

Aus der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Grabitz

Die Rolle der extrazellulären Matrix bei Aortendissektionen

Dissertation

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

vorgelegt von

Derya Unay - Curatolo

2010

2010

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

gez.:	Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan	
Referentin:	PD Dr. med. B. T. Weis-Müller
Korreferent:	PD Dr. med. Wolfram Müller

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Fragestellung	6
3. Material und Methoden	8
3.1 Patienten und Kontrollpersonen	8
3.2 Patienten und Kontrollpersonen qRT- PCR, IHC und WB	8
3.3 Microarray- Analysen	9
3.4 Quantitative Real- Time– PCR	10
3.5 Immunhistochemie (IHC)	13
3.6 Western- Blotting	20
3.7 Statistische Methoden	29
4. Ergebnisse	30
4.1 Zusammenfassung der Microarray- Ergebnisse	30
4.2 Quantitative Real- Time- PCR	34
4.3 Immunhistochemie und Western- Blot	36
5. Diskussion	75
6. Zusammenfassung	95
7. Anhang	98
7.1 Abkürzungsverzeichnis	98
8. Danksagung	100
9. Lebenslauf	102
10. Publikationen	103
11. Erklärung	104
12. Literaturverzeichnis	105

1. Einleitung

Die Aortendissektion ist eine lebensbedrohliche Erkrankung und entwickelt sich überwiegend ohne Vorankündigung durch spezifische Symptome (1). Sie führt 2- 3 Mal häufiger zu einer Notfallsituation als die Ruptur eines Aortenaneurysmas (2).

Das initiale Ereignis ist einen Riss in der Gefäßinnenwand (Intima und Media) der Aortenwand. Das Blut wühlt sich dann in der Media in Richtung des Blutstroms nach distal und bildet ein zweites Lumen, das „falsche Lumen“ aus. Es kommt dann entweder zur „Selbstheilung“, indem das dissezierende Hämatom durch ein Re-Entry erneuten Anschluss zum „wahren“ Aortenlumen findet oder es perforiert nach außen und der Patient verstirbt im Blutungsschock (3).

Einer weiteren Theorie des Ursprungs der Dissektion zufolge kommt es in der Aortenwand zu einer Blutung aus den Vasa vasorum (4, 5), die mit modernen diagnostischen Methoden, wie z.B. der Computertomografie oder der Magnetresonanztomografie im akuten Stadium der Erkrankung nachgewiesen werden kann. Mit der Zeit entwickelt sich dieses Hämatom zu einer Dissektion der Aortenwand, wobei die Intima und ein Teil der Media sekundär durch den Wanddruck einreißen.

Die heute gebräuchlichste Klassifikation, die Stanford- Klassifikation, unterscheidet die herznahen Aortendissektionen, die ihren Anfang in der Aorta ascendens haben (Stanford A) von den herzfernen Dissektionen (Stanford B), die in der Aorta thorakalis descendens, distal des Abganges der Arteria subclavia beginnen.

Patienten mit einer Stanford A- Dissektion versterben ohne sofortige chirurgische Intervention im Allgemeinen an einer Aortenperforation mit Perikardtamponade oder an einer akuten Aorteninsuffizienz, während Stanford B-Patienten eher durch eine Durchblutungsstörung anhängiger Organ- oder Extremitätenarterien als durch eine Aortenperforation gefährdet sind (6- 9).

Über die grundlegenden Defekte der Aortendissektion ist bisher nur wenig bekannt. Patienten mit angeborener Bindegewebsschwäche, wie z. B. beim Marfan- Syndrom,

das durch einen Defekt von Glycoprotein Fibrillin- 1 hervorgerufen wird oder dem Ehlers- Danlos- Syndrom mit einer Funktionsstörung des Typ III- Prokollagens, sind prädestiniert dafür, in sehr frühen Phasen ihres Lebens eine Aortensdissektion zu entwickeln (10- 17).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle der extrazellulären Matrix bei der Entstehung der Aortendissektion genauer zu untersuchen.

2. Fragestellung

Die vorliegende Promotion ist in das Forschungsprojekt von Frau Priv. Doz. Dr. Barbara Theresia Weis- Müller eingebunden, die sich im Rahmen ihrer Habilitation mit der erworbenen oder angeborenen Prädisposition zur Aortendissektion beschäftigte (18).

Neben epidemiologischen Studien zur Aortendissektion und klinischen human-genetischen Untersuchungen von Aortendissektionspatienten wurden im Rahmen des Forschungsprojektes auch verschiedene Gen- Chip Analysen von frisch dissezierten Aorta ascendens- Proben durchgeführt, die im Rahmen der Notfall-Operation gewonnen wurden. Als Kontrollpräparate diente die gesunde Aorta ascendens von gefäßgesunden Multiorganspendern (1, 19).

Drei unterschiedliche Genexpressionsstudien zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Es erwies sich, dass dem akuten Dissektionsereignis ein schon länger bestehender Strukturdefekt der Aortenwand vorausgegangen sein mußte. Verschiedene Gene, die für Bestandteile der extrazellulären Matrix, für Zelladhäsionsproteine und das Zytoskelett codieren, waren in der dissezierten und auch in den nicht dissezierten Bestandteilen der Aorta ascendens von Patienten mit einer akuten Stanford A- Dissektion, verglichen mit gesunder Kontrollaorta, erniedrigt exprimiert, wohin gegen Gene, die für Inflammation und Proteinbiosynthese codieren, in der dissezierten Aorta verstärkt nachweisbar waren (1, 18, 19).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich jetzt speziell mit der Rolle der extrazellulären Matrix bei der Pathogenese der akuten Aortendissektion.

Dafür wurde die RNA von einigen extrazellulären Matrixproteinen, für die die Gene-Chip- Analyse quantitativ eine signifikant unterschiedliche Genexpression in der akut dissezierten Aortenwand verglichen mit gesunder Kontrollaorta gezeigt hatte, mittels quantitativer Real- Time Polymerasekettenreaktion (qRT- PCR) nachuntersucht. Gleichzeitig wurde versucht, die Proteine selbst einerseits durch immunhistochemische Verfahren direkt darzustellen, andererseits mit Hilfe des

Western- Blots quantitativ zu erfassen. Dabei wurden jeweils Proben von akut dissezierter Aorta ascendens mit Proben von gesunder Kontrollaorta verglichen.

Ziel dieser weitergehenden, vergleichenden Untersuchungen von Dissektionspatienten und Multiorganspendern war es einerseits, die Ergebnisse der Genexpressionsstudie zu validieren, andererseits, bei Bestätigung der Befunde Hinweise auf ein mögliches Strukturdefizit in der extrazellulären Matrix der Aortenwand als mögliche Ursache der akuten Aortendissektion zu finden.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten und Kontrollpersonen der Micro- Arrays

Untersucht wurden 8 Dissektionspatienten, denen jeweils dem Alter und Geschlecht entsprechende Kontrollpersonen zugeordnet wurden.

Davon waren in der Dissektionsgruppe 6 Männer und 2 Frauen. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe betrug 57.5 ± 11.7 Jahre. Der jüngste Patient war 40 Jahre alt und der Älteste 73.

In der Kontrollgruppe waren 3 Männer und 5 Frauen. Das Durchschnittsalter der Multiorganspender betrug $44,0 \pm 11.9$ Jahre. Die jüngste Person war 35 Jahre alt und die Älteste 69 Jahre.

Die methodische Aufarbeitung der Proben und den Ablauf der unterschiedlichen Micro- Array- Analysen entnehmen Sie bitte der Habilitationsschrift von Frau Dr. BT Weis- Müller (18).

3.2 Patienten und Kontrollpersonen der qRT- PCR, Immunhistochemie und Western Blots

Untersucht wurden 11 Dissektionspatienten, denen jeweils dem Alter und Geschlecht entsprechende Kontrollpersonen zugeordnet wurden.

Davon waren in der Dissektionsgruppe 9 Männer und 2 Frauen. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe betrug 53 ± 14 Jahre. Der jüngste Patient war 40 Jahre alt und der Älteste 73 Jahre.

In der Kontrollgruppe waren 8 Männer und 3 Frauen. Das Durchschnittsalter der Multiorganspender betrug $46,8 \pm 7,3$ Jahre. Die jüngste Person war 35 Jahre alt und die Älteste 69 Jahre.

3.2 Microarray- Analysen

Grundlage dieser Arbeit bilden die Ergebnisse von 3 verschiedenen Micro- Array- Analysen, die die Gen- Expression in der frisch dissezierten Aorta ascendens analysierten. Diese Studie wurde im Rahmen der Habilitation von Frau Priv. Doz. Dr. Weis- Müller durchgeführt und kann dort ausführlich nachgelesen werden (18).

Die Aortenproben wurden aus dem Präparat gewonnen, das während des kardiochirurgischen Notfalleingriffes entnommen wurde. Diese Proben wurden mit „gefäßgesunder Aorta ascendens“ von Multiorganspendern verglichen.

Die Studie wurde von der Ethik- Kommission der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf befürwortet. Die Patienten/ Angehörigen waren einverstanden.

Genexpressionsstudie A:

Für diese Untersuchung wurde der breit gefächerte BD AtlasTM Human1.2, I Array (Clontech Laboratories, Inc., US) verwendet, welcher aus 3 unterschiedlichen Nylon- Membranen besteht, auf denen insgesamt 1187 einfache cDNA Spots (1178 bekannte menschliche Gene und 9 „House- keeping- Gene“, zur Normierung der Expressionsergebnisse) aufgebracht sind. Die Arrays wurden mit radioaktiv markierter cDNA aus Patienten- oder Kontrollproben inkubiert.

Genexpressionsstudie B:

Diese zweite Genexpressionsstudie erfolgte mit einem speziell auf das Herz- Kreislauf- System zugeschnittenen Array, dem BD AtlasTM Human Cardiovascular Array (Clontech Laboratories, Inc., US) und diente der Vervollständigung der Genexpressionsstudie A. Auf diese Nylon- Membran wurden insgesamt 1194 cDNA- Spots aufgebracht, und zwar zur Kontrolle 588 doppelt gespottete, für das Kardiovaskular- System spezifische Gene und 9 doppelt gespottete „House- keeping- Gene“. Dieser Array wurde ebenfalls mit radioaktiv markierter cDNA inkubiert.

Genexpressionsstudie C:

Zur Validierung der Ergebnisse der Genexpressionsstudien A und B wurde eine Affymetrix GeneChip® Analyse mit Hilfe des Affymetrix Human Genome U133A GeneChip® angefertigt. Auf diesen kleinen Glasfilter wurden 22.283 humane Genfragmente und EST Sequenzen appliziert und anschließend mit Biotin markierter cRNA inkubiert.

3.3 Quantitative Real- Time- PCR (qRT- PCR)

Zum Nachweis der spezifischen Genexpression auf molekularer Ebene wurde die hochsensible qRT- PCR- Methode angewandt, für die dieselben Aliquots verwendet wurden, die auch für die Array- Methode benutzt wurden.

Die Analyse erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM 7900 Sequence Detection Systems.

Unter Verwendung eines Oligo- (dT) Primers und einer DNase I- Behandlung wurde sichergestellt, dass ausschließlich *messengerRNA* (mRNA) revers transkribiert wurde, wobei ein Hybrid aus RNA und DNA (cDNA) entstand.

Aus 20 ng Gesamt- RNA wurden 4 µl cDNA- Lösung hergestellt, die mit 1,25 µl Primer- Mix (20x Assay- on- Demand TM Gene Expression Assay Mix) und 12,5 µl 2x TaqMan Universal Master Mix, No AmpErase^RUNG bis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl mit ddH₂O ergänzt wurde.

Diese Reaktionslösung wurde anschließend in eine PCR- Platte, 96 Well pipettiert, wobei jede Probe doppelt aufgetragen wurde.

Die spezifische Amplifikation des gewünschten cDNA- Fragmentes erfolgte in einem Thermocycler für 2 Minuten bei 50° C zur Optimierung der AmpErase UNG- Aktivität und anschließend 10 Minuten bei 95° C zur Optimierung der AmpliTaq Gold Enzyme- Aktivität, auf den insgesamt 40 Zyklen folgten. In jedem einzelnen Zyklus erfolgte zunächst eine Denaturierung für 15 Sekunden bei 95° C, bei der der DNA-Doppelstrang durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen unter Hitzeeinwirkung aufgetrennt wurde, und anschließend eine Hybridisierung (Anlagerung, Annealing) für 1 Minute bei 60° C.

Die relative Transkriptmenge wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ - Methode berechnet.

Die Genexpression/ Proteinverteilung wurde nun im Einzelnen mit folgenden

Methoden nachuntersucht: Immunhistochemie
 Western- Blot- Analyse

Basierend auf den Ergebnissen der Micro- Array- und qRT- PCR- Analysen wurden nun folgende Gene weitergehenden Analysen unterzogen:

Extrazelluläre Proteolyse: MMP- 2
 MMP- 9
 MMP- 11
 MMP- 19
 TIMP- 1
 TIMP- 2
 TIMP- 3
 HIF- 1 α

Zelloberflächengene/ Adhäsion: Kollagen- 4
 PKD- 2
 Decorin
 Elastin
 Vinculin
 Tenascin- C

Zellmotilität/ Zytoskelett: Actin
 Gelsolin
 SMMS- 1

Metabolismus: PGM- 1 (Glucosemetabolismus)

Materialien, Lösungen und Puffer:

ABI Prism 7900HT Sequence Detection Systems

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Oligo- (dT) Primers

(Superscript First Strand System, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)

mRNA

High- Capacity cDNA Archive Kit

Primer- Mix

(20x Assay- on- Demand TM Gene Expression Assay Mix)

TaqMan Universal Master Mix, No AmpErase^RUNG

(AB Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA)

RNase inhibitor

RNase- free, sterile- filtered water

96-Well Optical Reaction Plate

(Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Germany)

Optical Adhesive Covers/ Optical caps

Thermocycler

3.4 Immunhistochemie

LSAB- (Labeled Streptavidin Biotin) Methode

Fixierung des Gewebes für histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Einbettung:

Das bereits bei der Entnahme in 5% igem Formalin vorfixierte Gewebe wurde in einem Fixierautomaten über Nacht in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, Xylol) zunächst entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Ausgiessen:

In einer Ausgiessstation (Tissue-Tek Dispensing Console, Vogel) erfolgte sodann die Blockherstellung. Hierzu wurde das paraffingetränkte Gewebe in Blockform mit Paraffin übergossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet und ausgekühlt.

Entparaffinierung und Rehydrierung

Zunächst wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte, die mit einem Mikrotom (Microm HM 400) angefertigt wurden, mit Hilfe eines Wasserbades auf silanisierte Objektträger (HistoBond; Fa. Marienfeld) aufgezogen und bei 100°C für 10 Minuten im Brutschrank getrocknet. Es wurden hierbei beschichtete Objektträger verwendet, um ein späteres Abschwimmen der Präparate zu verhindern.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte dann 15 Minuten in Xylol entparaffiniert, dann in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert, mit Leitungswasser gespült und abschließend um die endogene Peroxidase zu blockieren für 10 Minuten in 3%iger H₂O₂- Lösung belassen und dann erneut mit Leitungswasser abgespült.

Steigerung der Antigenaktivität durch Hitzebehandlung

Einige Antigene werden durch die Fixation in Formalin verändert, sodass es notwendig wird, diese durch Antigenretrieval zu demaskieren und somit die Sensitivität zu steigern.

Hierzu wurde die Schnellkochtopfmethode angewandt. Prinzipiell ist es aber auch möglich, die Präparate zu autoklavieren oder die Wasserbad-, Heißdampf- oder Mikrowellenbehandlung einzusetzen, oder aber eine Proteasevorbehandlung durchzuführen.

Für die Schnellkochtopfmethode wurde zunächst Zitratpuffer aus 21g Zitronensäure, 25ml NaOH ad 10 L Aqua dest. erhitzt. Die Präparate wurden in den heißen Puffer gestellt und der Kochtopf verschlossen. Nach 15 Minuten Hitzebehandlung wurden sie 5 Minuten lang mit kaltem Wasser abgespült.

Immunhistologische Färbung

Der umfangreichste Anteil der histologischen Präparate wurde für die immunhistologische Färbung verwandt. Diese Methode ermöglicht es, bestimmte Zellkomponenten auf der Oberfläche oder im Zytosol und auch Zellorganellen sichtbar zu machen. Verwendet wurde hierbei die Avidin- Biotin- (LSAB-) Methode, die auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin beruht, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden. Der Primärantikörper bindet spezifisch an die gesuchte Zellstruktur, die als Antigen wirkt. Ein speziesspezifischer biotinkonjugierter Sekundärantikörper ist gegen den ersten Antikörper gerichtet. Ein peroxidasegekoppelter Avidin- Biotin- Komplex bindet mit den freien Stellen des Avidinmoleküls an das Biotin des Sekundärantikörpers und damit gegen die Zellkomponente. Mit Hilfe einer Substrat- Chromogenlösung läßt sich diese nun anfärben, wobei an der Stelle des gesuchten Antigens ein Präzipitat entsteht.

Verwendet wurde das UltraTek Reagent.

Je nachdem, ob eine Vorbehandlung mit Hitze notwendig war oder nicht, wurde die Hitzebehandlung im Anschluss an die Entparaffinierung vorgenommen oder ausgelassen. Allen immunhistologisch angefärbten Präparaten gemeinsam war aber die nun folgende Prozedur, und zwar als erstes die Verdünnung des monoklonalen Primärantikörpers mit Verdünnungsmedium (Normal Antibody Diluent) auf die erwünschte Konzentration.

Dann wurden die Präparate zunächst für 15 Minuten mit Avidin (1 Eiweiß ad 100ml Aqua dest.) und anschließend für 15 Minuten mit Biotin (0,02% d- Biotin in TBS- Puffer) inkubiert, um endogenes Avidin und Biotin zu blocken und damit eine unspezifische Bindung der Primärantikörper weitestgehend zu verhindern.

Die Präparate wurden mit Leitungswasser abgespült und in Triton- Lösung geschwenkt. Anschließend wurden alle Objektträger in einer feuchten Kammer

platziert und der Primärantikörper aufpipettiert. Nach 1 Stunde wurden die Präparate erneut mit Leitungswasser abgespült und in Triton- Lösung geschwenkt.

Nun wurde der sekundäre Antikörper und nach erneuter Spülung mit Leitungswasser und Tritonlösung das Tertiärreagent (HRP) aufgetragen und jeweils 15 Minuten belassen. Nachdem die Präparate erneut mit Leitungswasser abgespült und in Triton-Lösung geschwenkt waren, wurde Diaminobenzidin als Chromogen, das zunächst nach Anweisung des Herstellers aufbereitet und mittels eines Faltenfilters gefiltert wurde, aufgetragen. Nach 10 Minuten wurden die Objektträger erneut mit Leitungswasser gespült.

Die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer erfolgte 5 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden die Präparate 6 Minuten in heißem Wasser gebläut und zum Abkühlen mit Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte die Dehydratisierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und zuletzt das Eindecken mit einem xylolhaltigen Medium und Folie im Eindeckautomaten.

Die Auswertung der histologischen und immunhistologischen Präparate erfolgte im Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf unter der Aufsicht von em. Prof. Dr. W. Hort.

Hämalaun- Eosin- (HE-) Färbung

Zur morphologischen Beurteilung der Präparate wurde als Standard- und Übersichtsfärbung die HE- Färbung gewählt.

Hierbei werden die negativ geladenen, basophilen Anteile des Gewebes und der Zelle (z.B. die DNA des Kernchromatins, die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums) durch das im alkalischen Milieu färbende Hämalaun dargestellt, so dass diese blau erscheinen. Das negativ geladene Eosin hingegen färbt die positiv geladenen, azidophilen Bestandteile (z.B. Cytoplasma, Bindegewebsfasern, Muskelgewebe) nuanciert in verschiedenen Rottönen an.

Zunächst wurden die Präparate wie beschrieben entparaffiniert und rehydriert und für 10 Minuten in 3 % iges H_2O_2 gelegt, um die endogene Peroxidase zu blockieren (Konditionierung).

Anschließend wurden sie in einem Färbeautomaten mit Hämalun- Eosin- Lösung angefärbt, wobei das Hämalun 10 Minuten und das Eosin 2 Minuten auf den Präparaten verblieb. Dazwischen und anschließend erfolgte ein Waschschrift mit Leitungswasser.

Nach der Färbung wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und zuletzt in Xylol eingetaucht, bevor sie im Eindeckautomaten eingedeckt wurden.

Elastica- van- Gieson- Färbung

Die Elastica- van- Gieson- Färbung gehört zu den Spezialfärbungen und dient insbesondere zur Darstellung von Bindegewebe und hierbei vor allem von elastischen Fasern, deren Beurteilung bei der Diagnostik grösserer Blutgefäße von großer Bedeutung ist.

Wie bei allen Übersichtsfärbungen arbeitet man bei dieser auch mit nur 2 Farbnuancen. Die Laminae elasticae der Media stellen sich rotbraun und das Zytoplasma gelblich dar. Die einzelnen Wandschichten eines Gefäßes lassen sich dadurch besonders gut voneinander abgrenzen.

Die Elastica- van- Gieson- Färbung gehört zu den Trichromfärbungen, da bei dieser Art der Färbung drei Farbstoffe verwendet werden, wobei zwei dieser Farbstoffe sich in einer Farblösung befinden und simultan angeboten werden.

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung, wie oben beschrieben, erfolgte die Färbung im Färbeautomaten für 10 Minuten mit Elastica- Lösung (Pikrinsäure für das Zytoplasma und Säurefuchsin zur Darstellung des kollagenen Bindegewebes) und 5 Minuten mit Eisenhämatoxilin nach Weigert als Kernfärbung. Nach der Färbung erfolgte die Weiterbehandlung wie bei den o.g. Methoden.

AB- PAS- Färbung

Eine weitere wichtige Färbung zur lichtmikroskopischen Beurteilung der histologischen Schnitte ist die Perjodsäure- Schiff'sche- (PAS-) Färbung. Mit ihr werden Glykogen, Muzine, Stärke und Protein- Kohlenhydrat- Komplexe purpur und die Zellkerne blau dargestellt. Perjodsäure oxidiert selektiv bestimmte funktionelle Gruppen, wie z. B. primäre und sekundäre Amine. Während dieses Oxidationsvorganges werden die Bindungen zwischen zwei Kohlenstoffatomen gelöst und Aldehydgruppen angehängt. Diese Aldehydgruppen werden durch das schwefelige Fuchsin im Schiff'schen Reagent in eine rosa bis purpurrote unlösliche Verbindung, ähnlich dem basischen Fuchsin, überführt.

Nach erfolgter Entparaffinierung und Rehydrierung wurde das Gewebe im Färbeautomaten nacheinander für 15 Minuten mit dem Schiff'schen Reagent inkubiert, für 5 Minuten in 1% iger Perjodsäure oxidiert, danach 1 Minute in Hämalan und 8 Minuten in Alzianblau belassen und abschließend wie bei den übrigen Färbemethoden weiterbehandelt.

Kontrollen

Zur Erzielung verlässlicher Ergebnisse und zur Erleichterung der Interpretation wurden sowohl Positiv- als auch Negativ- Kontrollpräparate mitgeführt.

Das Gewebe richtete sich hierbei nach der Spezifität des Test- Antikörpers und wurde entweder getrennt vom Testschnitt auf einem eigenen Objektträger oder gemeinsam mit dem Testschnitt auf demselben Objektträger mitgefärbt.

Für die Positivkontrolle zeichnete sich das Gewebe durch das Vorhandensein stark reagierender antigener Strukturen, und für die Negativkontrolle durch das Fehlen eben dieser Strukturen aus.

Materialien, Lösungen und Puffer

Microm HM 400 (Microtom)

Sakura Tissue Tek DRS (Färbeautomat)

Coveraid; Fa. Vogel (Eindeckautomat)

TissueTek Dispensing Console; Fa. Vogel

Silanisierte Objektträger (HistoBond; Fa. Marienfeld)

10 mM Natriumzitatpuffer, pH 6,0: 21g Zitronensäure, 25ml NaOH ad 10 Liter dH_2O

Avidin (1 Eiweiß ad 100 ml dH_2O)

0,02 % Biotin (in TBS-Puffer)

0,03 % Triton X-100 (Merck)

Xylol

Ethanol (100 %, 96 %, 70% 50%)

ddH_2O

H_2O_2 (Merck)

Hämatoxilin

10x PBS, pH 7,4: 0,58 M Dinatriumhydrogenphosphat

0,17 M Natriumhydrogenphosphat

0,68 M NaCl

ddH_2O

Tris-Puffer, pH 7,6: 6,1g Tris (Merck) ad 50 ml dH_2O

41 ml HCl 1N ad 1000ml dH_2O

TBS-Puffer: 18g NaCl (Merck)

200 ml Tris-Puffer ad 2000 ml dH_2O

UltraTek Reagent (Ready-to-Use) Fa. ScyTek:

- Anti-Polyvalent ABN999 (mouse, rabbit, rat, guinea pig), biotinylierter Sekundär-Antikörper
- Horseradish Peroxidase ABL999 (Tertiärreagent, labeled streptavidin)
- Bulk DAB- Reagent ACK 999 (30 % H_2O_2 , DAB, PBS, ddH_2O)
- Normal Antibody Diluent ADT999(1000ml)

Faltenfilter 595 $\frac{1}{2}$, 150mm, Schleicher&Schuell

Antikörper:

MMP- 9	(Matrix Metalloproteinase 9 mouse monoclonal antibody NCL-MMP- 9, Clone 2C3, IgG1, kappa; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, United Kingdom)
MMP- 11	(MMP- 11 (Ab-2) Mouse Monoclonal Antibody, Clone SL3- 05, IgG 1/k; Oncogene Research Products; San Diego, CA)
MMP- 19	(MMP- 19 Epitope specific rabbit antibody; Spring Bioscience ams Biotechnology, Abingdon, Oxon)
TIMP- 2	(Rabbit Anti-Human TIMP- 2 Polyclonal Antibody; Chemicon International, Inc.)
TIMP- 3	(Mouse Anti- Human-TIMP- 3 Monoclonal Antibody, Clone 136-13H4, IgG1/k, Chemicon International, Inc.)
Kollagen- IV	(Monoclonal Mouse Anti-Human Collagen- IV, Clone CIV 22, IgG1/kappa; DakoCytomation Denmark A/S)
Decorin	(Decorin Ab- 1 Polyclonal Goat igG, Oncogene Research Products, San Diego, CA)
Vinculin	(Vinculin mouse monoclonal antibody NCL- VINC, Clone V284, IgG1; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, United Kingdom)
Tenascin- C	(Monoclonal antibody to TENASCIN- C, Clone DB7, IgG2a; Biohit Diagnostics PLC, Helsinki, Finland)
Gelsolin	(Monoclonal Mouse Aszites Fluid Anti- Gelsolin, Clone GS-2C4, Sigma-Aldrich, Inc.; Saint Louis, Missouri, USA)
SMMS- 1	(Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Myosin Heavy Chain SMMS- 1; Clone SMMS- 1, IgG 1/k; Dako Cytomation, Inc., CA/ USA)
PGM- 1	(Phosphoglucomutase- 1; Mouse Monoclonal Antibody; Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc- 100411)

3.5 Western-Blotting

Vorbereitung der Antigenprobe

Je 2- 3 g der gefrorenen Präparate wurde in ein 10 ml Röhrchen überführt, mit Aufschlusspuffer (Lysis- Puffer) versetzt und mittels eines Pistills homogenisiert. Ungelöste Bestandteile wurden durch 10minutiges Zentrifugieren bei 10.000 g sedimentiert. Die Überstände wurden abgezogen.

