

Die Relevanz der Hyaluronsäure-reichen extrazellulären Matrix im Mausmodell des abdominalen Aortenaneurysmas

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Fedor Brack
aus Pawlodar

Düsseldorf, August 2024

aus dem Institut für Translationale Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Maria Grandoch

2. Prof. Dr. Rainer Kalscheuer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Aortenaneurysma	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Risikofaktoren	4
1.1.3 Pathogenese von Aortenerkrankungen.....	7
1.1.3.1 Pathogenese der Atherosklerose.....	7
1.1.3.2 Pathogenese des AAAs	9
1.2 HA-System	13
1.2.1 HA	13
1.2.2 HA-Synthese	14
1.2.3 HA-Abbau.....	17
1.2.4 HA-Rezeptoren und -Interaktionspartner	18
1.3 HA Funktionen in vaskulären Pathologien.....	19
1.3.1 HA-medierte Effekte auf die vaskuläre Gefäßwand	19
1.3.2 HA-medierte Effekte auf die Inflammation.....	20
1.4 HA-Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von AAA.....	21
1.5 Ziel der Arbeit	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Tierexperimentelle Arbeiten.....	24
2.1.1 Tiere	24
2.1.2 Studiendesign	25
2.1.3 Applikation von AngII mittels osmotischer Minipumpen	25
2.1.4 Elastase-Perfusion zur Induktion eines abdominalen Aortenaneurysmas	25
2.1.5 Knochenmarkstransfer mit anschließender AngII-Infusion	26
2.2 Sonographie	27
2.2.1 Sonographische Untersuchung der Aorta	27
2.2.2 Echokardiographie	28
2.3 Histologische Untersuchungen.....	28
2.3.1 Elastika-Van Gieson Färbung	29
2.3.2 Second Harmonic Generation Mikroskopie.....	29
2.3.3 Tropoelastin Färbung	30

2.4 Telemetrische Überwachung des Blutdrucks und der Herzfrequenz	31
2.5 Durchflusszytometrie	32
2.5.1 Blut	33
2.5.2 Milz	35
2.5.3 Knochenmark	35
2.5.4 Aorta	36
2.6 In-vitro Monozytenexperimente	37
2.6.1 Monozytenisolation und Vorbereitung für die Polymerasekettenreaktion	37
2.7 Molekularbiologie	37
2.7.1 RNA-Isolation	37
2.7.2 cDNA-Synthese	38
2.7.3 Quantitative Realtime PCR	38
2.8 Bulk-RNA Sequenzierung muriner Aorten	39
2.9 Multiplex Zytokin-Analyse	40
2.10 Statistische Analysen	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Einfluss der <i>Has3</i> auf die AngII-induzierte Entwicklung von AAA	42
3.1.1 Inzidenz für Aneurysmen, Rupturen und Mortalität	42
3.1.4 Sonographische Untersuchungen der Aorta	45
3.1.5 Struktureller Umbau der Aortenwand	48
3.2 Einfluss der <i>Has3</i> -Defizienz auf die AngII-induzierte Entstehung von AAA	50
3.2.1 Inzidenz für Aneurysmen, Rupturen und Mortalität	50
3.2.3 Sonographische Untersuchung der Aorta und des Herzens	52
3.2.4 Einfluss der Hypertonie	54
3.2.5 Struktureller Umbau der Aortenwand	56
3.3 Einfluss der <i>Has3</i> -Defizienz auf die PPE-induzierte Entwicklung von AAA	57
3.3.1 Einfluss auf das Körper- und Organgewicht	57
3.3.2 Sonographische Untersuchung der Aorta	58
3.3.3 Einfluss der Immunzellen	59
3.4 Einfluss der <i>Has3</i> -Defizienz auf die Inflammation im AngII-induzierten AAA	61
3.4.1 Zirkulierende Zytokine und Chemokine	61
3.4.2 Zirkulierende Immunzellen	62
3.4.3 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen	64
3.4.4 Immunzellen aus der Milz	64

3.4.5 Immunzellen in der Aorta	66
3.5 Veränderung des aortalen Transkriptoms	67
3.6 Einfluss der <i>Has3</i> -Defizienz auf die Genexpression von AngII-induzierten AAA	72
3.6.1 Aortale mRNA-Expression	73
3.6.2 mRNA-Expression isolierter Monozyten	75
3.7 Einfluss durch KMT und AngII in <i>Apoe</i> -KO und <i>Apoe/Has3</i> -DKO.....	77
3.7.1 Zirkulierende Immunzellen	77
3.7.2 Immunzellen in der Aorta	78
4. Diskussion	81
4.1 <i>Has3</i> -Defizienz schützt vor Aortenrupturen	82
4.2 <i>Has3</i> -Defizienz hemmt die Immunantwort in der Aorta	88
4.2.1 <i>Has3</i> -Defizienz verringert die Immunzellinfiltration	88
4.2.2 <i>Has3</i> -Defizienz reduziert die lymphoide Immunzellpopulation der Milz	91
4.2.3 Immunzellen und nicht Stromazellen begünstigen aortale Inflammation nach KMT..	92
4.3 <i>Has3</i> -Defizienz deutet auf einen proinflammatorischen Phänotyp anhand aortaler Expressions- sowie Transkriptionsänderungen.....	93
4.3.1 <i>Has3</i> -Defizienz führt zur aortalen Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten und Monozyten.....	93
4.3.2 <i>Has3</i> -Defizienz führt zum antiinflammatorischen aortalen Expressionsprofil	94
4.3.3 <i>Has3</i> -Defizienz in Endothelzellen nicht für die gestiegene Infiltration verantwortlich	95
4.4 <i>Has3</i> -Defizienz in Monozyten mit protektivem Effekt	95
4.5 Ausblick	96
5. Zusammenfassung	98
6. Summary.....	99
7. Appendix.....	100
8. Abbildungsverzeichnis.....	103
9. Tabellenverzeichnis	105
10. Literatur	106
11. Originalarbeiten	121
12. Kongressbeiträge und Posterpräsentationen.....	122
13. Danksagung	123
14. Eidesstaatliche Versicherung.....	124

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
4-MU	4-Methylumbelliferon
α SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i> , Alpha glatter Muskel-Aktin
AA	Aortenaneurysma
AAA	Abdominales Aortenaneurysma
AD	Aortendissektion
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Alexa Fluor
AMG	Arzneimittelgesetz
AMP	Adenosinmonophosphat
AngII	Angiotensin II
Apoe	Apolipoprotein-E
α SMC	<i>α smooth muscle cell</i> , α glatte-Muskelzelle
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin 1-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> , CC-Motiv-Chemokinligand 2, entspricht MCP-1
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i> , CC-Motiv-Chemokinligand 3, entspricht MIP1 α
CCL4	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i> , CC-Motiv-Chemokinligand 4, entspricht MIP1 β
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> , CC-Motiv-Chemokinligand 4, entspricht RANTES
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CEMIP	<i>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</i> , Zellmigration-induzierendes und Hyaluronsäure-bindendes Protein
CX3CR	CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i> , Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
d	<i>day</i> , Tag
kDa	Kilodalton
DKO	<i>Double knockout</i> , Doppel-Knockout
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	<i>Dulbeccos Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung von Dulbecco
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i> , endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ESV	Endsystolisches Volumen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FFPE	<i>formalin fixed paraffin embedded</i> , formalinfixiert paraffineingebettet
g	Gramm
<i>g</i>	<i>gravitational force equivalent</i> , Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykane

GCSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GlcA	Glucuronsäure
GMP	<i>granulocyte macrophage progenitor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer
GlcNAc	N-acetylglucosamin
h	Stunde
HA	<i>Hyaluronic acid</i> , Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure bindendes Protein
HARE	Hyaluronsäurerezeptor für Endozytose
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i> , Hanks ausgewogene Salzlösung
HDL	<i>High density lipoprotein</i> , Lipoprotein mit hoher Dichte
<i>hHas3</i>	humane HAS3
HM-HA	hochmolekulare Hyaluronsäure
HSP	Hitzeschockprotein
HSVZ	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen
Hyal	Hyaluronidase
HZV	Herzzeitvolumen
I.E.	Internationale Einheit
I/R	Ischämie/Reperfusion
IFN β	Interferon Beta
IFN γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
JAK/STAT	<i>Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription</i> , Januskinase/ Signaltransduktion und Transkriptionsaktivator
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	<i>Knockout</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDL	<i>low density lipoprotein</i> , Lipoprotein mit geringer Dichte
LPS	Lipopolysaccharid
LT-HSC	<i>long-term hematopoietic stem cell</i> , langsam teilende blutbildende Stammzellen
LV	linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Ly6	<i>Lymphocytic antigen 6</i> , Lymphozytenantigen 6
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i> , endothelialer Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße
MCP1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1, entspricht CCL2
MEP	<i>megakaryocyte-erythroid progenitor</i> , erythroider megakaryotischer Vorläufer
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MHz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i> , Makrophagen inflammatorisches Protein
miRNA	MicroRNA
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPP	<i>multipotent progenitor 4</i> , Multipotente Vorläuferzellen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-RNA

NF κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> , nukleärer Faktor Kappa leichte Ketten Verstärker von aktivierten B-Zellen
nm	Nanometer
NM	niedermolekular
ox-LDL	oxidiertes LDL
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> , Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
PE	Polyethylen
PEB	Phosphat, EDTA, BSA
PPE	<i>Porcine pancreatic elastase</i> , aus Schweinen stammende Pankreas-Elastase
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, Qualitative Polymerasekettenreaktion
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> , Regulation der Aktivierung, Expression und Sekretion normaler T-Zellen, entspricht CCL-5
RHAMM	Rezeptor für Hyaluronsäure-medierte Motilität
RIN	<i>RNA integrity number</i> , RNA Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SMC	<i>smooth muscle cells</i> , glatte Muskelzelle
ST-HSC	<i>short-term hematopoietic stem cell</i> , schnell teilende blutbildende Stammzellen
SV	Schlagvolumen
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor Beta
T _H 1-Zellen	Typ 1-T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TMEM2	<i>Transmembrane protein 2</i> , Transmembranprotein 2
TNF α	<i>Tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor Alpha
TSG6	<i>Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i> , Tumornekrosefaktor induzierbares Gen 6
U	<i>Unit</i> , Einheit
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GlcA	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-N-acetylglucosamin
μ g	Mikrogramm
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> , vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i> , Lipoprotein mit sehr geringer Dichte
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i> , glatte Gefäßmuskelzelle
WD	Western-Diät
WT	Wildtyp
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

1. Einleitung

1.1 Aortenaneurysma

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Aortenerkrankungen sind bereits seit mehreren Jahrtausenden bekannt. So erwähnten bereits Gelehrte im alten Ägypten um 1600 v.Chr. das erste Mal ein Aneurysma¹. Die nächsten Überlieferungen von Aneurysmen hatte der griechische Arzt und Gelehrte Antyllos Mitte des 2. Jahrhunderts n.Chr. niedergeschrieben. Dort definiert er zum einen die unterschiedlichen Formen der Aortenaneurysmen (AA) und zum anderen beschreibt er die ersten Behandlungsoptionen, die später als „Antyllos-Operationen“ in die Geschichte eingehen². Es mussten 1500 Jahre vergehen, bis Rudolph Mates (1888) diese Art der Operation in der modernen Gefäßchirurgie einsetzte².

Mit der Anerkennung der Aorta im Frühjahr 2024 als eigenständiges Organ unterstreicht die europäische Gesellschaft für Herz-Thorax-Chirurgie und die amerikanische Gesellschaft für Thoraxchirurgie sowohl die Komplexität der Aorta als auch deren Wichtigkeit für die Diagnosestellung und Behandlung unter pathologischen Zuständen³. Die Aorta ist die Hauptschlagader mit ihrem Ursprung im linken Ventrikel des Herzens, über den Aortenbogen im Thorax bis hin zum Abdomen, wo sie sich an den Beinen in die Beinarterien verzweigt (Abbildung 1). Der Durchmesser der Aorta beträgt bei einem gesunden erwachsenen Menschen zwischen 2,5 und 3,5 cm. Wobei der Durchmesser im Aortenbogen im Vergleich zur Bauchaorta deutlich größer ist. Das AA lässt sich als eine massive irreversible Vergrößerung des Aortendurchmessers beschreiben, sodass die Struktur des Gefäßes dem eines aufgeblähten Ballons ähnelt. Am häufigsten tritt ein abdominales AA (AAA) unterhalb der Nierenarterien auf (Abbildung 1).

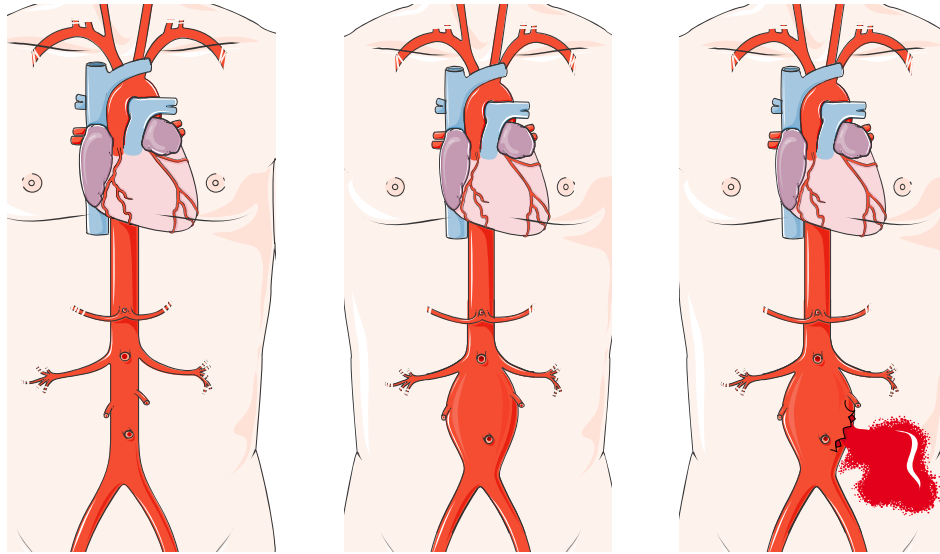


Abbildung 1. Schematische Illustration einer gesunden Aorta (links), eines abdominalen Aortenaneurysmas (mittig) und einer abdominalen Aortenruptur mit dem Austritt von Blut (rechts). In der Abbildung zeigt sich die Aorta im gesunden Zustand links und mit einem pathologisch vergrößerten Aortendurchmesser im Abdomen, ein AAA, mittig. Rechts zeigt sich der Zustand nach einer Aortenruptur und dem damit verbundenen Blutaustritt aus der Aorta in den Bauchraum. (Die Abbildung wurde teilweise mit Servier Medical Art erstellt, das von Servier bereitgestellt und unter einer Creative Commons Attribution 3.0 lizenziert wurde.)

Abzugrenzen ist ein AA von einer Aortendissektion (AD), bei der es zum Einriss der innersten Gefäßschicht der Aortenwand, der *Tunica intima*, kommt. Folglich fließt ein Teil des Blutes zwischen innerster und mittlerer Schicht der Aortenwand, die *Tunica media*. Es bildet sich ein falsches Lumen innerhalb der Aorta. Die äußerste Schicht, die *Tunica adventitia*, bleibt unversehrt (Abbildung 2).

