, B. T. (2002). Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*, *110*(5), 625-632. doi:10.1172/JCI15334
- Lopez-Candales, A., Holmes, D. R., Liao, S., Scott, M. J., Wickline, S. A., & Thompson, R. W. (1997). Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol*, *150*(3), 993-1007.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S. S., Coffeng, L. E., Colan, S. D., Colquhoun, S., Colson, K. E., Condon, J., Connor, M. D., Cooper, L. T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K. C., Couser, W., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cross, M., Dabhadkar, K. C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D. C., Dharmaratne, S. D., Dorsey, E. R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P. J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A. D., Forouzanfar, M. H., Fowkes, F. G., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M. K., Gabriel, S. E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R. F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y. A., Haring, D., Harrison, J. E., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hoen, B., Hotez, P. J., Hoy, D., Jacobsen, K. H., James, S. L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J. P., Knowlton, L. M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S. E., Ohno, S. L., Mabweijano, J., MacIntyre, M. F., Mallinger, L., March, L., Marks, G. B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McAnulty, J. H., McDermott, M. M., McGrath, J., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T. R., Mock, C., Mocumbi, A. O., Mokdad, A. A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M. N., Naldi, L., Narayan, K. M., Nasseri, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S. B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J. D., Rivero, A. P., Padilla, R. P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C. A., 3rd, Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J. T., Rein, D. B., Remuzzi, G., Rivara, F. P., Roberts, T., De Leon, F. R., Rosenfeld, L. C., Rushton, L., Sacco, R. L., Salomon, J. A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D. C., Segui-Gomez, M., Shepard,

- D. S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J. A., Thomas, B., Tleyjeh, I. M., Towbin, J. A., Truelsen, T., Undurraga, E. A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G. R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M. A., Weintraub, R., Wilkinson, J. D., Woolf, A. D., Wulf, S., Yeh, P. H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z. J., Lopez, A. D., Murray, C. J., AlMazroa, M. A. and Memish, Z. A. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, *380*(9859), 2095-2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0
- Lv, B. J., Lindholt, J. S., Cheng, X., Wang, J., & Shi, G. P. (2012). Plasma cathepsin S and cystatin C levels and risk of abdominal aortic aneurysm: a randomized population-based study. *PLoS One*, *7*(7), e41813. doi:10.1371/journal.pone.0041813
- Lv, B. J., Lindholt, J. S., Wang, J., Cheng, X., & Shi, G. P. (2013). Plasma levels of cathepsins L, K, and V and risks of abdominal aortic aneurysms: a randomized population-based study. *Atherosclerosis*, *230*(1), 100-105. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.018
- Mach, L., Mort, J. S., & Glossl, J. (1994). Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem*, *269*(17), 13030-13035
- Maier, A., Gee, M. W., Reeps, C., Pongratz, J., Eckstein, H. H., & Wall, W. A. (2010). A comparison of diameter, wall stress, and rupture potential index for abdominal aortic aneurysm rupture risk prediction. *Ann Biomed Eng*, *38*(10), 3124-3134. doi:10.1007/s10439-010-0067-6
- Maldonado, T. S., Rockman, C. B., Riles, E., Douglas, D., Adelman, M. A., Jacobowitz, G. R., . . . Riles, T. S. (2004). Ischemic complications after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*, *40*(4), 703-709; discussion 709-710. doi:10.1016/j.jvs.2004.07.032
- Malik, N., Greenfield, B. W., Wahl, A. F., & Kiener, P. A. (1996). Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *The Journal of Immunology*, *156*(10), 3952. doi:
- Martins, V. L., Caley, M., & O'Toole, E. A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res*, *351*(2), 255-268. doi:10.1007/s00441-012-1410-z
- Matusiak, N., Castelli, R., Tuin, A. W., Overkleeft, H. S., Wisastra, R., Dekker, F. J., Prely, L. M., Bischoff, R., van Waarde, A., Dierckx, R. A., Elsinga, P. H. (2015). A dual inhibitor of matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinases, [(1)(8)F]FB-ML5, as a molecular probe for non-invasive MMP/ADAM-targeted imaging. *Bioorg Med Chem*, *23*(1), 192-202. doi:10.1016/j.bmc.2014.11.013
- Mayranpaa, M. I., Trosien, J. A., Fontaine, V., Folkesson, M., Kazi, M., Eriksson, P., Swedenborg, J., Hedin, U. (2009). Mast cells associate with neovessels in the media and adventitia of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, *50*(2), 388-395; discussion 395-386. doi:10.1016/j.jvs.2009.03.055
- McNally, M. M., Agle, S. C., Parker, F. M., Bogey, W. M., Powell, C. S., & Stoner, M. C. (2010). Preoperative statin therapy is associated with improved outcomes and resource utilization in patients undergoing aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*, *51*(6), 1390-1396. doi:10.1016/j.jvs.2010.01.028
- Meijer, C., Stijnen, T., Wasser, M. M., & et al. (2013). Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, *159*(12), 815-823. doi:10.7326/0003-4819-159-12-201312170-00007
- Mezentsev, A., Nikolaev, A., & Bruskin, S. (2014). Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. *Gene*, *540*(1), 1-10. doi:10.1016/j.gene.2014.01.068
- Miller, F. J., Jr., Sharp, W. J., Fang, X., Oberley, L. W., Oberley, T. D., & Weintraub, N. L. (2002). Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *22*(4), 560-565. doi:10.1161/01.atv.0000013778.72404.30
- Moghadamyeghaneh, Z., Sgroi, M. D., Chen, S. L., Kabutey, N. K., Stamos, M. J., & Fujitani, R. M. (2016). Risk factors and outcomes of postoperative ischemic colitis in contemporary open and endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*, *63*(4), 866-872. doi:10.1016/j.jvs.2015.10.064
- Moore, G., Liao, S., Curci, J. A., Starcher, B. C., Martin, R. L., Hendricks, R. T., Chen, J. J., Thompson, R. W. (1999). Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms by systemic treatment with a hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitor (RS 132908). *J Vasc Surg*, *29*(3), 522-532. doi:10.1016/S0741-5214(99)70281-8
- Mosorin, M., Juvonen, J., Biancari, F., Satta, J., Surcel, H. M., Leinonen, M., Saikku P., Juvonen, T. (2001). Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Vasc Surg*, *34*(4), 606-610. doi:10.1067/mva.2001.117891
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, *69*(3), 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Newby, A. C. (2005). Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*, *85*(1), 1-31. doi:10.1152/physrev.00048.2003
- Newby, A. C. (2008). Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *28*(12), 2108-2114. doi:10.1161/ATVBAHA.108.173898



- Nishimura, K., Ikebuchi, M., Kanaoka, Y., Ohgi, S., Ueta, E., Nanba, E., & Ito, H. (2003). Relationships between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol*, *22*(3), 229-238. doi:10.1007/s00547-003-0957-7
- Nishimura, Y., Kawabata, T., & Kato, K. (1988). Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch Biochem Biophys*, *261*(1), 64-71. doi:10.1016/0003-9861(88)90104-X
- Nosoudi, N., Nahar-Gohad, P., Sinha, A., Chowdhury, A., Gerard, P., Carsten, C. G., Gray, B. H., Vyavahare, N. R. (2015). Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by targeted inhibition of matrix metalloproteinase activity with batimastat-loaded nanoparticles. *Circ Res*, *117*(11), e80-89. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307207
- Novinec, M., & Lenarcic, B. (2013). Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomol Concepts*, *4*(3), 287-308. doi:10.1515/bmc-2012-0054
- Paiva, K. B., & Granjeiro, J. M. (2014). Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys*, *561*(Supplement C), 74-87. doi:10.1016/j.abb.2014.07.034
- Palsdottir, A., Abrahamson, M., Thorsteinsson, L., Arnason, A., Olafsson, I., Grubb, A., & Jensson, O. (1988). Mutation in cystatin C gene causes hereditary brain haemorrhage. *Lancet*, *2*(8611), 603-604. doi:10.1016/S0140-6736(88)90641-1
- Panwar, P., Du, X., Sharma, V., Lamour, G., Castro, M., Li, H., & Bromme, D. (2013). Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers. *J Biol Chem*, *288*(8), 5940-5950. doi:10.1074/jbc.M112.419689
- Pennacchio, L. A., Lehesjoki, A. E., Stone, N. E., Willour, V. L., Virtaneva, K., Miao, J., D'Amato, E., Ramirez, L., Faham, M., Koskiniemi, M., Warrington, J. A., Norio, R., de la Chapelle, A., Cox, D. R., Myers, R. M. (1996). Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science*, *271*(5256), 1731-1734. doi:10.1126/science.271.5256.1731
- Petersen, E., Wagberg, F., & Angquist, K. A. (2002). Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *23*(2), 153-157. doi:10.1053/ejvs.2001.1572
- Petrinec, D., Liao, S., Holmes, D. R., Reilly, J. M., Parks, W. C., & Thompson, R. W. (1996). Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg*, *23*(2), 336-346. doi:10.1016/S0741-5214(96)70279-3
- Pyo, R., Lee, J. K., Shipley, J. M., Curci, J. A., Mao, D., Ziporin, S. J., Ennis, T. L., Shapiro, S. D., Senior, R. M., Thompson, R. W. (2000). Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*, *105*(11), 1641-1649. doi:10.1172/JCI8931
- Qin, Y., Cao, X., Guo, J., Zhang, Y., Pan, L., Zhang, H., Li, H., Tang, C., Du, J., Shi, G. P. (2012). Deficiency of cathepsin S attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res*, *96*(3), 401-410. doi:10.1093/cvr/cvs263
- Qin, Y., Cao, X., Yang, Y., & Shi, G. P. (2013). Cysteine protease cathepsins and matrix metalloproteinases in the development of abdominal aortic aneurysms. *Future Cardiol*, *9*(1), 89-103. doi:10.2217/fca.12.71
- Raffetto, J. D., & Khalil, R. A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*, *75*(2), 346-359. doi:10.1016/j.bcp.2007.07.004
- Rajagopalan, S., Meng, X. P., Ramasamy, S., Harrison, D. G., & Galis, Z. S. (1996). Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*, *98*(11), 2572-2579. doi:10.1172/JCI119076
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2008). *Duale Reihe Biochemie* (2. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Reeps, C., Essler, M., Pelisek, J., Seidl, S., Eckstein, H. H., & Krause, B. J. (2008). Increased 18F-fluorodeoxyglucose uptake in abdominal aortic aneurysms in positron emission/computed tomography is associated with inflammation, aortic wall instability, and acute symptoms. *J Vasc Surg*, *48*(2), 417-423; discussion 424. doi:10.1016/j.jvs.2008.03.059
- Reeps, C., Pelisek, J., Seidl, S., Schuster, T., Zimmermann, A., Kuehnl, A., & Eckstein, H. H. (2009). Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology*, *76*(5), 243-252. doi:10.1159/000228900
- Reijerkerk, A., Kooij, G., van der Pol, S. M., Khazen, S., Dijkstra, C. D., & de Vries, H. E. (2006). Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *Faseb j*, *20*(14), 2550-2552. doi:10.1096/fj.06-6099fje
- Reimerink, J. J., van der Laan, M. J., Koelemay, M. J., Balm, R., & Legemate, D. A. (2013). Systematic review and meta-analysis of population-based mortality from ruptured abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*, *100*(11), 1405-1413. doi:10.1002/bjs.9235

- Ren, G., Blum, G., Verdoes, M., Liu, H., Syed, S., Edgington, L. E., Gheysens, O., Miao, Z., Jiang, H., Gambhir, S. S., Bogoyo, M. Cheng, Z. (2011). Non-invasive imaging of cysteine cathepsin activity in solid tumors using a <sup>64</sup>Cu-labeled activity-based probe. *PLoS One*, 6(11), e28029. doi:10.1371/journal.pone.0028029
- Rückert, R. I., Hanack, U., Arónés-Gomez, S., & Yousefi, S. (2014). Aneurysmen der Bauchorta und der Beckenarterien. *Der Chirurg*, 85(9), 782-790. doi:10.1007/s00104-014-2718-x
- Saegusa, K., Ishimaru, N., Yanagi, K., Arakaki, R., Ogawa, K., Saito, I., Katunuma, N., Hayashi, Y. (2002). Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J Clin Invest*, 110(3), 361-369. doi:10.1172/JCI14682
- Sakalihan, N., Delvenne, P., Nusgens, B. V., Limet, R., & Lapiere, C. M. (1996). Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 24(1), 127-133. doi:10.1016/s0741-5214(96)70153-2
- Sakalihan, N., Limet, R., & Defawe, O. D. (2005). Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*, 365(9470), 1577-1589. doi:10.1016/S0140-6736(05)66459-8
- Sampson, U. K., Norman, P. E., Fowkes, F. G., Aboyans, V., Yanna, S., Harrell, F. E., Jr., Forouzanfar, M. H., Naghavi, M., Denenberg, J. O., McDermott, M. M., Criqui, M. H., Mensah, G. A., Ezzati, M., Murray, C. (2014). Global and regional burden of aortic dissection and aneurysms: mortality trends in 21 world regions, 1990 to 2010. *Glob Heart*, 9(1), 171-180 e110. doi:10.1016/j.gheart.2013.12.010
- Samukange, V., Yasukawa, K., & Inouye, K. (2014). Effects of heparin and cholesterol sulfate on the activity and stability of human matrix metalloproteinase 7. *Biosci Biotechnol Biochem*, 78(1), 41-48. doi:10.1080/09168451.2014.878213
- Sanceau, J., Boyd, D. D., Seiki, M., & Bauvois, B. (2002). Interferons inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B. *J Biol Chem*, 277(38), 35766-35775. doi:10.1074/jbc.M202959200
- Satta, J., Juvonen, T., Haukipuro, K., Juvonen, M., & Kairaluoma, M. I. (1995). Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc Surg*, 22(2), 155-160. doi:10.1016/S0741-5214(95)70110-9
- Schonbeck, U., Mach, F., & Libby, P. (1998). Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*, 161(7), 3340-3346.
- Sharma, A. K., Lu, G., Jester, A., Johnston, W. F., Zhao, Y., Hajzus, V. A., Saadatzadeh, M. R., Su, G., Bhamidipati, C. M., Mehta, G. S., Kron, I. L., Laubach, V. E., Murphy, M. P., Ailawadi, G., Upchurch, G. R., Jr. (2012). Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment. *Circulation*, 126(11 Suppl 1), S38-45. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.083451
- Shi, G. P., Sukhova, G. K., Grubb, A., Ducharme, A., Rhode, L. H., Lee, R. T., Ridker, P. M., Libby, P., Chapman, H. A. (1999). Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 104(9), 1191-1197. doi:10.1172/JCI7709
- Shi, G. P., Sukhova, G. K., Kuzuya, M., Ye, Q., Du, J., Zhang, Y., Pan, J. H., Lu, M. L., Cheng, X. W., Iguchi, A., Perrey, S., Lee, A. M., Chapman, H. A., Libby, P. (2003). Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res*, 92(5), 493-500. doi:10.1161/01.RES.0000060485.20318.96
- Silence, J., Lupu, F., Collen, D., & Lijnen, H. R. (2001). Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(9), 1440-1445. doi:10.1161/hq0901.097004
- Sivaraman, J., Lalumiere, M., Menard, R., & Cygler, M. (1999). Crystal structure of wild-type human procathepsin K. *Protein Sci*, 8(2), 283-290. doi:10.1110/ps.8.2.283
- Stather, P. W., Sidloff, D. A., Dattani, N., Gokani, V. J., Choke, E., Sayers, R. D., & Bown, M. J. (2014). Meta-analysis and meta-regression analysis of biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*, 101(11), 1358-1372. doi:10.1002/bjs.9593
- Stather, P. W., Sidloff, D. A., Rhema, I. A., Choke, E., Bown, M. J., & Sayers, R. D. (2014). A review of current reporting of abdominal aortic aneurysm mortality and prevalence in the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 47(3), 240-242. doi:10.1016/j.ejvs.2013.11.007
- Statistisches Bundesamt (2017). Tiefgegliederte Diagnosedaten der Krankenhauspatientinnen und -patienten. Abgerufen am 17.08.2018 von <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Krankenhaeuser/TiefgegliederteDiagnosedaten.html>
- Sukhova, G. K., Shi, G. P., Simon, D. I., Chapman, H. A., & Libby, P. (1998). Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 102(3), 576-583. doi:10.1172/JCI181