Proteinbestimmung nach Bradford

Zunächst wurde der Proteingehalt aller Proben durch Messung der UV- Absorption bestimmt (Colorimetrische Methode nach Bradford).

Durch 4 verschiedenen Verdünnungen von BSA (Protein- Standard) in Lysis- Puffer im Konzentrationsbereich von 0 bis 1,4 mg/ ml und Zugabe von Bradford- Reagenz mit anschließender Messung der Absorption wurde eine Eichkurve erstellt.

Die zu bestimmenden Proteinproben wurden in einem dem BSA- Standard entsprechenden Volumen ebenfalls in Bradford- Reagenz gelöst und dann gevortext.

Nach 45 Minuten Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm im Spektral- photometer (Eppendorf) gemessen und anhand der Eichkurve die Proteinkonzentration bestimmt.

Trennung der Proben durch Gelelektrophorese

Die Proben wurden zur Denaturierung mit Auftragspuffer und d_4H_2O versetzt und 5 Minuten bei 100°C inkubiert.

Das in diesem Puffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, welches unter Hitzeeinwirkung durch hydrophobe Wechselwirkungen der Kohlenstoffkette mit dem Aminosäurerest des Proteins nichtkovalente Bindungen im Protein auflöst und zusammen mit β - Mercaptoethanol, einem Reduktionsmittel, das kovalente Disulfidbrücken spaltet, die Proteinketten von ihrer ursprünglichen in eine langgestreckte Struktur überführt. Durch die nach aussen gerichteten negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS erhalten die Komplexe eine ihrer Masse entsprechende, konstante negative Ladung und sind aufgrund dieser Eigenschaft in der Gelelektrophorese trennbar.

Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Proben erneut zentrifugiert, um die festen Bestandteile abzutrennen. 5- 15 µl des flüssigen Überstandes wurde dann auf die Gele aufgetragen.

Die Auftrennung der Proteinprobe erfolgte mittels eines diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgels nach Laemmli (SDS- PAGE) mit Gelen der Grösse 12x 8x 0,1 cm. Je nach Molekülmasse des zu untersuchenden Antigens lag der Gehalt an Acrylamid zwischen 4 % und 12 %. Die Proteine durchliefen zunächst ein Sammelgel und dann das eigentliche Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich sowohl im pH- Wert als auch in der Acrylamidkonzentration. Folglich wurden die zu trennenden Proteine im Sammelgel aufgrund des schwach sauren pH- Wertes (pH 6,8) und der Wechselwirkung mit Pufferionen (Chlorid- und Glycinationen) in einer schmalen Bande konzentriert, bevor sie das engporige, leicht alkalische Trenngel (pH 8,8) passierten und entsprechend ihrer Masse aufgetrennt wurden.

Das Gel selbst ist ein Polymer aus Acrylamid und Bisacrylamid, welche lange Kettenmoleküle bilden und quervernetzt werden. Damit es zu dieser Vernetzung kommt, wurde der Reaktion der Radikalspender Ammoniumpersulfat (APS) und den Katalysator TEMED zugesetzt.

Herstellung eines 12 %- igen Polyacrylamidgels

Glasplatten, Kämmen und Spacer (1 mm) wurden mit 70 % Ethanol und fusselfreiem Papier gereinigt und zusammengebaut.

Danach wurde die Lösung für das Trenngel angesetzt, kurz vor dem Gießen APS und TEMED zugegeben und anschließend das Trenngel zügig gegossen, wobei ein Spalt durch einen Taschenformer freigehalten wurde.

Die Polymerisationsreaktion dauerte ca. 1 h. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Taschenformer entfernt, gründlich mit ddH_2O nachgespült und der Spalt mit 3 MM Whatmann Papier trocken gesaugt.

Das Sammelgel wurde ebenfalls zunächst ohne TEMED und APS angesetzt. Wiederum erfolgt die Zugabe der Radikalbildner/ -beschleuniger erst kurz vor dem Gießen. Nach dem Pipettieren wurde ein 10- kammeriger Taschenformer luftblasenfrei eingesetzt. Das Gel polymerisierte über Nacht.

Als nächstes wurden die Elektrophoresekammern zusammengebaut und 1x Elektrophorese- Laufpuffer eingefüllt.

Nachdem die Puffertanks an Kathode und Anode befüllt waren, wurden die Gele eingesetzt und auch mit Puffer beschichtet.

Für den Nachweis von spezifischen Antigenen in den Zellysaten wurden 20- 60 µg Proteine eingesetzt und mit einem entsprechenden Größenmarker (Prestained Protein Ladder 10- 160 kD, Fermentas) in die Geltaschen pipettiert.

Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte der Gellauf zunächst bei 100 V und anschliessend bei 200 V und 35 mA. Beendet wurde er kurz bevor die Laufront (Bromphenolblau) das Gel verließ.

Nach dem Gellauf wurden die Abstandshalter entfernt und die Glasplatten auseinandergenommen.

Zur Coomassiefärbung wurde das Gel direkt in die Färbelösung gelegt und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschüttelt. Anschliessend wurde das Gel bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung geschüttelt, wobei die Entfärbelösung mehrmals gewechselt wurde.

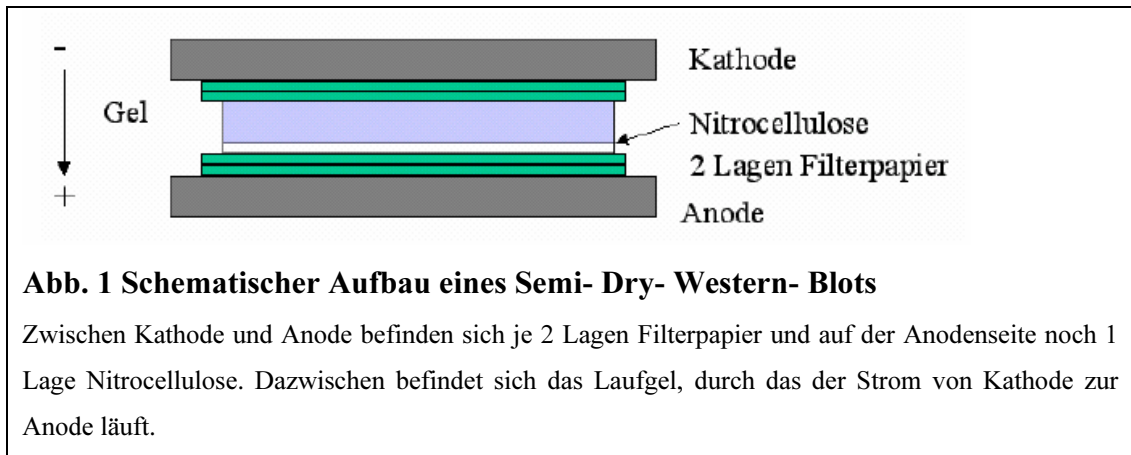
Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran

Der Transfer der Proteine auf eine Membran erfolgte nach dem Semi- Dry- Verfahren, bei dem die Proteine aus dem SDS- Gel mittels eines elektrischen Feldes auf die Membran transferiert werden.

Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern innerhalb dieses elektrischen Feldes zur Anode. Vor der Anode befindet sich die Nitrozellulosemembran, so daß die Proteine aus dem Gel auf der Kathodenseite auf die Membran wandern. Bei Proteinen <50 kD beträgt die Transferzeit weniger als eine Stunde. Ausserdem können mehrere Gele gleichzeitig "geblottet" werden.

Die Verwendung des Semidry- Blot- Systems hat den Vorteil, dass der Transfer gleichmässig über das ganze Gel erfolgt und nur geringe Mengen an Blotpuffer benötigt werden.

Nachteilig ist hier die hohe Stromdichte. Bei ungenügender Kühlung kommt es zur Schädigung der Membran und der Proteine durch Überhitzung.



Für den Blottaufbau wurden 2 Lagen Whatman 3 MM- Papier auf Gelgröße zurechtgeschnitten, mit Transfer- Puffer getränkt und luftblasenfrei auf die Anodenplatte aufgelegt (s. Abb. 1). Ein ebenfalls zurechtgeschnittener und mit Transfer- Puffer getränkter Nitrocellulose- Filter, der auf Grund seiner hohen Bindekapazität für Proteine und optimierten chemischen Stabilität als Methode der Wahl eingesetzt wurde, wurde auf die Whatman 3 MM- Papiere aufgelegt. Dann wurde das Gel - ebenfalls luftblasenfrei - auf den Nitrocellulose- Filter gelegt und als letztes erneut 2 Lagen zurechtgeschnittenes und getränktes Whatman 3MM- Papier aufgelegt. Der überschüssige Blotpuffer wurde aufgewischt, sodass der Strom nur durch das Gel fließen konnte.

Anschließend wurde die Abdeckhaube vorsichtig und parallel zum Korpus auf die Steckkontakte gedrückt. Als konstante Stromstärke wurden 20 mA eingestellt, wobei der Strom von der Kathode zur Anode floss.

Nach dem 1- stündigen Transfer wurde die Membran mit einer Pinzette entnommen und im Brutschrank gut getrocknet.

Um die Effizienz des Blots zu überprüfen wurde die Membran anschliessend 10 Minuten in Ponceau- S- Lösung gelegt. Nach mehrmaligem Waschen mit ddH_2O hoben sich die Banden vom Hintergrund ab, wodurch quantitative Aussagen über den Blot gemacht werden konnten.

Absättigen der unspezifischen Proteinbindestellen auf der Membran

Um eine unspezifische Adsorption der Erstantikörper an die Nitrocellulose-Membran, die eine extrem hohe Bindekapazität für Proteine besitzt, zu verhindern, musste die Membran über Nacht bei 4°C in Magermilchpulver- Puffer (Blotto: TBST- Puffer mit 5% Magermilchpulver), das keine Bindung mit Antikörpern eingeht, inkubiert und somit abgesättigt werden.

Immunreaktion

Alle Inkubations- und Waschschrte wurden in Falcon- Röhrchen mit einem Rollinkubator durchgeführt. Es wurden polyklonalen Antikörper verwendet, da das Antigen während der Gelelektrophorese meist durch β - Mercaptoethanol und Dodecylsulfat denaturiert wird, und somit monoklonale Antikörper, die gegen die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins gerichtet sind, schlechter oder gar nicht binden würden.

Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde der Antikörper in 2- 3 ml Blockierungslösung verdünnt und für 1 h bei 37°C im Rollinkubator inkubiert. Zum Entfernen von ungebundenem Antikörper wurde die Membran danach 3 Mal mit je 30 ml TBST- Puffer 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Für die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde der sekundäre Antikörper in Blockierungslösung verdünnt und dann 2 h bei 20°C im Rollinkubator inkubiert und anschließend erneut 3 Mal mit je 30 ml TBST- Puffer 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Als Konjugate wurden Meerrettichperoxidase- Konjugate verwendet. Da der sekundäre Antikörper durch eine Kopplung mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) eine Farbreaktion katalysieren kann, bei der sich wasserunlösliche Pigmente direkt auf der Membran absetzen, wurde so die gesuchte Proteinbande sichtbar gemacht.

Dehybridisierung – „Stripping“

Um eine bereits hybridisierte Membran für einen zweiten Proteinnachweis verwenden zu können, mussten die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper der vorausgegangenen Immundetektion entfernt werden.

Für diese Dehybridisierung, die auch als „Stripping“ bezeichnet wird, wurde die Membran 30 Minuten bei 50°C in Stripping- Lösung im Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurde 2x mit TBS- T gewaschen und die Membran konnte dann für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden.

Nachweisreaktion der gebundenen Antikörper

Das Visualisieren der Immunreaktion erfolgte zur Steigerung der Sensitivität durch das Chemilumineszenzverfahren, einer hochempfindlichen, nicht- radioaktiven Nachweismethode.

Hierzu wurde der Blot in einen Glasbehälter gelegt, die Detektionslösungen A und B 40: 1 zusammengemischt und luftblasenfrei auf die mit der Proteinseite nach oben liegende Membran pipettiert. Nach der Inkubationszeit von 5 Minuten wurde der Filter von überschüssiger Flüssigkeit befreit und anschließend in eine Folie und dann in eine Filmkassette gelegt.

Die Meerettich- Peroxidase katalysiert die Oxidation des Farbstoffes Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und bringt somit das Luminol in einen angeregten Zustand. Durch Lichtemission erreicht das Luminol wieder ein niedrigeres Energieniveau und damit seinen Grundzustand, was zu einer Schwärzung auf dem Röntgenfilm führte.

Die Expositionszeit mit dem Kodak- Biomax- Film betrug je nach Antikörper zwischen 5 Sekunden und 20 Minuten.

Materialien, Lösungen und Puffer

Lysis– Puffer:

1 % SDS
1 mM Natrium ortho-vanadate
10 mM Tris/ HCl, pH 7,4

Auftragspuffer:

0,125 M Tris/ HCl
4 % SDS
20 % Glycerol
10 % β - Mercaptoethanol
 ddH_2O
Bromphenol blue

Laufgel:

30:1 % w/v acrylamide: bisacrylamide
1 M Tris/ HCl pH 8,8
20 % SDS
 ddH_2O
10 % APS- Stammlösung
TEMED

Sammelgel :

30:1 % w/v acrylamide: bisacrylamide
1 M Tris/ HCl, pH 6,8
20 % SDS
 ddH_2O
10 % APS- Stammlösung
TEMED

Laufpuffer (Elektrodenpuffer):

250 mM Tris/ HCl, pH 8,3
1 % SDS
1,92 M Glycin, ddH_2O

Coomassie Blue Staining:

Coomassie Blue Staining 2.5 g/l
99,8 % Ethanol
100 % Essigsäure, ddH_2O

Entfärbelösung:	99,8 % Ethanol 100 % Essigsäure ddH ₂ O
Transfer – Puffer:	25 mM Tris/ HCl 192 mM Glycin 10 % MeOH
Ponceau- S – Lösung:	0,2 % Ponceau- S 2 % Trichloressigsäure
Entfärbelösung:	ddH ₂ O
Blotting Puffer (Blotto):	5 % Trockenmilchpulver 100 mM NaCl 10 mM Tris/ HCl, pH 7,5 0,1 % Tween-20
TBS:	20 mM Tris/ HCl, pH 7,4 150 mM NaCl ddH ₂ O
TBST – Puffer:	20 mM Tris/ HCl, pH 7,4 150 mM NaCl ddH ₂ O 0,1 % Tween- 20
Detektionslösung:	ECL Plus (Amersham BioSciences)
Stripping – Lösung:	20 % SDS 1 M Tris/ HCl, pH 6,8 14,4 M β- Mercaptoethanol

Antikörper

MMP- 2	(MMP- 2 (Ab- 6) mouse monoclonal IgG1; Oncogene Research Products, San Diego; CA)
MMP- 11	(MMP- 11 (Ab- 2) mouse monoclonal antibody, Clone SL3- 05, IgG1/k; Oncogene Research Products, San Diego, CA)
TIMP- 1	(Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1, mouse monoclonal antibody NCL- TIMP1- 485, Clone 6F6a, IgM/k; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK)
TIMP- 2	(Rabbit Anti-Human TIMP- 2 Polyclonal Antibody; Chemicon International, Inc.)
TIMP- 3	(Mouse Anti- Human- TIMP- 3 Monoclonal Antibody, Clone 136- 13H4, IgG1/k, Chemicon International, Inc.)
HIF- 1 α	(HIF- 1 alpha Monoclonal Antibody, Clone H1alpha67, IgG2b; Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO)
Kollagen- IV	(Polyclonal Antibody to Collagen Type IV; Acris Antibodies GmbH, Germany)
PKD- 2	(PolyFast Rabbit anti-Polycystin- 2 and Inhibitor Peptide; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA)
Elastin	(Elastin (C21): sc- 17581 goat polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology; Inc., Heidelberg, Germany)
Vinculin	(Vinculin mouse monoclonal antibody NCL- VINC, Clone V284, IgG1; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, United Kingdom)
Tenascin- C	(Monoclonal Antibody to TENASCIN- C, Clone EB2, IgG1; Biohit Diagnostics PLC, Helsinki, Finland)
Actin	(Mouse Monoclonal Anti- α - Actin, IgM, Clone BM- 75.2; Sigma- Aldrich, Inc.; Saint Louis, Missouri, USA)
Gelsolin	(Monoclonal Mouse Aszites Fluid Anti-Gelsolin, Clone GS- 2C4, Sigma- Aldrich, Inc.; Saint Louis, Missouri, USA)
SMMS- 1	(Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Myosin Heavy Chain SMMS- 1; Clone SMMS- 1, IgG 1/k; DakoCytomation, Inc., CA/ USA)

3.6 Statistische Methoden

Student's t- Test

Für jedes Gen der Kontroll- und Dissektionsproben wurde ein Mittelwert bestimmt. Da schwache, dem Hintergrund ähnelnde Signale auf dem Array immer zu einem störenden Signal-Rausch-Abstand führen, sind sie schlecht reproduzierbar. Die Ratios unterschiedlicher Genexpressionen, die auf solchen Werten beruhen, können sehr hoch sein, obwohl es eigentlich keinen signifikanten Unterschied der Expressionslevel der entsprechenden Gene gibt. Deshalb wurden für die Analyse sowohl in der Dissektions- als auch in der Kontrollgruppe nur Gene mit einem Hauptexpressionswert von mindestens 70% der Hauptexpression aller Gene, die auf dem Array abgebildet waren, verwendet. Gene, deren gemittelte Ratio von disseziierter und Kontroll- Aorta kleiner als 0.6 oder größer als 1.8 im Human und Cardiovascular- Array war, wurden als „unterschiedlich exprimiert“ betrachtet. Für die Affymetrix- Daten wurde ebenfalls ein Grenzwert von 70% gesetzt. Da die Affymetrix- Plattform präziser und sensitiver in der Erkennung von Signalen übereinstimmend exprimierter mRNA ist, als Arrays, die radioaktiv markierte Proben enthalten, wurde die „Fold change“ für die Affymetrix- Daten auf 2.0 gesetzt. Der unpaare Student's t-Test wurde soweit erforderlich mit einer Signifikanz von $p < 0.05$ verwendet, um die Genexpressionswerte aller drei Arrayformen miteinander vergleichen zu können. Alle t- Tests waren zweiseitig.

Verfügbarkeit der Rohdaten

Die Rohdaten für Clontech Human-, Cardiovascular- und die normalisierten Expressionsdaten für Affymetrix HG- 133A- Arrays lagen als Tabelle im Excel-Format vor.

4. Ergebnisse

4.1 Zusammenfassung der Microarray- Ergebnisse

Die genauen Ergebnisse der verschiedenen Micro- Array- Studien entnehmen Sie bitte der Habilitationsschrift von Frau Priv. Doz. Dr. Barbara Weis- Müller (18) und unserer Publikationen (1, 19).

BD AtlasTM Human1.2 Array.

Entsprechend des vordefinierten Bereiches waren 229 von 1185 Genen (19.3%) exprimiert. Von diesen wiederum waren 49 Gene (21.4%) für beide Gruppen unterschiedlich exprimiert. In der dissezierten Aorta waren im Vergleich zu den Kontrollgeweben 25 Gene höher und 24 Gene niedriger exprimiert.

BD AtlasTM Human Cardiovascular Array.

114 der 597 Gene (19.1%) wurden als exprimiert gewertet. 33 Gene (28.9%) zeigten Unterschiede in der Expression, 10 waren im Dissektionspräparat hochreguliert, während 23 Gene herunterreguliert waren.

Affymetrix HG- 133A GeneChip.

Die Affymetrix- Plattform zeigte bei 5.246 von 22.283 Genen (23.5%) eine nachweisbare Expression. Von diesen exprimierten Genen zeigten 823 Gene (15.7%) Unterschiede zwischen dissezierter Aorta und dem Kontrollgewebe, und zwar wiesen 323 Gene in der Dissektion eine höhere Expression auf, während 500 Gene hier geringer exprimiert wurden.

Tabelle 1. zeigt aus der vorangehenden Studie (19) diejenigen nachuntersuchten Gene, die im Clontech- Atlas- Experiment unterschiedlich exprimiert waren und vergleicht sie mit den Ergebnissen des Affymetrix-Experiments, getrennt nach funktionellen Gruppen.

Tabelle 1. Genexpressionsstudien: Aortendisektion gegenüber Kontrollaorta.

Genexpressionsstudien, die frisch disseziertes Aorta ascendens- Gewebe (D) mit nichtdissezierter Kontrollaorta (C) vergleichen.

Es wurden 3 verschiedene Genexpressionsstudien durchgeführt: 16 Proben wurden mit dem *BD Atlas™ Human1.2 Array* (h), 16 Proben mit *BD Atlas™ Human Cardiovascular Array* (c) und 8 Proben mit *Affymetrix Human Genome U133A GeneChip* untersucht. Die unterschiedlich exprimierten Gene der Atlas- Experimente, die in dieser Arbeit nachuntersucht wurden, 4 Gene (h), 6 Gene (c) und A= *Affymetrix Human Genome U133A GeneChip*, sind dargestellt und wurden mit den Genen des Affymetrix- Experiments verglichen. Ratio: Hauptexpression der Dissektion (D) geteilt durch die Hauptexpression der Kontrollen (C); n.e. = nicht exprimiert, n.s. = nicht signifikant, n.t. = nicht getestet, ↓ herunterreguliert, ↑ hochreguliert, ? = Regulation im Atlas- und Affymetrix- Experiment unterschiedlich.

Tabelle 1						
Genbezeichnung funktionelle Gruppe	Plattform Array- Typ	Atlas		Affymetrix		Regulation
		Ratio D/C	P- Wert	Ratio D/C	P- Wert	
Proteolyse/ Apoptose						
MMP- 11	h	2.1	<0.001	3.2	<0.05	↑
MMP- 19	A	n.t.		3.2	<0.05	↑
TIMP- 1	h,c	1.8	<0.01		n.s.	?
TIMP- 2	hc	0.4	<0.01		n.s.	?
TIMP- 3	c	0.2	<0.001		n.s.	?
Zelloberfläche/ Adhäsion						
Kollagen- IV α2	h	0.5	<0.1	0.4	<0.05	↓
Kollagen- IV α5	A	n.t.		0.32	<0.05	↓
PKD- 2	A	n.t.		0.4	<0.001	↓
Decorin	c	0.3	<0.05		n.s.	↓
Elastin	A	n.t.		0.4	<0.05	↓
Vinculin	c	0.2	<0.001		n.s.	?
Tenascin- C	c	2.6	<0.01	6.2	<0.05	↑
Zellmotilität/ Zytoskelett						
Actin α2	A	n.t.		0.13	<0.001	↓
Gelsolin	A	n.t.		0.5	<0.01	↓

Der direkte Vergleich der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen Clontech Atlas und Affymetrix zeigte eine hohe Übereinstimmung beider Datensätze. So waren in der vollständigen Auswertung (19) diejenigen Gene, die in Clontech Unterschiede zeigten, zu 84% auch in Affymetrix unterschiedlich exprimiert.

Extrazelluläre Matrix (ECM)

Etliche Gene, die die extrazelluläre Matrixproteine kodieren, zeigten eine geringere Expression in der dissezierten Aortenwand im Vergleich zu normalem Aortengewebe (Tabelle 1.).

Extrazelluläre Proteolyse/ Apoptose

Matrix- Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Obwohl die Bindegewebskomponenten in ihren Expressionsniveaus und im Grad ihrer unterschiedlichen Genexpression auf beiden Plattformen Ähnlichkeit aufwiesen, war die Expression der Matrix- Metalloproteinasen (MMPs) und ihrer Inhibitoren weniger einheitlich.

Auf der Affymetrix- Plattform war nur MMP- 19 hochreguliert, während MMP- 2 und MMP- 9 im Dissektions- und Kontrollgewebe gleichermaßen exprimiert waren. Gene für andere Metalloproteinasen waren nicht exprimiert.

TIMP- 1, TIMP- 2, und TIMP- 3 waren sowohl in der Dissektion als auch in der Kontrolle gleichermaßen exprimiert. Im Gegensatz dazu war auf der Clontech Plattform die Expression von MMP- 11 und TIMP- 1 im Dissektionsgewebe stärker, während TIMP- 2 und TIMP- 3 herunterreguliert waren.

Zelloberflächengene/ Adhäsion

Kollagen- IV

Während im Atlas Clontech Array die mRNA von Kollagen- IV $\alpha 1$ im Dissektions- und Kontrollgewebe gleichermaßen verteilt war, war Kollagen- IV $\alpha 6$ auf der kardiovaskulären Membran nicht exprimiert.

Der Affymetrix Chip zeigte eine vergleichbare Kollagenexpression wie das Atlas Experiment.

Gene für Kollagen- IV $\alpha 2$ und - IV $\alpha 5$ zeigten eine geringere Expression in der Dissektion, während die RNA für Kollagen- IV $\alpha 1$ gleichermaßen verteilt waren und die übrigen Kollagene keine signifikante Genexpression aufwiesen.

PKD- 2

Die Expression von Polycystin- 2, welches den Gencode für Zell- Zell- Adhäsionsproteine enthält, war in der dissezierten Aorta signifikant geringer exprimiert.

Elastin

Die mRNA der Gene für Elastin, einer wichtigen Bindegewebsfaser, war in der dissezierten Aorta reduziert.

Zellmotilität/ Zytoskelett

Actin, Gelsolin, Myosin light- und heavy chains

Eine weitere Gruppe, deren Expressionslevel vermindert war, besteht aus zytoskelettalen und myofibrillären Genen. Die Expression von α - Actin, Gelsolin und einige Myosin light- und heavy chains waren im Dissektionsgewebe herunterreguliert.

4.2 TaqMan qRT- PCR

Validierung der Gene mit unterschiedlicher Expression im Dissektions- und Kontrollgewebe durch TaqMan qRT- PCR.

Zur Überprüfung der bisher erzielten Ergebnisse wurde eine Teilmenge von 24 Genen, die durch den Dissektionsprozess beeinflusst waren, zusätzlich durch quantitative Real- Time PCR analysiert. Alle ausgewählten Gene sind für die Struktur und Funktion der Aorta von Bedeutung.

Die Microarraydaten bekräftigend, ergab diese Untersuchung, dass alle Gene außer MMP- 11 im Dissektionsgewebe hoch- oder herunterreguliert waren.

Tabelle 2. zeigt 11 der 24 untersuchten Gene, aufgeteilt nach funktionellen Gruppen, da diese 11 Gene zu den weiter nachuntersuchten Genen gehören.

Tabelle 2. Korrelation relevanter Gene der Clontech- / Affymetrix- Genexpressionslevel mit den Ergebnissen der TaqMan qRT- PCR

Gezeigt wird die Übereinstimmung der Array- Daten mit denen der PCR

c= Clontech array (BD Atlas™ Human1.2 Array oder BD Atlas™ Human Cardiovascular Array),

A= Affymetrix Human Genome U133A GeneChip, MYH- 11*= myosin heavy chain polypeptide 11,

HIF- 1 α **= hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit.