In der heutigen Zeit ist die Klassifikation von Aortenaneurysmen und -dissektion (I71) komplexer, weswegen das BfArM diesen Erkrankungen in der ICD-10 Klassifizierung ein eigenes Kapitel unter „Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren“ (I70-78) gewidmet hat. Den AA und AD werden hierbei die ICD-10 Codes „I71.0-71.9“ zugeordnet.

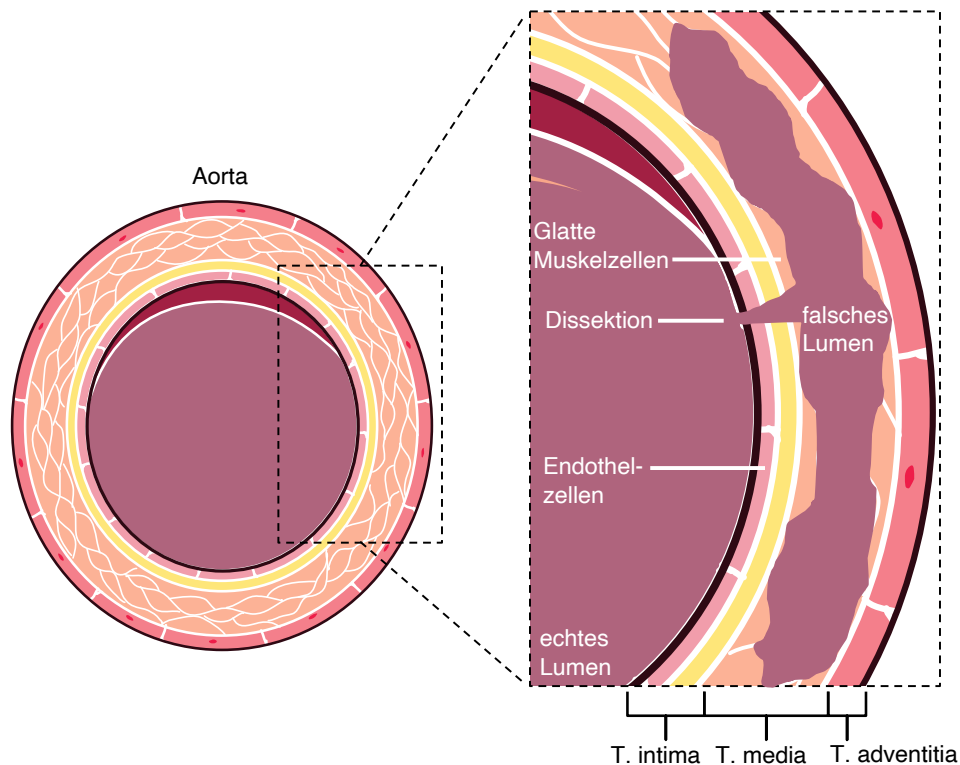


Abbildung 2. Schematische Darstellung einer Aorta im Querschnitt mit dem pathologischen Zustand einer Aortendissektion.

In dieser Abbildung ist auf der linken Seite ein vollständiger Aortenquerschnitt dargestellt. Im rechten Vergrößerungsfenster ist ein Teilausschnitt jener Aorta abgebildet, die den Zustand einer AD mit einem falschen Lumen darstellt. Die Aortenwand besteht aus drei Schichten. Die innerste Schicht ist die *Tunica intima* mit direkter Verbindung zum Lumen. An die *Tunica intima* grenzt die *Tunica media* und die äußerste Schicht der Aorta bildet die *Tunica adventitia*. (Die Abbildung wurde teilweise mit Servier Medical Art erstellt, das von Servier bereitgestellt und unter einer Creative Commons Attribution 3.0 lizenziert wurde.)

Im Kalenderjahr 2021 sind insgesamt 1.023.687 Todesfälle in Deutschland durch das statistische Bundesamt verzeichnet. Davon lassen sich 11.786 Todesfälle auf Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren und 4.226 Todesfälle auf AA und AD zurückführen (Abbildung 3)⁴. Die globale Prävalenz wurde abhängig von den Risikofaktoren für Personen im Alter zwischen 30 bis 79 Jahren in einer Metaanalyse von 2023 bestimmt und beträgt 0,92 %, was 35,12 Millionen Menschen einschließt⁵. Zu den Risikofaktoren zählen das hohe Alter, das männliche Geschlecht, der Zigarettenkonsum sowie andere kardiovaskuläre Erkrankungen⁶. Angesichts der persistierenden demografischen Entwicklung ist mit einer Zunahme der Prävalenzen und der damit verbundenen Mortalität zu rechnen. Zumal eine hohe Dunkelziffer für die AAA besteht, da nicht jeder Patient mit dieser Erkrankung diagnostiziert wird⁷.

Das Fatale an der Aortenerkrankung ist der asymptomatische Verlauf, womit die Gefahr einer Aortenruptur und damit des Austritts von Blut aus der Aorta besteht. Unbehandelt führt dieser medizinische Notfall meistens zum Tod. Die dabei erfassten Mortalitätsraten

liegen zwischen 60 bis 80 %⁸. Nur mithilfe bildgebender Verfahren wie dem Ultraschall, der Computer- oder Magnetresonanztomographie kann die Aortenerkrankung diagnostiziert werden. Die einzigen verfügbaren Therapieoptionen bilden die endovaskuläre Aneurysmreparatur sowie die offene chirurgische Aneurysmaoperation. Zudem bereitet die fehlende medikamentöse Therapie zur Behandlung oder Vorbeugung von Aortenerkrankungen große Sorge. Aus diesem Grund ist die Grundlagenforschung zu Aortenerkrankungen für die Identifizierung von molekularen Zielstrukturen notwendig, damit zukünftig Arzneistoffe entwickelt werden können.

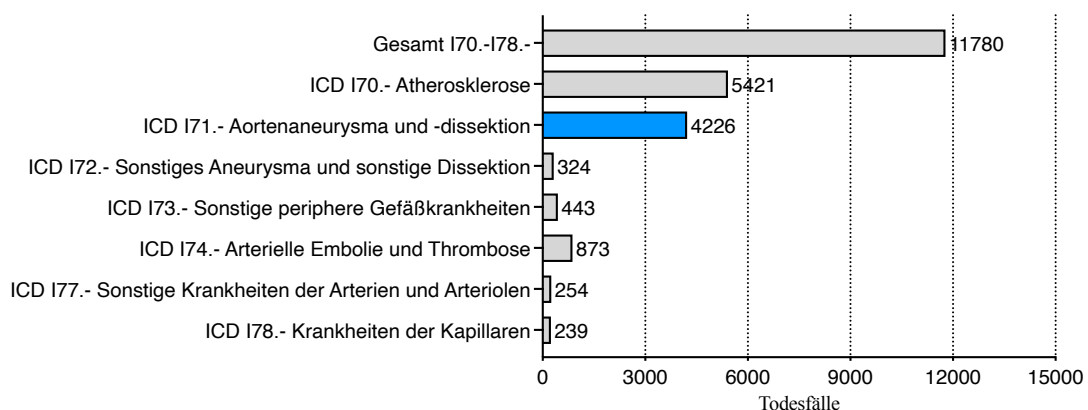


Abbildung 3: Todesfälle der Arterien, Arteriolen und Kapillaren (2021) in Deutschland.

Diese Abbildung der Todesursachenstatistik enthält alle Todesursachen abhängig der ICD-10 Klassifikation „Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren“ unabhängig vom Geschlecht oder Alter für das Berichtsjahr 2021. Diese Abbildung ist modifiziert nach den Ergebnissen der statistischen Bibliothek „Gesundheit. Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland“ aus dem Jahr 2021. In blau markiert ist die Anzahl der Todesfälle für die Ursache „Aortenaneurysma und -Dissektion“⁹.

1.1.2 Risikofaktoren

Die zur Entwicklung und Progression eines AAAs verantwortlichen Risikofaktoren lassen sich in zwei Gruppen, die modifizierbaren und nicht-modifizierbaren Risikofaktoren, einteilen. Zu den nicht-modifizierbaren Risikofaktoren gehören das Alter, Geschlecht, die Familiengeschichte sowie genetischen Einflüsse. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren summieren sich der Zigarettenkonsum, die kardiovaskulären Erkrankungen wie die Atherosklerose, die Hypertonie und die Hypercholesterinämie.

Das Alter spielt eine entscheidende Rolle für die Pathogenese. Zum Beispiel ist das Risiko, ein AA zu entwickeln, in der Gruppe der 75 - 79-jährigen Männer um das 200-fache größer als in der Gruppe der 40 - 44-jährigen Männer (0,83 vs. 164,57 von 100.000)¹⁰. Zwar existieren weniger Daten zur Ermittlung der Prävalenz bei weiblichen Patientinnen, doch konnte in einer Studie von L. Carter *et al.* (2020) mit 1,5 Millionen Frauen und 0,8 Millionen Männern die geschlechterspezifischen Risikofaktoren zur

Entwicklung eines AAAs gezeigt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass das Alter der Frau entscheidend mit der Entwicklung eines AAAs assoziiert ist¹¹. Die Prävalenz für Frauen im Alter von 70 Jahren liegt zwischen 0,74 bis 1,6 %¹² und ist damit deutlich niedriger als die der männlichen Patienten. Zwar entwickeln weibliche Patientinnen ein AAA im Vergleich zu den Männern in einem höheren Alter, jedoch sind diese meist aggressiver ausgeprägt, d.h. enden häufiger tödlich¹³. Insgesamt ist das Rupturrisiko bei Frauen um das 4-fache höher als bei männlichen Patienten⁸.

Eine positive Familienanamnese ist für etwa 12 % aller Patienten mit einem AAA verantwortlich¹⁴. In einer dänischen Studie mit Zwillingen konnte abhängig von den Risikofaktoren gezeigt werden, dass der genetische Faktor zu etwa 77 % für das Entstehen von AAA verantwortlich gemacht werden konnte¹⁵. Damit ist der Hauptanteil auf genetische Faktoren zurückzuführen, weswegen in der Forschung meist der Fokus auf die genetische und epigenetische Regulation gelegt wird¹⁶. Dabei wird u.a. der Einfluss von miRNA und langer, nicht-kodierender RNA in der Pathogenese der AAA näher untersucht^{17,18}. Ziel dieser Forschung ist die Ergründung der Mechanismen des AAAs und damit die Erkennung von potentiellen Biomarkern und therapeutischen Zielstrukturen.

Weltweit stellt der Zigarettenkonsum den mit Abstand größten Risikofaktor für die Entstehung und Entwicklung eines AAAs sowie dessen Ruptur dar. Der Zigarettenkonsum wird für 75 % aller AAA mit einem Aortendurchmesser ≥ 40 mm verantwortlich gemacht¹⁹. Laut einer US-amerikanischen Studie mit 3,1 Millionen untersuchten Personen gaben 42,8 % aller Teilnehmer an, Raucher zu sein. Unter den Patienten mit einer diagnostizierten AAA rauchen 80,2 %²⁰. Das Risiko unter Zigarettenkonsum ein AAA zu entwickeln, ist bei Frauen um den Faktor 15 und bei Männern um das 7-fache erhöht²¹. Vor allem haben rauchende Frauen unter 75 Jahren ein 26,4-fach erhöhtes Risiko²¹. Das relative Risiko für Raucher ein AAA auszubilden ist 2,5 mal höher als die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung und 3,5 mal höher als für eine zerebrovaskuläre Krankheit²². Darüber hinaus beschleunigt der Zigarettenkonsum die Wachstumsrate des Aortendurchmessers bei AAA-Patienten, wobei das Risiko für eine Aortenruptur unabhängig vom Aortendurchmesser erhöht ist²³. Es besteht eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Dauer und Menge des Zigarettenkonsums mit der Entwicklung eines AAAs²⁴. Demnach korreliert ein reduzierter Zigarettenkonsum mit einer verminderten Mortalitätsrate der Patienten mit AAA²⁵.

Patienten mit einer positiven Vorgeschichte einer koronaren Herzkrankheit weisen ein erhöhtes Risiko zur Entstehung eines AAAs auf²⁶. Zudem zeigt sich eine Amplifizierung

des Risikos, wenn zusätzlich eine atherosklerotische Erkrankung oder andere kardiovaskuläre Ereignisse vorliegen²⁶. Es bestehen Parallelen zur Entstehung und Entwicklung eines AAAs mit der Atherosklerose. Die Atherosklerose bezeichnet eine chronische Entzündungserkrankung der Aortenwand, die durch eine Verdickung der *Tunica intima* und die Ausbildung eines atherosklerotischen Plaques charakterisiert ist²⁷. Beide Erkrankungsbilder beschreiben einen multifaktoriellen Mechanismus, an dem verschiedene Schlüsselprozesse beteiligt sind. Zu diesen gehören die Inflammation der Aortenwand, die Apoptose sowie der Phänotypwechsel der glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) sowie der Abbau der extrazellulären Matrix (EZM)²⁸. Diese Prozesse laufen ebenfalls während der Atherosklerose ab und verdeutlichen deren Bedeutung als einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung eines AAAs. So weisen 25 - 55 % aller Patienten mit AAA eine atherosklerotische Erkrankung auf²⁹. Nach einer italienischen Studie wiesen Patienten im Alter von 65 - 75 Jahren mit einem Myokardinfarkt in der Vorgeschichte und einem massiven Zigarettenkonsum die höchste Prävalenz auf. Stattdessen zeigen jüngere Patienten die höchste Prävalenz für ein AAA aufgrund eines erhöhten kardiovaskulären Risikos oder eines vorangegangenen Myokardinfarkts oder Schlaganfalls³⁰. Obwohl die hohen Mortalitätsraten nach einer Aortenruptur fatal sind, stellen kardiovaskuläre Ereignisse die häufigsten Todesursache bei Patienten mit einem AAA dar³¹. Während eine Hypertonie nicht mit der Expansion eines AAAs assoziiert ist³², besteht ein erhöhtes Risiko einer Aortenruptur bei hypertensiven Patienten³³. Dabei ist der Einfluss des diastolischen Blutdrucks im Vergleich zum systolischen Blutdrucks mit einer höheren Prävalenz für die Entwicklung eines AAAs assoziiert³⁴. Bekanntermaßen sind veränderte Serumkonzentrationen von Gesamtcholesterin, Triglyceriden und Lipoproteinen wesentliche Risikofaktoren zur Entstehung der Atherosklerose sowie anderer kardiovaskulärer Erkrankungen. Hierbei weist das Lipoprotein mit hoher Dichte (*high density lipoprotein*, HDL) Cholesterin eine negative Korrelation mit dem Risiko eines AAAs auf³⁵. Kontrovers wird der Einfluss des Lipoproteins mit geringer Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) Cholesterins in AAA diskutiert. In einer Metaanalyse um Takagi *et al.* wurde eine Assoziation zwischen erhöhten LDL-Cholesterinwerten und dem Auftreten von AAA festgestellt³⁶. Diese Korrelation konnte Stather *et al.* in einer anderen Metaanalyse nicht bestätigen³⁷.