- Sukhova, G. K., Wang, B., Libby, P., Pan, J. H., Zhang, Y., Grubb, A., Fang, K., Chapman, H. A., Shi, G. P. (2005). Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice. *Circ Res*, *96*(3), 368-375. doi:10.1161/01.RES.0000155964.34150.F7
- Sukhova, G. K., & Shi, G. P. (2006). Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis? *Ann N Y Acad Sci*, *1085*, 161-169. doi:10.1196/annals.1383.028
- Sun, J., Sukhova, G. K., Zhang, J., Chen, H., Sjoberg, S., Libby, P., Xia, M., Xiong, N., Gelb, B. D., Shi, G. P. (2012). Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *32*(1), 15-23. doi:10.1161/ATVBAHA.111.235002
- Sun, J., Sukhova, G. K., Zhang, J., Chen, H., Sjoberg, S., Libby, P., Xiang, M., Wang, J., Peters, C., Reinheckel, T., Shi, G. P. (2011). Cathepsin L activity is essential to elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(11), 2500-2508. doi:10.1161/ATVBAHA.111.230201
- Thomas, D. M., Hulten, E. A., Ellis, S. T., Anderson, D. M., Anderson, N., McRae, F., Malik, J. A., Villines, T., C. Slim, A. M. (2014). Open versus Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm in the Elective and Emergent Setting in a Pooled Population of 37,781 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ISRN Cardiol*, *2014*, 149243. doi:10.1155/2014/149243
- Thompson, M. M., Jones, L., Nasim, A., Sayers, R. D., & Bell, P. R. (1996). Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *11*(4), 464-469. doi:10.1016/S1078-5884(96)80183-3
- Toczek, J., Ye, Y., Gona, K., Kim, H. Y., Han, J., Razavian, M., Golestani, R., Zhang, J., Wu, T. L., Jung, J. J., Sadeghi, M. M. (2017). Preclinical Evaluation of RYM1, a Matrix Metalloproteinase-Targeted Tracer for Imaging Aneurysm. *J Nucl Med*, *58*(8), 1318-1323. doi:10.2967/jnumed.116.188656
- Turk, B., Bieth Joseph, G., Björk, I., Dolenc, I., Turk, D., Cimerman, N., Kos, J., Čolič, A., Stoka, V., Turk, V. (1995). Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* (Vol. 376, pp. 225). doi:10.1515/bchm3.1995.376.4.225
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*, *1824*(1), 68-88. doi:10.1016/j.bbapap.2011.10.002
- Turk, V., Turk, B., Guncar, G., Turk, D., & Kos, J. (2002). Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul*, *42*, 285-303. doi:10.1016/S0065-2571(01)00034-6
- Ueda, K., Yoshimura, K., Yamashita, O., Harada, T., Morikage, N., & Hamano, K. (2015). Possible dual role of decorin in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One*, *10*(3), e0120689. doi:10.1371/journal.pone.0120689
- Van Den Berg, J. G., Aten, J., Annink, C., Ravesloot, J. H., Weber, E., & Weening, J. J. (2002). Interleukin-4 and -13 promote basolateral secretion of H(+) and cathepsin L by glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, *282*(1), F26-33. doi:10.1152/ajprenal.0102.2001
- Van Doren, S. R. (2015). Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol*, *44-46*, 224-231. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.005
- Vande Geest, J. P., Sacks, M. S., & Vorp, D. A. (2006). The effects of aneurysm on the biaxial mechanical behavior of human abdominal aorta. *J Biomech*, *39*(7), 1324-1334. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.03.003
- Vandenbroucke, R. E., Dejonckheere, E., Van Hauwermeiren, F., Lodens, S., De Rycke, R., Van Wonterghem, E., Staes, A., Gevaert, K., Lopez-Otin, C., Libert, C. (2013). Matrix metalloproteinase 13 modulates intestinal epithelial barrier integrity in inflammatory diseases by activating TNF. *EMBO Mol Med*, *5*(7), 1000-1016. doi:10.1002/emmm.201202100
- Wang, S. K., Green, L. A., Gutwein, A. R., Drucker, N. A., Motaganahalli, R. L., Gupta, A. K., Fajardo, A., Murphy, M. P. (2018). Description of human AAA by cytokine and immune cell aberrations compared to risk-factor matched controls. *Surgery*. doi:10.1016/j.surg.2018.03.002
- Wang, Y., Tang, C., & Qin, Y. (2013). Cathepsins: a new culprit behind abdominal aortic aneurysm. *Regen Med Res*, *1*(1), 5. doi:10.1186/2050-490X-1-5
- Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B., & Murphy, G. (1996). The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem*, *271*(29), 17119-17123.
- Williams, J. M., Zhang, J., North, P., Lacy, S., Yakes, M., Dahly-Vernon, A., & Roman, R. J. (2011). Evaluation of metalloprotease inhibitors on hypertension and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, *300*(4), F983-998. doi:10.1152/ajprenal.00262.2010
- Wilson, W. R., Anderton, M., Schwalbe, E. C., Jones, J. L., Furness, P. N., Bell, P. R., & Thompson, M. M. (2006). Matrix metalloproteinase-8 and -9 are increased at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Circulation*, *113*(3), 438-445. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.551572
- Wilson, W. R., Schwalbe, E. C., Jones, J. L., Bell, P. R., & Thompson, M. M. (2005). Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*, *92*(7), 828-833. doi:10.1002/bjs.4993

- Winer, A., Adams, S., & Mignatti, P. (2018). Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol Cancer Ther*, 17(6), 1147-1155. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0646
- Xie, X., Lu, H., Moorleggen, J. J., Howatt, D. A., Rateri, D. L., Cassis, L. A., & Daugherty, A. (2012). Doxycycline does not influence established abdominal aortic aneurysms in angiotensin II-infused mice. *PLoS One*, 7(9), e46411. doi:10.1371/journal.pone.0046411
- Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Ahmad, R., & Kaur, G. (2014). Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(3), 1085-1091. doi:10.7314/apjcp.2014.15.3.1085
- Yamamoto, K., Murphy, G., & Troeberg, L. (2015). Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biol*, 44-46, 255-263. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.007
- Yu, M., Chen, C., Cao, Y., & Qi, R. (2017). Inhibitory effects of doxycycline on the onset and progression of abdominal aortic aneurysm and its related mechanisms. *Eur J Pharmacol*, 811, 101-109. doi:10.1016/j.ejphar.2017.05.041
- Zhang, S., Feng, J., Li, H., Zhang, Y., Lu, Q., & Jing, Z. (2016). Open surgery (OS) versus endovascular aneurysm repair (EVAR) for hemodynamically stable and unstable ruptured abdominal aortic aneurysm (rAAA). *Heart Vessels*, 31(8), 1291-1302. doi:10.1007/s00380-015-0736-3
- Zheng, T., Zhu, Z., Wang, Z., Homer, R. J., Ma, B., Riese, R. J., Jr., Chapman, H. A., Jr., Shapiro, S. D., Elias, J. A. (2000). Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest*, 106(9), 1081-1093. doi:10.1172/JCI10458
- Zhou, Y., Wu, W., Lindholt, J. S., Sukhova, G. K., Libby, P., Yu, X., & Shi, G. P. (2015). Regulatory T cells in human and angiotensin II-induced mouse abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res*, 107(1), 98-107. doi:10.1093/cvr/cvv119

## 8 APPENDIX

---

### PUBLIKATION I

Klaus, V., Tanios-Schmies, F., Reeps, C., Trenner, M., Matevossian, E., Eckstein, H. H., Pelisek, J. (2017) Association of MMP levels with collagen degradation in the context of AAA. *EJVES*, 53(4):549-558.

### PUBLIKATION II

Klaus, V., Schmies, F., Reeps, C., Trenner, M., Geisbüsch, S., Lohoefer, F., Eckstein, H. H., Pelisek, J. (2018) Cathepsin B and S are associated with the degraded product of collagen I in abdominal aortic aneurysm. *VASA*, 47(4):285-293.

## Association of Matrix Metalloproteinase Levels with Collagen Degradation in the Context of Abdominal Aortic Aneurysm

V. Klaus<sup>a</sup>, F. Tanios-Schmies<sup>a</sup>, C. Reeps<sup>b</sup>, M. Trenner<sup>a</sup>, E. Matevossian<sup>c</sup>, H.-H. Eckstein<sup>a,d</sup>, J. Pelisek<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany

<sup>b</sup> Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden, Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Dresden, Germany

<sup>c</sup> Department of Surgery, Munich Transplant Centre, Munich, Germany

<sup>d</sup> DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Munich Heart Alliance, Munich, Germany

### WHAT THIS PAPER ADDS

This study attempts to clarify the role of matrix metalloproteinases (MMPs) in collagen degradation in abdominal aortic aneurysm (AAA) wall and compares the expression of MMPs at the mRNA and protein levels. Interestingly, MMPs showed no correlation between mRNA and protein, indicating that MMPs are differently regulated and their activity is apparently independent of their expression at mRNA level. Furthermore, the data show that collagen III seems to be the most important collagen in advanced AAA to maintain the aortic wall integrity. At the protein level, MMP-8, MMP-9, and MMP-12, in particular, seem to be associated with collagen I and collagen III and their degradation.

**Objective/Background:** Matrix metalloproteinases (MMPs) have already been identified as key players in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA). However, the current data remain inconclusive. In this study, the expression of MMPs at mRNA and protein levels were investigated in relation to the degradation of collagen I and collagen III.

**Methods:** Tissue samples were obtained from 40 patients with AAA undergoing open aortic repair, and from five healthy controls during kidney transplantation. Expression of MMPs 1, 2, 3, 7, 8, 9, and 12, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)1, and TIMP2 were measured at the mRNA level using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. At the protein level, MMPs, collagen I, and collagen III, and their degradation products carboxy-terminal collagen cross-links (CTX)-I and CTX-III, were quantified via enzyme linked immunosorbent assay. In addition, immunohistochemistry and gelatine zymography were performed.

**Results:** In AAA, significantly enhanced mRNA expression was observed for MMPs 3, 9, and 12 compared with controls ( $p \leq .001$ ). MMPs 3, 9, and 12 correlated significantly with macrophages ( $p = .007$ ,  $p = .018$ , and  $p = .015$ , respectively), and synthetic smooth muscle cells with MMPs 1, 2, and 9 ( $p = .020$ ,  $p = .018$ , and  $p = .027$ , respectively). At the protein level, MMPs 8, 9, and 12 were significantly elevated in AAA ( $p = .006$ ,  $p = .0004$ , and  $p < .001$ , respectively). No significant correlation between mRNA and protein was observed for any MMP. AAA contained significantly reduced intact collagen I (twofold;  $p = .002$ ), whereas collagen III was increased (4.6 fold;  $p < .001$ ). Regarding degraded collagen I and III relative to intact collagens, observations were inverse (1.4 fold increase for CTX-I [ $p < .001$ ]; fivefold decrease for CTX-III [ $p = .004$ ]). MMPs 8, 9, and 12 correlated with collagen I ( $p = .019$ ,  $p < .001$ , and  $p = 0.003$ , respectively), collagen III ( $p = .015$ ,  $p < .001$ , and  $p < .001$ , respectively), and degraded collagen I ( $p = .012$ ,  $p = .049$ , and  $p = .001$ , respectively).

**Conclusion:** No significant relationship was found between mRNA and protein and MMP levels. MMPs 9 and 12 were overexpressed in AAA at the mRNA and protein level, and MMP-8 at the protein level. MMP-2 was detected in synthetic SMCs. Collagen I and III showed inverse behaviour in AAA. In particular, MMPs 8, 9, and 12 appear to be associated with collagen I, collagen III, and their degradation products.

© 2017 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article history: Received 6 June 2016, Accepted 24 December 2016, Available online 10 February 2017

**Keywords:** Abdominal aortic aneurysm, Collagen degradation, Matrix metalloproteinases

### INTRODUCTION

Recent data state the prevalence of abdominal aortic aneurysm (AAA) to be between 1.7% and 12.7%.<sup>1–4</sup> The main risk of AAA is that it remains asymptomatic over years. However, in the case of rupture the estimated total mortality rate is 78–83%.<sup>5–7</sup> In addition, approximately one third of patients with ruptured AAA die before reaching hospital. Even in hospital,

\* Corresponding author. Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Ismaninger Str. 22, D-81675 Munich, Germany.

E-mail address: [j.pelisek@tum.de](mailto:j.pelisek@tum.de) (J. Pelisek).