Ratio= Anzahl der Dissektionspräparate (D) geteilt durch Anzahl der Kontrollpräparate (C)

Gen- Name	Array	Ratio (D/ C) Array	Ratio (D/C) qRT-PCR
Proteolyse/ Apoptose			
MMP- 11	c	2.1	0.57
TIMP- 2	c	0.41	0.53
TIMP- 3	c	0.2	0.47
HIF- 1 α **	A	1.7	1.86
Zelloberfläche/ Adhäsion			
PKD2	A	0.37	0.19
Decorin	c	0.34	0.61
Elastin	c	0.33	0.14
Vinculin	c	0.22	0.31
Tenascin- C	c	2.56	5.68
Zellmotilität/ Zytoskelett			
Actin- α 2	A	0.52	0.19
MYH- 11*	A	0.48	0.09

Extrazelluläre Matrix (ECM)

Etliche Gene, die extrazelluläre Matrixproteine kodieren, zeigten eine geringere Expression in der dissezierten Aortenwand im Vergleich zu normalem Aortengewebe (s.a. Tabelle 1.).

Extrazelluläre Proteolyse/ Apoptose

Matrix- Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Aus dieser Gruppe konnte nur die unterschiedliche Expression von TIMP- 2 und TIMP- 3 durch qRT- PCR bestätigt werden.

HIF- 1 α

Die unterschiedliche Expression von HIF- 1 α konnte durch die qRT- PCR ebenfalls bestätigt werden.

Zelloberflächengene/ Adhäsion

PKD- 2, Decorin, Elastin und Vinculin

Die Expression von Polycystin- 2, welches den Gencode für Zell- Zell Adhäsionsproteine enthält, sowie die Expression von Decorin, Elastin und Vinculin war in der dissezierten Aorta signifikant geringer, was auch durch qRT- PCR bestätigt werden konnte.

Tenascin- C

Lediglich die mRNA der Gene für Tenascin- C war in der dissezierten Aorta vermehrt, was ebenfalls durch qRT- PCR validiert werden konnte.

Zellmotilität/ Zytoskelett

Actin, Gelsolin, Myosin light- und heavy chains

Eine weitere Gruppe, deren Expressionslevel vermindert war, besteht aus zytoskelettalen und myofibrillären Genen. Die Expression von α - Actin, Gelsolin und einige Myosin light- und heavy chains waren auch in der qRT- PCR nachweisbar im Dissektionsgewebe herunterreguliert.

4.3 Immunhistochemie und Western- Blot

Übersichtsfärbungen

Zur Übersicht der Beschaffenheit der Präparate wurden Standardfärbungen wie HE-, EvG- und AB- Pas- Färbungen und zusätzlich noch Färbungen mit dem Kapillarfactor- VIII und CD- 34 markierte Färbungen sowohl der Kontrollpräparate als auch der Dissektionspräparate, Aneurysmapräparate und Präparate von Patienten mit Marfan- Syndrom durchgeführt.

Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE- Färbung)

Insgesamt wurden 31 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

13 Dissektionspräparate,

5 Aneurysma- Präparate und

3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Die Kontrollpräparate zeigten alle einen regelrechten Gefäßwandaufbau mit eindeutiger Trennung der drei Wandschichten Tunica intima, Tunica media und Tunica Adventitia. Die innerste Schicht, Tunica intima, ist dem Lumen zugewandt und besteht aus einer einzelnen Lage von Endothelzellen, die durch eine Basalmembran vom subendothelialen Bindegewebe getrennt ist. Sie war bei allen Präparaten sehr schmal und nicht pathologisch verändert. Die mittlere Schicht, Tunica media, ist die eigentliche Muskelschicht der Gefäßwand und besteht aus dicht angeordneten glatten Muskelzellen, Kollagen- und elastischen Bindegewebsfasern. Alle Präparate zeigten diesen regelrechten Aufbau der Media. Die Adventitia, die äußerste, dem Lumen abgewandte Schicht, wies ebenfalls in allen Präparaten einen normalen Aufbau aus lockerem Bindegewebe und darin enthaltenen Gefäßen und Nerven auf.

Dissezierte Aortenwand: Mit zwei Ausnahmen waren alle Dissektionen frisch, wiesen also einen querverlaufenden Intimaeinriss und Reste einer Wühlblutung auf, die zur Teilung der Media und zur Ausbildung einer Dissektionsmembran führte. In allen Präparaten waren sowohl Thrombosierungen als auch Fibrosierungen zu erkennen. Weiterhin lag eine zur Dissektion parallel verlaufende Medianekrose vor.

Die Intima war in allen Kontrollpräparaten schmal bis leicht fibrös verdickt. Die zwei Präparate, die eine ältere Dissektion erkennen ließen, zeigten weiterhin eine ausgeprägte Proliferation von modifizierten glatten Muskelzellen und gemischte Thromben.

Aneurysma: Diese Präparate waren nahezu alle atheromatös und arteriosklerotisch verändert. Des Weiteren ließen sich teils deutlich verkalkte, gemischte Thromben abgrenzen. Zwei der Präparate ließen eine deutliche Narbe erkennen.

Marfan- Probe: Diese Präparate zeigten ältere Prozesse mit großen, kernlosen geriffelten Thrombus- Anteilen und einer sehr schmalen Intima. Die Media zeigte örtlich zentrale Nekrosen und reichlich proliferierte glatte Muskelzellen.

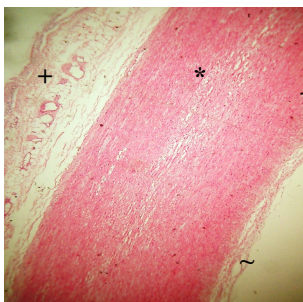


Abbildung 2.

HE- Färbung von Kontrollgewebe.

Schmale Intima, Media mit glatten Muskelzellen, Kollagen- und Elastinfasern und Adventitia mit Gefäßen und Nerven.

~ = Intima, * = Media, + = Adventitia

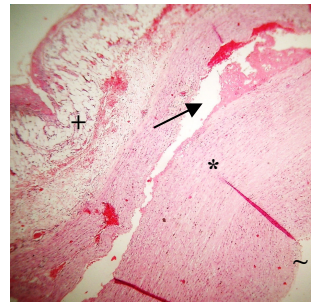


Abbildung 3.

HE- Färbung von Dissektionsgewebe.

Quer verlaufender Intimaeinriss, geteilte Media (→) und thrombosierte, fibrosierte Muskelzellen.

~ = Intima, * = Media, + = Adventitia

Elastica- van- Gieson- Färbung (EvG- Färbung)

Insgesamt wurden 31 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

13 Dissektionspräparate,

5 Aneurysma- Präparate und

3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Diese Präparate zeigten alle konstant eine normale bis leicht aufgelockerte Media mit dicht angeordneten glatten Muskelzellen und elastischen Bindegewebsfasern und eine meist sehr dünne Intima.

Dissezierte Aortenwand: Es war eine zarte Intima und eine weitgehend regelmässige Media mit zum Teil schweren atheromatösen Plaques in allen Präparaten zu erkennen. Die Dissektion trat bevorzugt im mittleren bis äusseren Drittel der Media auf.

Aneurysma: Diese Präparate zeigten alle eine deutliche Arteriosklerose und Fibrosierungen mit einer deutlich verdickten Intima, die zum Teil dicker als die Media war. In einem Präparat war kein erhaltenes Media- Gewebe mehr zu erkennen.

Marfan: Die Media imponierte in einem Präparat örtlich mit einer etwas ausgelichteten Membrana elastica interna, die sich zwischen der Tunica intima und der Tunica media befindet und aus elastischen Fasern besteht. Die Dissektion befand sich in allen Präparaten an der Grenze zum äusseren Drittel der Tunica media.

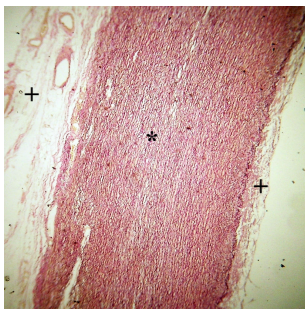


Abbildung 4.

EvG- Färbung von Kontrollgewebe.

Media mit dicht angeordneten glatten Muskelzellen und Bindegewebsfasern, dünne Intima.

~ = Intima, * = Media, + = Adventitia

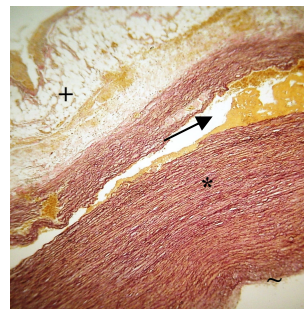


Abbildung 5.

EvG- Färbung von Dissektionsgewebe.

Zarte Intima, Media mit atheromatösen Plaques und Dissektionsspalt (→).

~ = Intima, * = Media, + = Adventitia

AB- Pas- Färbung

Insgesamt wurden 18 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

6 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

6 Dissektionspräparate,

5 Aneurysma-Präparate und

1 Aortenprobe von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Die Präparate wiesen alle eine mässige und diffuse Basophilie an der Intima- Media- Grenze auf.

Dissezierte Aortenwand: Örtlich um die Dissektion herum war eine stärkere Basophilie lumenwärts, in den inneren Schichten der Media betont zu erkennen.

Aneurysma: In 4 der 5 Präparate war keine Mediastruktur mehr zu erkennen. Ein Präparat wies örtlich an der Dissektion eine verstärkte Basophilie auf.

Marfan: In diesem Präparat war keine Basophilie erkennbar.

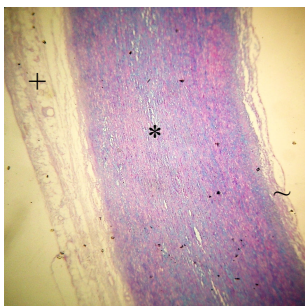


Abbildung 6.

AB- Pas- Färbung von Kontrollgewebe.

Schmale Intima, Media mit regelmäßig angeordneten glatten Muskelzellen und mäßiger Basophilie der Übergangszone.

~ = Intima, * = Media, + = Adventitia

Kapillarfaktor- VIII

Das F8- Antigen ist ein spezifischer und repräsentativer Marker für vaskuläre Endothelzellen. Insgesamt wurden 14 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

6 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

6 Dissektionspräparate,

1 Aneurysma- Präparat und

1 Aortenprobe von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: In allen Präparaten war nur vereinzelt eine schwach positive Kapillarfärbung in den Kapillaren der basalen Media und der Adventitia, zum Teil auch etwas tiefer in der Media zu erkennen

Dissezierte Aortenwand: Hier zeigten sich in allen Präparaten tiefere Media-Kapillaren auch jenseits der Dissektion deutlich positiv gefärbt.

Aneurysma: Das Präparat zeigte eine gute Kapillarfärbung in der Adventitia. Auch die basale Media zeigte deutlich positiv gefärbte Kapillare, während die arteriosklerotisch veränderte Nekrosezone negativ verblieb.

Marfan: In diesem Präparat waren alle Kapillare negativ.

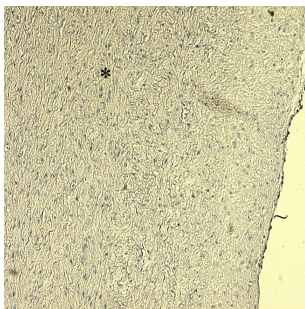


Abbildung 7.

Factor VIII- Färbung von Kontrollgewebe.

Schwach positive Kapillarfärbung in den Kapillaren der Media und Adventitia.

~ = Intima, * = Media

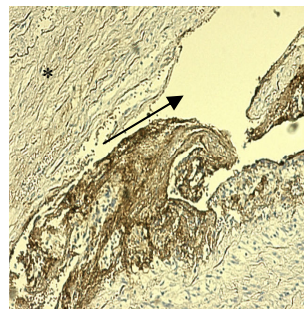


Abbildung 8.

Factor VIII- Färbung von Dissektionsgewebe.

Tiefere Mediakapillaren deutlich positiv gefärbt.

* = Media, → = Dissektionsspalt

CD- 34

Insgesamt wurden 13 Präparate ausgewertet (keine Abbildung). Von diesen waren:

6 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

5 Dissektionspräparate,

1 Aneurysma- Präparat und

1 Aortenprobe von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Lediglich 3 der 6 Präparate wiesen eine erkennbare Kapillarfärbung auf, die im mittleren Drittel der Media zu erkennen war. Alle Präparate waren sehr schwach gefärbt.

Dissezierte Aortenwand: In allen Präparaten war eine nur schwache Färbung der Kapillare zu erkennen. Insgesamt färbten sich nur wenige Kapillare an. Diese befanden sich bevorzugt im basalen Drittel der Media.

Aneurysma: Das Präparat zeigte ein ausgedehntes Granulationsgewebe in den basalen Anteilen der Media. Diese Narbe war streckenweise gefäßfrei.

Marfan: Das Präparat zeigte keine positive Kapillarfärbung.

Immunhistochemische Färbungen und Immunoblots:

Extrazelluläre Proteolyse/ Apoptose

MMP- 2

Immunhistochemie:

Die Immunhistologie ließ keine spezifische Färbung des dissezierten Gewebes erkennen. Zudem waren sowohl das Kontrollgewebe (Mamma- Ca), als auch das Aortengewebe negativ für diesen Antikörper, so dass keine weiteren Präparate untersucht wurden.

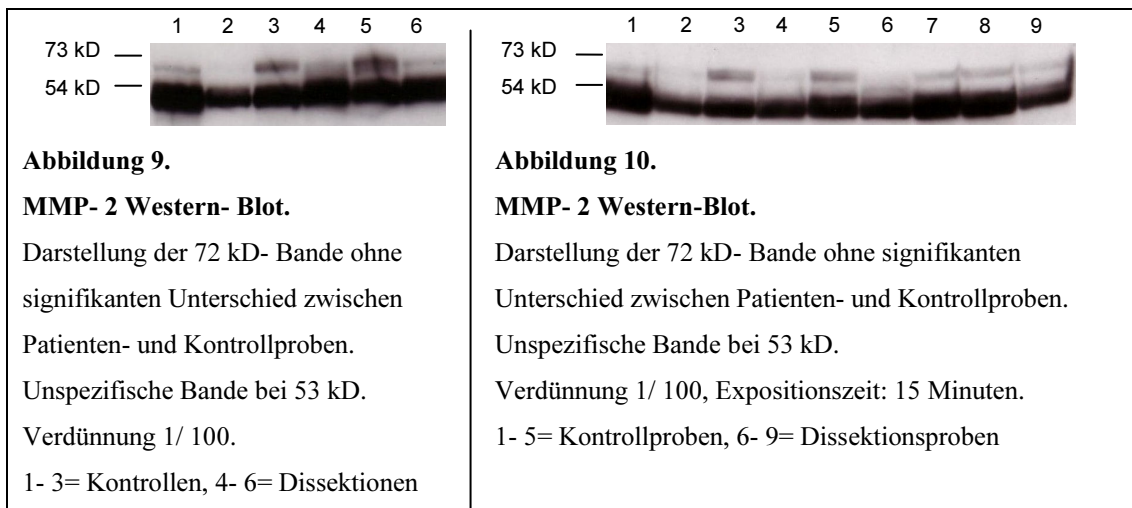
Western- Blot:

Insgesamt wurden 5 Immunoblots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 3 bzw. 5 Kontrollproben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingrösse: 72 kD (OMIM)

Die Bande bei 72 kD konnte zwar dargestellt werden, jedoch wies sie keinen deutlichen Unterschied zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv auf.



MMP- 9

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 30 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

13 Dissektionspräparate,

4 Aneurysma- Präparate und

3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: In der Media war keine deutlich positive Reaktion zu erkennen. Alle Präparate zeigten jedoch eine deutliche Anfärbung der Fettzellgrenzen in der Adventitia. Hier waren auch kleinere Gefäße angefärbt, jedoch zeigten die Granulozyten keine positive Reaktion.

Dissezierte Aortenwand: Alle Präparate zeigten eine deutliche Anfärbung der Granulozyten, der Lymphozyten und der Fettzellgrenzen in der Adventitia, während in der Media keine deutlich positive Reaktion zu erkennen war. In einigen Gefäßen färbte sich das Endothel positiv.

Aneurysma: Ein Präparat zeigte eine positive Reaktion der Thrombozyten und Granulozyten, sowie einen positiven Schaumzellsaum um Atherome. In der Dissektionszone konnten in allen Präparaten örtlich viele positive Monozyten erkannt werden.

Marfan: Ein Präparat zeigte keinerlei positive Reaktionen. Die anderen beiden Präparate wiesen in der Adventitia positiv gefärbte Granulozyten und wenige Lymphozyten in kleineren Lymphknoten und Fettzellhüllen auf, während die Media negativ verblieb.

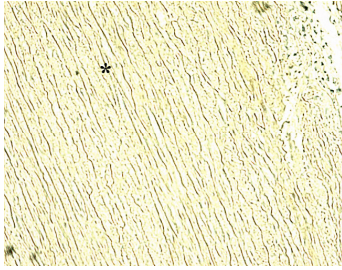


Abbildung 11.

MMP- 9- Färbung von Kontrollgewebe.

Die Reaktion verblieb negativ.

Verdünnung: 1/ 200, SKT

Vergrößerung: 10- fach, *= Media

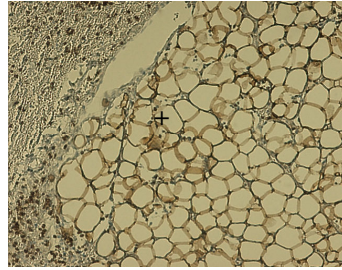


Abbildung 12.

MMP- 9- Färbung von Kontrollgewebe – Adventitia.

Deutlich positive Fettzellgrenzen in der Adventitia (+).

Verdünnung: 1/ 200, SKT

Vergrößerung: 10- fach

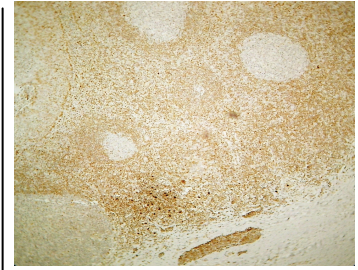


Abbildung 13.

Positive MMP- 9- Kontrollfärbung einer Tonsille.

Verdünnung: 1/ 200, SKT

Vergrößerung: 4- fach

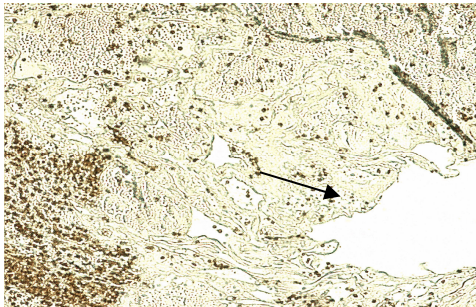


Abbildung 14.

MMP- 9- Färbung von Dissektionsgewebe.

Angefärbte Granulozyten und Lymphozyten im Dissektionskanal (→).

Verdünnung: 1/ 200, Vergrößerung: 10- fach

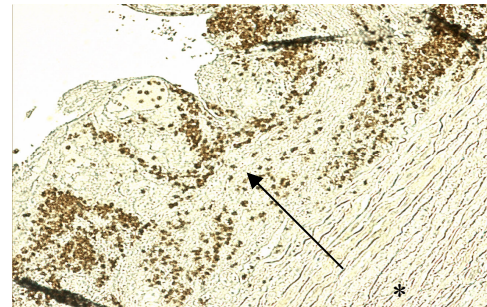


Abbildung 15.

MMP- 9- Färbung von Dissektionsgewebe.

Angefärbte Granulozyten und Lymphozyten im Dissektionskanal (→), Media (*) negativ.

Verdünnung: 1/ 200, Vergrößerung: 10- fach

Western- Blot:

Insgesamt wurde 1 Blot ausgewertet.

Je 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: 92 kD (OMIM)

Das Ergebnis des Western- Blot war nicht auswertbar, da der Antikörper für Immunoblots nicht geeignet war.

MMP- 11

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 30 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

13 Dissektionspräparate,

4 Aneurysma- Präparate und

3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: In 6 Präparaten verblieb die Media negativ, während in den übrigen 4 Präparaten die glatten Muskelzellen im äußeren Viertel der Media angedeutet positiv waren.

Dissezierte Aortenwand: 3 Präparate zeigten eine gering diffuse Anfärbung um Atherome und umgebende Schaumzellen. Die übrigen 10 Präparate zeigten eine starke Anfärbung von glatten Muskelzellen und deutlich diffuse Anfärbung um Cholesterinkristalle. In allen Präparaten waren die frischen Thromben in der Dissektionszone negativ.

Aneurysma: Alle Präparaten zeigten eine diffuse Anfärbung um Cholesterinkristalle und wenige positive Schaumzellmuster.

Marfan: In 2 Präparaten verblieb die Media negativ, während sie in einem Präparat angedeutet positiv war.

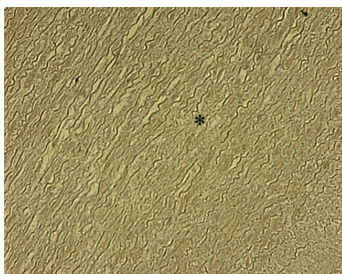


Abbildung 16.

MMP- 11- Färbung von Kontrollgewebe.

Muskelzellen der Media (*) negativ.

Verdünnung: 1/ 500, Vergrößerung: 10- fach

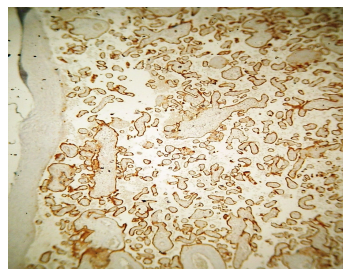


Abbildung 17.

**Positive MMP- 11- Färbung von Plazenta-
gewebe.**

Verdünnung: 1/ 500, Vergrößerung: 10- fach

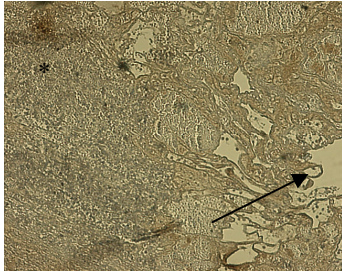


Abbildung 18.

MMP- 11- Färbung von Dissektionsgewebe.

Deutliche Anfärbung der glatten Muskelzellen der Media (*), →= Dissektionskanal

Verdünnung: 1/ 500

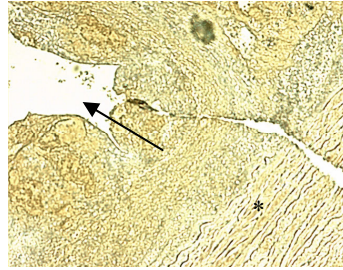


Abbildung 19.

MMP- 11- Färbung von Dissektionsgewebe.

Deutliche Anfärbung der glatten Muskelzellen der Media (*), →= Dissektionskanal

Verdünnung: 1/ 500, *= Media

Western- Blot:

Insgesamt wurden 5 Blots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 bzw. 6 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: 47+ 60 kD; 35 kD Abbauprodukt (Data sheet IM86, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Im Western- Blot wurden zwei Isoformen bei 48 kD und 54 kD exprimiert, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Dissektionsgewebe festgestellt werden.

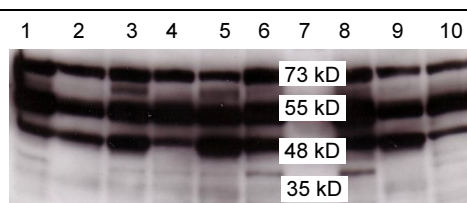


Abbildung 20. MMP- 11 Western- Blot

Expression von 2 Isoformen bei 48 kD und 54 kD ohne signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollproben.

1-6: Kontrollproben, 7= Proteinmarker, 8-10 = Patientenproben, Exposition: 1 min.

MMP- 19

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 54 Präparate in zwei unterschiedlichen Verdünnungen ausgewertet. 26 wurden in der Verdünnung 1/ 100 und 28 in der Verdünnung 1/ 150 ausgetestet. Weiterhin wurden Färbungen der Kontrollpräparate Plazenta und Appendix durchgeführt. Die Kontrollpräparate zeigten keine positive Immunreaktion.

1/ 100- Verdünnung:

Von diesen waren:

- 11 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,
- 12 Dissektionspräparate und
- 3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Die Media war in 6 Präparaten gering positiv, in einem Präparat zeigte sie kleinfleckig positive Bezirke und in 4 Präparaten war sie stark positiv angefärbt. In allen Präparaten waren die Vasa vasorum der Adventitia positiv, während in der Intima nur einzelne positive Zellen zu erkennen waren.

Dissezierte Aortenwand: In 4 Präparaten war die Media nur sehr schwach positiv gefärbt, während sie in 8 Präparaten stärker angefärbt war. In allen Präparaten verblieb ein zur Dissektion parallel verlaufender Streifen beidseits der Dissektion negativ. Thromben verblieben bis auf wenige positive Zellen ebenfalls negativ.

Marfan: Ein Präparat war bis auf wenige Einzelzellen in der Media negativ, während ein Präparat wenige fleckförmige positive Herde in der Media zeigte und das dritte Präparat eine schwach positiv gefärbte Media aufwies. In einem Präparat färbte sich der Thrombus positiv. In allen Präparaten waren die Endothelzellen der Vasa vasorum der Adventitia stark positiv, während die Intima fast vollständig negativ verblieb.

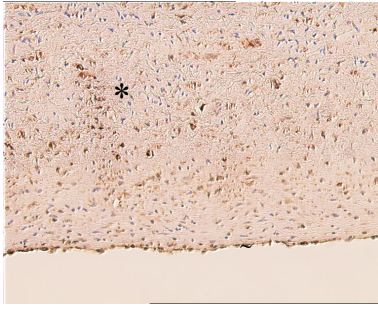


Abbildung 21.

MMP- 19- Färbung von Kontrollgewebe.

Kleinfleckig positive Media (*), zarte Intima (~)

Verdünnung: 1/ 100, Vergrößerung: 4- fach

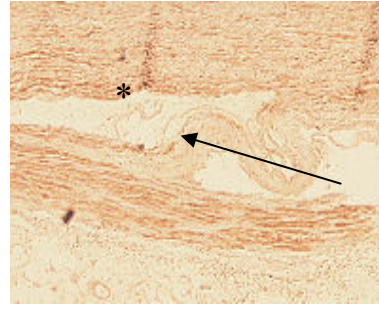


Abbildung 22.

MMP- 19- Färbung von Dissektionsgewebe.

Media (*) positiv, (→)= Dissektionskanal

Verdünnung: 1/ 100, Vergrößerung: 10- fach

1/ 150- Verdünnung:

Von diesen waren:

10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

12 Dissektionspräparate,

3 Aneurysma- Präparate und

3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Diese Präparate zeigten ein ähnliches Färbemuster wie die Kontrollpräparate mit der 1/ 100- Verdünnung, waren aber etwas schwächer positiv.