Bemerkenswert ist die negative Assoziation zwischen Diabetes mellitus und AAA. Obwohl ein Diabetes mellitus zu den Risikofaktoren einer koronaren Herzerkrankung gehört, zeigen zahlreiche Metaanalysen, dass Diabetiker ein um etwa 50 % erniedrigtes Risiko haben, ein AAA zu entwickeln³⁸. Zusätzlich wurde bei Diabetikern, die auch AAA

Patienten waren, sowohl eine reduzierte Wachstumsrate des Aortendurchmessers³⁹ als auch ein verringertes Rupturrisiko⁴⁰ festgestellt. Nichtsdestotrotz ist Diabetes mellitus bei AAA Patienten mit einer erhöhten Mortalität nach einem chirurgischen Eingriff der Aorta assoziiert⁴¹. In der Literatur wird die Hypothese debattiert, dass die positiven Effekte beim Diabetes mellitus auf AAA den antidiabetischen Medikamenten, vorwiegend Metformin, zugeschrieben werden⁴². So waren Mäuse nach einer Behandlung mit Metformin vor der Entwicklung eines AAA geschützt, da zum einen die Aorten im Vergleich zu Mäusen mit Placebo weniger degradiert waren und insgesamt eine reduzierte Infiltration von Immunzellen beobachtet wurde⁴³.

1.1.3 Pathogenese von Aortenerkrankungen

1.1.3.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung und Entwicklung eines AAA. Zum einen sind die Risikofaktoren der Atherosklerose wie der Zigarettenkonsum, die Dyslipidämien, das erhöhte Alter und das männliche Geschlecht ebenfalls mit einer erhöhten Inzidenz von AAA assoziiert⁴⁴. Zum anderen weist der zugrundeliegende Pathomechanismus für die Atherosklerose Parallelen zum AAA wie die Inflammation der Aortenwand, die Apoptose sowie den Phänotypwechsel der VSMC und die Degradation der EZM auf²⁸. Die Induktion eines murinen AAA erfolgt in den meisten Studien durch die Angiotensin II (AngII) Infusion in Apolipoprotein-E-defizienten (*ApoE*^{-/-}) Mäusen. *ApoE*^{-/-}-Mäuse werden ebenfalls zur experimentellen Erforschung der Atherosklerose verwendet, da der Mangel an APOE den Fettstoffwechsel stört, zur Hypercholesterinämie in der Maus führt und damit die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques begünstigt⁴⁵. Aus diesem Grund weisen *ApoE*-KO Mäuse, die mit AngII behandelt werden, Charakteristiken beider Erkrankungen auf⁴⁶.

Die Atherosklerose gehört zu den kardiovaskulären Erkrankung und ihre Komplikationen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar⁴⁷. Die Atherosklerose wird durch eine Dysfunktion von Endothelzellen (*endothelial cells*, EC) aufgrund verschiedener Risikofaktoren wie Alterung, Hyperlipidämie, Hypertonie, Rauchen und Diabetes mellitus verursacht⁴⁸. Pathologisch erhöhte Konzentrationen von LDL-Cholesterin im Blut stellen einen wesentlichen Faktor bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Atherosklerose dar⁴⁹. LDL-Cholesterin akkumuliert aufgrund der geschädigten EC in der *Tunica intima* und reagiert durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zu oxidiertem LDL-Cholesterin (ox-LDL-Cholesterin). Das ox-LDL-Cholesterin wirkt proinflammatorisch und ist mit einer Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten in

die Aortenwand assoziiert⁵⁰. Zudem führt die Hochregulation der Genexpression des Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor Kappa B (NF- κ B) in den EC der *Tunica intima* zum Abfall von Stickstoffmonoxid. Die Abnahme von Stickstoffmonoxid und die gleichzeitige Zunahme von NF- κ B resultieren in der Produktion von Adhäsionsmolekülen wie vaskulärem Zelladhäsionsmolekül 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM1) und der Sekretion von Chemokinen wie Monozyten-chemotaktischem Protein 1 (MCP1) durch die EC⁵¹. Die Adhäsionsmoleküle ermöglichen die Bindung zirkulierender Monozyten, welche daraufhin in die *Tunica intima* migrieren. Die Rekrutierung von Leukozyten erfordert sowohl Adhäsions- als auch Signalmoleküle auf der Oberfläche von EC und Leukozyten⁵¹. Neben den Monozyten migrieren zudem T-Lymphozyten in die subendotheliale Aortenwand und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Interferon Gamma (IFN γ) sowie Wachstumsfaktoren wie den transformierenden Wachstumsfaktor Beta (*transforming growth factor beta*, TGF β)^{52,53}. Charakteristisch für die Pathogenese der Atherosklerose ist die Entwicklung von Makrophagen zu Schaumzellen⁵⁴. Makrophagen nehmen das ox-LDL-Cholesterin über Scavenger-Rezeptoren auf⁵⁵ und sind nicht in der Lage mit den vorhandenen Enzyme die ox-LDL-Cholesterinpartikel zu verdauen. Die fortschreitende Lipidakkumulation in den Schaumzellen resultiert in deren Apoptose, was wiederum die Bildung einer extrazellulären Lipideinlagerung in der Aorta zur Folge hat und damit den Beginn der atherosklerotischen Plaquebildung charakterisiert. Gleichzeitig wandern VSMC in den Plaque ein, verändern ihren Phänotyp von einem kontraktilen zu einem synthetisierenden Typ und proliferieren im wachsenden atherosklerotischen Plaque⁵⁶. Die VSMC sezernieren vermehrt Kollagen, Glykosaminoglykane (GAG) sowie Proteoglykane in die *Tunica intima*. Dies führt zu einer progressiven Zunahme der intimalen Schichtdicke⁵⁷. Der atherosklerotische Plaque setzt sich aus kristallinem Cholesterin, ox-LDL, fibrotischen Proteinen, Calcium sowie nekrotischem Gewebe zusammen⁵⁸ und wächst kontinuierlich mit der Akkumulation von rekrutierten Leukozyten, der Proliferation von VSMC und der Einlagerung von LDL in die *Tunica intima*. Makrophagen produzieren Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und zersetzen damit Kollagen sowie Proteoglykane, was die Remodellierung der EZM vorantreibt⁵⁹. Die damit verbundene Degradation der Aortenwand erhöht das Risiko einer Ruptur des Gefäßes²⁷. Eine unbehandelte fortschreitende Atherosklerose kann zu Stenosen, Thrombenbildung, Embolien und Aneurysmen führen.

1.1.3.2 Pathogenese des AAAs

Trotz jahrzehntelanger Forschung ist der komplexe Pathomechanismus des AAAs noch immer unvollständig erklärt. Dies ist zurückzuführen auf die Vielzahl von Faktoren, die an seiner Entstehung beteiligt sind, darunter der Phänotypenwechsel der VSMC, die Degradation der EZM und die verstärkte Inflammation innerhalb der abdominalen Aorta⁶⁰. Die Pathogenese der Atherosklerose scheint trotz der Gemeinsamkeiten, nicht die kausale Ursache für die Entstehung von AAA zu sein, da sie parallel oder sekundär zum AAA verläuft⁶¹. Dies konnte in einem Mausmodell demonstriert werden, in dem die Entstehung eines atherosklerotischen Plaques erst nach der Entstehung eines AAA auftrat⁶². Jedoch ermöglicht die nähere Untersuchung der Atherosklerose einen besseren Einblick zur Aufdeckung der AAA-Pathogenese.

1.1.3.2.1 Rolle der VSMC

Der Verlust der strukturellen Integrität der Aortenwand, welcher zur irreversiblen Dilatation des Aortendurchmessers führt, ist ein charakteristisches Merkmal des AAAs. Die hochplastischen VSMC leisten einen wesentlichen Beitrag zur Aortenwand sowie deren Zugfestigkeit. Abhängig von den Vorgängen innerhalb der Aorta ist es für VSMC möglich, ihren Phänotypen zu verändern. Hierbei ist eine Differenzierung zwischen dem kontraktile und dem synthetisierenden Phänotyp erforderlich. Der kontraktile VSMC-Phänotyp weist eine spindelförmige Morphologie auf und ist für die Expression von Alpha-glatte Muskel Aktin (*alpha-smooth muscle actin*, α SMA), glattem Muskel Myosin schwerer Kette (*smooth muscle myosin heavy chain*, SMMHC), glattem Muskel 22 Alpha (*smooth muscle 22 alpha*, SM22 α) sowie Calponin verantwortlich⁶³. Eine Entzündungsreaktion oder einer Verletzung der Aorta begünstigt den Übergang zum synthetisierenden Phänotyp der VSMC und geht mit der Proliferation und der Migration der VSMC einher, die mit einer erhöhten Sekretion von proinflammatorischen Proteinen wie den MMP und einer Reduktion von kontraktile Proteinen verbunden ist⁶⁴. Demnach ist der Wechsel zum synthetisierenden Phänotyp ebenso mit der Pathogenese des AAAs assoziiert wie auch mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose oder der Hypertension⁶⁵.

Der Wachstumsfaktor TGF β ist wesentlich an der Zelldifferenzierung, der Proliferation sowie der Apoptose von VSMC beteiligt⁶⁶. Das Binden von TGF β am zellulären TGF β -Rezeptor 1 oder 2 führt zu einer Phosphorylierung von intrazellulären SMAD2/3. Das phosphorylierte SMAD2/3 geht dann einen Komplex mit SMAD4 ein, translatiert in den Nukleus und fördert die Transkription kontraktile Gene. Allerdings ist die Rolle von TGF β

ambivalent, da es nicht nur einen protektiven Faktor darstellt. Bei Patienten mit einem AAA wurden erhöhte Spiegel von TGF β nachgewiesen, die mit einer verringerten Proliferation der VSMC assoziiert sind, was zu einer abgeschwächten Aortenwand führt⁶⁷. Eine pathologische Reduktion der Anzahl an VSMC ist eng mit einem AAA verbunden, da sie zur Abnahme der EZM und damit zur Schwächung der Aortenwand führt²⁸. Auslöser für die Reduktion ist die Apoptose der VSMC während des AAAs, die durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Als auslösende Faktoren sind die Infiltration von Makrophagen in die Aortenwand mit einer einhergehenden Expression von Interleukin 6 (IL6), Tumornekrosefaktor Alpha (TNF α), MCP1 sowie das ox-LDL-Cholesterin zu nennen⁶⁸.

1.1.3.2.2 Rolle der EZM

VSMC sind wesentlich an der Synthese der EZM beteiligt. Die EZM besteht aus Proteoglykanen wie Versican, GAG wie Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA), Kollagenfibrillen und elastischen Fasern⁶⁹. Versican wird hauptsächlich in der Aorta als ein großes extrazelluläres Molekül synthetisiert und verleiht der Aortenwand eine Zugfestigkeit⁷⁰. Eine pathologische Akkumulation in der *Tunica media* erhöht den Druck innerhalb der Aortenwand und führt zu einer lokalen Delamination zwischen den VSMC und den elastischen Lamellen⁷⁰. Die HA als wesentlicher Bestandteil der EZM beeinflusst die biomechanischen Eigenschaften der Aorta durch die Fähigkeit Wasser zu binden. Darüber hinaus ist HA an der Aktivierung, Rekrutierung und Polarisation von Immunzellen als auch die Aktivierung, Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) beteiligt⁷¹⁻⁷³. Kollagen und Elastin sind maßgeblich an der Erhaltung der elastischen Eigenschaften, der strukturellen Festigkeit sowie der mechanischen Widerstandsfähigkeit der Aortenwand verantwortlich⁷⁴. Kollagenfibrillen setzen sich aus den Untereinheiten, den sogenannten Tropokollagenen, zusammen und verleihen der Aorta sowohl Stärke als auch Stabilität⁷⁴. Dabei entfallen 70 % des gesamten Kollagenanteils dem Kollagen Typ 1, der in der *Tunica intima* und *adventitia* vorkommt, wohingegen Kollagen Typ 3 in der *Tunica media* zusammen mit den elastischen Lamellen exprimiert ist⁷⁴. Elastin bündelt sich in Fasern in der *Tunica media* und ist maßgeblich für die biomechanischen und elastischen Eigenschaften der Aorta verantwortlich⁷⁴. VSMC und EZM bilden zusammengenommen eine funktionale Einheit zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Aorta⁷⁵. Charakteristisch für ein AAA ist die Degradation der EZM, was mit einer Fragmentierung der elastischen Lamellen und einer Dilatation der Aortenwand insgesamt einhergeht⁷⁶. Die Degradation ist hauptsächlich durch eine erhöhte Aktivität von MMP vermittelt. MMP

bilden eine Gruppe von Zink- und Calcium-abhängigen Endoproteasen, die für den Abbau von Komponenten der EZM verantwortlich sind. Zu den wichtigsten Proteinen, die dabei degradiert werden, zählen Kollagen und Elastin. In diesem Kontext sind insbesondere MMP2 und MMP9 zu nennen, deren Expression in der gesunden Aorta kaum, dafür aber in einem AAA signifikant erhöht ist⁷⁷. In einem murinen Aneurysmenmodell mit AngII konnte in *Mmp2*-Knockout (KO)⁷⁸ sowie in *Apoe/Mmp9*-Doppel-Knockout (DKO)⁷⁹ eine Assoziation zwischen der Entstehung und Entwicklung eines AAAs und den MMP hergestellt werden. Der vermehrte Abbau der EZM durch MMP führt zur Entstehung, zur Entwicklung und erhöht das Risiko einer Aortenruptur bei einem AAA⁷⁴.

1.1.3.2.2 Rolle der EC

Die EC nehmen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus, der Angiogenese, der Wundheilung, der Proliferation der VSMC, der Fibrose und der Inflammation ein⁸⁰. Dabei sind die biomechanischen Eigenschaften der Gefäße sowie das Strömungsverhalten des Blutes entscheidend bei der Entstehung von AAA beteiligt⁸¹. Innerhalb der Aorta wirken biomechanische Belastungen durch den pulsierenden Blutfluss, die sich aus der Axial-, Längs- und Scherspannung zusammensetzen. Die Scherspannung bildet sich aus der Viskosität und Strömungsgeschwindigkeit des Blutes sowie aus dem Aortendurchmesser⁸¹. Entlang der Aorta wirkt die Wandschubspannung, die aus der Strömung und Reibung des Blutes an den EC besteht. Innerhalb der Aorta fließt das Blut in einer laminaren Strömung und erzeugt dabei eine hohe Wandschubspannung. An den Abzweigungen der Aorta geht die laminare in eine turbulente Strömung über und setzt die EC damit einer veränderten Scherspannung aus⁸⁰. Aus diesem Grund entstehen humane AAAs an der infrarenalen abdominalen Aorta, da der laminare Blutfluss an der Bifurkation gestört und gleichzeitig der Schubspannungsgradient erhöht ist. Eine Dilatation des Aortendurchmessers, hervorgerufen durch eine abgeschwächte Aortenwand, verändert die physiologischen Funktionen der EC. Bei der Entstehung eines AAAs kommt es zu einem Anstieg der Scherkräfte insbesondere auf die *Tunica intima* und damit auf die EC, dass gleichzeitig die Morphologie der EC verändert⁸⁰. Die Verformung der EC schwächt die dazwischenliegenden *Tight Junctions* ab, mit der Folge, dass die Permeabilität durch die endotheliale Schicht steigt⁸⁰. Zudem führt die veränderte Blutströmung im Bereich des AAAs zu einem Anstieg von vaskulären Endothelwachstumsfaktoren und den Zelladhäsionsmolekülen ICAM1 sowie VCAM1⁸². Dadurch werden vermehrt Immunzellen gebunden und in das Gefäß aufgenommen. Dies führt zu einer vermehrt

Adhäsion von Immunzellen an die *Tunica intima*, von wo aus sie in die EC und anschließend in die VSMC migrieren⁸³. Neben den hämodynamischen Einflüsse auf die EC heben Brückner *et al.* hervor, dass die endotheliale Genexpression für die Prädilektionsstellen eines AAAs entscheidend ist⁸⁴. So zeigte diese Gruppe im AngII-Modell in isolierten EC aus *Apoe*-KO Mäusen mit einem Aneurysma eine veränderte Expression von Kollagen, MMP sowie Proteoglykanen und Glykoproteinen. Zudem sind proinflammatorische Zytokine wie Ccl2 und Il6 in den EC hochreguliert und tragen zur Progression des AAAs bei⁸⁴. Zusammenfassend ist die endotheliale Funktion maßgeblich an der Pathophysiologie des AAAs beteiligt.