1078-5884/© 2017 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2016.12.030>

the mortality of ruptured AAA ranges from 28.4% to 29.9% for endovascular repair to 40.8% to 43.9% for open surgical repair.<sup>8,9</sup> Thus, timely recognition of patients at such risk is essential. Currently, only the diameter of the aneurysm is an established diagnostic tool with which to evaluate the risk of rupture in clinical practice.<sup>10</sup> For more individualised treatment of patients with AAA, other parameters for risk stratification are necessary. Of course, this requires a comprehensive understanding of AAA pathogenesis and pathophysiology. In general, the aneurysmal aortic wall shows several decisive changes compared with healthy tissue. Accumulation of inflammatory cells, neovascularisation, degradation of collagen, loss of elastic fibres, and apoptosis of smooth muscle cells result in severe remodelling of the extracellular matrix (ECM) of the aortic wall, especially within the tunica media and adventitia,<sup>10</sup> in turn increasing wall stiffness and thinning. Continuous augmentation of mechanical stress and strain finally exceeds the stability of the AAA wall, which ultimately leads to rupture and consequent clinical events.<sup>10,11</sup>

The vessel wall remodelling is especially mediated by various matrix metalloproteinases (MMPs).<sup>11–13</sup> These proteolytic enzymes play an important role in the homeostasis of ECM in healthy tissues, as well as in the formation of aneurysms.<sup>12</sup> Chase and Newby indicated that three main characteristics of MMPs lead to their decisive pathogenic role in vascular diseases: the ability to cleave fibrillar collagen, the ability to degrade the whole spectrum of ECM proteins, and the ability to be activated in a cascade.<sup>13</sup>

Many studies have already focused on the expression of MMPs in AAA. Comparative data regarding expression of these proteases at mRNA and protein level, as well the comparison of their expression and occurrence with the amount of collagen and their degradation products within AAA wall, are still lacking.<sup>14,15</sup> Abdul-Hussien et al. analysed MMPs 1, 8, 9, 13, and 14, and measured degradation of collagen I.<sup>14</sup> The results showed enhanced collagen I turnover in correlation with MMP-8. Besides collagen I, collagen type III is the second fibrillar collagen present in the aortic wall.<sup>16</sup> Bode et al. found increased collagen type III in AAA comparing type III collagen in aortic occlusive disease, AAA, and healthy controls.<sup>15</sup>

So far, most studies have focused on the expression of MMPs at the mRNA level, or have analysed blood of affected patients for surrogate markers. Few studies have measured MMPs at protein level. Furthermore, there is still a lack of information about the relationship between mRNA and protein, particularly with regard to MMPs.

Therefore, in the present study, the main focus was on the main fibrillar collagens of the vessel wall (collagen I and collagen III),<sup>16</sup> their degradation products, and relevant MMPs (at mRNA and protein levels), known to play an important role in AAA: collagenases (MMPs 1 and 8) cleaving intact collagen; gelatinases (MMPs 2 and 9) cleaving denatured collagen; stromelysins (MMPs 3 and 7) with a broad substrate specificity; and macrophage elastase MMP-12. The aim was to identify relevant MMPs in the pathogenesis of AAA and their individual roles in the degradation of collagen I and collagen III.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and tissue specimens

Samples of human aortic tissue were collected from the Department of Vascular and Endovascular Surgery at Klinikum rechts der Isar (Munich, Germany) from patients scheduled for open aortic repair from the anterior sac of the infrarenal abdominal aorta between September 2012 and October 2014. In total, 40 patients with AAAs and nine control samples from kidney donors during kidney transplantations at the Department of General Surgery, Klinikum rechts der Isar, were included. The tissue samples were embedded in paraffin for histological analysis, or frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for polymerase chain reaction (PCR) and protein analysis within 2 h of surgical excision. Patient demographic data, risk factors, comorbidities, and medication are shown in Table 1. The study was performed according to the Guidelines of the World Medical Association Declaration of Helsinki. The local ethics committee approved the study, and written informed consent was given by all patients.

### RNA extraction and quantitative reverse transcription PCR

After mechanical homogenisation of the frozen tissue, RNA was isolated with RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Next, cDNA was synthesised with RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fisher Scientific, Schwerte, Germany). The quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using SYBR green fluorescence dye (peqLab, Erlangen, Germany) and StepOnePlus Real-Time PCR System (Fisher Scientific). All primers used were QuantiTect Primer Assays

**Table 1.** Patient characteristics.

	AAA (n = 40)	Control (n = 5)
Sex		
Female	6 (15)	1 (20)
Male	34 (85)	4 (80) <sup>a</sup>
Median (range) age (y)	67 (40–86)	57 (47–66) <sup>a</sup>
Median (range)		
Mean $\pm$ SD diameter (mm)		
Female	51 $\pm$ 7	
Male	70 $\pm$ 19	
Ruptured aneurysms	9 (23)	
Hypertension	30 (75)	
Smokers	12 (30)	
Hyperlipidaemia	15 (38)	
Hypercholesterolaemia	2 (5)	
Coronary heart disease	6 (15)	
Peripheral arterial disease	4 (10)	
Chronic kidney insufficiency	9 (23)	
Diabetes mellitus	2 (5)	
ASA or clopidogrel	30 (75)	
Beta-blockers	26 (65)	
ACE inhibitors	21 (53)	
Diuretics	18 (45)	
Statins	22 (55)	

*Note.* Data are n (%) unless otherwise indicated. ASA = acetylsalicylic acid; ACE = angiotensin converting enzyme. <sup>a</sup> No significant differences.

(Qiagen). For MMPs, the following primers were used: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP1 and TIMP2.

As it was not possible to separate individual cells located within the AAA wall, an indirect approach was used to associate cells expressing MMPs by analysing common surface markers of these cells: macrophages (macrophage scavenger receptor 1 [MSR-1]); leukocytes (CD45, PTPRC-5); T cells (CD3, CD3D-1); neovessels (vascular cell adhesion molecule 1 [VCAM-1]); and smooth muscle cells (SMCs; MYH11 [myosin heavy chain 11], and collagen I [COL1A-1]). The following specifications were set for quantitative PCR: initial heating at 95 °C for 5 minutes and 45 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 10 s. To avoid primer dimers, selected PCR runs included an additional step at the end of each cycle for 15 s: 75 °C for TIMP-2 and VCAM-1; 76 °C for MMP-7; 77 °C for MMP-2, MMP-9, TIMP-1, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), CD3, CD45, MYH11, and MSR-1; and 81 °C for collagen I. All results were normalised for the expression of GAPDH (Qiagen) and  $\beta$ -actin (Qiagen). The correlation between both housekeeping genes was  $\rho = .917$  ( $p < .001$ ). No significant differences were found between the individual results, independent of the housekeeping gene applied. All experiments were performed in duplicate, and each plate included negative and positive controls.

#### **Protein extraction and enzyme linked immunosorbent assays**

Proteins were isolated from the frozen tissue (anterior sac of the infrarenal abdominal aorta), which was homogenised in fluid nitrogen and isolated using Tissue Extraction Reagent I (Fisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. Total protein content was measured with Pierce BCA Protein Assay Kit (Fischer Scientific). A concentration of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  was then used in all experiments. The enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed in duplicate with the following kits, according to the protocols provided by the manufacturers: MMP-1 (Abcam, Cambridge, UK); MMP-2 (Abcam); MMP-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); MMP-7 (Abcam); MMP-8 (Abcam); MMP-9 (Abcam); MMP-12 (Biozol, Eching, Germany); TIMP-1 (Abcam); TIMP-2 (Abcam); GAPDH (LSBio, Seattle, WA, USA); collagen I (antikoerper-online, Aachen, Germany); collagen III (Abbexa, Cambridge, UK). In addition, to quantify the degradation products of collagen I and collagen III, specific ELISA assays were used, which determine the carboxy-terminal cross-links of the individual collagens: carboxy-terminal collagen cross-links (CTX)-I for degradation of collagen I (antikoerper-online); CTX-III for degradation of collagen III (antikoerper-online).

#### **Gelatin zymography**

For detection of the activity of MMP-2 and MMP-9, gelatine substrate zymograms were generated with ready to use 10% precast gels (Biorad, Munich, Germany). For this purpose, protein extracts from the control aortic and AAA tissue samples were used as for ELISA assays. An equal concentration of

50  $\mu\text{g}$  protein per lane was loaded into each well without preheating and the electrophoresis was run at 125 V for 90 minutes. The gels were then carefully removed and incubated twice in renaturing solution (Biorad) for 30 minutes. The renaturing buffer was replaced by developing solution (Tris HCl 50 mM, pH 7.5, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 200 mM NaCl), which was removed after 5 minutes, and the gels were incubated with fresh developing solution overnight at 37°C/5%  $\text{CO}_2$  in a cell culture incubator. The gels were then treated with a staining solution (40% methanol, 10% acetic acid, 0.5% coomassie blue) for 1–2 hours until they were uniformly dark blue. Afterwards, the zymogram gels were destained with 40% methanol and 10% acetic acid until sharp bands over the blue background were clearly visible. The gels were then digitalised and band intensity was quantified using free software, ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The median of the control tissue samples was set as 1, and results from AAA tissue samples were calculated in comparison.

#### **Histological analysis**

Cross sections of 2  $\mu\text{m}$  were cut from AAA and control aortic formalin fixed, paraffin embedded tissue, mounted onto slides treated with 0.1% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to improve adhesion, and dried for 1 hour at 56 °C. Haematoxylin and eosin and Elastica van Gieson staining were performed to characterise the morphology of the aortic wall. For immunohistochemistry, the sections were deparaffinised, rehydrated, treated in citrate buffer (pH 6.0), and heated in a water bath to retrieve antigens. The following primary antibodies were used: macrophages/monocytes (anti-CD68, clone KP1, dilution 1:2000 [Dako, Hamburg, Germany]); T cells (anti-CD3, dilution 1:400 [Dako]); B cells (anti-CD20, dilution 1:500 [Dako]); SMCs (anti-smooth muscle actin, clone HHF35, dilution 1:200 [Dako]); endothelial cells (CD31, clone JC70A, dilution 1:40 [Dako]); MMP-1 (dilution 1:100 [Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Germany]); MMP-2 (dilution 1:50 [Thermo Fischer Scientific]); MMP-3 (mouse monoclonal Ab, clone Ab-2, dilution 1:100 [LabVision; Thermo Fischer Scientific]); MMP-7 (dilution 1:100 [Thermo Fischer Scientific]); MMP-8 (dilution 1:100 [R&D System, Wiesbaden, Germany]); MMP-9 (dilution 1:100 [Thermo Fischer Scientific]); MMP-12 (dilution 1:400 [R&D System]). After primary antibody incubation, smooth muscle actin was visualised using the APAAP ChemMate Detection Kit (Dako), according to the manufacturer's instructions. The other primary antibodies were detected with a LSAB ChemMate Detection Kit (Dako).

#### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using SPSS version 20 (IBM, Chicago, IL, USA). As the samples were not normally distributed and, owing to their heterogeneity, the Mann–Whitney  $U$  test was used for comparison between the study groups. Spearman's rank correlation coefficient was determined to evaluate statistical dependence between variables. For multiple correction the Benjamini–Hochberg approach was used as it does not affect statistical power.<sup>17</sup>



## RESULTS

### Expression of MMPs at mRNA level and correlation with cellular markers

The expression pattern of relevant MMPs was analysed at mRNA level (Fig. 1). MMP-3 (595 fold;  $p = .001$ ), MMP-9 (12.8 fold;  $p = .001$ ), and MMP-12 (5522 fold;  $p < .001$ ) were significantly augmented in AAA compared with control aorta. Likewise, the mRNA of TIMP-1 (2.7 fold;  $p = .012$ ) was increased in aneurysm tissue. TIMP-1 showed the highest expression, being 2.1 fold higher than GAPDH, followed by MMP-9, TIMP-2, MMP-12, and MMP-2. Furthermore, a significant positive correlation was observed between MMP-2 and TIMP-2 ( $\rho = .378$ ;  $p = .023$ ), MMP-1 and MMP-3 ( $\rho = .381$ ;  $p = .020$ ), and between MMP-9 and MMP-12 ( $\rho = .606$ ;  $p < .001$ ) (Table S1; see Supplementary material).

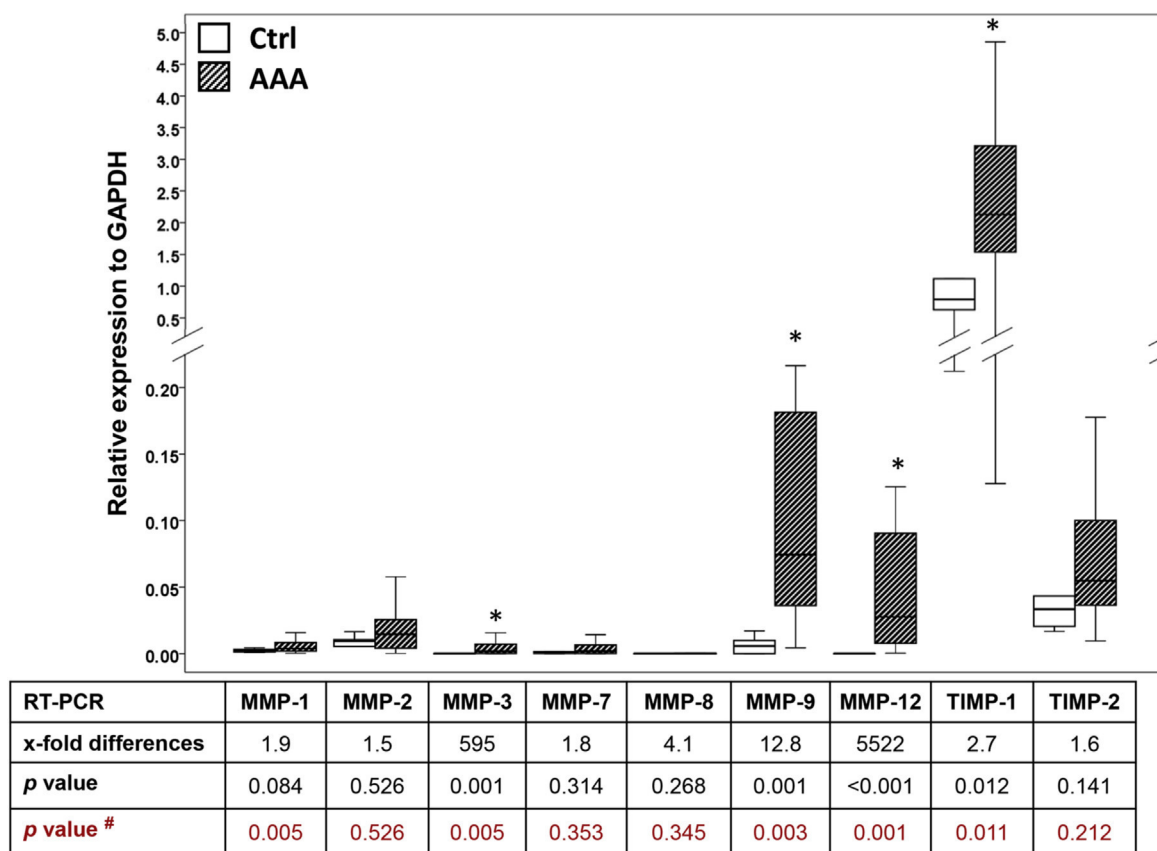
In order to achieve first insights into the cellular localisation of MMPs in AAA the relative expression of various common cellular markers of abundant cells in AAA wall was correlated with the expression of MMPs (Table S2; see Supplementary material). Lymphocytes (CD45) correlated positively with MMP-9 ( $\rho = .532$ ;  $p = .001$ ), as well as with T cells (CD3;  $\rho = .457$ ;  $p = .009$ ). Macrophages (MSR-1) were associated with MMP-3 ( $\rho = .441$ ;  $p = .007$ ), MMP-9 ( $\rho = .387$ ;  $p = .018$ ), and MMP-12 ( $\rho = .415$ ;  $p = .015$ ); neovessels (VCAM-1) correlated with MMP-9 ( $\rho = .342$ ;  $p = .041$ ).