Dissezierte Aortenwand: Die Dissektionspräparate zeigten ebenfalls das gleiche Färbemuster wie in der 1/ 100- Verdünnung und waren auch schwächer gefärbt.

Aneurysma: Ein Präparat zeigte fleckförmig positive Herde in der Media, während ein weiteres Präparat in der Media nur eine sehr schwach positive Reaktion zeigte und das dritte Präparat im inneren Mediadrittel stärker positiv reagierte.

Marfan: Diese Präparate zeigten ebenfalls ein ähnliches Färbemuster wie die Aortenproben der Marfan- Patienten mit der 1/ 100- Verdünnung, waren aber etwas schwächer gefärbt.



Abbildung 23.

MMP- 19- Färbung von Kontrollgewebe.

Kleinfleckig positive Media (*), zarte Intima (~).

Verdünnung: 1/ 150, Vergrößerung: 4- fach

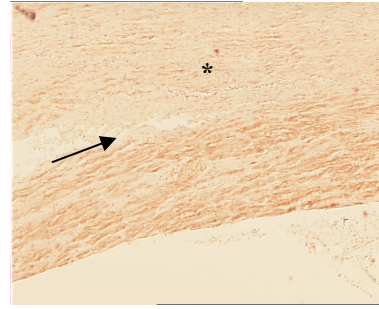


Abbildung 24.

MMP- 19- Färbung von Dissektionsgewebe.

Media (*) positiv, (→)= Dissektionskanal .

Verdünnung: 1/ 150, Vergrößerung: 4- fach

Western- Blot:

Insgesamt wurden 5 Blots ausgewertet.

Je 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: 57 kD (OMIM)

Der Western- Blot verblieb ohne Nachweis einer spezifischen Bande.

TIMP- 1

Immunhistochemie:

Die histologische Färbung zeigte sich unspezifisch. Es verblieb sowohl das Mamma-Gewebe als auch das Colon- Carcinomgewebe als Kontrollgewebe negativ.

Western- Blot:

Insgesamt wurden 3 Blots ausgewertet.

Je 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingrösse: 28 kDa

Im Western- Blot konnte eine Bande bei 28 kD dargestellt werden, zeigte jedoch keinerlei Unterschiede in der Menge der Patienten- und Kontrollproben.



Abbildung 25.

TIMP- 1 Western- Blot

Darstellung der 28 kD- Bande ohne signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollproben.

1- 5= Kontrollproben, 6- 9= Patientenproben

TIMP- 2

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 29 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

- 10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,
- 13 Dissektionspräparate,
- 3 Aneurysma- Präparate und
- 3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Die Media war in allen Kontrollpräparaten negativ. In der Intima zeigten einige Schaumzellen und örtlich auch vereinzelt Makrophagen in allen Präparaten eine positive Reaktion.

Dissezierte Aortenwand: Auch hier verblieben alle Präparate negativ, zeigten jedoch ein kleines Randareal mit herdförmig positiven glatten Muskelzellen.

Aneurysma: 2 der 3 Präparate zeigten positive Schaumzell- und Makrophagennester in arteriosklerotischen Herden, während das dritte Präparat negativ verblieb.

Marfan: Ein Präparat zeigte eine positive Reaktion im Nekrosebereich der Media, während 2 Präparate keine positive Reaktion in der Media erkennen ließen.

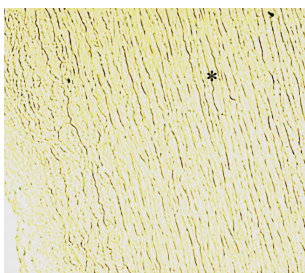


Abbildung 26.

TIMP- 2- Färbung von Kontrollgewebe.

Die Reaktion verblieb negativ.

Verdünnung: 1/ 500

Vergrößerung: 10- fach, * = Media

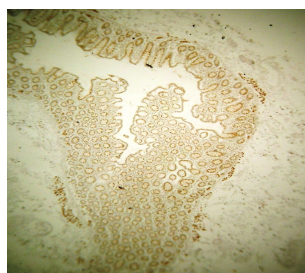


Abbildung 27.

Positive TIMP- 2- Färbung von Kontroll- Gewebe -Colon.

Verdünnung: 1/ 500

Vergrößerung: 4- fach

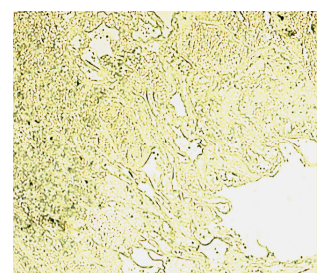


Abbildung 28.

TIMP- 2- Färbung von Dissektionsgewebe.

Die Reaktion verblieb

negativ. Vergrößerung: 10- fach, Verdünnung: 1/ 500

Western- Blot:

Insgesamt wurden 7 Blots ausgewertet.

Je 4 Proben Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingrösse: 21 kD (OMIM)

Im Western- Blot konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv gesehen werden. Tendenziell erschien die Bande des Patientenkollektivs bei 21 kD etwas schwächer, jedoch war dies so minimal, dass es nicht auswertbar erschien.

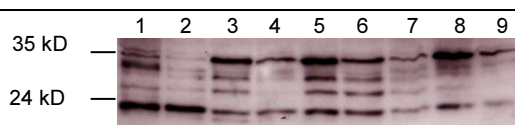


Abbildung 29.

TIMP- 2 Western- Blot.

Darstellung der 21 kD- Bande mit minimal reduzierter Expression der Patientenproben.

Verdünnung: 1/ 200, Exposition: 2 Minuten.

1- 5= Kontrollproben, Bande 6- 9= Patientenproben.

TIMP- 3

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 29 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

- 10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,
- 13 Dissektionspräparate,
- 3 Aneurysma- Präparate und
- 3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Alle Präparate zeigten eine positive Reaktion einzelner glatter Muskelzellen der Media. Weiterhin waren viele Fasern und Makrophagen der Intima und auch Monozyten der Adventitia positiv gefärbt.

Dissezierte Aortenwand: Alle Präparate zeigten im Dissektionsbereich in der Media einzelne positive Makrophagen, Granulozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fasern und Monozyten. In der Adventitia waren sowohl die Wände der Vasa vasorum als auch Monozyten angefärbt und in der Intima waren positive Schaumzellreste neben Atheromen zu erkennen.

Aneurysma: Die Intima zeigte in allen Präparaten massiv diffus positive Zellen um Cholesterinkristalle in großen Atheromen und positive Monozyten. In der Adventitia waren in allen Präparaten viele positive Makrophagen zu erkennen, während die Media negativ verblieb.

Marfan: Keins der drei Präparate zeigte positive Reaktionen in der Media. Zwei Präparate zeigten aber positiv gefärbte einzelne Fasern in der Dissektionsrandzone der Media und um einen organisierten Thrombus herum einzelne positive Endothelzellen in Kapillaren.

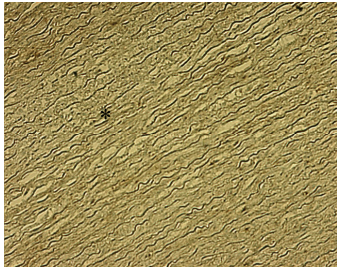


Abbildung 30.
TIMP- 3- Färbung von
Kontrollgewebe.
 Positive Reaktion der glatten
 Muskelzellen der Media (*)
 Verdünnung: 1/ 1000
 Vergrößerung: 10- fach

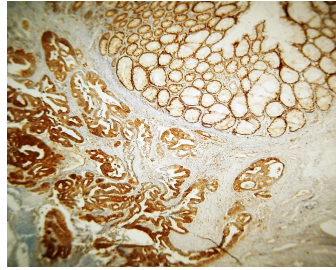


Abbildung 31.
Positive TIMP- 3- Färbung
von Kontrollgewebe-
Colon- Carcinom
 Verdünnung: 1/ 800
 Vergrößerung 4- fach

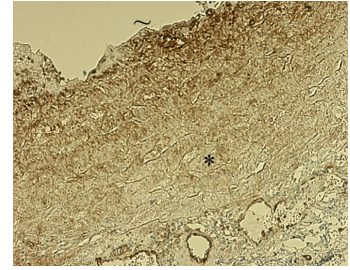


Abbildung 32.
TIMP- 3- Färbung von
Dissektionsgewebe. Diverse
 positiv gefärbte Zellen
 in Media (*) und Intima (~)
 Verdünnung: 1/ 1000
 Vergrößerung: 10- fach

Western- Blot:

Insgesamt wurden 6 Blots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 3 bzw. 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: 21.6 kD (OMIM)

Der Western- Blot verblieb ohne Nachweis einer differentiellen Proteinexpression. Es konnte trotz Darstellung der erwarteten Bande bei 21.6 kD kein Unterschied zwischen Kontrollen und Dissektionsgewebe nachgewiesen werden. Stattdessen erschien eine zusätzliche unspezifische Bande bei 48 kD.

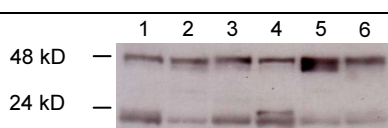


Abbildung 33.
TIMP- 3 Western- Blot.

Darstellung der 21 kD- Bande ohne Unterschied zwischen Kontroll- und Dissektionsproben. Zusätzliche unspezifische Bande bei 48 kD. 1- 3= Kontrollproben, 4- 6= Dissektionen.

HIF- 1 α

Immunhistochemie:

Die Immunhistochemie wies eine nur unspezifische Färbung auf, so dass die Präparate nicht ausgewertet wurden.

Western-Blot:

Insgesamt wurden 2 Blots ausgewertet.

Je 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingrösse: 120 kD (OMIM)

Der Western- Blot zeigte bei 120 kD eine deutlich stärkere Expression in den Dissektionspräparaten als in den Proben der Multiorganspender.

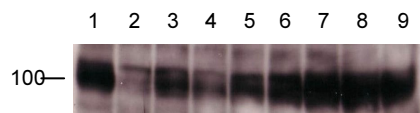


Abbildung 34.

HIF- 1 α Western- Blot.

Darstellung der 120 kD- Bande mit deutlich stärkerer Expression der Dissektionsproben.

Bande 1- 5= Kontrollproben, Bande 6- 9= Dissektionsproben

Verdünnung: 1/ 500, Exposition: 5 Minuten

Zelloberfläche/ Adhäsion

Kollagen- IV

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 18 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

6 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

6 Dissektionspräparate,

5 Aneurysma- Präparate und

1 Aortenprobe von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Alle Präparate zeigten einen spaltenförmig positiven Streifen inmitten der Media.

Dissezierte Aortenwand: Alle Präparate zeigten eine spaltenförmige sehr deutlich positive Reaktion der Media.

Aneurysma: Alle Präparate enthielten nur noch einen sehr geringen Mediaanteil, so dass die Färbung in dieser Schicht nicht als positiv gewertet werden konnte. Kleinere Blutgefäße in allen Schichten hingegen waren deutlich positiv.

Marfan: Das Präparat ließ höchstens einen schmalen oberflächlichen Anteil als angedeutet positiv erscheinen. Eine hier vorhandene Medianekrose verblieb negativ.



Abbildung 35.
Kollagen- IV- Färbung von Kontrollgewebe.
Spaltenförmig positiver Streifen in der Media (*)
Verdünnung: 1/ 700
Vergrößerung: 4- fach



Abbildung 36.
Kollagen- IV- Färbung von Kontrollgewebe.
Positive glatte Muskelzellen in der Media (*)
Verdünnung: 1/ 700
Vergrößerung: 10- fach

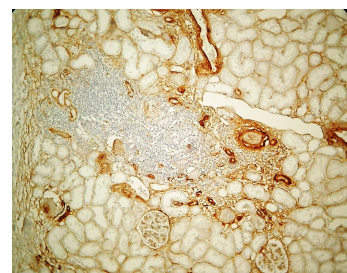


Abbildung 37.
Positive Kontroll- Färbung von Kollagen- IV- Niere
Verdünnung: 1/ 500
Vergrößerung: 10- fach

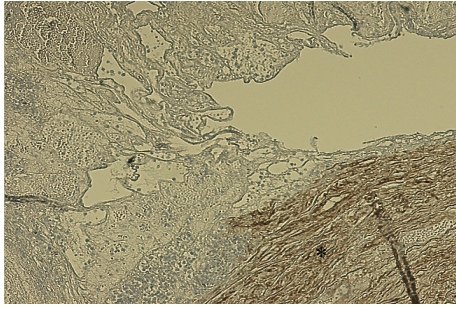


Abbildung 38.

Kollagen- IV- Färbung von Dissektionsgewebe.

Spaltenförmige Reaktion der Media (*).

Verdünnung: 1/ 700, Vergrößerung: 10- fach

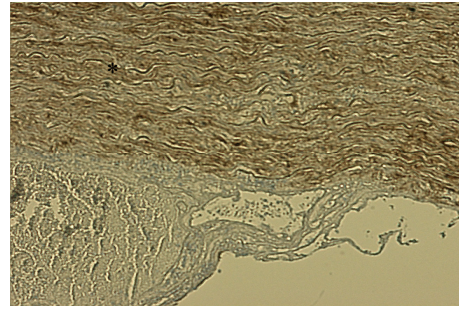


Abbildung 39.

Kollagen- IV- Färbung von Dissektionsgewebe.

Spaltenförmige Reaktion der Media (*).

Verdünnung: 1/ 700, Vergrößerung: 10- fach

Western- Blot:

Insgesamt wurden 3 Blots ausgewertet.

Je 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multi-organ Spendern.

Erwartete Proteingrösse: Isoform I: 160.6 kD, Isoform II: 127.9 kD (SwissProt-Nummer P02462)

Der Western- Blot zeigte bei 60 kD eine unspezifische gleichförmige Expression in Kontrollen und Dissektionen.

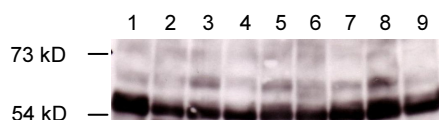


Abbildung 40.

Kollagen- IV Western- Blot

Gleichförmige Expression der 60 kD- Bande. Verdünnung: 1/ 5000, Exposition: <1 Minute

Bande 1- 5: Kontrollproben, Bande 6- 9: Dissektionsproben

PKD- 2

Immunhistochemie:

Die immunhistologische Färbung in dieser vorliegenden Arbeit zeigte trotz Verwendung von zwei unterschiedlichen PKD- 2- Antikörpern keine spezifische Anfärbung.

Western- Blot:

Insgesamt wurden 33 Blots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 3 bzw. 5 bzw. 6 Proben von Multiorganspendern,

Erwartete Grösse: 109.7 kD (Data sheet Zymed Laboratories Inc., Catalog No. 52-5217)

Im Western- Blot war eine deutliche Bande bei 109.7 kD detektierbar, aber ein Unterschied zwischen den Kontrollpräparaten und dem Dissektionsgewebe konnte nicht sichtbar gemacht werden.

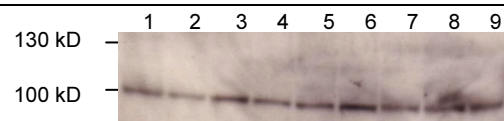


Abbildung 41.

PKD- 2 Western- Blot

Gleichförmige Expression der 109 kD- Bande. Verdünnung: 1/ 50, Exposition: 20 Sekunden

Bande 1- 5= Kontrollproben, Bande 6- 9= Dissektionsproben.

Decorin

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 24 Präparate mit 2 unterschiedlichen Verdünnungen ausgewertet. 9 wurden mit einer 1: 40 Verdünnung ausgetestet und 15 mit einer Verdünnung von 1: 500.

1: 40- Verdünnung:

Von diesen waren:

3 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern und
6 Dissektionspräparate.

Kontrollaorta: In allen Präparaten war die Media negativ. Die Adventitia zeigte positive Fasern, die in geringerer Anzahl auch in der fibrösen Zone der Intima zu erkennen waren.

Dissezierte Aortenwand: Während die Media in keinem der Präparate eine positive Reaktion zeigte, waren in der fetthaltigen Adventitia und auch in der Intima einzelne Fasern in allen Präparaten deutlich angefärbt.

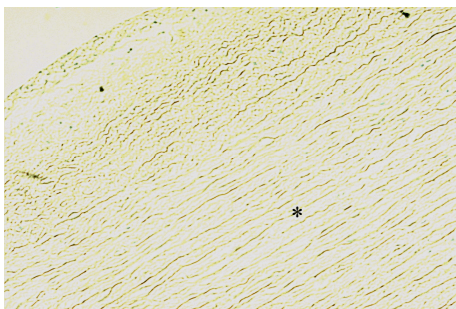


Abbildung 42.

Decorin- Färbung von Kontrollgewebe.

Keine positive Reaktion der Media (*)
zu erkennen.

Verdünnung: 1/ 40, Vergrößerung: 10- fach

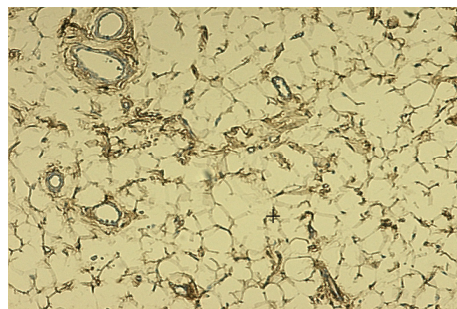


Abbildung 43.

Decorin- Färbung von Kontrollgewebe-

Adventitia (+) mit positiv gefärbten Fasern.

Verdünnung: 1/ 40, Vergrößerung: 15- fach.

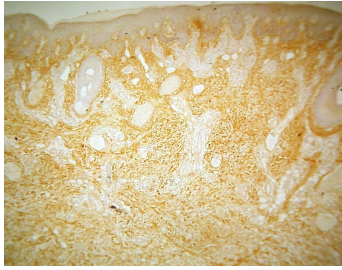


Abbildung 44.

**Positive Decorin- Färbung
von Kontrollgewebe- Haut**

Verdünnung: 1/ 40, Vergrößerung: 4- fach.

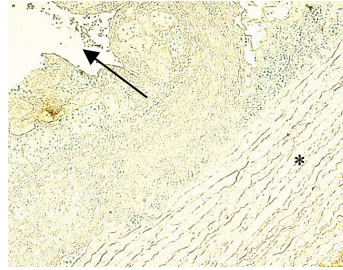


Abbildung 45.

Decorin- Färbung von Dissektionsgewebe.

Keine positive Reaktion.

* = Media, (→) = Dissektionskanal

Verdünnung: 1/ 40, Vergrößerung: 10- fach.

1: 500- Verdünnung:

Von diesen waren:

6 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

6 Dissektionspräparate,

2 Aneurysma- Präparate und

1 Aortenprobe von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: In allen Präparaten war die Media negativ.

Dissezierte Aortenwand: In allen Präparaten war die Media negativ.

Aneurysma: Die Media zeigte in beiden Präparaten keine positive Reaktion, während einzelne positive Fasern in der Adventitia zu erkennen waren. Im Dissektionsbereich waren in beiden Präparaten örtlich positive Herde in der Intima zu erkennen.

Marfan: In diesem Präparat war die Media negativ, während einzelne Fasern in der Nachbarschaft örtlich positiv erschienen.

Die 1: 500- Verdünnung zeigte eine insgesamt schwächer positive Reaktion, insbesondere der Adventitia, aber auch der Intimaherde. Die Media war in beiden Verdünnungen stets negativ.

Western- Blot:

Der Western-Blot lieferte keine auswertbaren Ergebnisse, da der Antikörper nicht geeignet war und dieser Versuch somit nicht funktionierte.

Elastin

Western- Blot:

Insgesamt wurden 10 Blots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 3 bzw. 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingrösse: 72 kD (OMIM)

Es konnte bei 72 kD eine Bande sichtbar gemacht werden, die jedoch keinen Unterschied zwischen Dissektion und Kontrollen aufwies.

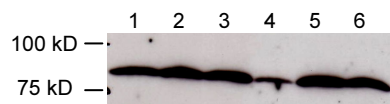


Abbildung 46.

Elastin Western- Blot

Darstellung der 72 kD- Bande ohne signifikanten Unterschied zwischen Dissektions- und Kontrollproben. Exposition: 5 Minuten. Bande 1- 3: Kontrollproben, Bande: 4- 6: Dissektionsproben.

Vinculin

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 5 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

2 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern und

3 Dissektionspräparate.

Kontrollaorta: Beide Präparate zeigten lediglich im inneren Drittel der Media eine positive Reaktion. Weiterhin waren kleinere Arterien angefärbt.

Dissezierte Aortenwand: In der Media war in allen Präparaten zwischen Dissektion und Lichtung ein schmaler Streifen positiv. Ausserdem waren viele undifferenzierte glatte Muskelzellen angefärbt, wobei sich unter dem fibroatheromatösen Polster der Intima ein schmales negatives Areal befand. In der Adventitia zeigten in allen Präparaten kleinere Arterien- und Nervenäste eine weitgehend positive Reaktion.

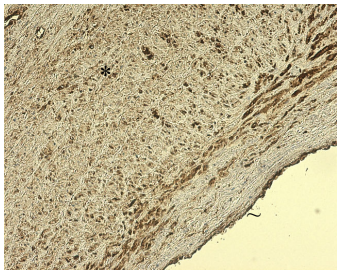


Abbildung 47.
Vinculin- Färbung von
Kontrollgewebe.

Positive Reaktion im inneren
Drittel der Media.

Verdünnung: 1/ 200

Vergrößerung: 4- fach.

* = Media, ~ = Intima

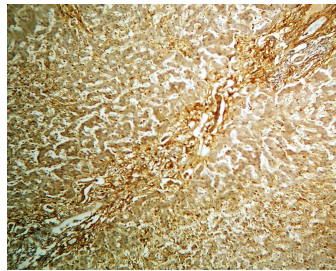


Abbildung 48.
Positive Vinculin- Färbung von
Kontrollgewebe – Leber.

Verdünnung: 1/ 200

Vergrößerung: 10- fach.

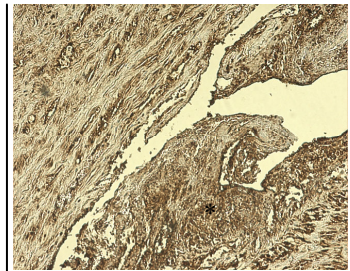


Abbildung 49.
Vinculin- Färbung von
Dissektionsgewebe.

Positiver Streifen im
Dissektionsareal.

Verdünnung: 1/ 200

Vergrößerung: 10- fach.

* = Media, (→) = Dissektions-
kanal

Western- Blot:

Insgesamt wurden 3 Blots ausgewertet.

Je 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multi-
organspendern.

Erwartete Proteingröße: 130 kD (Data sheet Novocastra Lab. Ltd., UK)

Die Bestimmung der Proteinmenge ergab zwar eine Expression der spezifischen Bande und einer etwas unterhalb dieser gelegenen unspezifischen Bande, jedoch konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollproben und den Proben der Dissektionspräparate sichtbar gemacht werden. Weiterhin konnte eine etwas unterhalb der erwarteten Grösse sichtbare Bande nachgewiesen werden, die jedoch ebenfalls keine Unterschiede aufwies.



Abbildung 50.

Vinculin Western- Blot

Darstellung der 130 kD- Proteinbande und einer bei ca. 120 kD gelegenen unspezifischen Bande ohne signifikanten Unterschied zwischen Dissektions- und Kontrollproben. Verdünnung: 1/ 3000, Exposition: 15 Sekunden.

Bande 1- 5: Kontrollproben, Bande 6- 9: Dissektionsproben.

Tenascin- C

Insgesamt wurden 53 Präparate mit 2 unterschiedlichen Verdünnungen ausgewertet. 26 mit einer Verdünnung von 1: 200 und 27 mit einer Verdünnung von 1: 1000.

1: 200

Von diesen waren:

- 9 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,
- 13 Dissektionspräparate,
- 1 Aneurysma- Präparat und
- 3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Die Media zeigte wenige kleinfleckig positive Herde, besonders an der Grenze vom mittleren zum äußeren Drittel. Die Intima zeigte ebenfalls deutlich positive fibroatheromatöse Herde und eine positiv gefärbte Plaquebasis, während die Adventitia überwiegend negativ verblieb.

Dissezierte Aortenwand: Die Gefäßwand wies kleinfleckig herdförmige positive und perivaskulär betonte Reaktionen beidseitig der Dissektion in der Media auf. Die Intima zeigte eine diffuse positive Färbung der Atherome und der fibrösen Anteile.

Aneurysma: Diese Präparate waren massiv positiv um grosse atheromatöse Herde.

Marfan: Der erhaltene Mediastreifen färbte sich etwas entfernt von der Dissektion deutlich positiv, während größere Strecken keine Reaktion zeigten.

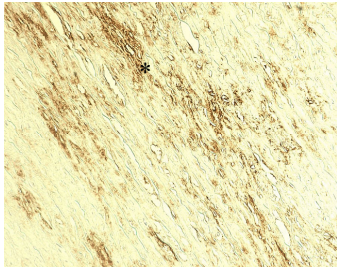


Abbildung 51.
Tenascin- C- Färbung von
Kontrollgewebe.

Kleinfleckige positive Areale
in der Media (*).

Verdünnung: 1/ 200

Vergrößerung: 10- fach

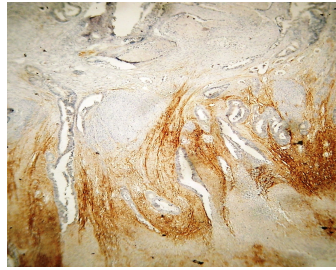


Abbildung 52.
Positive Tenascin- C- Färbung
von Kontrollgewebe- Colon- Ca.

Verdünnung: 1/ 200

Vergrößerung: 10- fach.

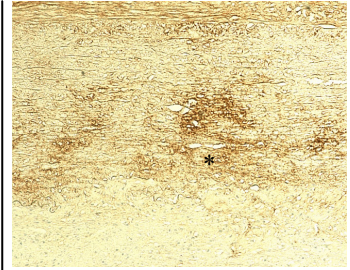


Abbildung 53.
Tenascin- C- Färbung von
Dissektionsgewebe.

Kleinfleckig positive Areale
in der Media (*).

Verdünnung: 1/ 200

Vergrößerung: 10- fach.

1: 1000

Von diesen waren:

- 9 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,
- 12 Dissektionspräparate,
- 3 Aneurysma- Präparate und
- 3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Die Media verblieb überwiegend negativ bis sehr schwach positiv im zentralen Drittel, während die Intima positive fibroatheromatöse Herde, zum Teil auch an der Plaquebasis zeigte.

Dissezierte Aortenwand: Media herdförmig positiv, perivaskulär betont, oft ungefähr in der Mitte der Media. Die Intima war ebenfalls herdförmig positiv, meist diffus in atheromatösen Nekrosen und zeigte auch wenige positive Schaumzellen.

Aneurysma: Hier konnte eine deutlich positive Färbung um die atheromatös veränderten Bezirke gesehen werden.

Marfan: Die Media verblieb bis auf wenige kleinfleckige Herde überwiegend negativ.