1.1.3.2.2 Rolle der inflammatorischen Zellen

Die Immunantwort in der Aortenwand ist eine der Säulen zur Charakterisierung der AAA-Pathogenese. Die Immunzellen sekretieren proinflammatorische Faktoren und führen zur Apoptose der Aortenwand, zum Phänotypenwechsel der VSMC sowie zur Freisetzung von MMP. Dabei tragen vor allem Neutrophile, Makrophagen sowie T- und B-Zellen zur Inflammation innerhalb der Aorta bei⁶. Die mit Abstand am häufigsten vorkommende Immunzellpopulation, die in die Aorta während eines AAA infiltrieren, sind CD4⁺-T Lymphozyten⁸⁵. Abhängig von der Stimulation können die T-Zellen entweder proinflammatorisch aber auch antiinflammatorisch wirken. Die Sekretion von IL1, -6, -12 und -23 führen zur Differenzierung der T-Zellen, die anschließend entweder IFN γ oder IL17 vermehrt ausschütten und damit zur vermehrten Rekrutierung von Makrophagen in der Aorta führen⁸⁶. Die Differenzierung zu antiinflammatorischen T-Zellen wird durch die Sekretion von IL2, -4 und TGF β eingeleitet und diese bedingt eine Ausschüttung von IL4, -5, -10, -13 und TGF β , was zu einer Limitierung von zytotoxischen Makrophagen und gleichzeitig zu einer Reduktion der MMP-Expression führt⁸⁶. Innerhalb der zirkulierenden Leukozyten nehmen Neutrophile einen Anteil von bis zu 70 % ein und werden als erstes am Ort der Entzündungsreaktion rekrutiert⁸⁷. Eine Akkumulation von Neutrophilen ist mit einer erhöhten Expression von MMP8 und MMP9 assoziiert⁷⁴. Zudem aktivieren die freigesetzten Proteasen der Neutrophilen alle MMP und erhöhen damit das Rupturrisiko der Aorta⁷⁴. Eng mit der Pathogenese des AAAs ist die Rolle der Monozyten und Makrophagen verbunden, da eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden Monozyten das Risiko für ein AAA erhöhen⁸⁸. Die Differenzierung der Monozyten in der Aortenwand zu M0 Makrophagen kann durch das Vorhandensein von Lipopolysacchariden (LPS) oder IFN γ zu proinflammatorischen M1 Makrophagen stimulieren. Diese sekretieren IL6, TNF α und MCP1 und verstärken damit die Entzündungsreaktion sowie die Aktivierung von MMP⁸⁹. Im Gegensatz dazu sind IL4

sowie IL13 in der Lage eine M2 Polarisation vorzunehmen. M2 Makrophagen sind antiinflammatorisch, indem sie TGF β und IL10 sekretieren und damit Reparaturvorgänge der EZM steuern⁹⁰. Anhand des M1 zu M2 Verhältnisses kann die Inflammation innerhalb der Aorta charakterisiert werden. Während ein äquivalentes Verhältnis aus M1- zu M2-Makrophagen ein AAA stabilisiert, unterstreicht ein hoher M1/M2 Koeffizient, der sich zu Beginn eines AAAs bildet, die vaskuläre Zerstörung durch einen höheren Anteil an M1 Makrophagen⁹¹. Der Schweregrad einer Inflammation beeinflusst die Wachstumsrate des Aortendurchmessers und erhöht dadurch das Rupturrisiko⁹². Demnach ist ein hoher Anteil an M2-Makrophagen anzustreben, damit die durch M1-Makrophagen induzierte vaskuläre Inflammation herabgesetzt werden kann⁹³. Dieser Therapieansatz konnte von Shinichi *et al.* in *ApoE*-KO Mäusen mit AngII-induzierten AAA-Modell bestätigt werden, indem die Injektion von M2-Makrophagen die Entwicklung eines AAAs hemmt⁹³.

1.2 HA-System

1.2.1 HA

Die EZM besteht aus Kollagen und Elastin⁹⁴, um ein physikalisches Grundgerüst für die mechanischen Eigenschaften der Aorta zu bilden⁹⁵. Zusätzlich befinden sich GAG und Proteoglykane in der EZM. Durch diese werden biochemische Prozesse wie Morphogenese, Differenzierung und Homöostase des Gewebes eingeleitet²⁷. Darüber hinaus interagieren Komponenten der EZM mit anderen Proteinen und beeinflussen so Adhäsion, Proliferation und Migration der VSMC⁷⁴. Einer der Hauptbestandteile der EZM ist die ubiquitär exprimierte HA. HA ist ein Polysaccharid zusammengesetzt aus alternierenden Molekülen von N-Acetyl-glucosamin (GlcNAc) und D-Glucuronsäure (GlcA). Die molekulare Masse von HA liegt bei bis zu 2×10^6 Da⁹⁶. Dabei sind die Zucker über eine glykosidische β -1,3- bzw. β -1,4-Bindung verknüpft und gehören verknüpft als Zuckerkette zu den GAG⁹⁷. Der Zuckerpolymer liegt ohne weitere sekundäre Modifikationen linear vor. Im Gegensatz sind andere GAG wie Chondroitinsulfat oder Heparansulfat sulfatiert⁹⁸. Da die Carbonsäure der GlcA deprotoniert vorliegt, weist das gesamte Molekül eine mehrfach negative Ladung auf (Abbildung 4). Eine wichtige Funktion der HA ist es, Wasser binden zu können. Eine Einheit des Disaccharides kann etwa 15 Moleküle Wasser in einer sogenannten Solvathülle einschließen⁹⁹. Diese hygroskopische Eigenschaft ist für viele Organe essentiell, weshalb HA in der Haut, im Glaskörper des Auges, in der Synovia sowie der Nabelschnur in hohen Konzentration

vorkommt¹⁰⁰. Die HA hat wichtige Funktionen sowohl in physiologischen als auch pathophysiologischen Zellprozessen. So ist sie z.B. in die embryonale Entwicklung, aber auch im kardiovaskulären System sowie im gastrointestinalen Trakt und in Tumoren involviert⁷².

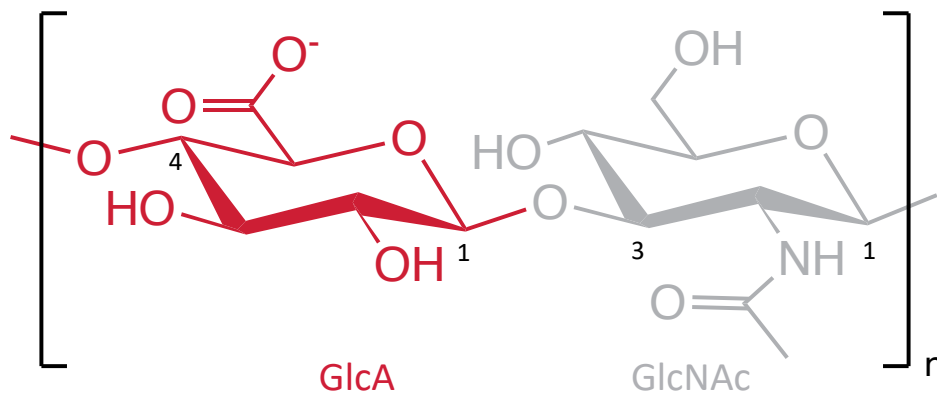


Abbildung 4. Molekulare Strukturformel von Hyaluronsäure in der Sesselkonformation. In der Sesselkonformation ist eine Sequenz der HA bestehend aus GlcA in rot und GlcNAc in grau dargestellt. Die HA ist ein Zuckerpolymer und besteht aus einer alternierenden Abfolge von GlcA und GlcNAc. Die Anzahl an Disaccharidsequenzen ist mit n angegeben und definiert das Molekulargewicht. Kohlenstoffatom 1 (C1) gibt das anomere Zentrum an. C3 und C4 sind mit C1 glykosidisch verknüpft. Die Carboxylgruppe der HA liegt deprotoniert und damit als Polyanion vor. Diese Abbildung wurde mithilfe der Software ChemDraw® 22.2.0.3348 von PerkinElmer erstellt.

1.2.2 HA-Synthese

Die Synthese der HA erfolgt durch membranständige Hyaluronsäuresynthasen (HAS) und unterscheidet sich damit von den restlichen GAG, da diese im Zellinneren im Golgi-Apparat synthetisiert werden¹⁰¹. Es existieren drei Isoformen der HAS (HAS1, 2 und 3). Die HAS besteht aus mehreren Domänen, die in der Plasmamembran verankert sind (Abbildung 5A). Die Glycosyltransferase der HAS verknüpft die Monosaccharide Uridindiphosphat-D-Glucuronsäure (UDP-GlcA) und Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) und anschließend wird die HA in den Extrazellulärraum extrudiert⁹⁷ (Abbildung 5B). Bei der Verlängerung der HA-Kette werden abwechselnd HA-UDP-GlcA zu einem neuen UDP-GlcNAc und dann HA-UDP-GlcNAc zu einem neuen UDP-GlcA hinzugefügt¹⁰². Für die Addition von UDP-GlcNAc an HA-UDP-GlcA sind eine UDP-GlcNAc-Akzeptorbindung, eine HA-UDP-GlcA-Donorbindung sowie eine UDP-GlcNAc-β-1,3(HA-GlcA-)Transferase beteiligt. Für die Addition von UDP-GlcA an HA-UDP-GlcNAc sind eine UDP-GlcA-Akzeptorbindung, eine HA-UDP-GlcNAc-Donorbindung und eine UDP-GlcNAc-β-1,4(HA-GlcNAc-)Transferase beteiligt

(Abbildung 6). Anschließend erfolgt nach jeder abgeschlossenen Addition eine HA-Translokation durch die Membran¹⁰². Das besondere an der Glycosyltransferase der HAS-Isoenzyme ist die Verknüpfung der Monosaccharide. Denn im Gegensatz zu den anderen GAG, weisen die Produkte der HAS-Isoenzyme keine Sulfatierung auf, sind über eine β -1,4-Verknüpfung zwischen GlcA und GlcNAc und über eine β -1,3-Verknüpfung zwischen GlcNAc und GlcA miteinander verknüpft (Abbildung 4).

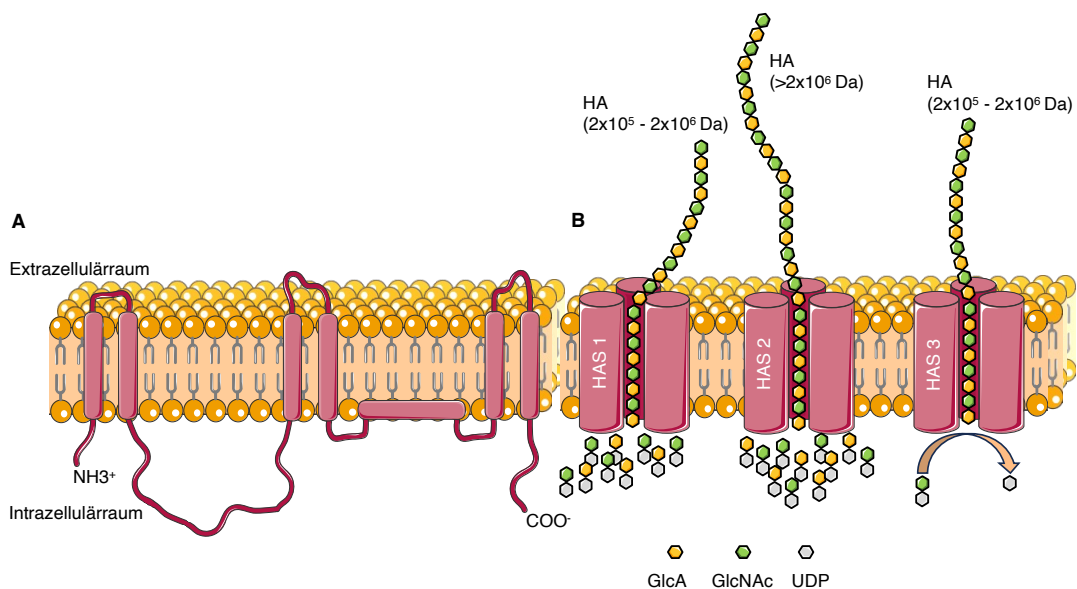


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Hyaluronsäuresynthese sowie die Synthese an den Isoenzymen HAS1, 2 und 3.

In **A** ist die HAS mit sieben Domänen abgebildet. Davon sind zwei am N-terminalen und fünf Domänen am C-terminalen Ende lokalisiert. Die zytoplasmatische Schleife zwischen dem N- und C-terminalen Ende bildet das katalytische Zentrum zur Glycosyltransferase und damit zur Synthese der HA. Der Ablauf der Synthese zeigt sich in **B**. Hierzu benötigen die HAS an UDP gebundene GlcA sowie GlcNAc, damit hieraus unter Abspaltung von UDP HA entstehen können. Anschließend wird die HA in den Extrazellulärraum extrudiert. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Itano *et al.*¹⁰³. (Teile der Abbildung wurden mit Servier Medical Art erstellt, das von Servier bereitgestellt und unter einer Creative Commons Attribution 3.0 lizenziert wurde.)