Collagen type I (synthetic phenotype of SMCs) correlated positively with MMP-1 ( $\rho = .381$ ;  $p = .020$ ), MMP-2 ( $\rho = .391$ ;  $p = .018$ ), and MMP-9 ( $\rho = .375$ ;  $p = .027$ ).

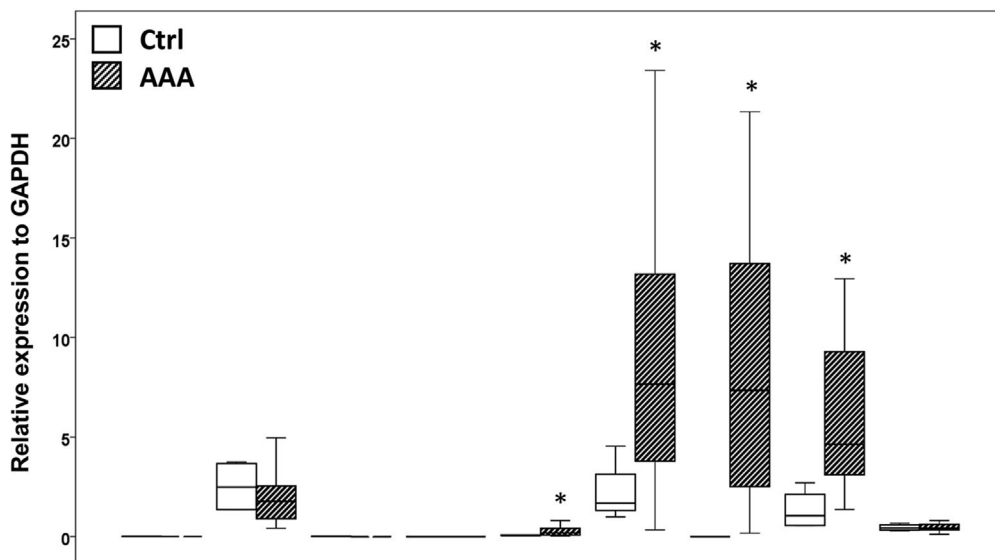
### Expression of MMPs at the protein level

Following analysis of MMP expression at the mRNA level, expression at the protein level was next focused on (Fig. 2). Increased amount of protein in AAA in contrast to control aorta was observed for MMP-9 (4.5 fold;  $p = .004$ ), MMP-8 (2.8 fold;  $p = .006$ ), MMP-12 (7300 fold;  $p < .001$ ), and TIMP-1 (4.4 fold;  $p = .006$ ). MMP-3 and MMP-7 were not detected in aneurysmal or control samples. The absolute protein concentrations in AAA samples are shown in Fig. 3. MMP-9 ( $287 \pm 170$  ng/mg total protein) and MMP-12 ( $310 \pm 235$  ng/mg) were the most abundant MMPs found in AAA, followed by MMP-2 ( $72 \pm 43$  ng/mg). TIMP-1 appeared to be the most frequent inhibitor ( $232 \pm 160$  ng/mg), while TIMP-2 ( $16 \pm 7$  ng/mg) was present at a much lower level. The overall Spearman's rank correlation coefficient between absolute and relative protein level was 0.715–0.905 ( $p < .001$ ), with the exception of TIMP-2 ( $\rho = 0.501$ ;  $p < .001$ ).

In line with the mRNA analysis, MMPs and TIMPs were also correlated to each other at protein level (Table S3; see Supplementary material). The correlation pattern between the individual MMPs and TIMPs at protein level was



**Figure 1.** Relative expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) at the mRNA level in infrarenal abdominal aortic aneurysm (AAA) and healthy control aorta (Ctrl). Expression was normalised to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), x fold differences display increase of median mRNA level in AAA related to control samples;  $p$  values were determined by Mann–Whitney  $U$  test. Note. RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction. \* $p < .05$ . #  $p$  corrected for multiple testing.<sup>17</sup>



ELISA	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9	MMP-12	TIMP-1	TIMP-2
x-fold differences	0.3	0.7	n.d.	n.d.	2.8	4.5	7300+	4.4	0.9
p value	0.413	0.215	-	-	0.006	0.004	<0.001	0.006	0.084
p value #	0.557	0.384	-	-	0.012	0.005	0.001	0.012	0.112

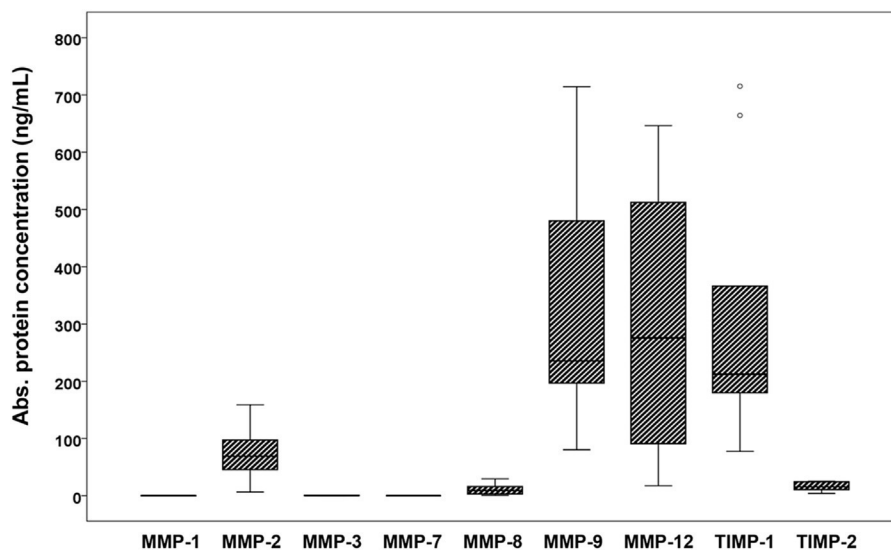
**Figure 2.** Relative expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) at protein level in abdominal aortic aneurysm (AAA) and healthy control aorta (Ctrl) using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expression was normalised to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), x fold differences display increase of median protein level in AAA related to control samples, p values were determined by Mann–Whitney U test. Note. Tremendous differences between AAA and control tissue for MMP-12 rely on the fact that the protein level of MMP-12 in the control aorta was extremely low. n.d. = not detected. \*p < .05. #p corrected for multiple testing.<sup>17</sup>

completely different than at mRNA level (compare Tables S1 and S3; see Supplementary material). The only conformity was found between MMP-9 and MMP-12 (p = .579; p < .001).

Finally, an attempt was made to associate the relative expression of MMPs at mRNA level with their relative values at protein level (RT-qPCR vs. ELISA, both normalised to GAPDH). No significant relationship between any of the analysed MMPs or TIMPs was observed.

**Association between collagen I and III, their degradation products, and MMPs**

In order to assess the effect of MMPs on the integrity of collagen I and collagen III, as well as their degraded products at protein level, their amount was compared in the study groups (Fig. 4). In comparison with control aorta, a significantly reduced amount of collagen I was observed in



**Figure 3.** Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in abdominal aortic aneurysms at protein level, measured by enzyme linked immunosorbent assay. Absolute protein concentration in ng per mg total protein content.

AAA samples ( $p = .002$ ), whereas the amount of collagen III was significantly increased ( $p < .001$ ). Furthermore, type I was the predominant fibrillar collagen in the aortic wall (AAA: 26 fold of collagen III; control: 289 fold).

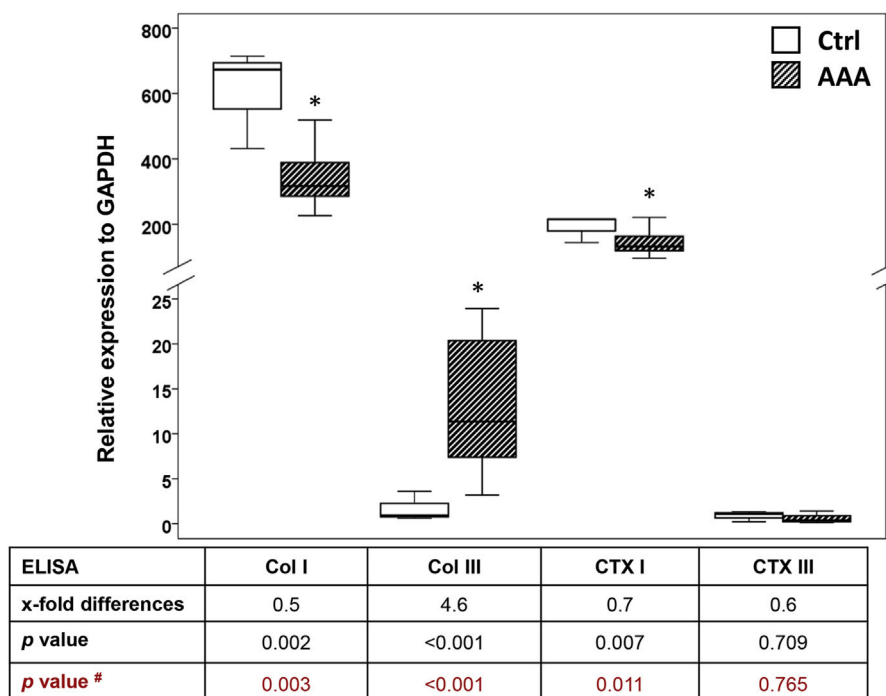
Regarding collagen degradation, the amount of CTX-I and CTX-III was reduced in AAA compared with control aorta; however, only CTX-I achieved statistical significance (30% reduction in AAA;  $p = .007$ ) (Fig. 4). In contrast, considering the ratio of degraded and intact collagen (CTX/collagen), significant differences were observed between the two groups (Fig. 5).

Furthermore, to detect possible associations between MMPs, collagen, and their degradation products, correlation analysis was performed at protein level (Table 2). Collagen I and its degradation product CTX-I was significantly associated with MMPs 1, 8, 9, and 12. Collagen III only correlated with MMP-12.

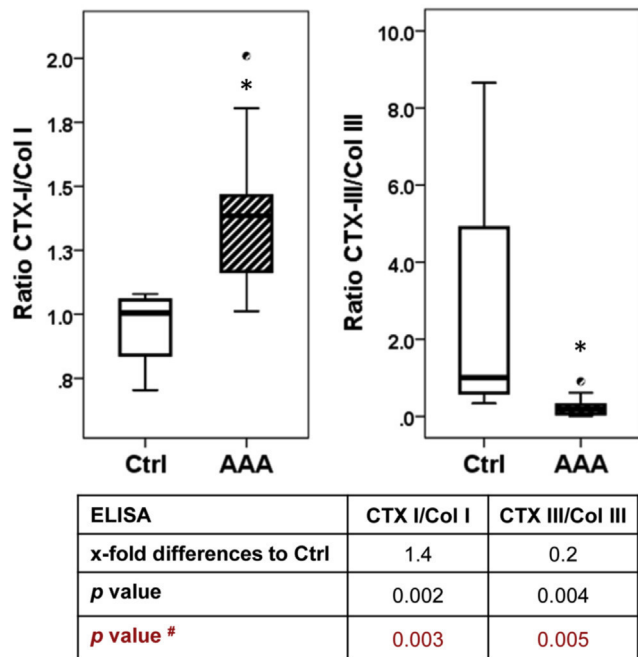
Finally, the results of the ELISA experiments were correlated with the patients' clinical parameters. Significantly positive correlation of degraded collagen type III (CTX-III) was observed with aneurysm diameter ( $\rho = .448$ ;  $p = .005$ ) and the occurrence of rupture ( $\rho = .478$ ;  $p = .003$ ).

#### Immunohistochemical analysis of MMPs within AAA wall

Consecutive staining was performed to associate the expression of MMPs and TIMPs with the individual cells within AAA wall (Fig. S1, Table S4; see Supplementary material). The strongest expression of MMPs was detected in macrophages. In SMCs only MMPs 1, 2, and 9, and partially MMP-3, were detected. Leukocytes were positive for MMP-1, MMP-9, and weak for MMP-12. Endothelial



**Figure 4.** Relative expression of collagen I (Col I) and collagen III (Col III) and their degradation products (carboxy-terminal collagen cross-links [CTX]-I and CTX III) using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expression was normalised to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The x fold differences display increase of median protein level in abdominal aortic aneurysm (AAA) related to controls. Note. \* $p < .05$ . # $p$  corrected for multiple testing.<sup>17</sup>



**Figure 5.** Relative expression of degraded (carboxy-terminal collagen cross-links [CTX]) to intact collagen. The x fold differences display increase of median protein level in abdominal aortic aneurysm (AAA) related to controls (Ctrl). The  $p$  values were determined by Mann–Whitney  $U$  test. Note. ELISA = enzyme linked immunosorbent assay. \* $p < .05$ . # $p$  corrected for multiple testing.<sup>17</sup>

cells of the neovessels located inside the AAA wall were strongly positive for MMP-1 and MMP-9, and weakly positive for MMPs 2, 3, 8, and 12, where the staining was not detected in all cells. TIMP-1 and TIMP-2 were detected in all cells within the AAA wall.