Obwohl kaum ein Unterschied in der Farbintensität zwischen Dissektions- und Kontrollgewebe zu sehen war, waren Veränderungen der Gewebestruktur bei den Dissektionspräparaten, die um die Dissektion herum wesentlich stärker eingefärbt waren, deutlich.

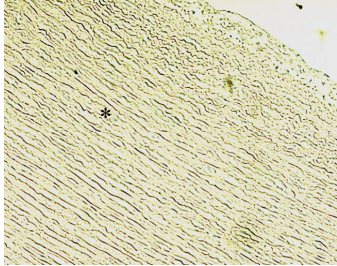


Abbildung 54.
Tenascin- C- Färbung von Kontrollgewebe.
Media negativ (*).
Verdünnung: 1/ 1000
Vergrößerung: 10- fach

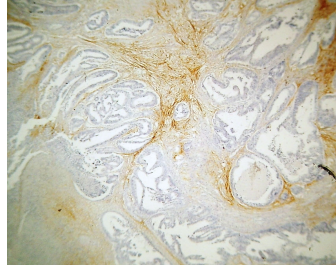


Abbildung 55.
Positive Tenascin- C- Färbung von Kontrollgewebe- Colon-Ca.
Verdünnung: 1/ 1000
Vergrößerung: 10- fach.

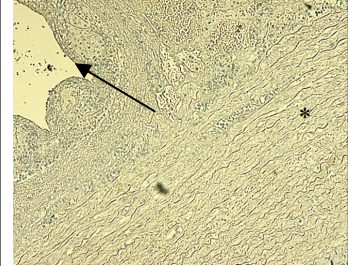


Abbildung 56.
Tenascin- C- Färbung von Dissektionsgewebe.
Media (*) wenig positiv.
(→)= Dissektionskanal.
Verdünnung: 1/ 1000
Vergrößerung: 10- fach.

Insgesamt zeigten beide Verdünnungsstufen ein sehr ähnliches Verteilungsmuster. Die Präparate mit der 1: 1000 Verdünnung zeigten jedoch eine sehr viel schwächere Färbung bzw. überhaupt keine Reaktion des Antikörpers mit dem Mediagewebe.

Western- Blot:

Insgesamt wurden 6 Blots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 3 bzw. 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: 190– 240 kD (OMIM)

Neben einer Bande zwischen 190 und 240 kD war eine zusätzliche, unspezifische, vermutlich durch Degradationsprodukte hervorgerufene Bande knapp unterhalb der spezifischen Größe nachzuweisen, die jedoch beide keinerlei Unterschiede in der Menge zwischen Dissektionspatienten und dem Kontrollkollektiv zeigten.

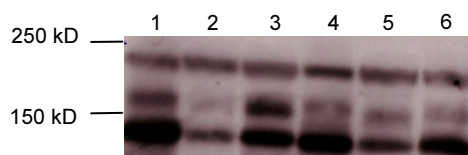


Abbildung 57.

Tenascin- C Western- Blot

Darstellung der Banden bei 190 kD und 240 kD. Desweiteren ist eine unspezifische Bande unterhalb der spezifischen Größe zu sehen. Kein Nachweis von Unterschieden zwischen Dissektions- und Kontrollproben. Verdünnung: 1/ 1000. Bande 1- 3= Kontrollproben, 4- 6= Dissektionsproben.

Zellmotilität/ Zytoskelett

Actin

Immunhistochemie:

Die Färbung zeigte eine unspezifische Reaktion und wurde deshalb nicht ausgewertet.

Western- Blot:

Insgesamt wurden 3 Blots ausgewertet.

Je 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: 42 kD (SwissProt P62736)

Im Western- Blot konnte die Expression bei der spezifischen Größe von 42 kDa nachgewiesen werden, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

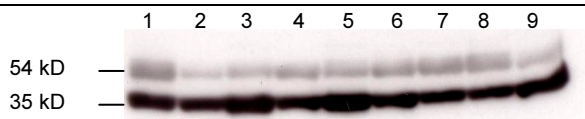


Abbildung 58.

Actin Western- Blot

Darstellung der 42 kD- Bande ohne dignifikanten Unterschied zwischen Dissektions- und Kontrollproben. Exposition: 3 Sekunden. 1- 5: Kontrollproben, 6- 9: Dissektionsproben.

Gelsolin

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 29 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

- 10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,
- 13 Dissektionspräparate,
- 3 Aneurysma- Präparate und
- 3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Im Kontrollgewebe war die Media in allen Präparaten diffus sehr schwach positiv und zeigte zusätzlich wenige positive glatte Muskelzellen um kleinere Gefäße und Nerven herum. Die Intima zeigte ebenfalls in allen Präparaten eine sehr schwache positive Reaktion, meist herdförmig um atheromatöse Plaques herum und vereinzelt auch positive Schaumzellen. Die Adventitia war in allen Präparaten negativ.

Dissezierte Aortenwand: Alle Präparate zeigten eine schwach positive Reaktion der Media um die Dissektion herum bei gleichzeitige Aussparung im Nekrosebereich und eine Anfärbung der Thromben und der Atherombasis. Weiterhin waren die glatten Muskelzellen kleinerer Gefäße und zum Teil auch Nerven angefärbt. Fibroatheromatöse Plaques in der Intima zeigten ebenfalls in allen Präparaten eine positive Reaktion. Zusätzlich zeigte die Adventitia eine positive Reaktion der Granulozyten und Monozyten.

Aneurysma: Die Media war in allen Präparaten negativ. Die Intima zeigte in einem Präparat wenige positive Schaumzellen am Atheromrand und verblieb in den zwei weiteren Präparaten negativ.

Marfan: Die oberflächlich erhaltene Media zeigte in allen Präparaten eine mäßig stark positive Reaktion, wobei ein schmaler Nekrorestreifen inmitten der Media negativ verblieb. In einem Präparat zeigte ein Thrombus eine stark positive Reaktion.



Abbildung 59.

Gelsolin- Färbung von Kontrollgewebe.

Diffus schwach positive Areale in der Media (*).

Verdünnung: 1/ 100

Vergrößerung: 10- fach.

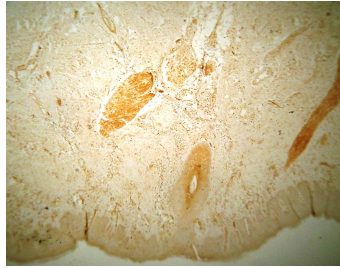


Abbildung 60.

Positive Gelsolin- Färbung von Kontrollgewebe- Haut.

Verdünnung: 1/ 100

Vergrößerung: 10- fach.

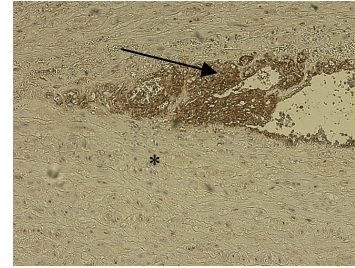


Abbildung 61.

Gelsolin- Färbung von Dissektionsgewebe.

Positive Reaktion der Media (*) um das Dissektionsareal (→).

Verdünnung: 1/ 100,

Vergrößerung: 10- fach.

Western- Blot:

Insgesamt wurden 5 Blots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 3 bzw. 5 bzw. 6 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: 90 + 93 kD [158].

Es konnte eine unspezifische Bande bei 54 kD und eine der spezifischen Größe von 90- 93 kD entsprechende Doppelbande bei 90 kD und 93 kD beobachtet werden, die jedoch keine Unterschiede in der Proteinmenge aufwiesen.

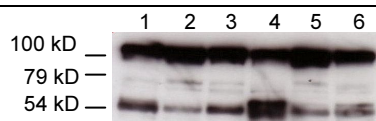


Abbildung 62.

Gelsolin Western- Blot

Darstellung einer unspezifischen 54 kD- Bande und der spezifischen Banden bei 90 kD und 93 kD ohne signifikante Unterschiede zwischen Dissektions- und Kontrollproben.

Bande 1- 3: Kontrollproben, Bande 4- 6: Dissektionsproben.

Myosine heavy chain polypeptase (SMMS- 1)

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 29 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

- 10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,
- 13 Dissektionspräparate,
- 3 Aneurysma- Präparate und
- 3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Das Kontrollgewebe zeigte in 3 Präparaten eine nur schwache Reaktion der Media. 10 Präparate zeigten eine deutlich positive Media, in der zentral und oberflächenparallel größere Abschnitte mit negativer Reaktion zu sehen waren. Glatte Muskelzellen der Intima färbten sich in allen Präparaten gering positiv.

Dissezierte Aortenwand: In diesen Präparaten war die Media bis auf 3 Präparate, die eine nur sehr schwache Reaktion zeigten, deutlich angefärbt, zeigte allerdings dissektionsparallele Aussparung der glatten Muskelzellen.

Aneurysma: Diese Präparate zeigten lediglich in den kleineren Gefäßwänden (Vasa vasorum) positive Reaktionen.

Marfan: Hier waren in allen Präparaten nur kleine positive Nester zu erkennen. Die Media zeigte eine streifenförmige Nekrosezone ohne positive Reaktion, die dissektionsparallel verlief.



Abbildung 63.

SMMS- 1- Färbung von Kontrollgewebe.

Positive Reaktion der Media (*).
Verdünnung: 1/ 4000
Vergrößerung: 10- fach.

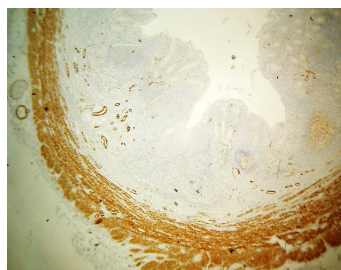


Abbildung 64.

Positive Kontrollfärbung von SMMS- 1- Appendix.

Verdünnung: 1/ 2000
Vergrößerung: 4- fach.

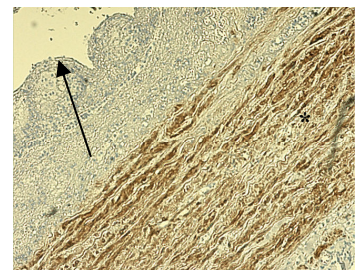


Abbildung 65.

SMMS- 1- Färbung von Dissektionsgewebe.

Positive Reaktion der Media(*)
(→)= Dissektionskanal.
Verdünnung: 1/ 4000
Vergrößerung: 4- fach.

Western- Blot:

Insgesamt wurden 6 Blots ausgewertet.

Je 3 bzw. 4 Proben von Patienten mit Aortendissektion und je 3 bzw. 5 Proben von Multiorganspendern.

Erwartete Proteingröße: Isoform I: 205 kD, Isoform II: 200 kD (Data sheet DakoCytomation, Inc., USA)

Auf Proteinebene war trotz Expression bei 200 kD kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festzustellen.

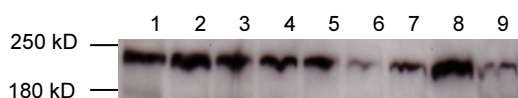


Abbildung 66.

SMMS- 1 Western- Blot

Darstellung der beiden spezifischen Banden bei 200 kD und 205 kD ohne signifikanten Unterschied zwischen Dissektions- und Kontrollproben. Expositionszeit: 5 Minuten.

Bande 1- 5: Kontrollproben, Bande 6- 9: Dissektionsproben.

Metabolismus

Phosphoglucomutase- 1 (PGM- 1)

Immunhistochemie:

Insgesamt wurden 26 Präparate ausgewertet. Von diesen waren:

10 Kontrollpräparate von gesunden Multiorganspendern,

13 Dissektionspräparate und

3 Aortenproben von Marfan- Patienten.

Kontrollaorta: Es war in allen Präparaten eine positive Reaktion der Media zu erkennen, die hauptsächlich perivaskulär basal betont war. Sowohl die Adventitia als auch die Intima waren angefärbt, jedoch wesentlich schwächer als in den Dissektionspräparaten.

Dissezierte Aortenwand: Alle Präparate zeigten eine deutlich positive Reaktion der Media im Dissektionskanal und perivaskulär betont. Weiterhin kam es in allen Präparaten zu einer starken Anfärbung der Thromben und des Granulationsgewebes. Sowohl die Adventitia als auch die Intima waren ebenfalls angefärbt, teils diffus, teils jedoch mit deutlich positiven Makrophagen und Schaumzellen.

Marfan: In einem Präparat war sowohl die Media als auch die Intima negativ, während ein großer Thrombus positiv reagierte. In den anderen beiden Präparaten waren sowohl Media als auch die Intima und die Adventitia im Dissektionsbereich positiv.

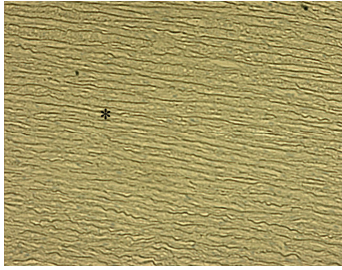


Abbildung 67.

PGM-1 - Färbung von Kontrollgewebe.

Schwach positive Reaktion der Media (*). Verdünnung: 1/ 200, Vergrößerung: 10- fach.

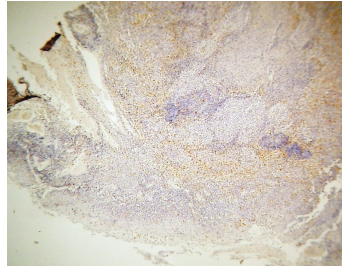


Abbildung 68.

Positive PGM- 1- Färbung von Kontrollgewebe- Tonsille.

Verdünnung: 1/ 200, Vergrößerung: 4- fach.

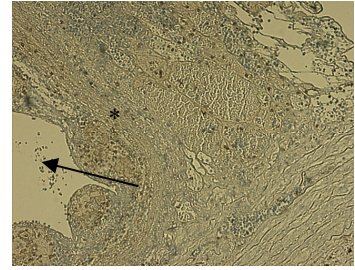


Abbildung 69.

PGM- 1- Färbung von Dissektionsgewebe.

Deutlich positive Reaktion der Media (*) im Dissektionskanal (→). Verdünnung: 1/200, Vergrößerung: 10- fach.

Western- Blot:

Für den Western Blot konnte kein geeigneter Antikörper gefunden werden.

Tabelle 3. zeigt eine Gesamtübersicht aller für diese Arbeit relevanten Gene und ihre Ergebnisse in Immunhistochemie, Western- Blot, Human- Array, Cardiovascular- Array, Affymetrix- GenChip und qRT- PCR als Übersicht.

Tabelle 3. Gesamtübersicht der Ergebnisse in IHC, Western- Blot, Human-Array, Cardiovascular- Array, Affymetrix- GenChip und qRT- PCR.

r= Ratio, p= t- Test= Student's t-Test (Wahrscheinlichkeitsverteilung), n.g.= nicht getestet, n.e.= nicht exprimiert, D= Dissektion, D↑= in der Dissektion hoch reguliert, D↓= in der Dissektion herunter reguliert, ⇔ = keine Veränderung in der Dissektion.

Gen- bezeichnung	Immunhisto- chemie	Western- Blot	Plattform Array-Typ		Affymetrix	qRT- PCR
Human						
Cardio-vascular						
Proteolyse/ Apoptose						
MMP- 2	n.g.	↔	D↓ r=0,35; p= 0,338	↔ r=0,71; p=0,134	↔ r=0,75; p=0,0374	n.g.
MMP- 9	D ↑	n.g.	↔ r=1,43; p= 0,44	↔ r=1,23; p=0,522	↔ r= 1,57; p=0,178	n.g.
MMP- 11	D ↑	↔	D ↑ r= 2,12; p= 0,0005	n.g.	D ↑ r= 3,2; p<0,05	D↓ r=0,57
MMP- 19	↔	n.g.	n.g.	n.g.	D ↑ r= 3,16; p<0,05	n.g.
TIMP- 1	n.g.	↔	D ↑ r=1,83 p= 0,0019	D ↑ r=1,81; p=0,001	↔ r=1,16; p=0,156	n.g.
TIMP- 2	↔	D↓	D↓ r=0,48; p< 0,0001	D↓ r=0,41; p<0,0001	↔ r=0,76; p=0,086	D↓ r=0,53
TIMP- 3	D ↑↑	↔	n.g.	D↓ r=0,24; p=0,001	↔ r=0,72; p=0,339	D↓ r=0,47
HIF- 1α	n.g.	D ↑	↔ r=1,29; p=0,5001	n.g.	D ↑ r=1,69; p=0,0054	D ↑ r=1,86
Zelloberfläche/ Adhäsion						
Kollagen- 4 α1	D↓	↔	n.g.	↔ r=0,87; p=0,916	n.e.	n.g.
α2			D↓ r=0,54; p=0,0033	n.g.	D↓ r=0,44; p=0,033	n.g.
α3			n.g.	↔ r=0,71; p=0,211	↔ r=0,89; p=0,321	n.g.
α4			n.g.	D ↑ r=2,08; p=0,354	n.g.	n.g.
α5			n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
α6			n.g.	↔ r=0,62; p=0,527	D↓ r=0,47; p=0,004	n.g.
PKD- 2	n.g.	↔	↔ r=0,25; p= 0,0526	n.g.	D↓ r=0,37; p=0,0002	D↓ r=0,19; Stufe2
Decorin	↔	n.g.	D↓ r=0,43; p=0,0381	D↓ r=0,34; p=0,015	D↓ r=0,65; p=0,082	D↓ r=0,61; Stufe 1
Elastin	n.g.	↔	n.g.	n.g.	D↓ r=0,41; p=0,0104	D↓ r=0,14; Stufe2
Vinculin	D ↑↑	↔	n.g.	D↓ r=0,22; p=0,001	D↓ r=0,61; p=0,0005	↔/ D↓ r=0,31; Stufe 0/1
Tenascin- C	D verändert	↔	n.g.	D ↑ r=2,56; p=0,005	D ↑ r=6,22; p=0,002	D ↑ r=5,68; Stufe 3
Zellmotilität/ Zytoskelett						
Actin- α2	n.g.	↔	n.g.	n.g.	D↓ r=0,52; p=0,0001	D↓ r=0,19
Gelsolin	D↓ mehr in Entry	↔	n.g.	n.g.	D↓ r=0,49; p<0,01	n.g.
SMMS- 1	D ↑	↔	n.g.	n.g.	D↓ r=0,48; p<0,0001	D↓ r=0,09; Stufe 2
Metabolismus						
PGM- 1	D ↑	n.g.	n.g.	n.g.	↔ r=0,71; p=0,027	n.g.

5. Diskussion

Obwohl die Hintergründe, die der Pathogenese der Aortendissektion zugrunde liegen, seit Langem Gegenstand der Forschung sind, sind die molekularbiologischen Eigenschaften noch weitestgehend ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit baut auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe auf (1, 18, 19), bei denen die Genexpression in der Aorta ascendens von Patienten mit einer akuten Aortendissektion und gesunden Multiorganspendern mit Hilfe von Gen- Chip- Untersuchungen miteinander verglichen wurde (1, 18, 19). Dabei zeigten sich interessante Ergebnisse. In der dissezierten Aorta waren, verglichen mit gesunder Kontrollaorta, Gene für Inflammations-, extrazelluläre Matrixproteolyse-, Proliferations-, Transkriptions- und Translationsprozesse hoch reguliert, während Gene der extrazellulären Matrixproteine, Adhäsionsproteine und Proteine des Zytoskeletts geringer exprimiert waren. Wir schlossen daraus, dass die Aortendissektion Folge eines ungenügenden „injury and repair“- Mechanismus ist. Die Aortenwand von Dissektionspatienten kann nur ungenügend auf Belastungen der Gefäßwand, wie Hypertonie und shear- stress reagieren, weil Komponenten der Gefäßwand, die für die „Festigkeit“ verantwortlich sind, herunter reguliert sind, während andererseits Umbauprozesse stattfinden, erkennbar an Inflammation, einem erhöhten turnover. Eine Theorie ist, dass glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) der Media, in der die Dissektion auftritt, weniger Proteine produzieren, die für die Stabilität der Aortenwandstruktur zuständig sind. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Anzahl der SMC selbst, die diese Gene exprimieren, im Dissektionsprozess reduziert wird (20, 21).

In der vorliegenden Arbeit habe ich auf die Extrazelluläre Matrix fokussiert und Gene der extrazellulären Matrix, die in den Genstudien signifikant unterschiedlich exprimiert waren, mittels TaqMan qRT- PCR validiert und auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und Western- Blotting nachuntersucht.

Extrazelluläre Matrix (ECM)

Die menschliche Aorta besteht aus 3 verschiedenen Schichten: Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die Media, in der der Dissektionsprozess statt findet, ist im Querschnitt die dickste Schicht und enthält fenestriertes Elastin, getrennt durch SMC, Kollagenfasern und Grundsubstanz, wie Proteoglykane und Glykoproteine (22- 24).

ECM: Proteolyse

Matrix- Metalloproteinasen

Wie bereits erwähnt wurde schon zuvor in Studien über Aortenaneurysmen eine signifikante Reduktion der Elastinmenge in der Wand der Aortendisektion gezeigt, was möglicher Weise durch eine hohe Elastaseaktivität zu Stande kommt (25, 26).

MMPs gehören zur Familie der Proteasen, und spielen eine wichtige Rolle in der Hämostase von Bindegeweben. Sie werden von unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert, insbesondere von Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, und Makrophagen.

Sie werden in klassische und neue MMPs unterteilt (27). Die klassischen MMPs werden als Proenzyme in inaktiver, latenter Form sezerniert und im Gewebe durch schrittweise Mechanismen aktiviert (28). Sie enthalten 3 Untergruppen: 1. die interstitiellen Kollagenasen (MMP- 1, -8, -13), welche fibrilläres Kollagen abbauen; 2. Gelatinasen (MMP- 2, -9, ie. Gelatinase A und B), welche auf Kollagen- IV (BM) wirken und auch teils fibrilläres Kollagen und Elastin abbauen und 3. Stromelysine (MMP- 3, -7, -10), die eine breite Substratspezifität (Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Gelatin, Kollagen Typ- IV) haben (27). Plasmin ist an der Aktivierung inaktiver MMPs beteiligt und der Urokinase- Plasminogen- Aktivator (uPA), ein zell- assoziierter Aktivator von Plasmin, spielt eine wichtige Rolle in der perizellulären Aktivierung von Plasminogen (28). Von Bedeutung ist das Plasmin hierbei insofern, als dass es Laminin, Fibronectin, Fibrin und andere extrazelluläre Matrixkomponenten abbaut. Damit begünstigt die gesteigerte kollagenolytische Aktivität, die aus plasmin- vermittelter Aktivierung von MMPs resultiert, die Plaqueruptur in atherosklerotischen Gefäßen (29, 30). Die neuen MMPs werden in

aktiver Form sezerniert oder sind mit der Zelloberfläche assoziiert. Sie enthalten 2 Untergruppen: RXKR- sezernierter Typ (MMP- 11= Stromelysin 3), welches u.a. alpha- 1- Antitrypsin abbaut, und RXKR- Membrantypen (MT- MMP- 1, MT- MMP- 2, MT- MMP- 3, MT- MMP- 4). Fibrinolytische Gene und MMPs werden während der Progression von Aortendissektionen unterschiedlich exprimiert (27). Der MMP- vermittelte Abbau der großen Matrixproteine wie z.B. Elastin und Kollagen erfolgt durch Proteinfragmentierung und führt damit zur Zerstörung der normalen lamellären Struktur der Aortenwand (31). Degeneriertes Elastin induziert Entzündungen und damit die Infiltration der Aortenwand mit Entzündungszellen. MMPs, die von diesen Zellen produziert werden (insbesondere MMP- 9, MMP- 12) führen damit zur Expansion und schließlich zur Ruptur des Aortenaneurysmas. Die Entwicklung, Expansion und Ruptur der Aneurysmen sind streng assoziiert mit progressiver Gewebeerstörung. Dies ist demnach die Folge einer progressiven Imbalance zwischen biomechanischen und biologischen Faktoren. Durch diese Prozesse spielen MMPs somit eine zentrale Rolle in der Entstehung von Aortenaneurysmen. Die MMP- Gewebeaktivität wird durch mehrere Faktoren reguliert: Gentranskription und Synthese inaktiver Zymogene und posttranslationaler Zymogene (32). Zusätzlich binden ihre natürlichen Inhibitoren, die TIMPs, inhibierend an die MMPs im Gewebe und verhindern so eine unspezifische Proteolyse (28).

Ishii und Asuwa (33) untersuchten die frisch dissezierte Aorta ascendens immunhistochemisch und konnten zeigen, dass in der Nähe des Dissektions- Entrys die Expression von MMP- 1 und TIMP- 2 in der Intima und Media, verglichen mit der Aorta descendens weiter distal und verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe, erhöht war.

MMP- 2 und -9 sind zwei der elastolytischen MMPs, die an der Umstrukturierung der ECM und vor allem der BM und am Abbau von Kollagen und Elastin innerhalb der Aortenwand beteiligt. MMP- 2 wird hauptsächlich von Makrophagen und SMC produziert (35). Unter den MMP- positiven Zellen, hauptsächlich Makrophagen, befinden sich die MMP- 2- positiven Zellen in der Intima und die MMP- 9- positiven Zellen in Intima und Adventitia. Frühere Studien haben gezeigt, dass MMP- 2 und -9 in Aneurysmen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erhöht war.

In der Studie von Bachmeier et al. (34) stellte sich MMP- 2 als schwache Bande von Pro- MMP- 2 (72kD) dar.

Diese konnte in der vorliegenden Arbeit zwar auch dargestellt werden, zeigte aber ebenso wie die übrigen Methoden keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

MMP- 9 (92- kD Gelatinase), ein potentes kollagenolytisches und elastolytisches Enzym, wird in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen exprimiert und ist an der Angiogenese und der Entzündungsantwort in Plaques und der Aneurysmenwand beteiligt (36- 39).

Vine und Powell (40) haben MMP- 9 (Gelatinase B) in AAA- Gewebeproben entdeckt und ihre Aktivität in Verbindung mit Entzündungszellinfiltraten gebracht. Über die Erhöhung von Entzündungszellinfiltraten, vor allem Lymphozyten und Makrophagen, die eine potentielle Quelle proteolytischer Aktivität darstellen, wurde bereits in 2 verschiedenen Studien berichtet (28).

Ishii und Asuwa (33), die ebenfalls dissezierte mit normaler Aorta mit Hilfe der Immunhistochemie verglichen, konnten zeigen, dass lokale Veränderungen der Basallaminae der Media eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Aortendissektion spielen. Sie fanden auch heraus, dass in der „Entry- Zone“ der beginnenden Dissektion signifikant höhere MMP- 2 und MMP- 9 Proteinkonzentrationen zu finden waren, als in intakten Gebieten derselben Aorta.

In dieser Studie konnte bis auf eine Anfärbung von Granulozyten, Lymphozyten, sowie Fettzellen der Adventitia in den Dissektionspräparaten, kein Unterschied in der Expressionsmenge von MMP- 2 und MMP- 9 zwischen Dissektion und Kontrolle festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese Genexpressionsstudien die gesamte Aortenwand enthielten und nicht nur speziell die „Entry- Zone“ der Dissektion. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Granulozyten an der Expression wesentlich beteiligt sind, da auch die Immunhistochemie keine signifikanten Unterschiede der glatten Muskelzellen in der

Entry- Zone zeigte. Die Anfärbung der Granulozyten im Dissektionsgewebe konnte hingegen deutlich nachgewiesen werden.