Die drei unterschiedlichen HAS besitzen eine ähnliche Aminosäuresequenz, jedoch produzieren sie HA mit unterschiedlichen Kettenlängen. Die längsten HA-Moleküle und damit die mit dem höchsten Molekulargewicht synthetisiert HAS2, wohingegen HAS1 und HAS3 HA mit einem geringeren Molekulargewicht extrudieren⁷³. Jedoch ist die Erkenntnis der unterschiedlichen HA-Kettenlängen durch HAS in der Literatur umstritten, da ebenfalls von HAS1 berichtet wird, dass die produzierten HA-Kettenlängen denen von HAS2 ähneln¹⁰⁴. Die Gene der drei Isoformen liegen sowohl im murinen als auch im humanen Genom hoch konserviert auf verschiedenen Chromosomen vor¹⁰⁵. Mithilfe von murinen KO-Modellen können Funktionen der jeweiligen HAS erforscht werden. Ein globaler *Has2*-KO in Mäusen bedingt eine embryonale Letalität, da es zu einer Fehlbildung des Herzens kommt¹⁰⁶. Bei der Bildung des Endokardkissens im

atrioventrikulären Kanal werden Atrium vom Ventrikel voneinander getrennt. Eine *Has2*-Defizienz unterbindet die Entstehung des Endokardkissens. Aus diesem Grund erfolgt die Untersuchung der HAS2-Defizienz in einem konditionalem KO-Modell, d.h. die Deletion wird zu einem bestimmten Zeitpunkt mittels *Cre/loxP* System ermöglicht. Im Gegensatz dazu sind *Has1*-KO Mäuse überlebensfähig und weisen keine Abnormalitäten auf. Ähnliches wurde auch bei *Has3*-KO Mäusen beobachtet, die eine durchschnittliche Lebenserwartung aufweisen¹⁰⁷.

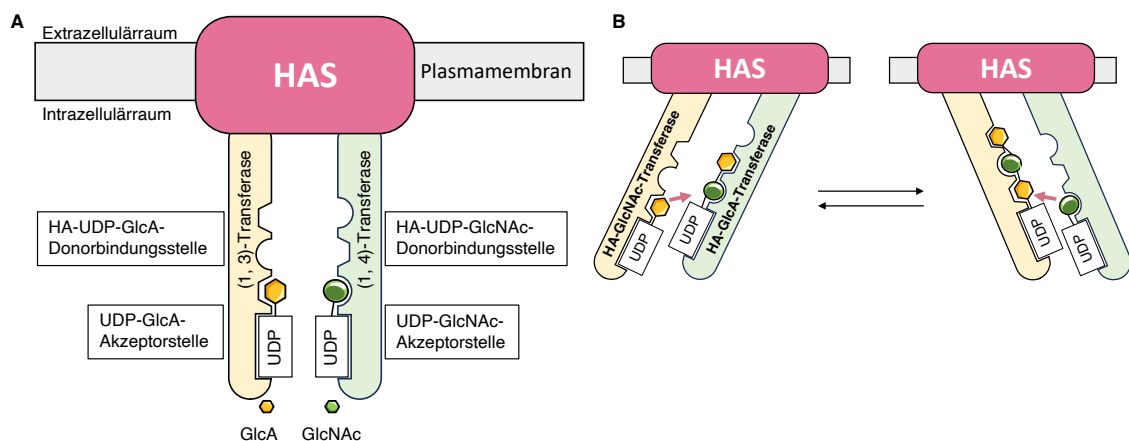


Abbildung 6. Schematische Darstellung der HAS Translokation zur HA-Synthese als Pendel-Modell. In **A** ist die Organisation der (1, 3)- und (1, 4)-Transferasen und der UDP-Glykosid-Bindungsstellen innerhalb des HAS-Enzyms dargestellt. Die Porenregion (rosa) befindet sich in der Plasmamembran und enthält zwei katalytische Domänen, die ins Zellinnere hineinragen. Die Domäne enthält eine Hyaluronyltransferase-Aktivität und Bindungsstellen, um eine HA-UDP-GlcA-Donorkette an UDP-GlcNAc (gelbe Domäne) oder eine HA-UDP-GlcNAc-Donorkette an UDP-GlcA (grüne Domäne) anzuhängen. In **B** ist die HA-Kettenbildung durch die schwingenden Domänen dargestellt. Die linke Position zeigt die Bindung von GlcNAc- β (1,4) an GlcA und die rechte Position zeigt die Bindung von GlcA- β (1,3) an GlcNAc. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Weigel¹⁰².

Da HA ebenfalls in der EZM des Gehirns vorkommt, führt die genetische Deletion eines HAS-Isoenzyms zu epileptischen Anfällen. Dabei führte der konstitutive *Has3*-KO zur höchsten Abnahme der HA-Konzentration im Hippocampus, sodass diese Mäuse am häufigsten einen epileptischen Anfall erlitten¹⁰⁸. In einem *Has1/Has3*-DKO Mausmodell wurden ebenfalls überlebensfähige Tiere beobachtet, die zwar mit einer verstärkten Wundheilung jedoch gleichzeitig mit einer erhöhten Inflammation assoziiert waren¹⁰⁷. Die Biosynthese von HA kann durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflusst werden. Dazu zählen TGF β 1, der Thrombozytenwachstumsfaktor (*platelet derived growth factor*, PDGF) sowie TNF α , die die Expression von HAS2 erhöhen, wohingegen die Expression von HAS3 durch Interleukin 1 Beta (IL1 β) und TNF α regulieren wird¹⁰⁹. TGF β 1, IL1 und PDGF induzieren die transkriptionelle Regulation von

HAS1. Nach Bindung der Zytokine erfolgt die Signaltransduktion durch NF- κ B- bzw. MAP-Kinase-Beteiligung¹⁰⁹. Es konnte bereits gezeigt werden, dass HAS3 eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Vorgängen wie der chronischen Darmentzündung¹¹⁰, der Neointimahyperplasie¹¹¹, der Atherosklerose¹¹² und der Arteriogenese¹¹³ einnimmt. Piroth *et al.* konnten eine protektive Rolle der HAS3 nach einem Myokardinfarkt aufzeigen¹¹⁴. Zusammengefasst stellt die HAS3-induzierte HA ein bevorzugte Zielstruktur zur Entwicklung eines pharmakologisch aktiven Arzneistoffes dar¹⁰⁷.

1.2.3 HA-Abbau

Die Degradation der HA verschiedener Kettenlängen wird zum einen von Hyaluronidasen (HYAL) katalysiert. HA liegt in unterschiedlichen Kettenlängen vor, sodass zwischen hochmolekularer HA (HM-HA) mit einem Molekulargewicht von 1.000-10.000 kDa, niedermolekularer HA (NM-HA) mit einem Molekulargewicht von 10-100 kDa und HA-Oligosacchariden, die aus 8 bis 30 Dimeren bestehen, unterschieden werden¹¹⁵. Die biologischen Funktionen sind abhängig von der HA-Kettenlänge, sodass HM-HA antiinflammatorische Effekte besitzt, indem die Wundheilung gefördert wird⁹⁶. Im Gegenteil dazu vermittelt die NM-HA proinflammatorische Wirkungen, da die Reifung der Monozyten zu Makrophagen begünstigt sowie eine Angiogenese induziert werden⁷¹. Die HYAL katalysieren die hydrolytische Spaltung der Zuckerverknüpfungen durch β -1,4-Endoglykosaminidasen und damit zur Fragmentierung der Bindung von GlcNAc mit GlcA der HA-Kette¹¹⁶. Insgesamt sind sechs HYAL im humanen Genom beschrieben¹¹⁶. HYAL1 und 2 sind die wichtigsten Vertreter der HYAL. HYAL2 spaltet an der Plasmamembran HA, welche ebenfalls am HA-Rezeptor CD44 bindet, auf eine Größe von etwa 20 kDa¹¹⁷. Eine Defizienz von *Hyal2* sorgt für einen Anstieg der Plasmakonzentration von HA, aber auch zu einer kardiopulmonalen Dysfunktion, welche mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist¹¹⁸. Die Abbauprodukte von HYAL2 werden anschließend in die Zelle internalisiert, wo sie dann in den Lysosomen von HYAL1 zu Oligosacchariden degradiert werden¹¹⁷. Beide HYAL besitzen ihr pH-Optimum im sauren Milieu. Dementsprechend ist der Katabolismus in den Lysosomen sowie im entzündeten Gewebe gewährleistet¹¹⁹. HYAL1 ist in Krebszellen am höchsten exprimiert und führt durch die Degradation zu HA-Oligosacchariden zum Tumorwachstum sowie zur Angiogenese⁷¹. HYAL3 ist dahingegen nur schwach exprimiert und scheint eine vergleichsweise zu den anderen HYAL geringe Aktivität zu besitzen, um HA zu spalten, da *Hyal3*-KO Mäuse keine veränderte HA-Menge aufweisen¹²⁰. HYAL4 gehört fälschlicherweise zu den HYAL, obwohl es Chondroitinsulfat degradiert und nicht in der

Lage ist, HA zu spalten¹¹⁵. Das Spermium-Adhäsions-Molekül-1 ist die fünfte HYAL und degradiert die HA unter pH neutralen Bedingungen in den Testikeln. HYAL6 wird zwar in Mäusen exprimiert und stellt ein humanes Pseudogen dar¹²⁰. Zudem wurden weitere Moleküle zur Degradation der HA identifiziert. Dazu zählen das Zellmigration-induzierendes und HA-bindendes Protein (CEMIP) sowie das Transmembranprotein 2 (TMEM2). HM-HA wird in die Zelle über die Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen und bindet in den Vesikeln an CEMIP. Dort erfolgt eine β -1,4-Endoglykosaminidase im sauren Milieu und damit eine Fragmentierung zu 35-50 kDa schwere HA¹¹⁵. HA mit diesem Molekulargewicht fördert die Polarisation von Monozyten sowohl zu M2-Makrophagen als auch zum M1-Phänotyp¹¹⁵. TMEM2 katabolisiert im pH neutralem Milieu und in Abhängigkeit von Kalzium HM-HA zu HA-Fragmenten mit einer molekularen Masse von 5 kDa¹¹⁵. Die Aktivität von TMEM2 ist nicht von lebendigen Zellen abhängig und unterscheidet sich auf diese Weise von den anderen HA-degradierenden Enzymen¹¹⁵.

1.2.4 HA-Rezeptoren und -Interaktionspartner

Die biologische Rolle der HA wird durch die Interaktion mit verschiedenen HA-bindenden Proteinen induziert. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass HA kovalente Bindungen zu sogenannten Hyaladherinen eingeht. HA interagiert über einen *Linker* der Proteoglykanen wie Aggrecan sowie Versikan und beeinflusst damit die biomechanischen Eigenschaften der EZM⁷³. Der prominenteste HA-Rezeptor ist der *Cluster of differentiation 44* (CD44). CD44 ist ein transmembranäres Glykoprotein und fungiert als zellulärer Rezeptor für den Hauptliganden HA¹²¹. Strukturell besteht CD44 aus einem N-terminalen *Linker*-Molekül im Extrazellulärraum, einer transmembranären Domäne sowie einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne¹²². CD44 ist in vielen Zellen einschließlich Immunzellen, VSMC, Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert¹²³. Außerdem kann der Rezeptor in der Standardform (CD44s) und in einer variablen Form (CD44v) vorliegen¹²⁴. Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Migration von Leukozyten und Adhäsion von Fibroblasten an die EZM¹²⁵. Nach der Bindung von HA an die HA-Bindungsdomäne kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Phosphorylierungskaskaden, die verschiedene Funktionen wie Proliferation, Angiogenese, Migration und Differenzierung von Immunzellen modulieren können¹²⁶. *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1* (LYVE1) verfügt, genauso wie CD44, über eine *Linker*-Domäne und bindet HA und ist überwiegend in Lymphgefäßen exprimiert⁷³. LYVE1 ist wesentlich an der Migration von dendritischen Zellen, die mit einer HA-reichen Glykokalyx umgeben sind, in Lymphknoten beteiligt und aktiviert auf

diese Weise das Immunsystem. Außerdem moduliert LYVE1 mit HA die Migration von aus Monozyten-stammenden Makrophagen ins entzündete Gewebe¹²⁷. Im Gegensatz zu CD44 und LYVE1 besitzt *Receptor for hyaluronan mediated motility* (RHAMM) über keine Linker-Domäne, sondern verfügt über eine BX₇B-Sequenz zur Interaktion mit HA. RHAMM ist an der Zellmotilität, der Wundheilung sowie der Modifikation der RAS-Signalkaskade involviert¹²⁶. Umstritten ist jedoch wie die Interaktion der HA mit *Toll like receptor 2* (TLR2) und TLR4 vermittelt wird, da TLR weder über eine *Linker*-Domäne noch eine BX₇B-Sequenz besitzen. In diesem Zusammenhang können NM-HA und HA-Oligosaccharide Entzündungsreaktionen begünstigen⁹⁶. Es wird angenommen, dass HA aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften als Polyanion die Liganden von TLR2/4 im entzündeten Gewebe nachahmt und auf diese Weise eine Inflammation begünstigt¹²⁸. Eine weitere Möglichkeit die Rekrutierung von Leukozyten während einer Inflammation durch HA zu beeinflussen, ist die Bildung fadenförmiger Strukturen, die als HA-Kabel bezeichnet werden. Diese bestehen aus einer kovalenten Bindung zwischen HA und dem Tumor-Nekrose-Faktor-induzierbaren Gen 6 (TSG6) und haben die Eigenschaft Immunzellen zu binden¹²⁹.

1.3 HA Funktionen in vaskulären Pathologien

1.3.1 HA-medierte Effekte auf die vaskuläre Gefäßwand

Wie beschrieben ist HA ein wesentlicher Bestandteil der EZM und erfüllt zahlreiche biologische Funktionen, insbesondere im Kontext von Entzündungsreaktionen und Gefäßerkrankungen wie der Atherosklerose. HA und HAS3 spielen dabei eine zentrale Rolle in der Inflammation und im Wechsel zum synthetisierenden Phänotyp der VSMC. Unter den Isoformen ist HAS3 hauptsächlich in humanen Nabelvenen-EC exprimiert, während HAS1 in diesen Zelltypen nicht nachgewiesen ist¹³⁰. Während der laminaren Strömung des Blutes sind die EC sowie die endotheliale Glykokalyx maßgeblich für die kontrollierte Zelladhäsion, -motilität und -proliferation verantwortlich¹³⁰. HA führt zur Hydratation der Gefäßwand und vermittelt hierdurch mechanosensitive Eigenschaften, da dadurch der Druck der Aortenwand beeinflusst wird²⁷. Bei einer Verletzung der Gefäßwand und der daraus resultierenden Dysfunktion der EC wird HA aus der endothelialen Glykokalyx freigesetzt, was zu einem Anstieg der HA-Plasmakonzentration führt¹³¹. Die potentielle Nutzung von HA als Biomarker für bestimmte Entzündungserkrankungen ist Gegenstand aktueller Diskussionen, da hierdurch das Ausmaß der Endothelschädigung quantifiziert werden könnte¹³¹. So

konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausscheidung der HA aus der endothelialen Glykokalyx zu erhöhten Plasma- sowie Urinkonzentrationen von HA führt und damit als verlässlicher Biomarker für den pathologischen Zustand der EC bei Sepsis, Diabetes und Ischämie/ Reperfusion fungiert¹³¹. Während der Atherosklerose wurden bislang keine Veränderungen der Plasmakonzentrationen von HA berichtet. Patienten, die zusätzlich eine Diabetes mellitus Typ 1 Erkrankung aufweisen, hatten erhöhte Plasmakonzentrationen von HA sowie von HYAL und zeigten eine Zunahme der Aortenwanddicke auf¹³¹.