**Table 2.** Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ ) between collagen type I (Col I) and collagen III (Col III), their degradation products (carboxy-terminal collagen cross-links [CTX]), and matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) at protein level.

	Col I	Col III	CTX I	CTX III
MMP-1	.380 <sup>a</sup>	—	.331 <sup>a</sup>	—
MMP-8	.405 <sup>a</sup>	—	.457 <sup>b</sup>	—
MMP-9	.418 <sup>a</sup>	—	.592 <sup>c</sup>	—
MMP-12	.433 <sup>a</sup>	.314 <sup>a</sup>	.511 <sup>b</sup>	—
TIMP-1	.345 <sup>a</sup>	—	.521 <sup>b</sup>	—
TIMP-2	—	.337 <sup>a</sup>	.539 <sup>c</sup>	.447 <sup>b</sup>

Note. Only MMPs with significant correlations are shown.

<sup>a</sup>  $p < .05$ . <sup>b</sup>  $p < .01$ . <sup>c</sup>  $p < .001$ .

### Zymographic analysis of the proteolytic activity of MMP-2 and MMP-9

Finally, to analyse the proteolytic activity of MMP-2 and MMP-9 zymography was performed in control tissue and AAA wall samples (Fig. 6). In accordance with the results obtained from the ELISA assays, the proteolytic activity of MMP-9 was significantly higher in AAA than in healthy aorta (9.1 fold increase in AAA compared with control by median;  $p = .003$ ). In contrast, MMP-2 activity was not statistically significantly different between the study groups (2.6 fold increase in AAA by median;  $p = .167$ ).

### DISCUSSION

The formation of an AAA results in pathophysiological changes in the composition of the ECM due to the excessive activity of various proteolytic enzymes, particularly MMPs. The current study shows the expression pattern of the most relevant MMPs at mRNA and protein levels, their effect on the changes in collagen content, and the extent of its degradation in AAA wall.

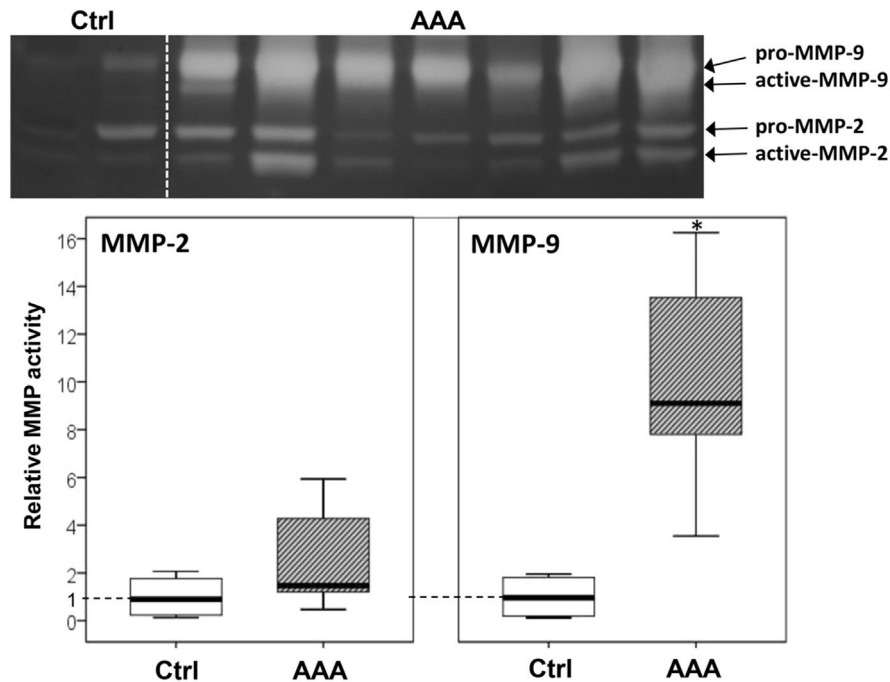
First, decisive differences were found in the expression of MMPs and TIMPs at mRNA versus protein level. No significant relationship was detected between the mRNA expression of particular MMPs or TIMPs and their corresponding proteins. Furthermore, a different expression pattern was observed at mRNA and protein level in AAA samples versus those from healthy controls. While PCR analyses showed elevated levels of MMPs 3, 9, and 12, and TIMP-1 in aneurysmal tissue, protein quantification demonstrated an increase in expression of MMPs 8, 9, and 12, and TIMP-1.<sup>18</sup> The discrepancy between mRNA and protein is not surprising, and confirms the assumption that analysis at protein level should be the primary effort, particularly regarding proteolytic enzymes. It has already been described that protein and mRNA are differently regulated and are often independent of each other.<sup>19</sup> Furthermore, the half life of proteins differs from that of the corresponding mRNA.<sup>20</sup> From all MMPs analysed in this study, only MMP-9 and MMP-12 were increased in AAA at both mRNA and protein level (note: even if they were augmented, no correlation was observed between the individual values). Thus, no reliable conclusion can be drawn about proteolytic enzymes from expression analysis at the mRNA level alone. However, both MMP-9 and

MMP-12 play a critical role in the degradation of ECM.<sup>11–13</sup> Both proteinases are expressed in macrophages and other inflammatory cells, which have already been associated with AAA progression and rupture.<sup>2,21–23</sup> MMP-9 is well known to play a critical role in AAA, which the present results clearly confirm. MMP-12 is a macrophage elastase, degrading elastin fibres. Furthermore, correlation at mRNA and protein levels was observed between MMP-9 and MMP-12, underlining that they both predominantly originate from macrophages or other inflammatory cells.<sup>23</sup> Although it is still not clear whether MMP-12 essentially contributes to aneurysm formation or has a more supportive character,<sup>24,25</sup> the present results approve MMP-12 as a possible important contributor to AAA progression and potential rupture.

Astonishingly, in the current study neither MMP-2 mRNA nor protein was significantly elevated in aneurysmal aortic tissue. Existing literature states that increased MMP-2 is found in AAA, as well as in cultures of SMCs.<sup>2,26,27</sup> The apparent discrepancy can be explained as follows. First, AAA is generally characterised by a loss of SMCs, and MMP-2 is the main proteolytic enzyme synthesised by these cells.<sup>26,28,29</sup> The current data further support this statement, observing a significant correlation between the synthetic phenotype of SMCs and MMP-2. Furthermore, the ELISA data were confirmed by gelatine zymography. Therefore, this finding might be explained by decreased SMC content in AAA wall. However, it must be mentioned that these results could also be just associated with the present study group. Thus, further experiments in another, larger cohort are necessary to confirm or rebut the current data.

Considering physiological inhibitors of the proteolytic activity of the MMPs, expression of TIMP-1 was elevated at mRNA and protein levels and correlated partially with that of MMPs. Both inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, have a broad substrate specificity among the MMPs.<sup>30–32</sup> Previous research has already suggested that TIMP-1 expression is upregulated in parallel with MMP-9 by for example, various inflammatory factors, such as tumour necrosis factor- $\alpha$ .<sup>33</sup> Such a mechanism can be explained as a physiological reaction to prevent exceeding proteolysis. Nevertheless, although TIMP-1 is overexpressed in aneurysms, the MMP-9/TIMP-1 ratio is still significantly increased compared with control aorta, in favour of augmented proteolytic activity.

Increased collagen turnover is one of the central factors in aneurysm growth and rupture.<sup>7,14–16</sup> In this context, the two most important fibrillar collagens in the vessel wall, collagen type I and III, were analysed. Although the findings of Abdul-Hussien et al., of increased carboxy-terminal cross-links of collagen type I in aneurysms,<sup>14</sup> could not be supported, the present results indicate elevated collagen turnover in another way. First, a significant decrease was observed in the content of collagen I in AAA. Furthermore, the ratio of CTX-I/collagen I was significantly increased. These results can be explained as a sign of augmented collagen type I proteolysis in AAA. Interestingly, collagen III showed completely different behaviour with accumulation of collagen III in the aneurysmal wall and decreased degradation. These data suggest differently regulated



**Figure 6.** Gelatine zymography of total protein lysates from healthy aortic control samples (Ctrl) and abdominal aortic aneurysm (AAA) samples. Example of the gelatine gel is shown in the upper part of the figure. Pro- and active forms of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are marked by arrows. The lower part shows densitometric quantification of the band intensities. The results of the control samples (Ctrl) were set as 1 and the intensity of the AAA specimens was adapted accordingly. Statistical comparison was determined by Mann–Whitney *U* test. Note. \**p* < .05.

collagen turnover for these two types of collagen. In fact, MMP-8, which was significantly increased in AAA and correlated positively with intact collagen III and degraded collagen I, has a 20 fold higher affinity and proteolytic activity towards collagen I than collagen III.<sup>18</sup> Furthermore, it has already been shown that collagen III synthesis is increased in AAAs, although the formation of fibrils is impaired, resulting in lower mechanical stability.<sup>13</sup> In addition, expression of collagen III and CTX-I correlated positively with MMP-9 and MMP-12, associating active collagen turnover in AAA with high proteolytic activity.

### Study limitations

It should be mentioned that information about the medical history of the individuals providing the control aortic tissue is lacking, owing to the privacy and confidentiality policy of the kidney donors. Consequently, the aneurysm and control group were only able to be matched with regard to age and sex, but not with regard to, for example, smoking, comorbidities, or medication. These factors might be a source of additional bias. Furthermore, it is of note that in the elderly, even although the donors did not have aneurysms, there is often the presence of mild atherosclerosis containing inflammatory cells, which may show a different expression pattern of MMPs than the healthy aortas of younger individuals. Finally, statins have been described to prevent the growth particularly of small AAAs.<sup>34</sup> Therefore, a subgroup analysis was performed to compare the results obtained from tissue samples from patients with or without statin treatment. No significant differences were observed between these two groups. This fact can be

explained by the low number of study samples and by the fact that the acquired MMP and TIMP values were heterogeneous, which might disguise potential small differences.

### CONCLUSION

In summary, in the present study new aspects of the role of MMPs in the pathophysiology of AAA were revealed. First, no significant relationship in MMP expression was observed between the mRNA and protein levels. Consequently, the role of proteolytic enzymes such as MMPs in AAA cannot be deduced simply by PCR analysis. Investigation at the protein level should be the first choice, if such tissue material is available. Furthermore, MMPs 8, 9, and 12 seem to play a critical role in AAA, as MMP-9 and MMP-12 were overexpressed at both mRNA and protein level and MMP-8 at protein level, and all three MMPs were associated with the degradation and protein turnover of collagen I and collagen III. In addition, MMPs 8, 9, and 12 were associated with inflammatory cells within AAA, especially macrophages. In contrast, MMP-2 seems to be particularly associated with the synthetic phenotype of SMCs and might serve as a potential marker of AAA progression. Finally, collagen I and collagen III showed inverse behaviour in AAA. Whereas collagen I was significantly degraded, the amount of collagen III was significantly increased. Hence, collagen III might play a primary role in aortic wall integrity, counteracting the accelerated dilatation of the diseased aorta as a mechanism of healing processes within the AAA wall. The present results might also explain the beneficial effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on AAA,<sup>35</sup> which have already been described to increase the synthesis of collagen III.<sup>36</sup>

**CONFLICT OF INTEREST**

None.

**FUNDING**

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (RE3146/1-1, AOBJ: 584484).

**APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA**

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2016.12.030>.

**REFERENCES**

- Baumgartner I, Hirsch AT, Abola MT, Cacoub PP, Poldermans D, Steg PG, et al. Cardiovascular risk profile and outcome of patients with abdominal aortic aneurysm in out-patients with atherothrombosis: data from the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *J Vasc Surg* 2008;**48**:808–14.
- Stather PW, Sidloff DA, Rhema IA, Choke E, Bown MJ, Sayers RD. A review of current reporting of abdominal aortic aneurysm mortality and prevalence in the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014;**47**:240–2.
- Khashram M, Williman JA, Hider PN, Jones GT, Roake JA. Systematic review and meta-analysis of factors influencing survival following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016;**51**:203–15.
- Hernesniemi JA, Vänni V, Hakala T. The prevalence of abdominal aortic aneurysm is consistently high among patients with coronary artery disease. *J Vasc Surg* 2015;**62**:232–40. e3.
- Reimerink JJ, van der Laan MJ, Koelemay MJ, Balm R, Legemate DA. Systematic review and meta-analysis of population-based mortality from ruptured abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2013;**100**:1405–13.
- Antoniou GA, Georgiadis GS, Antoniou SA, Neequaye S, Brennan JA, Torella F, et al. Late rupture of abdominal aortic aneurysm after previous endovascular repair: a systematic review and meta-analysis. *J Endovasc Ther* 2015;**22**:734–44.
- Kuivaniemi H, Ryer EJ, Elmore JR, Tromp G. Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2015;**13**:975–87.
- Portelli Tremont JN, Cha A, Dombrovskiy VY, Rahimi SA. Endovascular repair for ruptured abdominal aortic aneurysms has improved outcomes compared to open surgical repair. *Vasc Endovascular Surg* 2016;**50**:147–55.
- Zhang S, Feng J, Li H, Zhang Y, Lu Q, Jing Z. Open surgery (OS) versus endovascular aneurysm repair (EVAR) for hemodynamically stable and unstable ruptured abdominal aortic aneurysm (rAAA). *Heart Vessels* 2016;**31**:1291–302.
- Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005;**365**:1577–89.
- Maegdefessel L, Dalman RL, Tsao PS. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: microRNAs, proteases, genetic associations. *Annu Rev Med* 2014;**65**:49–62.
- Elmore JR, Keister BF, Franklin DP, Youkey JR, Carey DJ. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1998;**12**:221–8.
- Chase AJ, Newby AC. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res* 2003;**40**:329–43.
- Abdul-Hussien H, Soekhoe RG, Weber E, von der Thüsen JH, Kleemann R, Mulder A, et al. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol* 2007;**170**:809–17.
- Bode MK, Soini Y, Melkko J, Satta J, Risteli L, Risteli J. Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis. *J Vasc Surg* 2000;**32**:1201–7.
- Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 2009;**89**:957–89.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 1995;**57**:298–300.
- Wilson WR, Schwalbe EC, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2005;**92**:828–33.
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 2003;**4**:117.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;**82**:373–428.
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002;**110**:625–32.
- Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:1145–51.
- Reeps C, Pelisek J, Seidl S, Schuster T, Zimmermann A, Kuehl A, et al. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology* 2009;**76**:243–52.
- Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000;**105**:1641–9.
- Longo GM, Buda SJ, Fiotta N, Xiong W, Griener T, Shapiro S, et al. MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery* 2005;**137**:457–62.
- Kadoglou NP, Liapis CD. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Med Res Opin* 2004;**20**:419–32.
- Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2000;**32**:575–83.
- Thompson RW, Liao S, Curci JA. Vascular smooth muscle cell apoptosis in abdominal aortic aneurysms. *Coron Artery Dis* 1997;**8**:623–31.
- Goodall S, Porter KE, Bell PR, Thompson MM. Enhanced invasive properties exhibited by smooth muscle cells are associated with elevated production of MMP-2 in patients with aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;**24**:72–80.
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010;**1803**:55–71.
- Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:625–35.
- Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 1997;**122**:264–72.
- Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Ishida M, Ishida T, et al. Induction of Timp1 in smooth muscle cells during