MMP- 11 (Stromelysin- 3)

Wie erwähnt wird Stromelysin- 3 im Gegensatz zu den klassischen MMPs in aktiver Form sezerniert und hat eine abweichende Substratspezifität. Es baut nur in geringem Umfang ECM- Komponenten, wie z.B. Laminin, Fibronectin und Kollagen (41, 42) ab. Stattdessen interagiert es sehr ausgeprägt mit Serin- Protease- Inhibitoren (=Serpinen) (43, 44). Serpine regulieren mehrere Funktionen, die mit dieser Erkrankung assoziiert sind, wie z.B. Blutdruck (45), Fibrinolyse (43), Koagulation (46) oder Lipoprotein- Stoffwechsel (47- 49). Die Gruppe der Serpine besteht aus einsträngigen Proteinen, wie z.B. α 1- Proteinase- Inhibitor (Elastolyse), α 1- Antitrypsin (Lipoproteinabbau, Renininhibitor), α 2- Antiplasmin (Fibrinolyse), α 2- Makroglobulin (Lipoproteinabbau), Plasminogen- Aktivator- Inhibitor (Fibrinolyse), AT- III (Koagulationsprozesse), C1- Inhibitor (Komplementaktivierung), Angiotensinogen u.a.

Humane atherosklerotische Plaques exprimieren Stromelysin- 3 *in situ*, während Fettsäureketten in Kontrollproben wenig oder gar kein Stromelysin- 3 exprimieren. Stromelysin- 3 befindet sich hauptsächlich in Endothelzellen, SMC und Makrophagen innerhalb der Läsion (50). Interessanterweise inhibieren Serpine auch Matrix- abbauende Enzyme, wie z.B. Kathepsine (51). Der Abbau von Matrixkomponenten könnte somit nicht nur von der Imbalance zwischen TIMPs und MMPs abhängig sein, sondern auch durch eine Verminderung dieser Serpine, den Inhibitoren des Matrixabbaus beschleunigt werden.

Die WB- Analyse in einer Studie von Uwe Schönbeck et al. (50) ergab eine kaum erfassbare Immunreaktion von MMP- 11 in den Kontrollen, jedoch ein markant erhöhtes Level der Proteinase in atherosklerotischem Gewebe. Die immunreaktiven Banden hatten molekulare Massen von ~64, 48, 35 und 28 kD, entsprechend der Zymogen-, Intermediär- und Aktivform von Stromelysin- 3 (42, 43, 52- 55). Diese konnten auch hier nachgewiesen werden, zeigten aber quantitativ keine Unterschiede in den beiden Gruppen.

Unsere qRT-PCR hatte ergeben, dass MMP-11 bei den Dissektionen herunter reguliert war. Die Affymetrix-Analyse lieferte keine Ergebnisse und im Clontech-Array war dieser Antikörper stärker exprimiert, was dafür spricht, dass es sich um ein Sondenproblem, und demnach um eine unspezifische Bindung auf dem Array handeln könnte.

MMP-19

Alle MMPs sind beteiligt am Abbau verschiedener Komponenten der ECM während der Entwicklung, Hämostase und unter pathologischen Bedingungen. Weiterhin regulieren sie zelluläre Wachstumsfaktoren und Entzündungsreaktionen durch Spaltung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und ihren Rezeptoren (56).

Kürzlich wurde ein neues Mitglied der MMP-Familie, MMP-19 entdeckt, welches die typische Domäne-Organisation der löslichen Mitglieder der MMP-Familie zeigte, nämlich eine Signal-Sequenz, eine Propeptid-Domäne mit Cystein-Rest, welches essentiell für das Verweilen in der latenten Form ist, eine katalytische Domäne mit der typischen Zink-Bindungsstelle, eine Verbindungsregion und ein COOH-Ende (57). Es unterscheidet sich von den anderen in seiner chromosomalen Lokalisation und Struktur und wird in vivo durch Endothel- und VSMC exprimiert. Durch seine einzigartigen strukturellen Eigenschaften bildet es das erste Mitglied der neuen MMP-Unterfamilie. MMP-19 fehlen verschiedene Eigenschaften, die in anderen MMP-Unterklassen vorhanden sind, wie z.B. Aspartat-, Tyrosin- und Glycinreste nahe der Zink-Bindungsstelle. Die katalytische Domäne von MMP-19 kann die Komponenten der Basalmembran Kollagen-IV, Laminin und Nidogen und auch größere Komponenten wie Tenascin-C Isoformen, Fibronectin und Typ I Gelatin in vitro hydrolysieren, was zu der Annahme führt, dass MMP-19 eine potente Proteinase ist, mit der Fähigkeit, ein breites Spektrum extrazellulärer Matrixkomponenten hydrolysieren zu können.

Weiterhin spielt MMP-19 eine wichtige Rolle im physiologischen Umbau von Bindegewebe und auch in der Morphogenese von Gewebe, in der Gewebereparatur und der Angiogenese (58). Auf Grund seines Vorkommens in physiologischen Gewebe spielt MMP-19 eine wichtige Rolle in deren Umbau oder

der Aktivierung sezernierter und membrangebundener Proteine, wie z.B. Wachstumsfaktoren (59). Die Aktivität der katalytischen Domäne von MMP- 19 wird durch TIMP- 2, -3, -4 und weniger effizient auch durch TIMP- 1 inhibiert. Das latente MMP- 19 wird durch Autoproteolyse aktiviert und kann im Gegensatz zu den übrigen MMPs keine weiteren latenten MMPs aktivieren.

Eine Studie von Impola et al. (60) konnte MMP- 19 in SMC der Media großer Blutgefäße und normaler Haut, wie auch in Endothelzellen akut entzündlicher Synovia- Kapillaren zeigen.

Unsere Affymetrixexperimente von Matrix MMP- 19 zeigten eine erhöhte Genexpression, während die übrigen Methoden keinen Unterschied zeigten, bzw. die Western- Blot- Analyse keine spezifische Färbung aufwies.

Titz et al. (61) behandelten die ECM von Tumoren mit MMP- 19 und analysierten seine Effekte an kapillarähnlichen Strukturen. Daraus resultierte, dass die kapillarähnliche Strukturformation inhibiert wurde. Die Autoren folgerten, dass MMP- 19 eins der Enzyme sein könnte, welches in die Stabilisierung oder Reifung der keimenden Blutgefäße eingreift. Da es sich hier um ausgereiftes Gewebe handelt, blieb hier dieser Effekt aus. Die Überexpression der RNA von MMP- 19 könnte aber möglicherweise ein Hinweis auf einen Umbau der Gefäßwand sein.

TIMPs

Die Aktivierung der MMPs und ihr proteolytisches Potential wird streng durch TIMPs kontrolliert (62, 63). TIMPs inhibieren direkt die matrixabbauenden MMPs und sind weiterhin an der Regulation der Zellform, -funktion und deren Überleben beteiligt, unabhängig vom MMP- inhibitorischen Effekt. TIMPs besitzen auch weitere Funktionen, wie z.B. die Regulation der Angiogenese, Aktivierung von pro-MMP- 2 und Mitogenese (64- 68).

Es sind z. Zt. 4 Mitglieder der TIMP- Familie bekannt, von denen lediglich TIMP- 1, -2 und -3 den Gefäßwänden zugeordnet werden konnten. TIMP- 1 und -2 werden als lösliche Proteine sezerniert, während TIMP- 3 an die ECM gebunden ist. TIMP- 1, -2 und -3 scheinen ungefähr gleich effektiv in der Bindung der katalytischen Seite und

Inhibition der aktiven Form von Stromelysin, Kollagenase und Gelatinasen zu sein (69). TIMP- 1 und -2 interagieren auch noch mit einem separaten C- Terminal an beiden Gelatinasen. TIMP- 1 bindet und verlangsamt die Aktivierung der latenten Pro- Form von MMP- 9 (70) und TIMP- 2 bindet und reguliert die Aktivierung von pro- MMP- 2 sowohl positiv als auch negativ (66, 71).

Durch das überwiegende Vorhandensein der TIMPs in der ECM und der Restriktion der MMPs auf die perizelluläre Umgebung wird ersichtlich, dass TIMPs die Integrität der interstitiellen Matrix schützen. Dies impliziert eine Reduktion der Erosionen in der Media und Stabilisierung der Progelatinase- B, -A und aktive Gelatinase- A, die auch eine β - caseinolytische Kapazität besitzt. TIMPs werden durch neutrophile Elastase und andere Serinproteasen abgebaut (72). Somit kann die neutrophile Elastase die Metalloproteinase- Aktivität steigern, indem sie ihre Inhibitoren inaktiviert. Die X- chromosomale Bindung der wichtigsten TIMPs schafft einen Zusammenhang zwischen der Prädominanz bei Männern und der erhöhten Proteolyse in Aortenaneurysmen.

TIMP- 1

TIMP- 1 ist ein multifunktionales Protein, das sich in den meisten Geweben und Blutflüssigkeiten befindet. Es hat darüber hinaus auch weitere Funktionen, die mit der MMP- Inhibition zusammen hängen könnten oder auch unabhängig von ihr stattfinden, wie z.B. Wachstumsstimulation. Diese mitogenen Effekte von TIMP- 1 auf verschiedene Zelltypen *in vitro* konnten durch zahlreiche Studien belegt werden. TIMP- 1 hatte entweder einen inhibierenden oder keinen Effekt auf die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen *in vitro*. In vivo Studien zeigten eine mit der Überexpression von TIMP- 1 assoziierte Reduktion der Migration der SMC und der Entwicklung der Neointima (73).

Während unsere Clontech- Arrays dies bestätigten, zeigten sowohl der Affymetrix- Array, als auch der Western- Blot keine Unterschiede an.

TIMP- 2

Das zellgebundene TIMP- 2 enthält den intrazellulären und den MT- 1- MMP gebundenen Inhibitor. Das intrazelluläre TIMP- 2, das mit Lysosomen und

Endosomen assoziiert ist, ist bestimmt für einen schnellen Abbau (74), während das membran- assoziierte TIMP- 2 den größeren Anteil des zellulären TIMP- 2 repräsentiert.

Alle von uns angewandten Methoden, bis auf den Affymetrix- Array und die Immunhistochemie ergaben eine schwächere Expression von TIMP- 2 in den Dissektionspräparaten, wobei der Western- Blot keinen auswertbaren Unterschied, aber immerhin eine tendenzielle Reduktion zeigen konnte.

TIMP- 3

TIMP- 3 wird als ein glykosiliertes 24- 29 kD Protein exprimiert und wirkt inhibitorisch auf interstitielle Kollagenase, Stromelysin- 1 und Gelatinase- A und -B. Frühere Daten haben gezeigt, dass TIMP- 3 an Progelatinase- A und auch relativ fest an Gelatinase- A bindet, ähnlich wie TIMP- 2 (75). TIMP- 3 ist ein potenterer MMP- 9- Inhibitor als die anderen TIMPs. Es ist einzigartig in seiner Eigenschaft, in der ECM lokalisiert zu sein und an diese zu binden, wo es MMPs neutralisiert und das Überleben der Zelle beeinflusst (76). Die Apoptose wird durch den N- Terminus von TIMP- 3 vermittelt, welches die MMP- Inhibitor- Domaine besitzt. TIMP- 3- induzierte Apoptose ist charakterisiert durch Zellschrumpfung, Abrundung, Membranbläschenbildung und Lösung der Zelle von der Verankerung. Die Induktion des apoptotischen Zelltods durch TIMP- 3- Überexpression wurde schon in vaskulären Zellen und Krebszellen *in vitro* und *in vivo* gezeigt (77). Zu den nützlichen Effekten von TIMP- 3 gehören sowohl die Zellmigration als auch die Zellinvasion durch MMP- Blockade, reduzierte Angiogenese und eine erhöhte Apoptoserate, Letzteres durch teils ungeklärte Mechanismen. Weiterhin induziert TIMP- 3 eine mitochondriale Aktivierung, die anhand des Verlusts des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Zytocrom- C demonstriert werden konnte. Depolarisation der Mitochondrienmembran und Auslösung von Zytocrom- C belegen, dass Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der durch TIMP- 3 induzierten Regulation der Apoptose spielen.

Wir konnten die Erkenntnis, dass TIMP- 3 überall in der Media der Aorta, hauptsächlich extrazellulär, vorhanden ist, durch Anwendung immunohistochemischer Methoden bekräftigen.

Die endogenen TIMP- 3 Level sind höher in Schulterregionen der atheromatösen Plaques, dort, wo eine erhöhte Apoptoserate der vaskulären glatten Muskelzellen zur Destabilisierung und Ruptur führt. Unsere Daten belegen, dass TIMP- 3 ein voll funktionsfähiger MMP- Inhibitor ist und seine Rolle in der Regulation der Proteinasen *in vivo* der Rolle von TIMP- 1 und -2 gleicht. Die Unterschiede resultieren lediglich aus der abweichenden Lokalisierung in der ECM, der gewebespezifischen Expressierung und der Art der Regulierung. Die Mikroarrays und die qRT- PCR konnten diese Daten nicht stützen, sondern zeigten eine eher schwächere Tendenz. Dies weist darauf hin, dass es zwar keinen Unterschied in der Proteinmenge, wohl aber in der Verteilung zu geben scheint.

HIF- 1 α

HIF- 1 α ist ein heterodimerischer DNA- Komplex, der aus 2 Untereinheiten besteht, 1 α und 1 β . Die HIF- 1 α - Untereinheit ist ein 826- Aminosäuren- Protein, welches spezifisch für HIF- 1 α ist, während HIF- 1 β identisch mit dem ARNT- Protein (Basis) ist und mit anderen Basis- Helix- Loop- Helix- Proteinen dimerisieren kann. HIF- 1 α - Proteinlevel, die das Level der HIF- 1 α - DNA- Bindung und –Transkriptionsaktivität bestimmen, steigen exponentiell mit dem Abfall der Sauerstoffkonzentration an [78]. Somit ist dieser DNA- bindende Komplex ein Schlüsselenzym zur Regulation der Genexpression bei Veränderungen der zellulären Oxygenierung [79]. Unter Hypoxie steigen sowohl HIF- 1 α - Proteinlevel, als auch die Aktivität der HIF- 1 α - Aktivierungsdomänen [80, 81]. Die Expression des HIF- 1 α - Proteins wird auch in verschiedenen pulmonalen Zelltypen, vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen, sowohl *in vivo* als auch in der Zellkultur durch Hypoxie induziert [82].

Diese vorliegenden Daten konnten durch fast alle in dieser Studie angewendeten Methoden bestätigt werden. Während der Western- Blot eine tendenzielle Erhöhung der Expression im Dissektionsgewebe ergab und der Affymetrix- Array dies unterschätzte, ergab die qRT- PCR nur eine grenzwertige Erhöhung und die Clontech- Arrays einen nicht signifikanten Unterschied beider Gruppen. Die Immunhistochemie konnte aufgrund unspezifischer Reaktionen nicht ausgewertet werden.

ECM: Zelloberfläche und Adhäsion

Endothelzellen leiten sich aus dem primitiven Mesoderm ab [83], was bei Erwachsenen ein simples squamöses Epithel darstellt, aus dem sich das kardiovaskuläre und lymphatische System entwickelt. In vivo haften Endothelzellen an der Basalmembran und sind unter normalen Bedingungen meist unbeweglich [84, 85]. Die extrazelluläre Matrix von Bindegeweben setzt sich aus Molekülen zusammen, die vier Proteinfamilien angehören: Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine und Elastin. Die menschliche Aorta enthält 12- 24 g Kollagen und 28- 32 g Elastin pro 100 g Gewebe [23].

Kollagen

Kollagene sind Strukturproteine der extrazellulären Matrix mit einer oder mehreren Triple- Helix- Domäne [86- 91]. Dieser Grundstruktur liegt eine Vereinigung von drei Polypeptidketten zugrunde, die eine charakteristische Aminosäure- Sequenz hervorbringen. Neunzehn Kollagentypen wurden bisher beschrieben. Alle Kollagene besitzen Triple- Helix- Domänen, aber in unterschiedlicher Zusammenstellung. Die Struktur und die Funktion des Moleküls in der extrazellulären Matrix hängen von der Anzahl, der Grösse der helikalen Domänen und der Grösse der globulären Domänen, die sie unterscheiden, ab. Kollagene können weiterhin in zwei Untergruppen unterteilt werden: fibrilläre und nicht fibrilläre Kollagene [92]. Kollagen Typ- IV gehört zur Gruppe der nicht fibrillären Kollagene und ist ein essentieller Bestandteil der Basalmembran, in der es ein Gerüst bildet, mit dem weitere Membranbestandteile, wie z.B. Laminin, Fibronectin oder Heparansulfat assoziiert sein können [93]. Das Kollagen- IV Molekül hat mindestens 2 bioaktive Domänen, welche die verschiedenen Effekte an Endothelzellen vermitteln können, die für das Zellwachstum und Reparaturmechanismen von großer Bedeutung sind. Dadurch ist es sehr aktiv an der Adhäsion und Migration aortaler Endothelzellen beteiligt [92].

Schwer verdickte Typ- IV Kollagenstrukturen, die die glatten Muskelzellen umgeben, konnten in fibrösen Plaques, aber nie in der unbeschädigten Intima gefunden werden [94, 95]. Die Ketten des Typ- IV- Kollagens sind zu einem supramolekularen Netzwerk zusammengefügt, das sich nur in der Zusammensetzung der Ketten unterscheidet. 6 Ketten des Typ- IV- Kollagens sind in 3 Hauptnetzwerke getrennt

[96]. Die Genexpression von Typ- IV- 2 und -5 war in der Dissektion herunter-reguliert. Sariola [97] hatte schon zuvor Defekte im Typ- IV- Kollagen um glatte Muskelzellen bei der Aortendissektion mit Hilfe der Immunhistochemie gezeigt. Defekte in der Basalmembran von glatten Muskelzellen konnten bei der zystischen Mediafibrose und der Medianekrose in der gesamten Media, jedoch keine Defekte in der Expression interstitieller Kollagene, Typ- I und -III, gesehen werden.

Die Immunhistologie und auch der Western- Blot konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede in der Menge des Kollagen- IV- Proteins zwischen Dissektion und Kontrolle zeigen.

PKD- 2

PKD- 2 oder Polycystin 2 ist das Produkt des mutierten Gens in der autosomal dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) und familiäre Häufung von Aortendissektionen [98]. Die ADPKD wird durch eine Mutation von mindestens 2 unterschiedlichen Genen, pkd- 1 und pkd- 2 hervorgerufen [99- 102]. Ihre Proteinprodukte, PKD- 1 und PKD- 2 (bzw. Polycystin- 1 und Polycystin- 2) sind große membrangebundene Proteine, die vermutlich eine Rolle in der Signaltransduktion und Calciumregulation spielen [99- 102]. Ein Großteil von PKD- 2 befindet sich im ER, in der es als kalziumabhängiger, intrazellulärer Kalziumkanal fungiert [103]. Ein signifikant geringerer Anteil befindet sich in der Plasmamembran, in der es als nichtselektiver Kationenkanal fungiert [104- 106] und die ECM durch fokale Adhäsionsproteine mit dem Aktin- Zytoskelett verbindet [107, 108].

Gefäßveränderungen, wie z.B. intrakranielle Aneurysmen und Dissektionen der thorakalen Aorta sind wichtige extrarenale Manifestationen der ADPKD [109- 119]. Torres et al. [116] zeigten, dass PKD- 2 mRNA und Polycystin- 2 auch in kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta exprimiert werden und das Verteilungsmuster der Expression von Polycystin- 2 in normalen elastischen und großen Arterien dem von Polycystin- 1 gleicht und detektierte im Western- Blot eine 110 kD- Bande in der 100.000 x g- Fraktion der ASMC- Homogenate.

Dies konnte zwar in dieser Studie ebenfalls gezeigt werden, jedoch wies weder der Western- Blot, noch die Atlas- Arrays eine Veränderung zwischen Dissektion und Kontrolle nach. Der Affymetrix- GenChip hingegen zeigte eine schwächere

Expression der Dissektionsproben, was auch durch die qRT-PCR bestätigt werden konnten. Die immunhistochemische Färbung verblieb trotz Verwendung von 2 verschiedenen Antikörpern unspezifisch, so dass sie nicht weiter ausgewertet wurde.

Decorin

Decorin fördert den Verkalkungsprozess in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand und wird auch als ein Promoter des intimalen Verkalkungsprozesses angesehen [120]. Es gehört zur großen Gruppe der Proteoglykane, deren Hauptfunktion darin besteht die Zelladhäsion, Migration und Proliferation zu regulieren [121-123]. Es besteht aus einem 38.000-dalton Mr-Hüllenprotein, das eine Dermatansulfat- oder Chondroitinsulfat-Kette besitzt und wird im Knochengewebe und den meisten kollagenhaltigen mesenchymalen Geweben, wie z.B. der Gefäß-Adventitia und der Adventitia von Hautgewebe exprimiert [124, 125]. Weiterhin reguliert Decorin auch die Umwandlung der Growthfactor- β Aktivität [126], der Kollagen-Fibrillogenese [124, 127] und kontrolliert Tumorzellproliferationen [128].

Während der Arteriosklerose und Restenose kommuniziert extrazelluläres Decorin mit glatten Muskelzellen und Kollagen Typ- I und -III im faserigen Anteil und mit glatten Muskelzellen und Makrophagen in der Hüllenregion [129, 130].

Des Weiteren interagiert es mit ECM-Proteinen und mit Makromolekülen, die die Gefäßwand durchdringen können, wie z.B. LDL [131], was auch zu eben diesen Ergebnissen der von uns durchgeführten Immunhistochemie führte, nämlich der positiven Reaktion der Adventitia mit ihren Fettzellen, während die Array- und qRT-PCR-Methoden keinen Unterschied der Decorin-Expression zeigen konnten. Der Western-Blot lieferte mit diesem Antikörper keine Ergebnisse.

Die ECM enthält viele Glykoproteine, welche an Zelloberflächenproteine binden und Zell-Matrix- und Zell-Zell-Verbindungen aufbauen [23].

Unsere Analyse ergab herabgesetzte Expressionslevel einiger Gene in der Dissektion, z.B. der Gene, die Fibulin-5, das Zelloberflächenprotein MUC-18,

SPARC-like-1 (Osteonectin), Clusterin und Connexin-43 kodieren. Weiterhin war die Expression verschiedener Integrine der erkrankten Aorta ebenfalls erniedrigt.

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren an der Zelloberfläche. Der Gewebeumbau hängt von der Integrin-Matrix-Signalisierung und -Interaktion ab [24]. Wir konnten auch beobachten, dass die Expression der beiden Gene Polycystin-1 und -2 erniedrigt war.

Elastin

Elastin ist ebenfalls eines der wichtigsten Matrix-Strukturproteine der Arterienwand [132-138]. Es ist das Hauptprotein der extrazellulären Matrix großer Arterien, wie z.B. der Aorta, das ihnen Dehnbarkeit und elastischen Widerstand verleiht. Wie die meisten der Strukturproteine wird auch Elastin als Monomer, Tropoelastin, synthetisiert und wird nachträglich zu einer stabilen, polymeren Struktur der extrazellulären Matrix [139, 140]. Es besteht aus löslichen Untereinheiten, welche intermolekular in ein fibröses Netzwerk verstrickt sind (Desmosin- und Isodesmosin-Verbindungen) und somit ein hoch polymerisiertes, unlösliches Protein bilden.

In der normalen Aorta bildet Elastin eine gerüstähnliche, ununterbrochene Struktur, bestehend aus elastischen Fasern und interlaminären Fasern, die die einzelnen Schichten zusammen halten [136, 137, 141-143]. Reifes Elastin ist ein sehr stabiles Protein mit einer biologischen Halbwertszeit von ungefähr 70 Jahren [135, 136]. Die elastische Struktur und ihre Bestandteile in der Media sind wesentliche Komponenten, die zur Stabilität und Festigkeit der Aorta beitragen. Wenn es im Gewebe abgelagert ist, ist das polymerisierte Elastin nicht mehr am Umbau der Matrix beteiligt, erhält aber dessen Elastizität während tausender Zyklen von Dehnung und Rückstoß. Es wird in der frühen Kindheit synthetisiert und abgelagert und im weiteren Leben nicht mehr signifikant synthetisiert [135, 136].

Im Alter wird die Struktur der Aorta modifiziert: sie dilatiert und verdickt sich durch Fragmentation und Kalzifizierung elastischer Fasern [137, 141, 143, 144]. In der dissezierten Aorta bekommen die interlaminären elastischen Fasern eine irreguläre Struktur und Form und werden reduziert [141, 142]. Diese zerstörte Struktur und der Abbau der interlaminären elastischen Fasern führt zu einer Instabilität der Media und

einer Schwäche gegenüber äußerer Kräfte, speziell jener, die zu einer Dissektion führen können.

Die eigentliche Pathologie der dissezierten Media entsteht mit einem Anstieg des Elastinabbaus [141, 142]. Wenn bereits ein Riss existiert, neigt die Dissektion dazu, sich in die abgebauten Elastinschichten auszudehnen und dort ein entzündliches Infiltrat, die Hauptquelle proteolytischer Enzyme, wie Elastasen und Metalloproteinasen, die den dramatischen Zerfall des Elastinnetzwerkes der Media fördern, zu bilden [143, 145, 146]. Polymeres Elastin ist in nahezu allen Reagenzien unlöslich, ausser in denen, die Polypeptidbanden spalten. Somit werden dann die löslichen Elastinfragmente ins Blut freigesetzt [147].

Die mehr als doppelte Reduktion der Genexpression von Elastin in der Dissektion, die bereits die Affymetrix- Analyse und die quantitative RT- PCR zeigten, konnte auf der Proteinebene nicht gesehen werden [147]. Abgesehen vom Kollagen- IV haben wir eine verminderte Genexpressionen von Kollagen- XVIII und vom Proteoglykan Decorin in der Dissektion gefunden, dessen Proteine eine hohe Affinität zu Kollagen- I und -III- Fibrillen besitzen.

Vinculin

Vinculin ist ein 130 kD Zytoskelett- Protein, befindet sich in verschiedenen adhäsiven Zellstrukturen aller Zellen und gilt als ein ubiquitärer Marker der Microfilament- Membran mit Zell- Zell- und Zell- Matrix Verbindungsstellen [148]. Es wurde in Verbindungsplatten aller adhären Strukturen nachgewiesen und wird in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, vor allem aber in Blutplättchen [149]. *In vivo* befindet es sich nahe der Membran- Aktin- Filamentverbindungen. Obwohl es nicht direkt mit F- Aktin und der Plasmamembran interagiert, wird angenommen, dass dieses Protein eine Schlüsselrolle in Microfilament- Verbindungen spielt [150]. Als eine der Hauptkomponenten der fokalen Adhäsion und Zonula adhärens Verbindungen, ist es vermutlich an der Verkettung der Mikrofilamente in Bereich der Zellverankerung und Zell- Zell- Kontakten beteiligt. Es ist Teil eines Proteinkomplexes, das einen submembranalen Plaque bildet und das Aktin- Zytoskelett mit den transmembranalen Integrin- oder Cadherin- Adhäsionsrezeptoren verbindet. Vinculin ist in allen Zelltypen zu finden und seine Organisation und Expression wird

bei Veränderung der Zellform und Zelldichte, während der Zellmigration *in vivo*, nach Wachstumsstimulation durch Serumfaktoren, und während der Differenzierung verschiedener Zelltypen und der Embryonalentwicklung reguliert [151].