VSMC befinden sich in gesunden Aorten in der *Tunica media* und sind für die arterielle Kontraktion sowie die Produktion von Komponenten der EZM verantwortlich. Dieser Zustand wird als kontraktiler Phänotyp der VSMC beschrieben, da kontraktile Proteine wie α SMA und Elastin synthetisiert werden und von Kollagen, HA sowie Proteoglykanen umgeben sind²⁷. Der kontraktile Phänotyp der VSMC verleiht der Aorta eine Widerstandsfähigkeit vor Blutdruckschwankungen und ermöglicht die Veränderung des Aortendurchmessers abhängig von Systole und Diastole²⁷. Kommt es nun zu einer Verletzung der Aorta reagieren die VSMC auf die freigesetzten Zytokine und leiten einen Phänotypwechsel hin zum synthetisierenden Typ ein. In VSMC wird die Synthese von HA durch das Zytokin IL1 β reguliert, wie in *Apoe*-KO Mäusen gezeigt wurde¹¹². IL1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zur Proliferation und Aktivierung von VSMC sowie zur T-Zell-Polarisation führt und damit die Pathogenese der Atherosklerose vorantreibt¹⁰⁶. Eine genetische Deletion von *Has3* in *Apoe*-KO Mäusen hemmt die durch Makrophagen induzierte Entzündung sowie die Atherosklerose, indem weniger Typ 1-T-Helferzellen (T_H1-Zellen) in diesen Mäusen polarisiert wurden¹¹². Diese Befunde zeigen eine direkte Verbindung zwischen der HA Synthese und der Pathogenese der Atherosklerose¹⁰⁶.

1.3.2 HA-mediierte Effekte auf die Inflammation

Charakteristisch für atherosklerotische Läsionen ist die Akkumulation von HA¹³². Chronische Entzündungsreaktionen sind typisch für die Atherosklerose, weshalb Immunzellen besonderes Augenmerk verdienen¹³³. Die meisten Immunzellen exprimieren den HA-Rezeptor CD44. So aktiviert HA nach Bindung von CD44 die Polarisation von T Zellen zu T_H1-Zellen und fördert die Makrophagen-vermittelte Entzündungsreaktion in der Atherosklerose¹¹². *Cd44*-KO Mäuse entwickeln eine geringere Entzündungsreaktion und signifikant weniger Atherosklerose, was die Bedeutung des HA/CD44 Signalwegs für die Rekrutierung von Makrophagen in

atherosklerotische Läsionen und die Stimulation zum synthetisierenden Phänotyp der VSMC unterstreicht¹³⁴.

Ein weiterer Signalweg, der chronische Entzündungen beeinflusst, wird durch HA-Fragmente über TLR4 in Anwesenheit von LPS vermittelt¹³⁵. Dabei kommt es zur nukleären Translokation von NF- κ B über *myeloid differentiation primary response protein 88*, sodass proinflammatorische Zytokine wie IL1 β , TNF α und MMP13 hochreguliert werden. Diese Rezeptoren werden ebenfalls auf Immunzellen, EC sowie VSMC exprimiert. So ist HA in der Lage über den TLR in EC die NF- κ B Signalkaskade zu aktivieren, sodass vermehrt Neutrophile in die Zellen migrieren und dadurch vermehrt Chemokine wie Makrophagen inflammatorisches Protein 2 (MIP2) zur Rekrutierung von Makrophagen ausgeschüttet werden⁹⁶. Obwohl bisher kein direkter Zusammenhang eines HA/TLR2- bzw. HA/TLR4-Signalwegs mit Atherosklerose oder anderen vaskulären Erkrankung nachgewiesen wurde, wurde ein solcher Zusammenhang nach Lungenverletzungen beobachtet¹³⁶. Zudem stellten Romo *et al.* fest, dass adipöse Patienten erhöhte NM-HA Plasmaspiegel aufweisen. Dabei wurde eine erhöhte Genexpression von TLR2 in Monozyten festgestellt, sodass NM-HA den NF- κ B-abhängigen Signalweg in diesen Zellen aktiviert und damit eine leichte Entzündungsreaktion in adipösen Patienten auslöst¹³⁷.

HA und HA-bindende Moleküle sind in der Lage, supramolekulare Verbindungen zu bilden, um Monozyten/Makrophagen bzw. T-Zellen zu binden. Die sogenannten HA-Kabel sind proinflammatorisch und wurden erstmals in intestinalen glatten Muskelzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankung und anschließend in VSMC im atherosklerotischen Modell nachgewiesen^{138,139}.

1.4 HA-Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von AAA

Bislang ist die genaue Rolle von HA sowie HAS3 in der Entstehung und Entwicklung von AAA nicht vollständig geklärt. Die Entzündungsreaktion ist einer der treibenden Faktoren, die zur Pathogenese der AAA führt. In der chronisch entzündlichen Darmerkrankung führte die genetische Deletion von *Has3* zu einer verringerten Infiltration von Immunzellen im Dickdarm. Dabei vermittelte die gezielte *Has3*-Defizienz im Endothel einen Schutz vor der Dextransulfat-Natrium-induzierten Kolitis¹¹⁰. Zudem unterdrückt eine murine *Has3*-Defizienz die neointimale Hyperplasie, indem die PDGF-vermittelte Migration von VSMC reduziert wurde¹¹¹. Damit wurde gezeigt, dass HAS3

eine wichtige Rolle in dem Phänotypwechsel der VSMC während der neointimalen Hyperplasie einnimmt. Im atherosklerotischen Modell wurde in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine reduzierte T_H1 -Zell-Polarisation sowie eine verringerte Makrophagen-induzierte Entzündung im atherosklerotischen Plaque festgestellt¹¹².

Bei der Entstehung einer AD stellte Humphrey fest, dass eine Anreicherung von GAG und Proteoglykanen innerhalb der Aortenwand stattfindet, die zu einer Delamination der elastischen Lamellen beitragen¹⁴⁰. Hierbei sind HA und Versican hervorgehoben, da durch die vermehrte Anreicherung in der *Tunica media* die mechanosensitiven Eigenschaften der Aorta verändert werden, sodass die Zugfestigkeit der Aorta reduziert ist. Begründet ist der Anstieg der GAG und insbesondere der HA durch die erhöhte Aktivität von TGF β in der Aortenwand¹⁴⁰. Diesen Zusammenhang der gestiegenen HA-Akkumulation durch eine gestiegene TGF β -Aktivität konnten ebenfalls Nataatmadja *et al.* bei der Untersuchung des AAAs beim Marfan Syndroms belegen¹⁴¹. Der Pathomechanismus ist dadurch begründet, dass HA und Versican zu einem gestiegenen Donnan-Druck innerhalb der Aortenwand führen¹⁴⁰. Da die HA ein mehrfach negativ geladenes Molekül ist, wird die interstitielle Flüssigkeit in die Aortenwand hineingezogen, was gleichzeitig den Druck erhöht und zur Delamination der elastischen Lamellen beiträgt¹⁴⁰. Humane AAA Patienten weisen eine höhere aortale Expression des HA-Rezeptors CD44 als in gesunden Aorten auf¹⁴². Über CD44 ist bekannt, dass die genetische Deletion dieses Gens in Mäusen einen Schutz vor der Entstehung von thorakalen AD bietet¹²⁵. Zudem korreliert CD44 positiv mit der Ansammlung von Makrophagen in Aorten von AAA-Patienten. Proinflammatorische Faktoren wie IL1 β , TNF α und IFN γ induzieren die Ablösung des HA-Rezeptors CD44 von den Makrophagen zu einer löslichen Form, die anschließend EC zur Synthese von IL1 β stimulieren¹⁴³. Der Anstieg dieses Zytokins führt zur verstärkten Expression von HA in den EC sowie zur vermehrten Rekrutierung von Monozyten in die Aorta^{143,144}. Somit trägt die CD44/HA-Achse maßgeblich zur Infiltration von Monozyten in die Aorta bei. Anschließend führen die Chemokine CCR2 und CX3CR1 zur Differenzierung der Monozyten in Makrophagen und verstärken dadurch die Inflammation in der Aorta⁸⁸. Mäuse mit einem *Cd44*-KO waren vor der Entwicklung einer AD geschützt, sodass die Interaktion von CD44 mit HA eine wichtige Rolle bei der Immunantwort während der Pathogenese spielt¹²⁵.

1.5 Ziel der Arbeit

AAA und AD stellen schwerwiegende chronische Erkrankungen der Aorta dar, die lange Zeit asymptomatisch bei gleichzeitig permanent bestehender Gefahr einer Aortenruptur verlaufen und mit einer erhöhten Letalität einhergehen. Aktuell besteht die einzige

Therapieoption in einem chirurgischen Eingriff bzw. endovaskulären Eingriff, welche jedoch mit hohen Risiken und Komplikationen verbunden sind. Da bislang keine nicht-invasive pharmakologisch wirksame Zielstruktur identifiziert ist, besteht weiterhin die Notwendigkeit, die zugrundeliegenden Pathomechanismen genauer zu charakterisieren, um die fortschreitende Ausweitung der Aorta zu hemmen oder sogar umzukehren. Eine vielversprechende mögliche Zielstruktur bildet hierbei die HA-reiche Matrix und insbesondere die HA-Synthase HAS3. Dies basiert insbesondere auf der Tatsache, dass HA und spezifisch das HAS3 auf die Kernprozesse der AAA Entwicklung Einfluss nehmen: HA ist einer der Hauptbestandteile der EZM der Aortenwand und seine Synthese ist vor allem im entzündeten Gewebe hochreguliert. Zudem vermittelt HA eine Immunantwort über Makrophagen und T-Zellen und erhöht dadurch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1 β . Dadurch wird die Inflammation im Gewebe verstärkt und es kommt zu einer Migration, Proliferation und Differenzierung von Leukozyten. Schließlich führt die Bindung von HA am Rezeptor CD44, zu einer Modulation der Adhäsion, Migration und Proliferation glatter Muskelzellen. Sowohl die Inflammation als auch die Modulation der VSMC stellen hierbei Prozesse dar, welche maßgeblich von HAS3 und der synthetisierten HA moduliert werden. Darüber hinaus ist der Einfluss der HAS3 in verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie der neointimalen Hyperplasie, der Atherosklerose, der Arteriogenese, der akuten Kolitis sowie der kardialen Ischämie und Reperfusion beleuchtet worden.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von HAS3/HA auf die Entwicklung und Progression des AAAs untersucht werden, um so neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Die Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes für tierexperimentellen Arbeiten liegt unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2018.A222 vor. Innerhalb der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlichen Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf erfolgten sowohl die Zucht als auch die Haltung der Tiere. Die Tiere unterlagen in einem temperaturkontrollierten Haltungsraum einer Tag- und-Nacht-Gleiche von jeweils 12 Stunden und hatten Zugang zu entkeimtem Wasser und Haltungsfutter mit einem Rohfettanteil von 3,6 % (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) *ad libitum*.

2.1.1 Tiere

Für die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten wurden männliche Mäuse mit einem *Apoe/Has3*-DKO und entsprechende männlichen Kontrollmäuse mit alleiniger *Apoe* Defizienz (*Apoe*-KO) verwendet. Um *Apoe/Has3*-DKO Mäuse zu generieren, wurde gemäß der Beschreibung nach Kiene *et al.* *Has3*-defiziente Mäuse von genOway (Lyon, Frankreich) genutzt und diese mit *Apoe*-KO Tieren (Hudson, USA), die ebenfalls einen C57BL/6-Hintergrund aufweisen, gekreuzt¹¹¹. Nach der jeweiligen Minipumpenimplantation erhielten die Tiere anstelle des Haltungsfutters eine Westerndiät (WD) mit einer Zusammensetzung von 21,1 % Rohfett und 0,15 % Cholesterin (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) (Tabelle 1). Diese Tiere wurden von Herrn Prof. Dr. Fischer (Institut für Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. Zusammensetzung der WD.

Inhaltsstoffe	%	Zusatzstoffe	pro kg
Rohprotein	21,5	Vitamin A (IE)	15000
Rohfett	21,1	Vitamin D3 (IE)	1500
Rohfaser	4,0	Vitamin E (mg)	150
Rohasche	6,3	Vitamin C (mg)	1030
Stärke	9,6	Kupfer Copper (mg)	14
Zucker	32,6	Cholesterol (mg)	1550

2.1.2 Studiendesign

Apoe-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäuse erhielten nach Implantation von osmotischen Minipumpen mit kontinuierlicher Freisetzung von AngII (1000 ng/kg/min) oder einer physiologischen Kochsalzlösung (NaCl) eine Behandlung für entweder 7 oder 28 Tage. Nach Versuchsende wurde das kardiale Blut aus dem rechten Ventrikel mit 50 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA- *Ethylendiaminetetraacetic acid*), als Antikoagulanz, entnommen. Für weitere Analysen wurden Aorta, Milz, Femur und Tibia entnommen.

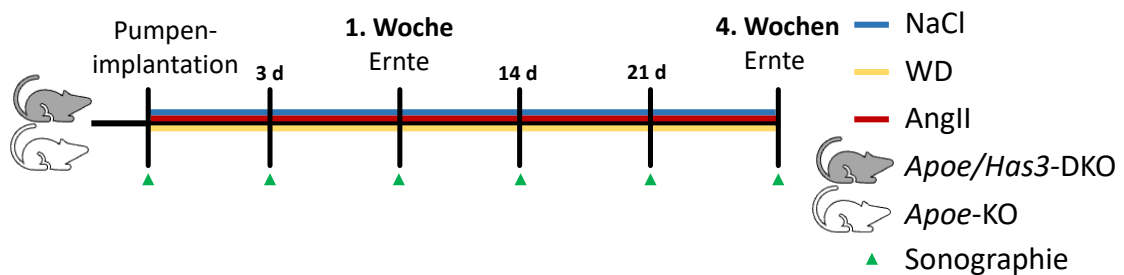


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Untersuchung von AAA.

In dieser Darstellung ist der zeitliche Ablauf der tierexperimentellen Arbeiten abgebildet. Nach der Pumpenimplantation mit entweder einer Lösung aus Angiotensin II (AngII) in einer Dosis von 1000 ng/kg/min oder einer physiologischen Kochsalz-Lösung (NaCl) erhielten sowohl *Apoe/Has3*-DKO als auch die Kontrollgruppen *Apoe*-KO Mäuse eine Westernndiät (WD). Die Aorta wurde sonographisch vor der Pumpenimplantation zur Basalbestimmung sowie 3, 7, 14, 21 und 28 Tage postoperativ durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte postoperativ nach 7 oder 28 Tagen.

2.1.3 Applikation von AngII mittels osmotischer Minipumpen

Die Induktion eines AAA erfolgte durch die Implantation einer osmotischen Minipumpe von Alzet® (Cupertino, USA) mit AngII oder NaCl für einen Zeitraum von 7 bis 28 Tagen. Die Minipumpe wurde entweder mit NaCl (0,9 %, B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) oder einer humanen AngII-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit einer Dosis von 1000 ng/kg/min befüllt¹⁴⁵. Eine chronische Infusion von AngII führt im Zusammenspiel mit der WD zur Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen und der Ausbildung von AAA⁴⁵.