- development of abdominal aortic aneurysms. *Hiroshima J Med Sci* 2013;**62**:63–7.
- 34 Takagi H, Yamamoto H, Iwata K, Goto S, Umemoto T. ALICE (All-Literature Investigation of Cardiovascular Evidence) Group. Effects of statin therapy on abdominal aortic aneurysm growth: a meta-analysis and meta-regression of observational comparative studies. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;**44**:287–92.
- 35 Silverberg D, Younis A, Savion N, Harari G, Yakubovitch D, Sheick Yousif B, et al. Long-term renin-angiotensin blocking therapy in hypertensive patients with normal aorta may attenuate the formation of abdominal aortic aneurysms. *J Am Soc Hypertens* 2014;**8**:571–7.
- 36 Claridge MW, Hobbs SD, Quick CR, Day NE, Bradbury AW, Wilmink AB. ACE inhibitors increase type III collagen synthesis: a potential explanation for reduction in acute vascular events by ACE inhibitors. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;**28**:67–70.



# Cathepsin S is associated with degradation of collagen I in abdominal aortic aneurysm

Veronika Klaus<sup>1</sup>, Fadwa Schmies<sup>1</sup>, Christian Reeps<sup>2</sup>, Matthias Trenner<sup>1</sup>, Sarah Geisbüsch<sup>1</sup>, Fabian Lohoefer<sup>3</sup>, Hans-Henning Eckstein<sup>1</sup>, and Jaroslav Pelisek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Vascular and Endovascular Surgery, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany

<sup>2</sup> University Centre for Vascular Medicine and Department of Vascular Surgery, University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden University of Technology, Dresden, Germany

<sup>3</sup> Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Munich, Germany

**Summary:** *Background:* Cathepsins have been described in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA), their exact role, especially in collagen degradation, is still unclear. The aim of the present study was therefore to analyse relevant cathepsins in human AAA tissue samples in relation to collagen I, III, and their degradation products. *Materials and methods:* Samples from 37 AAA patients obtained from elective open surgical repair and eight healthy non-aneurysmatic aortas from kidney donors were included. Expression of cathepsins B, D, K, L, S, cystatin C, collagen I and III, their degraded products C-Telopeptide of type 1 and 3 collagen (CTX-I, CTX-III), cellular markers for leukocytes (CD45), T cells (CD3), macrophage scavenger receptor-1 (MSR-1), synthetic, and contractile smooth muscle cells (SMCs) (smoothelin: SMTH, collagen I and III, myosin heavy chain: MHC, embryonic smooth muscle myosin heavy chain: SMemb) were determined at messenger RNA (mRNA) level, using SYBRGreen-based quantitative PCR and at protein level using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Results:* Expression of cathepsins B, D, L, and S at mRNA level was significantly elevated in AAA compared to control aorta (1.7-fold,  $p = 0.025$ ; 2.5-fold,  $p = 0.002$ ; 2.6-fold,  $p = 0.034$ ; and 7.0-fold,  $p = 0.003$ ). Expression of cathepsin S correlated significantly with leukocytes and macrophages ( $p = 0.398$ ,  $p = 0.033$  and  $p = 0.422$ ,  $p = 0.020$ ), synthetic SMCs were significantly associated with cathepsins B, D, and L ( $p = 0.522$ ,  $p = 0.003$ ;  $p = 0.431$ ,  $p = 0.015$  and  $p = 0.467$ ,  $p = 0.008$ ). At protein level, cathepsins B and S were elevated in AAA compared to controls (5.4-fold,  $p = 0.001$  and 7.3-fold,  $p < 0.001$ ). Significant correlations were observed between collagen I, its degraded product, and cathepsin S ( $r = -0.350$ ,  $p = 0.034$  and  $r = +0.504$ ,  $p < 0.001$ ). Expression of cathepsin B was associated with SMCs, expression of cathepsin S with inflammatory cells. *Conclusions:* Particularly cathepsin S was associated with the degradation product of collagen I and thus might be involved in the progression of AAA. Furthermore, cathepsin S correlated with inflammatory cells.

**Keywords:** Abdominal aortic aneurysm (AAA), cathepsins, collagen degradation

## Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common pathology in elderly, frequently associated with increased risk of rupture and a consequent high mortality rate [1]. The hallmark of AAA progression is an imbalance between proteolytic degradation and synthesis of the components of extracellular matrix (ECM) within the aortic wall [1–3]. These processes result in progressive weakening and expansion of the aortic diameter. Matrix metalloproteinases (MMPs) have already been implicated as main culprits of AAA [4–6], but they are not the only proteolytic enzymes active in the diseased aorta. Recently, cathepsins, lysosomal proteases of the cysteine, and the aspartic family, have

been described as potential malefactors leading to disruption of vascular ECM [7–10].

In the past, cathepsins were thought to have an intracellular housekeeping function by degrading unwanted endocytosed proteins within lysosomes due to their optimal proteolytic activity in the acidic environment [10, 11]. In the last two decades, however, new physiological and pathophysiological functions of cathepsins have been discovered and assigned a role in the pathogenesis of AAA as well [10, 12]. It has been discovered that some cathepsins are active at physiologic pH level as well, but also that some cells are capable of creating a local acidic microenvironment extracellularly [13]. Thus, cathepsins have gained substantial importance in the current research concerning



the pathogenesis of AAA and have been successfully detected in diseased aortas [4, 8, 9].

The aim of the study was to ascertain any relationship between the degradation of collagen and cathepsin expression in the AAA wall. We focused on cathepsins B, D, K, L, and S, which have already been described as being capable of degrading collagen fibres [14–16]. We assessed their expression at mRNA and protein level to create a comprehensive expression pattern for cathepsins in AAA. Furthermore, by quantification of intact and degraded collagen I and III in correlation to the expression of cathepsins, we tried to ascertain their role in the weakening of the diseased aortic wall.

## Materials and methods

### Patients and tissue specimen

Tissue samples of aortic wall were obtained from 46 patients who underwent an open abdominal aortic repair. AAA specimens were taken from the anterior sac of the aneurysm and stored appropriately until further analysis. All patients gave written informed consent to participate in this study. The local ethics committee (Ethikkommission der Fakultät der Medizin der Technischen Universität München) approved this study. In addition, twelve non-aneurysmatic control aortic samples (Ctrl), kindly provided by the Department of General Surgery during kidney transplantation from living donors, were included. Due to the confidentiality policy for kidney transplantation, no information about the medical history of these donors is known, with the exception of age and sex.

### RNA extraction and RT-qPCR

Gene expression of cathepsin B, D, K, L, S, cystatin C, and GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) was detected by RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction). To identify the individual cell types in the AAA wall, CD45 served as a marker for leukocytes, CD3 for T cells, MSR-1 (macrophage scavenger receptor 1) for macrophages, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) for endothelial cells, myosin heavy chain (MHC) and smoothelin (SMTN) for smooth muscle cells (SMCs) of the contractile phenotype, and collagen I and non-muscle MHC (SMemb) for SMCs of the synthetic phenotype. The RNA was extracted from fresh frozen tissue samples using the RNA tissue extraction Kit (Qiagen, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) was obtained with RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fisher Scientific, Schwerte, Germany). SYBR green fluorescence dye (peqLab, Erlangen, Germany) and QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden, Germany; Cathepsin B (CTSB\_1), Cathepsin D (CTSD\_1), Cathepsin K (CTSK\_1), Cathepsin

L (CTSL\_1), Cathepsin S (CTSS\_1), Cystatin C (CST3\_1), GAPDH (GAPDH\_1), MSR-1, CD3 (CD3D\_1), CD45 (PT-PRC\_5), VCAM-1, MHC (MYH11) and SMTN (SMTN\_1) for contractile phenotype of SMCs, Collagen I (COL1A\_1) and SMemb (MYH10) for synthetic phenotype of SMCs) were used for real-time qPCR (StepOnePlus, Fisher Scientific). All assays were performed in duplicates with negative and positive controls. Results were normalised to GAPDH.

### Protein extraction and ELISA

Proteins were isolated from the frozen tissue using Tissue Extraction Reagent I (Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Total protein content was measured with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific). Then, each sample was diluted to a final concentration of 1 µg/µl with the same extraction buffer. The ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) experiments were performed with the following kits according to the protocols provided by the manufacturers: Cathepsin B, D, and S Human ELISA Kits were purchased from Abcam (Cambridge, UK) as well as the Cystatin C Human ELISA Kit, Human Cross Linked C-Telopeptide Of Type III Collagen (CTXIII) ELISA Kit and Human GAPDH ELISA Kit from LSBio (Seattle, USA), Human Collagen Type I ELISA Kit and C-Telopeptide of Type 1 Collagen (CTXI) ELISA Kit from antikoerper-online (Aachen, Germany), and Human Collagen Type III ELISA Kit from Abbeva (Cambridge, UK). By applying a standard curve with recombinant protein along with each experiment, absolute quantification of the protein content was possible.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using IBM's SPSS software version 20 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Due to sample heterogeneity and differences between the number of individuals in the study groups (46 vs. 12), Mann-Whitney U test was used for comparison. For correlation, only the AAA patients were analysed. One-sample Kolmogorov-Smirnov test was used to distinguish between parametric and non-parametric samples. PCR values were not normally distributed, therefore, the Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ ) was determined, ELISA values followed normal distribution and were compared by Pearson test ( $r$ ).

## Results

### Patients' characteristics

The clinical data of the AAA patients as well as controls are summarised in Table I. The mean aneurysmal diameter was  $52 \pm 8$  mm for females and  $62 \pm 19$  mm for males, the

**Table 1.** Patients' characteristics.

	Abdominal aortic aneurysm	Controls
Number of patients	37	8
Gender female/male (%)	5/32 (13.5%/86.5%)	2/6 (25%/75%)
Age	63.9 ± 10.2 years	46.4 ± 7.3 years
Mean diameter ± SD	Female: 52 ± 8 mm Male: 62 ± 19 mm	
Hypertension	29 (78%)	
Smokers	9 (24%)	
Hyperlipidaemia	18 (49%)	
Coronary heart disease	6 (16%)	
Peripheral arterial disease	4 (11%)	
Chronic kidney insufficiency	7 (19%)	
Diabetes mellitus	2 (5%)	
ASA/Clopidogrel	28 (76%)	
Beta-blocker	24 (65%)	
ACE inhibitors	18 (49%)	
Statins	24 (65%)	
Diuretics	17 (46%)	

AAA patient age was  $63.9 \pm 10.2$  years, for the donors of healthy aortae  $46.4 \pm 7.3$  years. Due to legal restrictions, we had no additional information about the medical history of the donors. The main risk factors for cardiovascular disease in AAA patients were hypertension with 78%, smoking with 24%, and hyperlipidaemia with 49%. Of the study patients, 76% were treated with antiplatelet agents (acetylsalicylic acid or clopidogrel), 65% with beta-blockers, and 65% were on statins.

### Expression of cathepsins at mRNA level and correlation to cells within the AAA wall

The expression of cathepsins and their inhibitor cystatin C at mRNA level is summarised in Figure 1. Cathepsin B, D, L, and S were significantly higher expressed in AAA compared to healthy aorta (1.7-fold,  $p = 0.025$ ; 2.5-fold,  $p = 0.002$ ; 2.6-fold,  $p = 0.034$ , and 7.0-fold,  $p = 0.003$ ). Cathepsin K and cystatin C did not show any significant differences in the expression between the study groups ( $p = 0.256$  and  $p = 0.571$ ).

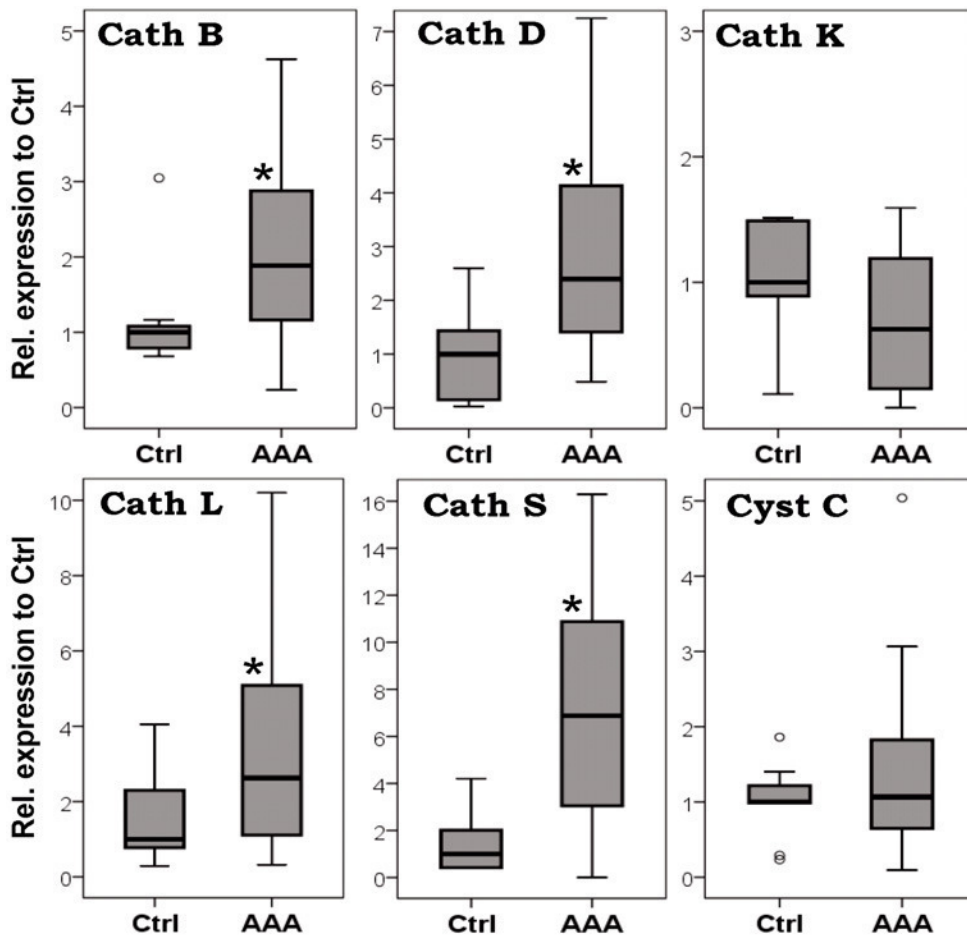
Next, we compared the mRNA expression levels of cathepsins to each other (Figure 2). The highest expression was observed for cystatin C and cathepsin D with 63% and 13% of the expression of GAPDH. The remained cathepsins were at similar levels with less than 10% of GAPDH. The lowest mRNA expression was observed for cathepsin K. Furthermore, to retrace the relationships between

the individual cathepsins, we correlated their expression inter-individually (ESM 1). Interestingly, with the exception of cathepsin K along with cathepsin S, all other cathepsins showed a significant relationship to each other, suggesting a synergistic regulation of their expression at mRNA level.