Diese Studie ergab, dass die Genexpression von Aktin- 2 selbst und einigen aktinbindenden Proteinen (Aktinin- 1 und -4, Vinculin, Gelsolin, Filamin- A, Makrophin oder aktinbindendes Protein ABP620) in den Dissektionspräparaten reduziert ist. Allerdings zeigte Vinculin in den Dissektionspräparaten einen Unterschied im Proteinverteilungsmuster. Die Media war in den Dissektionspräparaten überwiegend positiv, während die Media im gesunden Gewebe nur inneren Drittel angefärbt wurde, was die bisherigen Informationen bestätigt.

Tenascin- C (Tn- C)

Tenascin, auch Hexabrachion oder Cytotactin genannt, ist ein großes extrazelluläres Matrix- Glykoprotein, welches in verschiedenen Geweben mit der Zellproliferation während der Embryogenese und pathologischen Prozessen assoziiert ist [152] und an der Angiogenese, Zelladhäsion und Migration beteiligt ist. In regenerativen Geweben spielt Tenascin- C auch eine Rolle im Zellwachstum, Zellbewegung, endothelialer Zellkeimung und MMP- Gen- Expression [153]. Es ist ein oligomerisches Glykoprotein und enthält an seinem Aminoterminal ein zysteinreiches Segment, gefolgt von epidermal growth factor- like repeats, Fibronectin Typ- III- Repeats und einem globulären Carboxylterminus (homolog zu Fibrinogen) [154]. Tenascin- C inhibiert die Verbindung der Fibroblasten und Endothelzellen mit verschiedenen Adhäsionsproteinen [155].

Die funktionale Aktivität von Tenascin in glatten Muskelzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Eine der interessanten Eigenschaften von Tenascin- C ist, dass das Molekül zwischenzeitlich in verschiedenen Arealen, in denen Migration oder Motilität statt findet, exprimiert werden kann. Diese räumlich und zeitlich beschränkte Verteilung legt nahe, dass es eine Schlüsselrolle während der Gewebeumwandlung besitzt und seine Expression die Krankheitsaktivität widerspiegelt. Eine Verletzung induziert die Tenascin- C- Expression innerhalb von 1 bis 24 Stunden in fast allen Geweben, vor allem in Arterien [153].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen diese Erkenntnisse. Die Histologie zeigte eine veränderte Verteilung im Dissektionsgewebe, und alle übrigen Methoden zeigten auch eine enorm signifikante Veränderung im Sinne einer Überexpression im Dissektionsgewebe. Der Western- Blot zeigte zwar keine Unterschiede, jedoch konnten zusätzlich zu der erwarteten Bande mehrere Banden identifiziert werden, die am Ehesten Degradationsprodukten entsprechen.

Zellmotilität und Zytoskelettproteine

Actin

Actin ist eins der vielen Proteine, welches von Caspasen während des apoptotischen Zelltodes abgebaut wird, jedoch ist die Rolle dieses Abbaus bisher ungeklärt. Die einzelnen Filamente sind zu Aktinbündeln zusammengefasst. Actin- Mikrofilamente zerreißen, wenn Zellen der Apoptose unterzogen werden. Im Gegensatz zu anderen zytoskelettalen Proteinen handelt es sich bei der Auflösung der Aktinfilamente in apoptotischen Zellen nicht um eine Proteolyse, sondern eher um eine Depolymerisation von F- Aktin zu G- Aktin, welche sodann in der löslichen Fraktion der Zellen nachgewiesen werden kann. Die F- Aktin- Depolymerisation wurde auch in anderen Zelltypen nachgewiesen, die als Folge verschiedener apoptotischer Stimuli einer Apoptose unterzogen werden. Dies legt nahe, dass die Zerreissung des Mikrofilament- Netzwerks durch verschiedene Prozesse induziert wird, wie z.B. durch Depolymerisation oder Proteolyse [156]. Andere Studien zeigten, dass während der Apoptose das Aktin- Netzwerk in kugelförmigen Strukturen reorganisiert wird und somit die Apoptosebläschen vom Rest des Zytosols trennt [157].

Unsere Affymetrix- Analyse ergab mit mehr als sechsfacher Verminderung eine mehr als signifikante Reduktion, was auch durch die qRT- PCR nachgewiesen werden konnte. Die immunhistologische Anfärbung konnte jedoch keine spezifische Färbung zeigen.

Gelsolin

Gelsolin, ein multifunktionales, Actin- bindendes Protein, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Actin- Aggregation und dessen Abbau im Zytoplasma hochmotiler Zellen, wie z.B. Makrophagen und Thrombozyten [158]. Es ist unter den Wirbeltier- Proteinen in seiner Eigenschaft, sowohl zytoplasmatisch, als auch sezerniert vorhanden zu sein, einzigartig. SMC enthalten Gelsolin in hohen Konzentrationen [159]. Auf mRNA- Ebene besitzen SMC und kardiale Zellen den höchsten Anteil. SMC synthetisieren sowohl die zytoplasmatische als auch die sezernierte Form von Gelsolin [158]. Der Unterschied zwischen Plasma- Gelsolin und Zytoplasma- Gelsolin besteht in der 25- Aminosäurerest- Verlängerung und seinem aminoterminalen Ende. Die beiden Gelsoline werden durch unterschiedliche mRNAs kodiert, welche eine einheitliche 5'- Sequenz, jedoch unterschiedliche 3'- Sequenzen besitzen [160].

Die Multifunktionalität von Gelsolin kann teils dadurch erklärt werden, dass es drei Actin- Bindungsstellen besitzt [161]. Das NH₂- terminale Ende besitzt zwei unterschiedliche Actin- Bindungsdomänen: eins besitzt Actin- auflösende Aktivität, während das andere an Actinfilamente bindet. Das COOH- Ende des Peptids bindet reversibel Actin und wird durch Ca⁺⁺ reguliert [162]. Weiterhin wird Gelsolin auch durch Polyphosphoinositole reguliert [163- 165], was vermuten lässt, dass Gelsolin eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Reorganisation des Zytoskeletts spielt.

Zytoplasmatisches Gelsolin wurde erstmals in hochmotilen Zellen, wie z.B. Leukozyten beschrieben, wo die Actin-Polymerisation dynamisch ist. Sowohl zytoplasmatisches, als auch sezerniertes Gelsolin löst Actinfilamente auf, bildet Polymerisationskerne für G- Actin und bindet an das schnell wachsende Ende der Actin- Polymere [166- 169]. Dennoch exprimieren ASMC trotz ihrer stabilisierenden Actin- Bündel hohe Mengen an Gelsolin. Die sekretorische Form kommt in tierischen Seren vor und wird auch als „Actin- depolymerisierender Faktor“ oder „Brevin“ bezeichnet [170]. Plasma- Gelsolin, welches in einer Konzentration von >200 µg/ ml im humanen Plasma vorhanden ist, hat eine protektive Funktion durch die Unterstützung des Abbaus von Actin- Filamenten, die während einer Gewebeverletzung freigesetzt werden. Es spielt auch eine wichtige unterstützende Rolle in der schnellen Beseitigung der Actin- Filamente aus der Zirkulation, der Abwehr der kapillären Blockade und lokalisierten Thrombose [171].

Der Abbau der Actin- Filamente im Plasma und Interstitium wurde als eine der Hauptfunktionen des Plasma- Gelsolins angesehen. Dennoch ist die Funktion von Gelsolin in SMC und anderen α - SM- Actin- enthaltenden Zellen, wie z.B. Myoepithelzellen [172], sehr komplex in Bezug auf ihren hohen Gehalt an stabilisierenden Microfilamenten. Es kann lokal mit der das Muskelgewebe umgebenden interstitiellen Flüssigkeit interagieren.

Unser Affymetrix- Test ergab mit zwei verschiedenen Sonden eine Reduktion des Gelsolin- RNA- Gehaltes im Dissektionsgewebe, was auch im histologischen Bild erkannt werden konnte. Wir haben reduzierte Expressionslevel einiger myofibrillären Gene festgestellt, die zum Kontraktionssystem glatter Muskelzellen bei Dissektionen gehören. Eine mögliche Erklärung könnte ein Verbrauch glatter Muskelzellen in der Media der dissezierten Aorta sein. Ein Verlust der Kontraktilität bedeutet gleichsam eine Reduktion der Widerstandskraft gegenüber pulsativer hämodynamischer Belastungen.

Glatte Muskelzellen

Myosine heavy chain polypeptase (SMMS- 1)

VSMC zeigen ungewöhnliche Wachstumseigenschaften bei Erkrankungen wie Bluthochdruck und Atherosklerose. Es ist belegt worden, dass SMC- Wachstum durch Hypertrophie und Zellteilung beschleunigt werden kann [173]. Das Zytoskelett ist ein dynamisches intrazelluläres Netzwerk, welches die Zellmorphologie und –motilität und auch den intrazellulären Transport reguliert. Es ist zusammengesetzt aus 3 wesentlichen Proteinfilament- Typen: Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Das Hauptprotein der Zytoskeletts in den meisten Zellen ist Aktin, welches polymerisiert und Aktinfilamente bildet (Mikrofilamente).

Glatte Muskelzellen verändern ihre Grösse während der normalen Entwicklung und synthetisieren kontraktile Proteine, wie z.B. MHC und α - Actin, welche charakteristisch für die vollendete Differenzierung sind. Adulte SMC besitzen die Fähigkeit, wieder in den Zellzyklus einzutreten, wenn sie durch entsprechende Mitogene adäquat stimuliert werden. Mit dieser proliferativen Reaktion ist der Verlust der dicken Myosinfilamente und der Kontraktionsfähigkeit verbunden.

Gleichzeitig reichern sie vermehrt synthetisierende Organellen an und steigern die Sekretion extrazellulärer Matrix- Proteine. Myosin, ein essentieller Bestandteil der kontraktilen Elemente des Sarkomers, kommt in verschiedenen Isoformen vor, welche in einer gewebespezifischen Art verteilt sind und abhängig vom Entwicklungsstadium reguliert werden [174].

Das SM- Molekül besteht aus 2 schweren und 2 essentiellen leichten Ketten, sowie aus 2 regulatorischen Leichtketten. Ein SM- MHC- Dimer hat 2 N- terminale globuläre Köpfe, an denen die ATP- und Actin- Bindungsstellen lokalisiert sind, und ein gekringeltes Spiralstäbchen, bestehend aus 2 SM- MHC α - helikalen C-terminalen Enden. Biochemische und immunochemische Studien konnten zeigen, dass es Strukturunterschiede in der Zusammensetzung der MHC adulter und in der Entwicklung befindlicher Muskelgewebe gibt [175]. Adultes ASM besteht aus 2 MHC vom SM- Typ, die als MHC- 1 (205 kD) und MHC- 2 (200 kD) bezeichnet werden. Im fetalen Stadium der Entwicklung enthält VSMC nur MHC- 1 und kein MHC- 2.

Addinger und Murphy [176] zeigten durch Genkartierung, dass die strukturellen Unterschiede zwischen SM- 1 und SM- 2 im leichten Meromyosin liegen könnten.

In dieser Studie war mit allen Methoden eine signifikante Reduktion im Dissektionsgewebe, bzw. in der Histochemie eine Umverteilung nachweisbar.

Metabolismus

Phosphoglucomutase- 1 (PGM- 1)

Dieses Enzym katalysiert den Transfer einer Phosphatgruppe zwischen der ersten und der sechsten Position des Glucosemoleküls [177] und spielt somit sowohl im Glykoneogenese- als auch im Glykolyse- Zyklus eine bedeutende Rolle.

Unsere Affymetrix- Analyse ergab eine nur grenzwertig signifikante Tendenz der Überexpression, was auch anhand der Immunhistochemie bestätigt werden konnte. Der Antikörper eignete sich jedoch nicht für eine Western- Blot- Analyse.

6. Zusammenfassung

Obwohl die klinische Signifikanz dieser Studie zur Zeit noch nicht definitiv eingeschätzt werden kann, zeigen die Daten der sowohl auf molekularbiologischer Ebene, als auch auf Proteinebene unterschiedlich exprimierten Gene, wesentliche, der Entstehung der Aortendissektion zugrunde liegende biologische Prozesse. Die Genexpressionsstudien, die akut disseziertes und gesundes Kontrollaortengewebe miteinander verglichen, zeigten wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Während einige Gene, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, im Dissektionsgewebe hochreguliert waren, waren viele Gene, die Stabilität und Integrität der Aortenwand vermitteln, herunterreguliert.

Die Darstellung der Expression in Aortendissektionen war mit einer exzellenten Genauigkeit fähig, biologisch wichtige Veränderungen der Genexpression zu entdecken, die vermeintlich ausschließlich mit der Aortendissektion assoziiert sind, und gab wichtige Folgeeffekte der Gewebeumstrukturierung und -Dysfunktion der Aortenbestandteile für künftige fundamentale Analysen zu erkennen. Damit wurde ein wichtiger Baustein für Folgeuntersuchungen gesetzt. Dies ermöglichte somit in der Tat weitere Untersuchungen der Expression und Darstellung einiger extrazellulär lokalisierten Matrixkomponenten, des Zytoskeletts und von Adhäsionsproteinen durch eine Ausweitung von der molekularen Ebene auf die Proteinebene.

Die Veränderungen der Menge auf Proteinebene waren jedoch insgesamt zu gering, um sie auf Proteinebene darzustellen, so dass der Western- Blot, der selbst Zweifacherhöhungen nur ungenau darzustellen vermag, in seiner Aussagekraft in den meisten Fällen versagte. Dies legte die Vermutung nahe, dass nicht nur die Menge der Gene entscheidend war, sondern auch deren Verteilung im Gewebe verändert sein könnte.

Um eine visuelle Analyse zu ermöglichen und diesen Verdacht zu bestätigen, folgten schließlich immunhistochemische Färbungen, welche viele Ergebnisse im Wesentlichen bestätigen konnten. Während die Gene, die für die Adhäsion und Zelloberflächenstrukturen kodierten, keinen wesentlichen Unterschied zeigten, waren

wie erwartet die Gene der Proteolyseproteine überexprimiert und die der Zellmotilität herabgesetzt.

Die Aortendissektion scheint somit der dramatische Endpunkt eines nachhaltigen Abbauprozesses zu sein, der mit einer nur insuffizienten Umstrukturierung der Aortenwand beantwortet wird.

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist neben der glatten Muskulatur ein Hauptbestandteil von Gefäßen. Die extrazelluläre Matrix von Bindegeweben weist ausser den Kollagenen und dem Elastin auch verschiedene Proteoglykane (früher saure Mucopolysaccharide), Hyaluronat, adhäsive Glykoproteine und Adhäsionsproteine auf. Während die Gene der „Hauptkollagene“ in diesem Experiment in der dissezierten und gesunden Aorta gleich exprimiert waren, waren die "Nebenkollagene" -IV, -VIII und -XIV sowie das daran bindende Proteoglycan Decorin in der dissezierten Aorta schwächer exprimiert.

Die einzelnen Bindegewebskomponenten werden von spezifischen Metalloproteinasen (MMP) abgebaut, die wiederum durch spezifische Inhibitoren (TIMP) gehemmt werden. Die Genexpressionstudien erbrachten bezüglich der Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. MMP- 2 und -9, die bei der Ausbildung des Aortenaneurysma eine Rolle spielen sollen, lagen in dieser Studie in allen 3 Genexpressionsstudien sowohl in der dissezierten, als auch in der gesunden Aorta unterhalb der definierten Nachweisgrenze, so daß die verminderte Expression von ECM- Bestandteilen wahrscheinlich nicht Folge ihres vermehrten Abbaus ist.

Die Windkesselfunktion der Aorta ascendens erfordert elastische Eigenschaften. Elastin ist deshalb ein Hauptbestandteil der herznahen Aorta. Mehrere Arbeitsgruppen konnten in der aneurysmatisch veränderten Wand eine absolute Abnahme des Elastingehaltes und eine Zunahme des Kollagenanteils nachweisen. Gleichzeitig war die Elastaseaktivität erhöht. Auch in diesem Experimenten war der relative mRNA- Gehalt von Elastin in der dissezierten Aorta verglichen mit der nicht dissezierten Kontrollaorta erniedrigt, wobei dies nicht Folge einer vermehrten Elastaseaktivität ist.

Verschiedene Gene, die die Zelladhäsion vermitteln, wie z.B. das Polycystin, oder Adhäsionsrezeptoren, wie Integrine, waren in diesem Experiment in der dissezierten Aorta erniedrigt exprimiert. Es ist bekannt, dass Patienten mit Mutationen des Polycystins einerseits zu einer polyzystischen Nierendegeneration, andererseits aber auch vermehrt zu vaskulären Erkrankungen, wie zerebralen Aneurysmen oder Dissektionen neigen. Denkbar ist, daß ein Teil der Dissektionspatienten eine Mutation des Polycystin- 1 oder -2 Gens aufweisen und deshalb in den Genexpressionsstudien nicht oder vermindert nachweisbar waren.

Die Gene zahlreicher myofibrillärer Proteine, die Bestandteile der glatten Muskelzelle sind, waren in der dissezierten Aorta schwächer als in der gesunden Kontrollaorta exprimiert, wie leichte oder schwere Myosinketten und auch Tropomyosin, was eventuell für eine Depletion von glatten Muskelzellen in der dissezierten Aortenwand spricht.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	= Arteria
AA	= Aortenaneurysma
AAA	= Abdominelles Aortenaneurysma
AB- PAS	= Alzianblau- Periodic- Acid- Schiff- Reaktion
ADPKD	= Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease
APEG- 1	= Aortic Preferentially Expressed Protein- 1
Aqua dest.	= Aqua destillata
ASMC	= Aortic Smooth Muscle Cells
BM	= Basalmembran
CD- 34	= Antigen, membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 116 kD; wird in unreifen hämatopoetischen Stammzellen gebildet
cDNA	= Complementary Deoxyribonucleic Acid
ECM	= Extrazelluläre Matrix
eR	= Endoplasmatisches Retikulum
EvG	= Elastica van Gieson
F8	= (Kapillar-) Faktor 8
g	= Gramm
g	= Erdbeschleunigung
HE	= Hämalaun- Eosin
HIF- 1 α	= Hypoxia- Inducible Factor- 1 α
HRP	= Horseradish Peroxidase
IHC	= Immunhistochemie
KCNMB- 1	= Potassium large conductance calcium- activated channel, subfamily M, beta member- 1
kD	= Kilodalton
L	= Liter
LSAB	= Labelled Strept- Avidin- Biotin- Methode
mA	= Milliampere
MMP (-2; -9; -11; -19)	= Matrix- Metalloproteinase (-2; -9; -11; -19)

MOS	= Multiorganspender
mRNA	= Messenger Ribonucleic Acid
MUC- 18	= Mucin- 18 (Melanoma associated antigen)
PGM- 1	= Phosphoglucomutase- 1
PKD (-1; -2)	= Polycystic Kidney Disease (-1; -2)
PLS-DA	= Partial Least Squares- Discriminant Analysis
RT- PCR	= Real Time- Polymerase Chain Reaction
SKT	= Schnellkochtopf- Methode
SM	= Smooth muscle
SMC	= Smooth Muscle Cells
SMMS- 1	= Smooth muscle myosin heavy chain polypeptase
TIMP (-1; -2; -3)	= Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (-1; -2; 3)
Tn- C	= Tenascin- C
t- Test	= Student's t-Test (Wahrscheinlichkeitsverteilung)
uPA	= Urokinase- Plasminogen- Aktivator
UV	= Ultraviolett
V	= Volt
V.	= Vena
VSMC	= Vascular Smooth Muscle Cells
WB	= Western- Blot

8. Danksagung

Ich danke ganz herzlich **Frau PD Dr. med. Barbara T. Weiss- Müller** für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung der Proben, die Durchführung der Vorarbeiten, ohne die diese Arbeit nicht existieren könnte, ihre klinische, finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung, die anregenden Gespräche, die vielen hilfreichen Diskussionen und Korrekturen, sowie für ihre Ratschläge und Geduld bei Fertigstellung der Arbeit und dafür, dass sie immer Verständnis zeigte für all meine Launen und Lebenslagen.

Frau Dr. Olga Modlich danke ich für die intensive Betreuung und die zahlreichen Diskussionen, Hilfestellungen und Korrekturen sowohl während, als auch vor und nach ihrer Arbeitszeit, persönlich, als auch telefonisch und per E-Mail und weil sie immer zu mir gehalten hat und mir geholfen hat, nie die Hoffnung zu verlieren.

Herrn PD Dr. med. Wolfram Müller danke ich ganz herzlich für die Hilfe bei der Auswertung der Präparate und Daten, sowie die hilfreichen Korrekturen und Anregungen, die wesentlich zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. H. Bojar danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Geräte und Materialien, sowie für die großen und kleinen Hilfestellungen.

Ich danke auch der „**Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität**“, die das Projekt förderte und somit die vorliegende Arbeit ermöglichte.

Weiterhin danke ich **Herrn Prof. Dr. med. W. Hort**, der mir bei der Auswertung der vielen Präparate mit seiner großen wissenschaftlichen Erfahrung zur Seite stand.

Ich danke auch **Frau Andrea Stahl**, die mich bei der Herstellung dieser Präparate tatkräftig unterstützte.

Ein großer Dank geht an **meine Eltern, meinen Bruder und meinen Mann**, die mich immer in allen Belangen unterstützten, mir zur Seite standen, mit Geduld, Verständnis, Vertrauen und vielen kleinen und grossen Hilfestellungen zum

Gelingen beigetragen haben und bis zur Fertigstellung eine sehr große Motivationsarbeit geleistet haben, damit ich die Hoffnung und die Kraft zum Durchhalten nicht verliere.

Natürlich danke ich auch allen weiteren Personen, die mich im Zusammenhang mit dieser Arbeit fachlich unterstützt, inspiriert und weitergebracht haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Derya Unay-Curatolo, geb. Unay
Geburtsdatum : 09.06.1980
Geburtsort: Bremen
Familienstand: verheiratet, keine Kinder, Ehemann: Vincenzo Curatolo
Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1999 Allgemeine Hochschulreife
1990 - 1999 Städt. Humboldt - Gymnasium, Düsseldorf
1986 - 1990 Paul – Klee – Schule, Katholische Grundschule, Düsseldorf

Hochschulbildung

2006 Approbation
2000 - 2006 Studium der Humanmedizin, HHU Düsseldorf

Ärztliche Tätigkeit

Seit 01/2010 Ärztin in der Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie im Florence – Nightingale – Krankenhaus der Kaiserswerther Diakonie in Düsseldorf
06/2007 - 12/2009 Ärztin in der Anästhesiologie und Intensivmedizin im Dominikus-Krankenhaus Düsseldorf-Heerdt
05/2007 Ärztin in der Anästhesie und Intensivmedizin im St. Josefs Krankenhaus Hilden GmbH

Sprachen

Deutsch: Muttersprache
Türkisch: Sehr gut in Wort und Schrift
Englisch: Fließend
Französisch: Fließend

10. Publikation

“Gene expression in acute Stanford type A dissection: a comparative microarray study.”

Weis-Müller BT, Modlich O, Drobinskaya I, Unay D, Huber R, Bojar H, Schipke JD, Feindt P, Gams E, Müller W, Goecke T, Sandmann W.

J Transl Med. 2006 Jul 6;4:29.

11. Erklärung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Derya Unay-Curatolo, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen angefertigt habe.

Ich erkläre, dass nur ein Antrag eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Die Dissertation wurde an keiner Universität oder Hochschule vorgelegt. Die Ergebnisse wurden bis zum Zeitpunkt des Einreichens nicht publiziert. Es wurde bisher kein weiteres Promotionsverfahren eröffnet.

Düsseldorf, den 11.08.2010

Derya Unay-Curatolo

12. Literaturverzeichnis

1. Barbara Theresia Weis-Müller, Olga Modlich, Irina Drobinskaya, Derya Unay, Rita Huber, Hans Bojar, Jochen D Schipke, Peter Feindt, Emmeran Gams, Wolfram Müller, Timm Goecke, and Wilhelm Sandmann. Gene expression in acute Stanford type A dissection: a comparative microarray study. *J Transl Med.* 2006; 4: 29. Published online 2006 July 6. doi: 10.1186/1479-5876-4-29. PMCID: PMC1557406
2. Borst HG, Heinemann MK, Stone CD (1996) Incidence in „Surgical treatment of aortic dissection“ *Borst HG, Heinemann MK, Stone CD, Churchill Livingstone Inc.*
1. Ausgabe: 13
3. Schneiderman J, Bordin GM, Adar R, Smolinsky A, Seiffert D, Engelberg I, Dilley RB, Thinnis T, Loskutoff DJ Patterns of expression of fibrinolytic genes and matrix metalloproteinase-9 in dissecting aortic aneurysms.
Am J Pathol. 1998 Mar;152(3):703-10
4. Sawhney NS, deMaria AN, Blanchard DG. Aortic intramural hematoma. An increasingly recognized and potentially fatal entity. *Chest.* 2001;120:1340-6.
5. Evangelista A, Mukherjee D, Mehta RH, O’Gara PT, Fattori R, Cooper JV, Isselbacher E, Suzuki T, Eagle KA; (IRAD). Investigators. Aortic intramural hematoma of the aorta: a mystery in evolution. *Circulation.* 2005;111:1063-70
6. Cambria RP, Brewster DC, Gertler J et al. (1988). Vascular complications associated with spontaneous aortic dissection.
J Vasc Surg 7: 199
7. Da Gama AD (1991) The surgical management of aortic dissection: from university to diversity, a continuous challenge.
J Cardiovasc Surg 32: 141

8. Fann JI, Sarris GE, Mitchell RS et al. (1990) Treatment of patients with aortic dissection presenting with peripheral vascular complications.
Ann Surg 212: 705
9. Müller BT, Grabitz K, Fürst G, Sandmann W (2000) Die akute Aortendissektion. Diagnostik und Therapie von ischämischen Komplikationen. *Chirurg* 71: 209
10. Larson EW, Edwards W. Risk factors for aortic dissection: A necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol.* 1984;53:849-55.
11. Gray JR, Bridges AB, Faed MJW, Pringle T, Bams P, Dean J, Boxer M. Ascertainment and severity of Marfan syndrome in a Scottish population.
J Med Genet. 1994;31:51-4.
12. Raghunath M, Nienaber C, Kodolitsch Y. 100 Jahre Marfan-Syndrom- eine Bestandsaufnahme. *Dt Ärztebl.* 1997;94:A-821/B-681/C-637.
13. Pyeritz RE, McKusick VA. The Marfan syndrome: diagnosis and management. *N Engl J Med.* 1979;300:772-7.
14. Coselli JS, Le Maire SA, Büket S. Marfan syndrome: The variability and outcome of operative management. *J Vasc Surg.* 1995;21:432-43.
15. Habbal MHE. Cardiovascular manifestations of Marfan's syndrome in the young. *Am Heart J.* 1992;123:752-7.
16. Murdoch JL, Walker BA, Halpern BA, Kuzma JW, McKusick VA. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. *N Engl J Med.* 1972;286:804-8.
17. Serry C, Agomuhoh O, Goldin M. Review of Ehlers-Danlos syndrome.
J Cardiovasc Surg 1988;29:530-4

18. Mueller BT. Gibt es eine angeborene oder erworbene Prädisposition zur Aortendissektion-

Habilitationsschrift an der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf 2004
<http://diss.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/show?dissid=1219>

19. Müller BT, Modlich O, Prisack HB, Bojar H, Schipke JD, Goecke T, Feindt P, Petzold T, Gams E, Muller W, Hort W, Sandmann W (2002) Gene expression profiles in the acutely dissected human aorta. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 24:356-64

20. Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML: Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:1510-20.