2.1.4 Elastase-Perfusion zur Induktion eines abdominalen Aortenaneurysmas

Neben der Pumpenimplantation mit AngII kann eine Infusion mit 4,5 U/ml aus Schweinen stammende Pankreas-Elastase (*porcine pancreatic elastase*, PPE) (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) erfolgen, um ein AAA zu induzieren¹⁴⁶. Bei der Durchführung der Operation wird die freigelegte Aorta infrarenal mit einer verdauenden Enzymlösung durchspült,

sodass es zur Degradation der Aortenwand kommt und damit eine Aussackung der Aorta initiiert wird. Diese Aussackung entwickelt sich dann zu einem AAA^{146–148}. Verglichen wurden die mit PPE-behandelten Mäuse mit denen die anstelle der PPE-Lösung NaCl erhielten. Diese Operation wurde von Frau Julia Odendahl geborene Pauli durchgeführt.

2.1.5 Knochenmarkstransfer mit anschließender AngII-Infusion

Zur Untersuchung von Effekten durch Stroma- bzw. Immunzellen, wurde ein Knochenmarkstransfermodell eingesetzt. Hierzu wurden die Tiere Empfängertiere mit einer Strahlendosis von 10 Gy bestrahlt. Für die Versuchsdurchführung wurden *Apoe*-KO Mäuse als Spender und *Apoe/Has3*-DKO Mäuse als Empfänger und *vice versa* verwendet. Zum Ausschluss des Effekts durch den Knochenmarkstransfer (KMT) selber wurden Kontrollgruppen mit einem Transfer von *Apoe*-KO in *Apoe*-KO sowie *Apoe/Has3*-DKO in *Apoe/Has3*-DKO durchgeführt. Aus der Tibia und Femur der Spendertiere wurden die Knochenmarkszellen im Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium auf eine Konzentration von 5,5 Millionen Zellen eingestellt. Anschließend erfolgte der KMT über eine retrobulbäre Injektion in den Empfängertieren. Eine ausreichende antibiotische Infektionsprophylaxe wurde über das Trinkwasser verabreicht. In Abbildung 7 wurde der Ablauf des KMT mit anschließender Implantation von AngII-befüllten (1000 ng/kg/min) Minipumpen dargestellt.

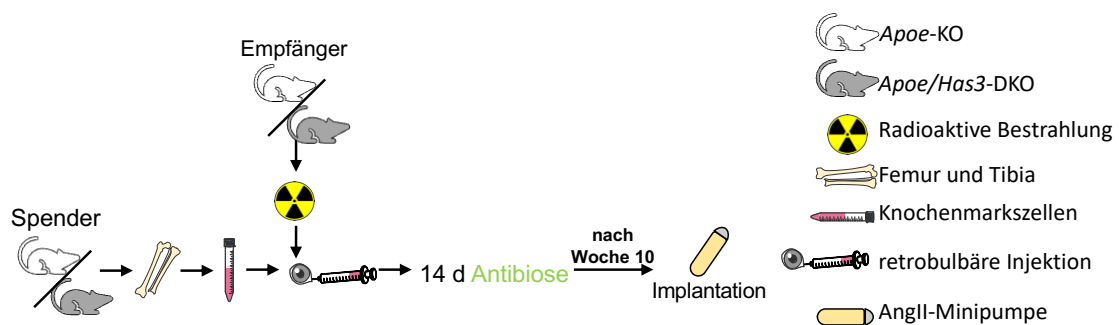


Abbildung 8. Schematische Darstellung des Knochenmarkstransfers (KMT) nach Bestrahlung mit anschließender Implantation der Minipumpe.

In einer Ganzkörperbestrahlung wurden *Apoe/Has3*-DKO und *Apoe*-KO Empfänger einer Bestrahlung ausgesetzt. Den Spendermäusen wurden die Knochenmarkszellen isoliert, aufgearbeitet und 5,5 Millionen Zellen retrobulbär den Empfängern injiziert. Als Spender wurden *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäuse verwendet. Damit ergeben sich vier Gruppen mit folgender Zusammensetzung:

- Apoe*-KO Spender in *Apoe/Has3*-DKO Empfänger,
- Apoe*-KO Spender in *Apoe*-KO Empfänger,
- Apoe/Has3*-DKO Spender in *Apoe*-KO Empfänger sowie
- Apoe/Has3*-DKO Spender in *Apoe/Has3*-DKO Empfänger.

Während der ersten vierzehn Tage erhielten die Empfänger eine prophylaktische Antibiotikatherapie. Die Pumpenimplantation mit AngII erfolgte 10 Wochen nach dem KMT. Die AngII Dosis betrug 1000 ng/kg/min.

2.2 Sonographie

2.2.1 Sonographische Untersuchung der Aorta

Ein murines AAA definiert sich durch eine Erweiterung des Aortendurchmessers um das 1,5-fache. Zur longitudinalen Detektion der Effekte auf die Aorta, wurden beide Genotypen zu Beginn, 3, 7, 14, 21 und 28 Tagen nach der Implantation der osmotischen Pumpen mit AngII oder nach der PPE-Infusion sonographisch untersucht. Für diesen Zweck wurde das hochauflösende Ultraschalgerät Vevo 3100 mit einem 20 – 46 MHz Schallkopf (MX400, VisualSonics Inc., FUJIFILM, Toronto, Kanada) verwendet. Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert. Während der gesamten sonographischen Messung wurden die Herzfrequenz, die Atemfrequenz und das Elektrokardiogram (EKG) der Maus über einen beheizbaren Elektroden-Kontakt-Pad aufgezeichnet. Die Körpertemperatur wurde mit einer rektalen Sonde kontinuierlich gemessen. Zur Untersuchung der abdominalen Aorta wurden Kurz- und Langachsenaufnahmen im B-Mode sowie Pulswellen und Farbdopplerbilder aufgenommen. In der longitudinalen Ansicht wurde zur Visualisierung der gesamten Länge der abdominalen Aorta eine sowie zur initialen Abschätzung der Größe, Form sowie Lokalisation des Aneurysmas durchgeführt. In der Kurzachsenaufnahme wurde der maximale Aortendurchmesser nach der *leading to leading edge* Methode¹⁴⁹ sowie die Lumenfläche als maximale Querabmessung orthogonal zur Gefäßachse bestimmt. Repräsentative dreidimensionale (3D)-Bilder wurden als Serie aus zweidimensionalen Aufnahmen gebildet, die mit dem Herzzyklus und der Atemfrequenz abgeglichen und dann zu einem 3D-Datensatz zusammengestellt wurden. Die Sonde mit dem 3D-Motor wurde transversal entlang der suprarenalen Aorta oberhalb der rechten *Arteria renalis* bewegt. Die gemessene Entfernung betrug 1,0 cm. Die Blutgeschwindigkeit wurde mittels des gepulsten Doppler Verfahrens entweder in der suprarenalen Aorta zwischen dem *Arteria coeliacus* und der *Arteria mesenterica superior* oder der größten Stelle des Aneurysmas gemessen. Der Farbdoppler wurde zur Visualisierung des Blutflusses und des Aortenlumens herangezogen. Abdominale AD wurden anhand der Durchmesserzunahme, Änderung der Blutflussgeschwindigkeit und dem Vorhandensein einer Dissektion und einer Kappe bestimmt. Für die Aufnahme der thorakalen Aorta wurde die parasternale Longitudinalansicht verwendet. Alle Aufnahmen wurden während der Systole und Diastole gemessen. Die echokardiographischen Bilder wurden für beide Modelle mit Vevo3100 (VevoLAB, FUJIFILM, Visual Sonics, Toronto, Kanada) ausgewertet. Daraus ergaben sich die Durchmesser während der Systole und der Diastole, die maximale systolische Blutgeschwindigkeit, die Unterscheidung von

falschem und echtem Lumen sowie von Thromben und AD. Die sonografischen Untersuchungen und die Auswertungen wurden von Dr. Tatsiana Suvorava durchgeführt.

2.2.2 Echokardiographie

Zur Bestimmung der kardialen Funktionsparametern wurden *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäuse vor der AngII-Infusion sowie 3 und 7 Tage nach der AngII-Infusion echokardiografisch untersucht. Für diesen Zweck wurde das hochauflösende Ultraschalgerät Vevo 3100 mit einem 20 – 46 MHz Schallkopf (MX400, VisualSonics Inc., FUJIFILM, Toronto, Kanada) verwendet. Die Tiere wurden mit einer Isofluran narkotisiert. Während der gesamten sonographischen Messung wurden die Herzfrequenz, die Atemfrequenz und das EKG der Maus über einen beheizbaren Elektroden-Kontakt-Pad aufgezeichnet. Zusätzlich wurde die Körpertemperatur mithilfe einer rektalen Temperaturmessung verfolgt und bei 37 °C gehalten.

Die parasternale Ansicht wurden in longitudinaler Achse aufgenommen. Die endsystolischen und enddiastolischen Volumina des linken Ventrikels (LV) wurden durch Identifizierung der Rahmen mit maximalen und minimalen Querschnittsflächen berechnet. LV-Ejektionsfraktion (LVEF), Herzzeitvolumen (HZV) und Schlagvolumen (SV) wurden aus den Volumendaten berechnet. Die echokardiographischen Untersuchungen und die Auswertung erfolgten durch Dr. Tatsiana Suvorava.

2.3 Histologische Untersuchungen

Nach dem Spülen der Aorta mit einer PBS-Lösung, um restliche Blutrückstände zu entfernen, wurde das perivaskuläre Fett der Aorta mit größter Vorsicht entfernt, ohne dabei die *Tunica adventitia* zu beschädigen. Anschließend wurde die Aorta in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA, Histofix 4%, Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 24 h bei 4 °C fixiert und die Morphologie erhalten, da es zur Quervernetzung der Proteine kommt. Nach der Fixierung wurde die Aorta in PBS überführt und in einer ansteigenden Ethanolreihe und Roticlear® (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) entwässert. Die Aorta wurde im Paraffinblock eingebettet, im Rotationsmikrotom eingespannt und in konsekutive Querschnitte geschnitten. Die Querschnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Superfrost®plus, Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen und für 24 h bei Raumtemperatur gelagert,

um sie dann im Klimaschrank für 60 min bei 60 °C zu trocknen, wodurch es zu einer Hitzefixierung des Gewebes auf dem Objektträger kam.

2.3.1 Elastika-Van Gieson Färbung

Bei der Elastika-Van Gieson Färbung handelt es sich um eine Trichromfärbung, wobei es zur Visualisierung der Zellkerne, der elastischen Fasern und der Kollagenfibrillen in den Aortenquerschnitten kommt. Vor der Färbung erfolgte eine Entparaffinierung des Gewebes, da die Färbung in einem hydrophilen Milieu ablaufen muss. Hierzu wurden die Objektträger mit den hitzefixierten Aortenquerschnitten dreimal in RotiClear® (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für 15 min gegeben, anschließend für 2 min in eine absteigende Ethanolreihe (100 %, 96 % und 70 %) überführt und zum Schluss zweimal für 5 min in PBS gewaschen.

Die auf diese Weise entparaffinierten Objektträger wurden dann mit einer Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für 20 min gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser gespült. Mit 80 %igen Ethanol wurden die Schnitte differenziert und mit destilliertem Wasser gespült. Durch die erste Färbelösung wurden die elastischen Fasern dunkelviolet angefärbt. Mit der Eisenhämatoxylinlösung (nach Weigert A + nach Weigert B, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Zellkerne für 3 min angefärbt. Um Hämatein-Niederschläge zu vermeiden, wurde erneut mit destilliertem Wasser gespült. Die Färbung mit Hämatoxylin erfolgt im Säuren, weshalb durch das Spülen mit Leitungswasser für 10 min die angefärbten Zellkerne eine blaue Farbe annehmen. Nach dem Bläuen erfolgte die Färbung mittels Gieson-Lösung (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für 2 min. Anschließend erfolgte die Entwässerung in der aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 % und 100 %). Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Eindeckmittel Roti®Mount (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) konserviert. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mittels Objektiven mit einer 2,5- sowie 10-fachen Vergrößerung am IMAGER M2 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland). Zur Auswertung der Aufnahmen wurde die ZEN-Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

2.3.2 Second Harmonic Generation Mikroskopie

Bei der Frequenzverdopplung (*Second Harmonic Generation*, SHG) handelt es sich um eine nichtlineare optische Technik zur Strukturaufklärung biologischer Gewebe. Insbesondere wird SHG zur Identifizierung von Kollagenfasern verwendet¹⁵⁰. Bei der

SHG wird ein intensiver Laserstrahl durch die Gewebeprobe geleitet. Beim Aufprall des Lichts auf die Kollagenfasern, kommt es dabei zur Erzeugung eines Lichts mit der doppelten Frequenz bzw. mit der Hälfte der Wellenlänge des ursprünglichen Laserstrahls. Die Lichtstrahlen werden von Detektoren erfasst und in Abhängigkeit zu der Ausrichtung und der Dichte des Kollagens im Gewebe ohne weitere Färbemethode charakterisiert¹⁵¹. Für die SHG-Methode wurden in Paraffin eingebettete Aortenquerschnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm verwendet. Zunächst wurden die Proben wie bereits oben beschrieben entparaffiniert, mit einem *Chameleon Vision II* Laser bestrahlt und mit einem TCS SP8 Mikroskop (*Leica microsystems*, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Die zur Frequenzverdopplung verwendete Wellenlänge wurde auf 810 nm definiert und mit einer Infrarot Apo L25x/0.95 W Objektiv aufgezeichnet. Die mikroskopischen Aufnahmen der SHG-Methode wurden von Christian Jüngst von der *Cluster of Excellence for Aging Research at the University of Cologne* und Laura-Marie Zimmermann von der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerhard Sengle aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der ImageJ Software.

2.3.3 Tropoelastin Färbung

Bei dieser Methode handelt sich um eine lösungsmittelfreie Färbung der Aortenquerschnitte zur Anfärbung des Tropoelastins. Bei Tropoelastin handelt es sich um den Grundbaustein des Elastins, der sich durch eine alternierende Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Strukturen auszeichnet. Die entparaffinierten Aortenquerschnitte wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und unterliefen einer Antigendemaskierung. Eine Antigendemaskierung findet bei Schnittpräparaten nach Paraformaldehydfixierung und Paraffineinbettung statt. Dabei werden die Objektträger in ein Citrat gepuffertes System (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) bei einem pH-Wert von 6,0 bei 180 Watt für 15 min erhitzt. Hierdurch werden die quervernetzten Antigene wieder freigesetzt. Nach dem Kochen wurde die Lösung mit den Objektträgern für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Objektträger wurden dreimal für 10 min mit einem TBS-Puffer (*Tris-buffered saline*) gewaschen. Danach wurden die Aortenquerschnitte in 5 %igem Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*-BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und einer 0,1 %igen Triton X-100 Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 1 × TBS für 1 h geblockt, um unspezifische Bindungen durch hydrophobe Wechselwirkungen zu vermeiden. Der Erstantikörper, ein aus Kaninchen gewonnener polyklonaler Antikörper (ab21600, Abcam, Cambridge, UK), wurde in einer Konzentration von 1:200 in 0,5 % BSA in TBS über Nacht bei 4 °C hinzugegeben. Die

Objektträger wurden zweimal mit TBS-Tween 0,1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 10 min gewaschen, um dann den Zweitantikörper AF555 (A-21427, InvitroGen Thermo Fischer, Carlsbad, USA) in einer Konzentration von 1:1000 in 0,5 % BSA in TBS für 1 h zu inkubieren. Anschließend wurde der Waschschrift mit TBS-Tween 0,1 % für 10 min zweimal wiederholt und im TBS-gepufferten Lösungsmittel gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden, wie im Abschnitt 2.3.2 Second Harmonic Generation Mikroskopie beschrieben, aufgenommen.