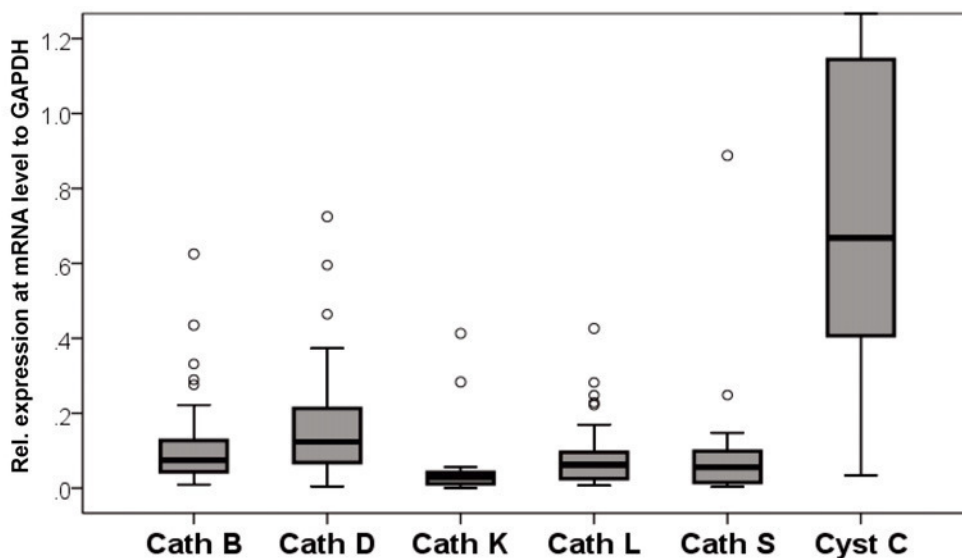
Finally, because we were not able to isolate the individual cells from the AAA wall, we analysed the expression of common cellular markers of the individual cell types to gain indirect information about the source of these lysosomal proteolytic enzymes (ESM 2). Interestingly, the expression of cathepsin S correlated significantly with markers of leukocytes and macrophages ( $\rho = 0.398$ ,  $p = 0.033$  and  $\rho = 0.422$ ,  $p = 0.020$ ). Furthermore, the synthetic phenotype of SMCs was significantly associated with cathepsin B, D, and L ( $\rho = 0.522$ ,  $p < 0.001$ ;  $\rho = 0.431$ ,  $p = 0.015$  and  $\rho = 0.468$ ,  $p = 0.008$ ). The expression of cystatin C correlated with both types of SMCs (synthetic:  $\rho = 0.350$ ,  $p = 0.029$ ; contractile:  $\rho = 0.467$ ,  $p = 0.008$ ).

### Expression of cathepsins at protein level

For the analysis of the expression of cathepsins at protein level, we excluded cathepsin K and L because of their low mRNA expression. An increased amount of protein was observed in AAA compared to healthy aorta for cathepsin B and cathepsin S (Figure 3). Cathepsin D and cystatin C did not show any significant differences between the



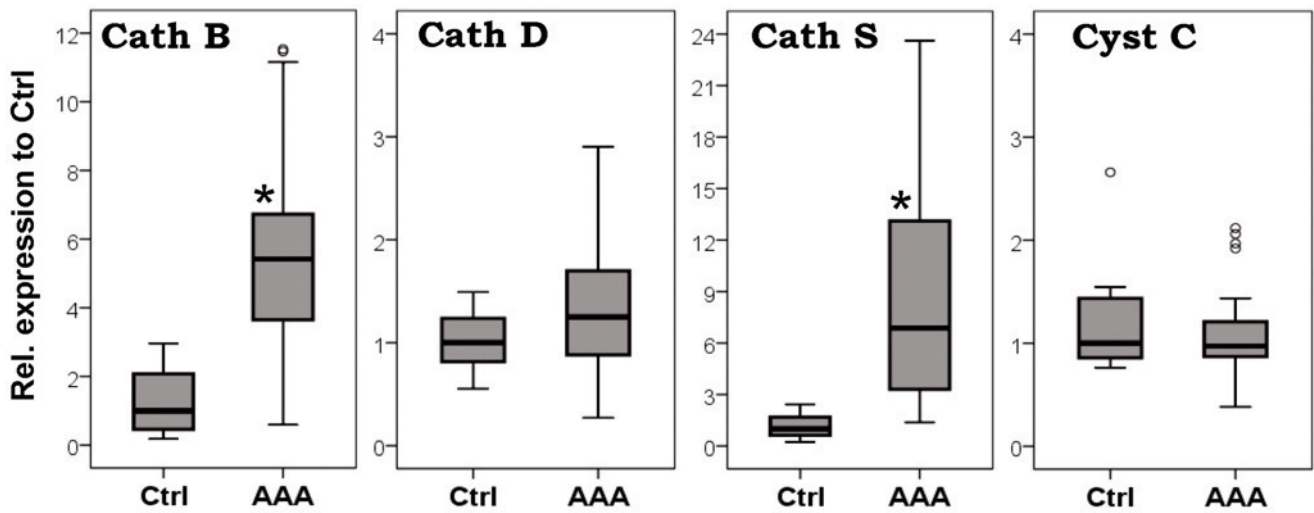
**Figure 1.** mRNA expression of cathepsins and their inhibitor cystatin C in abdominal aortic aneurysm (AAA) compared to non-aneurysmal aorta (Ctrl) using RT-qPCR. Ctrl was set to 1, all results are normalised to GAPDH. \* $p < 0.05$



**Figure 2.** Syndetic comparison of cathepsin expression in abdominal aortic aneurysm (AAA) at mRNA level. GAPDH was set to 1.

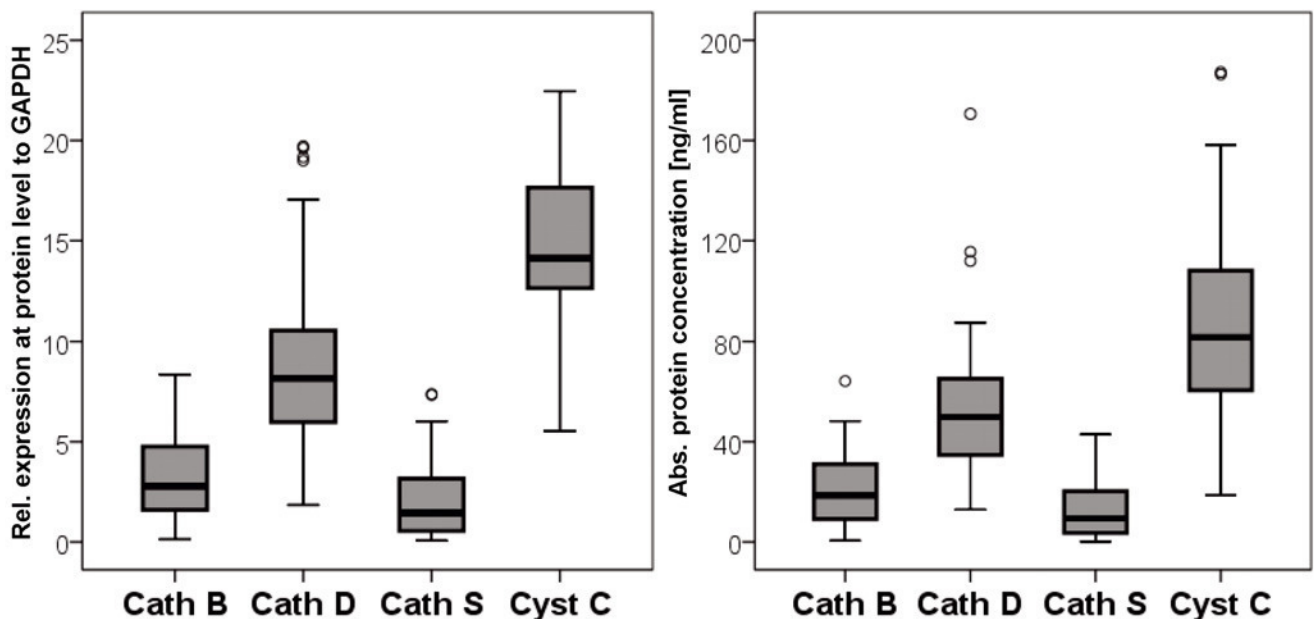
study groups. As additional information, Figure 4 shows the comparison of absolute and relative protein values of cathepsins. Similar to the results of mRNA expression analysis, the highest amount of protein was observed for cystatin C, which was about two to sevenfold higher than for cathepsins. The results of RT-qPCR were confirmed at protein level for cathepsin D as well, which was the most

abundant in AAA. The appearance of cathepsin B and S was at the same level. Furthermore, a significant relationship was observed between the relative and absolute protein measurement with  $\rho$  between .87 and .96 ( $p < 0.001$ ). Finally, in accordance with the analysis of mRNA expression, the protein levels of the individual cathepsins were compared to each other (ESM 3). Significant correlations



ELISA	Cath B	Cath D	Cath S	Cyst C
<b>x-fold differences (abs. values ng/mg total protein)</b>	7.2	1.7	17.6	1.7
<b>P value</b>	<0.001	0.012	<0.001	0.005
<b>x-fold differences (rel. values to GAPDH)</b>	5.4	1.2	7.3	0.9
<b>P value</b>	<0.001	0.210	<0.001	0.560

**Figure 3.** Protein expression of cathepsins and their inhibitor cystatin C in abdominal aortic aneurysm (AAA) compared to non-aneurysmal aorta (Ctrl) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ctrl was set to 1, x-fold differences display increase of protein level in AAA related to controls. \* $p < 0.05$ .



**Figure 4.** Expression of cathepsins and their inhibitor cystatin C in abdominal aortic aneurysm (AAA) at protein level determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Left: expression pattern after normalisation to GAPDH, right: absolute protein concentration in ng/mg of total protein content.

were found between cathepsin B, D, and S, which seem to act in a collective manner ( $r = 0.331$ ,  $p < 0.032$  and  $r = 0.629$ ,  $p < 0.001$ ).

## Cathepsins, collagens, and their degradation products

In order to assess the effect of cathepsins on the integrity of ECM in the AAA wall, the protein content of collagen type I and III as well as their degraded products CTX I and III was determined (Figure 5). A significantly lower amount of collagen I was observed in AAA samples than in controls (twofold,  $p < 0.001$ ). In contrast, collagen III was significantly increased (4.3-fold,  $p < 0.001$ ). Regarding the relative amount of protein, type I was the most abundant collagen in AAA, 26-fold higher than collagen III. Considering the ratio of degraded versus intact collagen, the AAA samples contained significantly more degraded collagen I (1.4-fold,  $p = 0.001$ ), while degraded collagen III was relatively reduced (0.1-fold,  $p = 0.005$ ). Following the measurement of collagen I and III and their degradation products, the associations to cathepsins were evaluated. A significant correlation was found only between collagen I, its degradation product CTX I, and cathepsin S ( $r = -0.350$ ,  $p < 0.034$  and  $r = +0.504$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 6).

## Discussion

Lysosomal cathepsins participate in vascular remodelling and AAA formation by regulating inflammation, apoptosis of SMCs, neovascularisation, and expression of other proteolytic enzymes [4, 7, 8, 10, 12, 17]. The results of our present work emphasise the role of cathepsins in AAA by degradation of collagen I, in particular by cysteine proteases B and S.

The analysis at mRNA level revealed significantly elevated expression of cathepsin B, D, L, and S in AAA compared to non-aneurysmal aorta. These results were in accordance with already published data [10, 18–20]. Cathepsin B is ubiquitously expressed in human tissue and may induce apoptosis of e.g. SMCs [7], causing accelerated progression of AAA. Cathepsins L and S have already been detected in macrophages and dendritic cells in the aneurysmal wall as well as in cerebral aneurysms [10, 21, 22]. In addition, we did not find any significant differences for cystatin C between the study groups. Sukova et al. [10] described expression of cystatin C in SMCs, which are the main cellular component of healthy vascular tissue but also abundant in diseased aorta. This could also explain the high expression of cystatin C both at mRNA and protein level.