21. Mulvihill ER, Jaeger J, Sengupta R, Ruzzo WL, Reimer C, Lukito S, Schwartz SM: Atherosclerotic plaque smooth muscle cells have a distinct phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:1283-9.

22. Bucher O, Wartenberg H: Kreislaufapparat: Cytology, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen Volume 12. *Edited by: Bucher.*
Wartenberg: Hans Huber Verlag, Bern, Auflage; 1997:229-244.

23. Petrides PE: Binde- und Stützgewebe in Biochemie und Pathobiochemie
Volume 5. Edited by: Löffler. Petrides: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Auflage; 1997:733-59.

24. Hofmann E: Biochemie der Binde- und Stützgewebe in Medizinische Biochemie
Volume 3. Edited by: Hofmann E. UNI-MED Verlag AG, Bremen, Auflage; 2001:679-85.

25. Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT: Elastin degradation in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 1987, 65:13-21.

26. White JV, Haas K, Phillips S, Comerota AJ: Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation. *J Vasc Surg* 1993, 17:371-80.

27. Segura AM, Luna RE, Horiba K, Stetler-Stevenson WG, McAllister HA Jr, Willerson JT, Ferrans VJ.

Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome.

Circulation. 1998 Nov 10;98(19 Suppl):II331-7; discussion II337-8.

28. Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, Tilson MD.

Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg*. 1994 Nov;20(5):814-20.

29. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P: Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994, 94: 2493-2503

30. Shah PK, Falk EF, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal- Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V: Human monocytederived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. *Circulation* 1995, 92:1565-1569

31. Koullias GJ, Ravichandran P, Korkolis DP, Rimm DL, Elefteriades JA

Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections.

Ann Thorac Surg. 2004 Dec;78(6):2106-10; discussion 2110-1

32. Lesauskaite V, Epistolato MC, Castagnini M, Urbonavicius S, Tanganelli P

Expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors, and osteopontin in the wall of thoracic and abdominal aortas with dilatative pathology.

Hum Pathol. 2006 Aug;37(8):1076-84

33. Ishii T, Asuwa N: Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection.

Human Pathol 2001, 31:640-6.

34. Bachmeier BE, Boukamp P, Lichtinghagen R, Fusenig NE, Fink E.
Matrix metalloproteinases-2,-3,-7,-9 and-10, but not MMP-11, are differentially expressed in normal, benign tumorigenic and malignant human keratinocyte cell lines. *Biol Chem.* 2000 May-Jun;381(5-6):497-507.
35. Nishimura K, Ikebuchi M, Kanaoka Y, Ohgi S, Ueta E, Nanba E, Ito H.
Relationships between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in the wall of abdominal aortic aneurysms.
Int Angiol. 2003 Sep;22(3):229-38.
36. Schneiderman J, Bordin GM, Engelberg I, Adar R, Seiffert D, Thinnest T, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ: Expression of fibrinolytic genes in atherosclerotic abdominal aortic aneurysm wall: a possible mechanism for aneurysm expansion. *J Clin Invest* 1995, 96:639-645
37. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC: Production and localization of 92- kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms: an elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest* 1995, 96:318-326
38. Johnson MD, Kim HRC, Chesler L, Wu GT, Bouck N, Polverini PJ:
Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase.
J Cell Physiol 1994, 160:194-202
39. Kamat BR, Galli SJ, Barger AC, Lainey LL, Silverman KJ: Neovascularization and coronary atherosclerotic plaque: cinematographic localization and quantitative histologic analysis. *Hum Pathol* 1987, 18:1036-1042
40. Vine N, Powell JT. Metalloproteinases in degenerative aortic disease.
Clin Sci (Lond). 1991 Aug;81(2):233-9.
41. Noël, A., M. Santavica, I. Stoll, C. L'Hoir, A. Staub, G. Murphy, M.C. Rio, and P. Basset. 1995. Identification of structural determinants controlling human and mouse stromelysin-3 proteolytic activities. *J. Biol. Chem.* 270: 22866–22872.

42. Murphy, G., J.-P. Segain, M. O'Shea, M. Cockett, C. Ioannou, O. Lefebvre, P. Chambon, and P. Basset. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin- 3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 1993 Jul 25; 268(21):15435–15441.
43. Pei, D., G. Majmudar, and S.J. Weiss. 1994. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin- 3. *J. Biol. Chem.* 269:25849– 25855.
44. Potempa, J., E. Korzus, and J. Travis. 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 269:15957– 15960.
45. Scharpe, S., M. Eid, W. Cooreman, and A. Lauwers. 1976. Alpha-1-Anti-trypsin, an inhibitor of renin. *Biochem. J.* 153:505– 507.
46. Pratt, C.W., and F.C. Church. 1993. General features of the heparin-binding serpins antithrombin, heparin cofactor II, and protein C inhibitor. *Blood.* 4:479– 490.
47. Janciauskiene, S., O. Al Rayyes, C.-H. Floren, and S. Eriksson. 1997. Low density lipoprotein catabolism is enhanced by the cleaved form of alpha-1-antitrypsin. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* 57:325– 336.
48. Kasza, A., H.H. Petersen, C.W. Heegaard, K. Oka, A. Christensen, A. Dubin, L. Chan, and P.A. Andreasen. 1997. Specificity of serine proteinase/serpin complex binding to verylow-density lipoprotein receptor and alpha2-macroglobulin receptor/low density-lipoprotein-receptor-related protein. *Eur. J. Biochem.* 248:270– 281.
49. Janciauskiene, S., S. Lindgren, and H.T. Wright. 1998. The C- terminal peptide of alpha-1-antitrypsin increases low density lipoprotein binding in HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* 254:460– 467.

50. Uwe Schönbeck, François Mach, Galina K. Sukhova, Elizabeth Atkinson, Ethan Levesque, Michael Herman, Pierre Graber, Paul Basset, and Peter Libby
Expression of Stromelysin- 3 in Atherosclerotic Lesions: Regulation via CD40–CD40 Ligand Signaling In Vitro and In Vivo
J Exp Med. 1999 March 1; 189(5): 843– 853.
51. Schick, C., Y. Kamachi, A.J. Bartuski, S. Cataltepe, N.M. Schechter, P.A. Pemberton, and G.A. Silverman. 1997. Squamous cell carcinoma-antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J. Biol. Chem.* 272:1849– 1855.
52. Pei, D., and S.J. Weiss. 1995. Furin- dependent intracellular activation of the human stromelysin- 3 zymogen. *Nature.* 375:244– 247.
53. Santavicca, M., A. Noel, H. Angliker, I. Stoll, J.-P. Segain, P. Anglard, M. Chretien, N. Seidah, and P. Basset. 1996. Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro- stromelysin- 3 activation by 4-amino-phenylmercuric acetate and furin- type convertases.
Biochem. J. 315:953– 958.
54. Guerin, E., M.-G. Ludwig, P. Basset, and P. Anglard. 1997. 853 Schönbeck et al. Stromelysin- 3 induction and interstitial collagenase repression by retinoic acid.
J. Biol. Chem. 272:11088– 11095.
55. Mari, B.P., I.C. Anderson, S.E. Mari, Y. Ning, Y. Lutz, L. Kobzik, and M.A. Shipp. 1998. Stromelysin- 3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism.
J. Biol. Chem. 273:618– 626.
56. Bister V, Salmela MT, Heikkilä P, Anttila A, Rintala R, Isaka K, Andersson S, Saarialho-Kere U Matrilysins-1 and -2 (MMP- 7 and -26) and metalloelastase (MMP- 12), unlike MMP- 19, are up- regulated in necrotizing enterocolitis.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005 Jan;40(1):60- 6.

57. Penda's, A. M., Knauper, V., Puente, X. S., Llano, E., Mattei, M. G., Apte, S., Murphy, G., and López-Otin, C. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 4281– 4286

58. Hieta N, Impola U, López-Otín C, Saarialho-Kere U, Kähäri VM. Matrix metalloproteinase-19 expression in dermal wounds and by fibroblasts in culture. *J Invest Dermatol.* 2003 Nov;121(5):997- 1004.

59. Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem.* 2000 May 19;275(20):14809- 16.

60. Impola U, Toriseva M, Suomela S, Jeskanen L, Hieta N, Jahkola T, Grenman R, Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinase-19 is expressed by proliferating epithelium but disappears with neoplastic dedifferentiation. *Int J Cancer.* 2003 Mar 1;103(6):709-16.

61. Titz B, Dietrich S, Sadowski T, Beck C, Petersen A, Sedlacek R: Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1. *Cell Mol Life Sci* 2004, 61:1826- 33.

62. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal- Hansen B, De Carlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4:197– 250.

63. Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective-tissue breakdown. *Pharmacol Ther.* 1996;70:163– 182.

64. Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K., and Hayakawa, T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 1264– 1271

65. Stetler-Stevenson, W. G., Bersch, N., and Golde, D. W. (1992) *FEBS Lett.* 296, 231–234.

66. Strongin, A., Collier, I. E., Bannikov, G., Marmer, B., Grant, G., and Goldberg, G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 5331– 5338
67. Corcoran, M. L., and Stetler-Stevenson, W. G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13453– 13459
68. Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E., and Shinagawa, A. (1994) *J. Cell Sci.* 107, 2373– 2379
69. Increased secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 from the aortas of cholesterol fed rabbits partially counterbalances increased metalloproteinase activity. Zaltsman AB, George SJ, Newby AC
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Jul;19(7):1700- 7.
70. O’Connell JP, Willenbrock F, Docherty AJP, Eaton D, Murphy G. Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B.
J Biol Chem. 1994;269:14961– 14973.
71. Murphy G, Willenbrock F, Ward RV, Cockett MI, Eaton D, Docherty AJP. The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biochem J.* 1992;283: 637– 641.
72. Brophy CM, Marks WH, Reilly JM, Tilson MD. Decreased tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in abdominal aortic aneurysm tissue: a preliminary report. *J Surg Res.* 1991 Jun;50(6):653- 7.
73. Akahane T, Akahane M, Shah A, Thorgeirsson UP. TIMP-1 stimulates proliferation of human aortic smooth muscle cells and Ras effector pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Nov 5;324(1):440- 5.

74. Vigetti D, Moretto P, Viola M, Genasetti A, Rizzi M, Karousou E, Pallotti F, De Luca G, Passi A. Matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitors of metalloproteinases regulate human aortic smooth muscle cell migration during in vitro aging. *FASEB J.* 2006 Jun;20(8):1118- 30

75. Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem.* 1996 Feb 2;271(5):2874.

76. Fedak PW, Altamentova SM, Weisel RD, Nili N, Ohno N, Verma S, Lee TY, Kiani C, Mickle DA, Strauss BH, Li RK. Matrix remodeling in experimental and human heart failure: a possible regulatory role for TIMP-3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Feb;284(2):H626-34. Epub 2002 Oct 10

77. Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):13787-95. Epub 2002 Feb 4

78. Chang H, Shyu KG, Wang BW, Kuan P. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by cyclical mechanical stretch in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Lond).* 2003 Oct;105(4):447- 56.

79. Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 268, 21513– 21518

80. Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C. and Marti, H. H. (1996) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiological relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.* 271, C1172– C1180

81. Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M. and Bunn, H. F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its a subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 32253– 32259

82. Yu, A. Y., Frid, M. G. and Shimoda, L. A. (1998) Temporal, spatial and oxygen-regulated expression of hypoxia- inducible factor 1 in the lung.
Am. J. Physiol. 275, L818– L826
83. Snell, R. S. 1975. Clinical Embryology for Medical Students. 1975.
Little, Brown and Company Inc., Boston, MA, 30- 34.
84. Haudenschild, C. C., and S. Harris-Hooker. 1984. Endothelial cell motility.
In *Biology of Endothelial Cells*.
E, A. Jaffe, editor. Martinus-Nijhoff Publishers, Boston, pp. 74-78.
85. Sholley, M. M., M. A. Gimbrone, Jr., and R. S. Cotran. 1977. Cellular migration and replication in endothelial regeneration.
Lab. Invest. 36:18- 25.
86. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins.
FASEB J 1991;5:2814-23.
87. van der Rest M. Les collagènes, une famille de protéines très diversifiée.
Regard sur la Biochimie 1993;4:33- 44.
88. van der Rest M, Garrone R, Hérbage D. Collagen a family of proteins with many facets. *Adv Mol Cell Biol* 1993;6:1- 67.
89. van der Rest M, Bruckner P. Collagens: diversity at the molecular and supramolecular levels. *Curr Opin Struct Biol* 1993;3:430- 6.
90. Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily.
Curr Opin Cell Biol 1993;5:883-90.
91. Labourdette L. Mécanismes moléculaires de l'assemblage des collagènes FACITs.
Etude in vitro de la triple hélice du domaine COL1 du collagène IX.
Thèse n. 346.94 Université Claude Bernard, Lyon I, 1994

92. Lethias C, Labourdette L, Willems R, Comte J, Herbage D.
Composition and organization of the extracellular matrix of vein walls: collagen networks.
Int Angiol. 1996 Jun;15(2):104- 13.
93. Maurel E, Azerma C, Deloly J, Bouissou H. Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study.
Clin Chim Acta 1990;193:27- 38.
94. Seki T, Naito I, Oohashi T, Sado Y, Ninomiya Y: Differential expression of type IV collagen isoforms, alpha5(IV) and alpha6(IV) chains, in basement membranes surrounding smooth muscle cells.
Histochem Cell Biol 1998, 110:359- 66.
95. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS: Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics.
Coll Relat Res 1985, 5:355- 68.
96. Borza DB, Bondar O, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Todd P, Hudson BG: The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes.
J Biol Chem 2001, 276:28532- 40.
97. Sariola H, Viljanen T, Luosto R: Histological pattern and changes in extracellular matrix in aortic dissections. *J Clin Pathol 1986, 139:1074- 81*
98. Ma R, Li WP, Rundle D, Kong J, Akbarali HI, Tsiokas L. PKD2 functions as an epidermal growth factor-activated plasma membrane channel.
Mol Cell Biol. 2005 Sep;25(18):8285- 98
99. Arnaout, M. A. 2001. Molecular genetics and pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Annu. Rev. Med. 52:93- 123.*

100. Boletta, A., and G. G. Germino. 2003. Role of polycystins in renal tubulogenesis. *Trends Cell Biol.* 13:484- 492.
101. Igarashi, P., and S. Somlo. 2002. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:2384- 2398.
102. Wilson, P. D. 2004. Polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 350:151- 164.
103. Koulen, P., Y. Cai, L. Geng, Y. Maeda, S. Nishimura, R. Witzgall, B. E. Ehrlich, and S. Somlo. 2002. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.* 4:191- 197.
104. Gonzalez-Perrett, S., K. Kim, C. Ibarra, A. E. Damiano, E. Zotta, M. Batelli, P. C. Harris, I. L. Reisin, M. A. Arnaout, and H. F. Cantiello. 2001. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1182- 1187.
105. Hanaoka, K., F. Qian, A. Boletta, A. K. Bhunia, K. Piontek, L. Tsiokas, V. P. Sukhatme, W. B. Guggino, and G. G. Germino. 2000. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408:990- 994.
106. Luo, Y., P. M. Vassilev, X. Li, Y. Kawanabe, and J. Zhou. 2003. Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channel in renal epithelia. *Mol. Cell. Biol.* 23:2600- 2607.
107. Wilson PD: Polycystin: new aspects of structure, function, and regulation. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12:834- 45.
108. Weston BS, Bagneris C, Price RG, Stirling JL: The polycystin-1 Ctype lectin domain binds carbohydrate in a calcium-dependent manner, and interacts with extracellular matrix proteins in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1536:161- 76.

109. Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO: Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease.

J Am Soc Nephrol 3:88 -95, 1992

110. Chapman AB, Rubinstein D, Hughes R, Stears JC, Earnest MP, Johnson AM, Gabow PA, Kaehny WD: Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 327 : 916-920, 1992

111. Huston J III, Torres VE, Sullivan PP, Offord KP, Wiebers DO: Value of magnetic resonance angiography for the detection of intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease.

J Am Soc Nephrol 3:1871 -1877, 1993

112. Chauveau D, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Macnicol A, Gonzalo A, Grünfeld J-P: Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 45:1140 -1146, 1994

113. Ruggieri PM, Poulos N, Masaryk TJ, Ross JS, Obuchowski NA, Awad IA, Braun WE, Nally J, Lewin JS, Modic MT: Occult intracranial aneurysms in polycystic kidney disease: Screening with MR angiography.

Radiology 191:33 -39, 1994

114. Schievink WI, Torres VE, Wiebers DO, Huston J III: Intracranial arterial dolichoectasia in autosomal dominant polycystic kidney disease.

J Am Soc Nephrol 8:1298 -1303, 1997

115. Leier CV, Baker PB, Kilman JW, Wooley CF: Cardiovascular abnormalities associated with autosomal dominant polycystic kidney disease.

Ann Intern Med 100:683 -688, 1984

116. Torres VE, Holley KE, Offord KP: Epidemiology. In: Problems in Diagnosis and Management of Polycystic Kidney Disease, *edited by Grantham JJ, Gardner KD, Kansas City, PKR Foundation, 1985, pp49 - 69*

117. Biermann CW, Gasser TC, Breuer C, Rutishauser G: Marfan syndrome and cystic kidneys of the adult type. *Helv Chir Acta* 59 : 513-515, 1992
118. Somlo S, Rutecki G, Giuffra LA, Reeders ST, Cugino A, Whitter FC: A kindred exhibiting co-segregation of an overlap connective tissue disorder and the chromosome 16 linked form of autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 4:1371 -1378, 1993
119. Kulla L, Deymeer F, Smith TW, Weiner M, Mullins TF III: Intracranial dissecting and saccular aneurysms in polycystic kidney disease. *Arch Neurol* 39:776 -778, 1982
120. Jens W. Fischer, Susie A. Steitz, Pamela Y. Johnson, Allen Burke, Frank Kolodgie, Renu Virmani, Cecilia Giachelli and Thomas N. Wight Decorin Promotes Aortic Smooth Muscle Cell Calcification and Colocalizes to Calcified Regions in Human Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:2391- 2396
121. Wight, T. N., Kinsella, M. G., and Qwarnstrom, E. E. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 793– 801
122. Wight, T. N. (1989) *Arteriosclerosis* 9, 1– 20
123. Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1991) *Cell* 64, 867– 869
124. Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 1998;17:1– 19.
125. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990;38:1549– 1563.

126. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- by the proteoglycan decorin. *Nature*. 1990;346:281– 284.
127. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*. 1997;136:729– 743.
128. De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 1996;271:18961– 18965.
129. Radhakrishnamurthy B, Tracy RE, Dalferes ER, Jr., Berenson GS. Proteoglycans in human coronary arteriosclerotic lesions. *Exp Mol Pathol*. 1998; 65:1– 8.
130. Evanko S, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics and the proximity of PDGF and TGF- β 1. *Am J Pathol*. 1998;152: 533– 546.
131. Chait, A., and Wight, T. N. (2000) *Curr. Opin. Lipid*. 11, 457– 463
132. Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media: the lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis*. 1985;5:19 – 34.
133. Dobrin PB. Mechanics of normal and diseased blood vessels. *Ann Vasc Surg*. 1988;2:283– 294.
134. Neumann RE, Logan MA. The determination of collagen and elastin in tissues. *J Biol Chem*. 1950;186:549 – 556.
135. Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis*. 1992;97: 201– 208.

136. Rucker RB, Tinker D. Structure and metabolism of arterial elastin.
Int Rev Exp Pathol. 1977;17:1– 47.
137. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Agerelated changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis.* 1983;3:64 – 76.
138. Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res.* 1967;20:99 – 111.
139. Mecham, R. & Davis, E. 1994 Elastic fiber structure and assembly. In Extracellular matrix assembly and structure (ed. P. Yurchenco, D. Birk & R. Mecham), pp. 281– 314. San Diego, CA: Academic Press.
140. Vrhovski, B. & Weiss, A. 1998 Biochemistry of elastin.
Eur. J. Biochem. 258, 1– 18.
141. Nakashima Y, Shiokawa Y, Sueishi K. Alterations of elastic architecture in human aortic dissecting aneurysm. *Lab Invest.* 1990;62:751– 760.
142. Nakashima Y, Sueishi K. Alteration of elastic architecture in the lathyrctic rat aorta implies the pathogenesis of aortic dissecting aneurysm.
Am J Pathol. 1992;140:959 – 969.
143. Schlatmann TJ, Becker AE. Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aortic aneurysm. *Am J Cardiol.* 1977;39: 13– 20.
144. Wolinsky H. Long-term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes: morphological and chemical studies.
Circ Res. 1972;30:301– 309.

145. Schlatmann TJ, Becker AE. Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta: comparative histopathologic study of significance of medial changes.
Am J Cardiol. 1977;39:21– 26.
146. Murray CA, Edwards JE. Spontaneous laceration of ascending aorta.
Circulation. 1973;47:848– 858.
147. Tadashi Shinohara, Kimihiro Suzuki, Makoto Okada, Masaru Shiigai, Masashi Shimizu, Tadaaki Maehara and Fumitaka Ohsuzu Soluble Elastin Fragments in Serum Are Elevated in Acute Aortic Dissection
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003;23:1839- 1844
148. Belkin AM, Ornatsky OI, Kabakov AE, Glukhova MA, Koteliansky VE.
Diversity of vinculin/meta-vinculin in human tissues and cultivated cells. Expression of muscle specific variants of vinculin in human aorta smooth muscle cells.
J Biol Chem. 1988 May 15;263(14):6631- 5.
149. Belkin AM, Ornatsky OI, Glukhova MA, Koteliansky VE.
Immunolocalization of meta-vinculin in human smooth and cardiac muscles.
J Cell Biol. 1988 Aug;107(2):545- 53.
150. Wilkins, J. A., and Lin, Sh. (1986) *J. CeU Biol.* 102, 1085- 109
151. Coll JL, Ben-Ze'ev A, Ezzell RM, Rodríguez Fernández JL, Baribault H, Oshima RG, Adamson ED. Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 26;92(20):9161- 5.
152. Mackie EJ, Scott-Burden T, Hahn AW, Kern F, Bernhardt J, Regenass S, Weller A, Bühler FR. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II.
Am J Pathol. 1992 Aug;141(2):377- 88.

153. Wallner K, Shah PK, Sharifi BG. Balloon catheterization induces arterial expression of new Tenascin-C isoform. *Atherosclerosis*. 2002 Mar;161(1):75- 83.
154. LaFleur DW, Fagin JA, Forrester JS, Rubin SA, Sharifi BG. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of rat tenascin. Platelet-derived growth factor-BB markedly stimulates expression of spliced variants of tenascin mRNA in arterial smooth muscle cells.
J Biol Chem. 1994 Aug 12;269(32):20757- 63.
155. Chiquet-Ehrismann, R. (1991) *Cum Opin. Cell Biol.* 3, 800- 804
156. Suarez-Huerta N, Mosselmans R, Dumont JE, Robaye B. Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2000 Aug;184(2):239- 45.
157. Levee MG, Dabrowska MI, Lelli JL, Jr., Hinshaw DB. 1996 Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells.
Am J Physiol 271:C1981- C1992.
158. Chaponnier C, Kocher O, Gabbiani G. Modulation of gelsolin content in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental intimal thickening and culture. An immunohistochemical and biochemical study.
Eur J Biochem. 1990 Jul 5;190(3):559- 65.
159. Dabrowska R, Hinssen H, Gałazkiewicz B, Nowak E. Modulation of gelsolin-induced actin-filament severing by caldesmon and tropomyosin and the effect of these proteins on the actin activation of myosin Mg(2+)-ATPase activity.
Biochem J. 1996 May 1;315 (Pt 3):753- 9.
160. Kwiatkowski DJ, Mehl R, Izumo S, Nadal-Ginard B, Yin HL. Muscle is the major source of plasma gelsolin. *J Biol Chem*. 1988 Jun 15;263(17):8239- 43.
161. Bryan, J. (1988) *J. Cell Biol.* 106. 1553 - 1562.

162. Chaponnier, C., Janmey, P. A. & Yin, H. L. (1986)
J. Cell Biol. 103, 1473- 1481.
163. Janmey, P. A., and Stossel, T. P. (1987) *Nature* 325,362- 364
164. Janmey, P. A., Iida, K., Yin, H. L., and Stossel, T. P. (1987)
J. Biol. Chem. 262,12228- 12236
165. Yin, H. L., Iida, K., and Janmey, P. A. (1988) *J. Cell Biol.* 106, 805- 812
166. Pollard, T. D. & Cooper, J. A. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* 55, 987- 1035.
167. Stossel, T. P., Chaponnier, C., Ezzell, R. M., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Kwiatkowski, D. J., Lind, S. E., Smith, D. B., Southwick, F. S., Yin, H. L. & Zaner, K. S. (1985) *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 353- 402.
168. Weeds, A. (1982) *Nature* 296, 811 - 816.
169. Yin, H. L. (1985) *BioEssays* 7, 176- 179.
170. Synthesis and secretion of serum gelsolin by smooth muscle tissue. Nodes BR, Shackelford JE, Lebherz HG. *J Biol Chem.* 1987 Apr 15;262(11):5422- 7.
171. Lind, S. E., Smith, D. B., Janmey, P. A., and Stossel, T. P. (1986)
J. Clin. Invest. 78, 736- 742
172. Chaponnier, C. & Gabbiani, G. (1989) *Am. J. Pathol.* 134, 597- 603
173. Babij P, Kawamoto S, White S, Adelstein RS, Periasamy M. Differential expression of SM1 and SM2 myosin isoforms in cultured vascular smooth muscle.
Am J Physiol. 1992 Mar;262(3 Pt 1):C607- 13.

174. Borrione AC, Zanellato AM, Scannapieco G, Pauletto P, Sartore S. Myosin heavy-chain isoforms in adult and developing rabbit vascular smooth muscle.

Eur J Biochem. 1989 Aug 1;183(2):413- 7.

175. Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, Lalande A, Boisset N, Mathieu F, Wegman M, Glancy L, Gasc JM, Brunotte F, Bruneval P, Wolf JE, Michel JB, Jeunemaitre X. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus.

Nat Genet. 2006 Mar;38(3):343-9. Epub 2006 Jan 29.

176. Eddinger, T. J. & Murphy, R. A. (1988) *Biochemistry* 27, 3807- 3811

177. Phosphoglucomutase 1; PGM1. *MIM* *171900