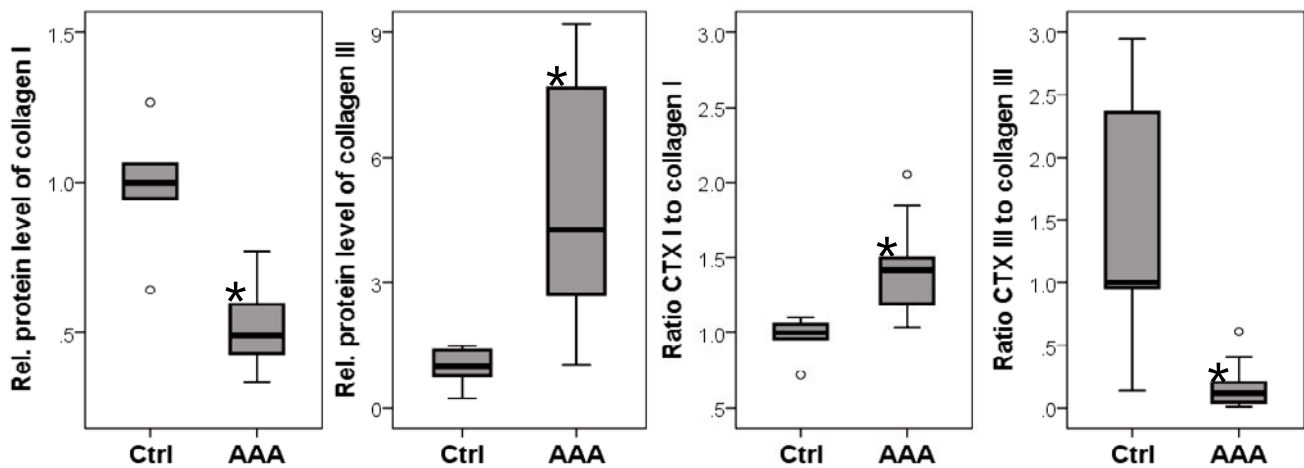
Our current results are partially in accordance with our previous study [8], where the expression of cathepsin K at mRNA level was also higher in non-aneurysmal tissue samples than in AAA. On the other hand, we observed

increased expression of cathepsin B and L in aneurysmal tissue; this was not the case for cathepsin D and S. These discrepancies can have two reasons. First, in the current study, we extracted the RNA from freshly frozen tissue samples, in the previous work from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) aortic specimens. Even though we optimised both methods and they provided reliable data, the quality of RNA from FFPE samples is inevitably markedly lower. However, it must be mentioned that we used specific primer pairs to amplify segments of 80–120 base pairs to overcome the bottleneck of FFPE samples. The second reason for the differences between the two studies is that we included a new study cohort of AAA patients as well as controls. In a smaller group of patients, in our case 37 individuals, there is always a certain heterogeneity present.

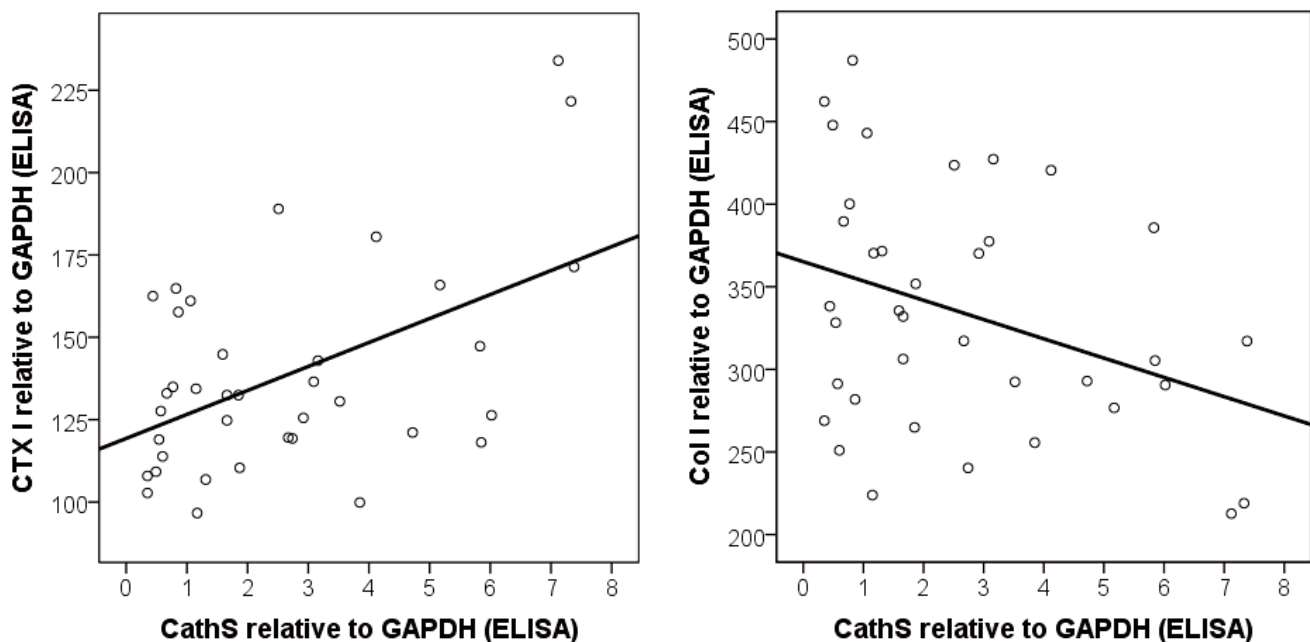
Interestingly, looking at the relationship between the mRNA expression levels of individual cathepsins tested in our study, almost all of them correlated to each other. These results can be explained by the fact that cathepsins are markedly upregulated by common inflammatory factors such as tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , or interleukin 1b [7, 12, 23]. Inflammatory cells are already known to be abundantly present in AAA [1, 2, 6]. Furthermore, reactive oxygen species (ROS) are able to increase the expression of cathepsins as well [24].

Since we were not able to isolate the individual cells from the AAA tissue, we performed an indirect comparison of the expression of cathepsins with known markers of cells within the AAA. Interestingly, expression of cathepsin S was the only cysteine protease significantly associated with inflammatory cells. This is in line with the already published findings, stating that this proteolytic enzyme is expressed in phagocytic cells such as e.g. macrophages and dendritic cells [21, 25]. The expression of most cathepsins seems to be associated with SMCs, cathepsins B, D, L, and cystatin C with the synthetic phenotype of SMCs and cystatin C with the contractile phenotype of SMCs. Cathepsins are known to be very potent proteases, capable of digesting various collagens and elastin [4, 10, 23]. Consequently, they serve SMCs as local tools to degrade the surrounding ECM, enabling them to migrate. Furthermore, the current results confirmed our previous data based on immunohistochemistry, suggesting that SMCs are an important source of cysteine and aspartate proteases [8, 9]. The same conclusion was made for inflammatory cells [7, 12]. Cathepsins have been described to induce apoptosis [7, 26]. These circumstances might further facilitate the progression of AAA towards rupture.

At protein level, cathepsin B and S confirmed the results of the mRNA analysis and demonstrated significant increase in AAA tissue as well. Interestingly, the protein amount of these two cysteine proteases also significantly correlated to each other. The reason for the common increase of both cathepsins is unknown since they are located on different chromosomes. While cathepsin B is located on chromosome 8p23.1, cathepsin S is on 1q21. In addition, it must be mentioned that among cathepsins, particularly



**Figure 5.** Expression of collagen I and III and their degradation products (CTX I and III) in abdominal aortic aneurysm (AAA) and non-aneurysmal control (Ctrl). Protein concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Relative protein amount in AAA related to Ctrl set to 1 and normalised to GAPDH. \*  $p < 0.05$ .



**Figure 6.** Scatter plots showing significant correlations between cathepsin S and the degradation product of collagen I (CTX I) (left) and collagen I (right). Calculated Pearson correlation coefficient is: left:  $r = +0.504$ ,  $p < 0.001$ , right:  $r = -0.350$ ,  $p < 0.034$ .

cysteine protease S behaves uniquely as it is also active at neutral pH [27].

Regarding the lack of significant correlations between mRNA and protein, such results are not surprising. First, the post-transcriptional mechanisms transforming mRNA into protein are regulated differently than the gene activity [28]. Second, the half-life of the proteins may significantly differ from that of the mRNA [29]. Furthermore, the stability of cathepsins strongly depends on their environment. They mostly have a very narrow optimum of pH 4 to 6 and lose their activity at neutral pH [7, 30].

Moreover, our results demonstrated a significant decrease in the content of collagen I in the AAA wall and a significantly elevated ratio of degraded versus intact col-

lagen I, indicating augmented collagen I turnover and proteolysis. In contrast, collagen III seems to accumulate during AAA progression, showing an even lower amount of its degradation product. These results are in line with the work of Labat-Robert et al. [31], who found fibronectin and collagen type III to be predominantly synthesised in AAA and suggest a tissue-repair-process, analogous to wound healing. Several groups have already demonstrated collagenolytic activity of cathepsins in cell culture media of SMCs, ECs, or macrophages [7, 23, 32, 33]. Especially cathepsin S expresses collagenolytic enzyme activity against type I collagen [10], which would confirm the results of our current study. In addition, cathepsins possess very high elastolytic activity in AAA [19] and thus might

also play an important role in the development and progression of the aortic disease beside the well-known matrix metalloproteinases.

## Limitations

We lack any information about medical history of the donors of the healthy control aorta due to the confidentiality policy for kidney transplantation. Thus, we could compare AAA and controls only for age and gender. Furthermore, the non-aneurysmal control group used in our study was not age-matched with the AAA study group. It is extremely difficult to obtain healthy aortic samples, thus we had to work with the tissue material available. These discrepancies can be a source of potential bias. Nevertheless, we analysed our control tissue aortas microscopically and included only those with intact media, minimal thickening of the intima, and without any signs of atherosclerosis.

## Conclusions

In summary, significantly elevated expression of cathepsin B and S was observed in AAA compared to non-aneurysmal aorta. This expression pattern was observed both at mRNA and protein level. Furthermore, cathepsin S was significantly associated with the degradation product of collagen I. Thus, cathepsin S might play a particular role in the diseased aorta since this proteolytic enzyme is also active at neutral pH and is furthermore related to inflammatory cells, which are abundant in AAA and therefore might represent the main source of cathepsin S.

## Acknowledgements

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (RE3146/1-1, AOBJ: 584484).

## Electronic supplementary material

The electronic supplementary material is available with the online version of the article at <http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000701>

### ESM 1. Table.

Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ )<sup>a</sup> for cathepsins and their expression interrelation at mRNA level.

### ESM 2. Table.

Spearman's rank correlation coefficient ( $\rho$ )<sup>a</sup> for cathepsins and cellular markers at mRNA level.

### ESM 3. Table.

Pearson correlation coefficient ( $r$ )<sup>a</sup> between individual cathepsins at protein level (ELISA).

## References

1. Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg.* 2002;39(2):110–230.
2. Guo DC, Papke CL, He R, Milewicz DM. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085:339–52.
3. Maegdefessel L, Dalman RL, Tsao PS. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: microRNAs, proteases, genetic associations. *Annu Rev Med.* 2014;65(1):49–62.
4. Abdul-Hussien H, Soekhoe RG, Weber E, von der Thüsen JH, Kleemann R, Mulder A, et al. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol.* 2007; 170(3):809–17.
5. Chase AJ, Newby AC. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res.* 2003;40(4):329–43.
6. Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR, Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2003;38(3):584–8.
7. Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1359–66.
8. Lohoefer F, Reeps C, Lipp C, Rudelius M, Haertl F, Matevossian E, et al. Quantitative expression and localization of cysteine and aspartic proteases in human abdominal aortic aneurysms. *Exp Mol Med.* 2014;46:e95.
9. Lohoefer F, Reeps C, Lipp C, Rudelius M, Zimmermann A, Ockert S, et al. Histopathological analysis of cellular localization of cathepsins in abdominal aortic aneurysm wall. *Int J Exp Pathol.* 2012;93(4):252–8.
10. Sukhova GK, Shi GP. Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis? *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085:161–9.
11. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 1997;59(1): 63–88.
12. Wang Y, Tang C, Qin Y. Cathepsins: a new culprit behind abdominal aortic aneurysm. *Regen Med Res.* 2013;1(1):5.
13. Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, et al. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med.* 2000;192(6):789–99.
14. Aguda AH, Panwar P, Du X, Nguyen NT, Brayer GD, Bromme D. Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(49),17474–9.
15. Maciewicz RA, Etherington DJ, Kos J, Turk V. Collagenolytic cathepsins of rabbit spleen: a kinetic analysis of collagen degradation and inhibition by chicken cystatin. *Coll Relat Res.* 1987;7(4),295–304.
16. Scott PG, Pearson H. Cathepsin D: specificity of peptide-bond cleavage in type-I collagen and effects on type-III collagen and procollagen. *Eur J Biochem.* 1981;114(1),59–62.
17. Qin Y, Cao X, Yang Y, Guo-Ping Shi. Cysteine protease cathepsins and matrix metalloproteinases in the development of abdominal aortic aneurysms. *Future Cardiol.* 2013;9(1):89–103.
18. Abisi S, Burnand KG, Waltham M, Humphries J, Taylor PR, Smith A. Cysteine protease activity in the wall of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2007;46(6):1260–6.
19. Gacko M, Chyczewski L. Activity and localization of cathepsin B, D and G in aortic aneurysm. *Int Surg.* 1997;82(4):398–402.

20. Qin Y, Yang Y, Liu R, Cao X, Liu O, Liu J, et al. Combined Cathepsin S and hs-CRP predicting inflammation of Abdominal Aortic Aneurysm. *Clin Biochem*. 2013;46(12):1026–9.
21. Zavasnik-Bergant T, Turk B. Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens*. 2006;67(5):349–55.
22. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824(1):68–88.
23. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1998;102(3):576–83.
24. Hua Y, Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(2):195–208.
25. Pierre P, Mellman I. Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. *Curr Opin Immunol*. 1998;10(2):145–53.
26. Ishisaka R, Utsumi T, Kanno T, Arita K, Katunuma N, Akiyama J, et al. Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct Funct*. 1999;24(6):465–70.
27. Shi GP, Munger JS, Meara JP, Rich DH, Chapman HA. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem*. 1992;267(11):7258–62.
28. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003;4(9):117.
29. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):1720–30.
30. Turk B, Bieth JG, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem*. 1995;376(4):225–30.
31. Labat-Robert J, Szendroi M, Godeau G, Robert L. Comparative distribution patterns of type I and III collagens and fibronectin in human arteriosclerotic aorta. *Pathol Biol (Paris)*. 1985;33(4):261–5.
32. Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(9):3849–53.
33. Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 1999;104(9):1191–7.

Submitted: 18.11.2017

Accepted after revision: 31.01.2018

Published online: 06.04.2018

There are no conflicts of interest existing.

#### Correspondence address

Jaroslav Pelisek, PhD  
Department of Vascular and Endovascular Surgery  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München  
Ismaninger Str. 22  
81675 Munich  
Germany

j.pelisek@tum.de