2.4 Telemetrische Überwachung des Blutdrucks und der Herzfrequenz

Um den Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Entstehung einer Hypertonie zu verstehen, wurde der Blutdruck vor und nach der Verabreichung des blutdrucksteigernden AngII mit Hilfe eines telemetrischen Systems aufgezeichnet. Bei diesem Eingriff wurde den Mäusen ein Telemetrie-Transmitter unter die Haut implantiert und mittels zugehörigem Messkatheter, der in die *Arteria carotis communis* eingeführt wurde, wurde der Blutdruck abgeleitet. Die Übertragung der Messwerte erfolgte alle 20 Minuten für 10 Sekunden automatisch ohne Beeinflussung der Maus. In Kombinationsnarkose mit Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin (10 mg/kg KG) wurde eine mediane Hautinzision im Halsbereich durchgeführt. Dabei wurde unter vorsichtiger Mobilisierung des Fett- und Bindegewebes die *Arteria carotis communis* freipräpariert. Es wurden drei Fäden unter der Arterie platziert. Ein Faden wurde an der Bifurkation des Gefäßes fest verschlossen und die anderen beiden Fäden wurden benutzt, um den Katheter (PA-C10, Data Sciences International (DSI), St. Paul, MN, USA) zu fixieren. In Richtung Aortenbogen wurde die *Arteria carotis communis* mittels einer Gefäßklemme verschlossen und an der Bifurkation ein Loch in der abgebundenen Region geschnitten. Der Messkatheter wurde in die Arterie eingeführt, die Gefäßklemme eröffnet, der Katheter bis zum Aortenbogen geschoben und mit den beiden Fäden fixiert. Im Anschluss wurde am Bauch subkutan eine Tasche per stumpfer Sondierung präpariert und in diese der Transmitter platziert. Der Katheter ist mit dem Transmitter verbunden, der Herzfunktionen wie Blutdruck und Herzfrequenz über Radiofrequenz an einen Empfänger überträgt. Nach der Implantation des Transmitters erhielten die Mäuse eine Regenerationsphase von sieben Tagen. Danach erfolgte eine Basalmessung über 72 Stunden. Zehn Tage nach der Transmitterimplantation erfolgte die Implantation der Minipumpen wie bereits in Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Die Daten wurden kontinuierlich für die Dauer der 28-tägigen AngII Infusion gesammelt. Die Auswertung der Daten

erfolgte mit der Software Ponemah (DSI, St. Paul, MN, USA). Annika Zimmermann führte die Operation zur Implantation des telemetrischen Systems durch.

2.5 Durchflusszytometrie

Die Immunzellpopulationen wurden im kardialen Blut sowie in verschiedenen Organen (Milz, Aorta und Tibia sowie Femur) mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell scanning*, FACS) untersucht. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die Organe wie zuvor beschrieben entnommen und zu Einzelzellsuspensionen aufbereitet. Mit Hilfe einer Antikörperfärbung und einer *Live/Dead*-Färbung wurden die Proben im BD LSR Fortessa™ (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) vermessen. Zur Berechnung der absoluten Zellzahl wurden Flow-12 Count™ *Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo 10.8.1 *Analysis Software* (Becton Dickinson & Company (BD), Franklin Lakes, New Jersey, USA). Eine Gating-Strategie für jedes Organ ist im Appendix dargestellt. Die ermittelten Immunzellpopulationen aus den verschiedenen Geweben sind in Tabelle 2 zusammengetragen.

Tabelle 2. Beschreibung der verschiedenen Immunzellen aus Blut und Aorta mithilfe der verwendeten Antikörper beim FACS.

Immunzellpopulationen im Blut	Antikörperkombination
myeloide Leukozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺
Lymphozyten	CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD3 ⁺
Monozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly-6G ⁻ CD115 ⁺
Ly-6C ^{high} Monozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly-6C ^{high}
Ly-6C ^{low} Monozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly-6C ^{low}
Neutrophile Granulozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly-6G ⁺
CD4 ⁺ T Zellen	CD45 ⁺ CD19 ⁺ Ly-6G ⁻ CD11b ⁻ CD19 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺
CD8a ⁺ T Zellen	CD45 ⁺ CD19 ⁺ Ly-6G ⁻ CD11b ⁻ CD19 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8a ⁺
B Zellen	CD45 ⁺ CD19 ⁺ Ly-6G ⁻ CD11b ⁻ CD19 ⁺
Immunzellpopulationen der Aorta	Antikörperkombination
myeloide Leukozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺
Lymphozyten	CD45 ⁺ Ly-6G ⁻ CD11b ⁻
Neutrophile Granulozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly-6G ⁺
Makrophagen	CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly-6G ⁻ F4/80 ⁺ CD64 ⁺

2.5.1 Blut

Um unspezifische Bindungen über den F_c-Rezeptor zu verhindern wurde eine Zugabe von 0,50 µl des CD16/32-Antikörpers für 10 min bei 4 °C der Probe zugegeben. Die Proben wurden dann mit den in Tabelle 4 angegebenen Antikörper-Kombinationen lichtgeschützt für 15 min bei 4 °C gefärbt. Da das Blut hauptsächlich aus Erythrozyten besteht und diese bei der Messung stören wurden diese mit Hilfe einer hypotonen Ammoniumchloridlösung (Ery-Lyse-Puffer, Tabelle 3) für 7 min bei 4 °C lysiert. Die Probe wurde anschließend bei 800 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PEB auf 50 µl resuspendiert. Zur Fixierung wurden 5 µl der Fixierlösung (Tabelle 3) für 20 min bei Raumtemperatur zugesetzt. Im nächsten Schritt wurde PEB (Tabelle 3) auf 1000 µl zugegeben und bei 800 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit PEB auf 212,5 µl resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen zur direkten Messung im BD LSRFortessa überführt. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeführt. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden 5,00 µl Blut aliquotiert und direkt mit Ery-Lyse-Puffer lysiert, anschließend zentrifugiert und das Pellet in PEB auf ein Volumen von 205 µl aufgenommen. Dieser Zellsuspension wurde dann mit 5,00 µl Flow Count™ Fluorospheres versetzt und im BD LSR Fortessa™ gemessen.

Tabelle 3. Verwendete Lösungsmittel für die durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Lysepuffer für Erythrozyten	155 mM NH ₄ Cl + 10 mM KHCO ₃ + 0,1 mM EDTA	Eigene Herstellung
PEB	2 mM EDTA + 0,5 % BSA in DPBS	Eigene Herstellung
Isotoner FACS Puffer	BD FACS Flow Trägerflüssigkeit	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
DMEM 10% FCS	10% fötales Kälberserum (FCS)	FCS, Gibco, NY, USA
	DMEM	Life Technologies™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA,
<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS)	1,26 mM CaCl ₂ + 0,49 mM MgCl ₂ + 0,41 mM MgSO ₄ + 5,3 mM KCl + 0,44 mM KH ₂ PO ₄ + 4,17 mM NaHCO ₃ + 137,39 mM NaCl + 0,34 mM NaH ₂ PO ₄ + 5,55 mM Glukose	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Enzymatische Verdaulösung für Aorta	1200 U/ml Kollagenase II	Worthington Biochemicals, Lakewood, USA
	60 U/ml DNase	Sigma Aldrich, St. Louise, USA
	in HBSS	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Fixierlösung	1 % (V/V) Roti®-Histofix 10% in DPBS	Eigene Herstellung

Tabelle 4. Verwendete Antikörper zur Identifizierung von Leukozyten, Lymphozyten und hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen für die durchflusszytometrische Untersuchung.

Gewebe	Population	Antikörper-Fluorochrom	Klon	Hersteller	Titer
Blut Knochenmark Milz	Leukozyten	CD45-PE	30-F11	Biolegend, San Diego, USA	1:25
		Ly6G-BV650	1A8	Biolegend, San Diego, USA	1:12,5
		CD11b-PE/Dazzle	M1/70	Biolegend, San Diego, USA	1:100
		Ly-6C-APC-Cy7	HK1.4	Biolegend, San Diego, USA	1:200
		CD115-BV711	AFS98	Biolegend, San Diego, USA	1:50
	Lymphozyten	CD19-PacBI	6D5	Biolegend, San Diego, USA	1:12,5
		CD3-AF700	17A2	Biolegend, San Diego, USA	1:50
		CD8a-AF647	53-6.7	Biolegend, San Diego, USA	1:100
		CD4-FITC	RM4-5	Biolegend, San Diego, USA	1:200
	Aorta	Leukozyten	Live Dead aqua 526	N/A	Thermo Fisher Scientific, Eugene, USA
CD45-AF 700			30-F11	Biolegend, San Diego, USA	1:25
Ly-6G-BV421			1A8	Biolegend, San Diego, USA	1:25
CD11b-PerCP-Cy5-5			M1/70	Biolegend, San Diego, USA	1:25
F4/80-PE			BM8	Biolegend, San Diego, USA	1:25
CD64-APC			X54-5/7.1	Biolegend, San Diego, USA	1:25
Knochenmark	Hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen	CD16/32 – BV421	93	Biolegend, San Diego, USA	1:50
		CD34 – PE/ Dazzle	581	Biolegend, San Diego, USA	1:50
		CD48 – PE	BJ40	Biolegend, San Diego, USA	1:50
		CD150 – PE/ Cy5	TC15-12F12.2	Biolegend, San Diego, USA	1:200
		c-kit – PE/ Cy7	2B8	Biolegend, San Diego, USA	1:100
		Lineage – AF700	17A2	Biolegend, San Diego, USA	1:25
		Sca-2 – BV650	1A8	Biolegend, San Diego, USA	1:100

2.5.2 Milz

Für die durchflusszytometrischen Analyse der Milz wurde diese zunächst mit PEB in ein gentleMACS C-Röhrchen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben, woraufhin diese in einem gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) für 60 s dissoziiert wurde. Diese Milzsuspension wurde über einen 70 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) gegeben. Im Anschluss wurde das Filtrat bei 800 x g für 10 min und bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DPBS auf 250 µl resuspendiert. Aus dieser Milzzellsuspension wurden 12,5 µl entnommen und mit 0,5 µl CD16/32 Antikörper versetzt. Um tote Zellen von den lebenden zu unterscheiden, wurde danach 88,0 µl LIVE/DEADTM *fixable aqua* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Um überschüssiges LIVE/DEADTM *fixable aqua* herauszuwaschen wurden 1000 µl PBS addiert und anschließend bei 800 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 12,5 µl PEB resuspendiert. Die Antikörperfärbung erfolgte wie im Abschnitt 2.3.1 für 15 min bei 4 °C. Danach wurde der Ery-Lyse-Puffer für 7 min bei 4 °C zugegeben, die Zellsuspension bei 800 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur mit 5 µl der Fixierlösung stabilisiert. Danach wurden 1000 µl PEB pipettiert, durchmischt und bei 800 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 212,5 µl PEB resuspendiert, um die Probe im BD LSRFortessa zu vermessen.

2.5.3 Knochenmark

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Knochenmarkszellen wurde nach 7-tägiger AngII- oder NaCl-Infusion Femur und Tibia der Mäuse entnommen. Um an das Knochenmark zu gelangen, wurden die Epiphysen abgetrennt und der Knochen wurde mit einer Kanüle mit PBS gefüllten Spritze über einen 70 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) ausgespült. Das Filtrat wurde auf eine ähnliche Weise wie das Blut oder Milz zur durchflusszytometrischen Identifizierung der Leukozyten und Lymphozyten prozessiert (Tabelle 4). Für die Bestimmung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPC) wurden die Knochenmarkszellen wie zuvor beschrieben isoliert und filtriert.

2.5.4 Aorta

Um die Immunzellen der Aorta messen zu können, wurde die Aorta zunächst mit einer Mischung aus PBS und Heparin gespült. Nach der Entnahme wurde die Aorta mit einer Federschere zerkleinert und in einer enzymatischen Verdauung (Tabelle 3) bei 37 °C für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Immunsuspension durch einen 70 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) unter Zugabe von insgesamt 6000 µl PEB filtriert. Diese Suspension wurde bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1000 µl DMEM 10% FCS aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert und bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 37,5 µl PEB aufgenommen und mit 1,50 µl CD16/32-Antikörper für 10 min bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen an den Fc-γ-Rezeptor auszuschließen. Die Zellsuspension wurde anschließend für die Antikörperfärbung sowie für die Flow Count™ Messung aufgeteilt. Vor der Antikörperfärbung wurde die Suspension mit 1,00 µl LIVE/DEAD™ fixable aqua (Life Technologies, Eugene, OR, USA) in 40,0 µl PBS für 30 min bei 4 °C versetzt, um lebende Zellen zu identifizieren. Anschließend wurde die Probe gewaschen und bei 300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1000 µl PBS der Suspension hinzugegeben, bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 25,0 µl PEB resuspendiert und mit dem Antikörpergemisch für 15 min bei 4 °C gefärbt. Vor der Messung in PEB erfolgte eine weitere Zugabe von 1000 µl PEB. Die Probe wurde bei den oben genannten Parametern zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde auf 225 µl PEB resuspendiert und anschließend vermessen. Zur Bestimmung der Zellkonzentration mittels Flow Count™ wurde zusätzlich eine Kontrolle der Probe auf Blutkontamination durchgeführt. Dazu wurde die Probe mit dem CD16/32-Antikörper blockiert und anschließend für 15 min mit 0,5 µl Ter119-Antikörper inkubiert. Danach wurde der Zellsuspension 1000 µl PEB hinzugegeben und unter den genannten Parametern zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit Flow Count™ Fluorospheres in 212,5 µl PEB aufgenommen und im BD LSRFortessa™ gemessen.

2.6 In-vitro Monozytenexperimente

2.6.1 Monozytenisolation und Vorbereitung für die Polymerasekettenreaktion

Die Isolation aus dem Knochenmark von Femur und Tibia erfolgte an *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen. Zur Isolierung der Monozyten wurde das murine CD115 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Kultivierung der Monozyten erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM Kultivierlösung mit der Zusammensetzung wie in Tabelle 5 beschrieben. Die Stimulierung mit AngII (10 ng/ml) erfolgte für 6 h, wohingegen Kontrollzellen die DMEM Kultivierlösung ohne den Zusatz von AngII erhielten. Gemäß dem Herstellerprotokoll von RNeasy® Plus Universal Kit Mini 50 (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurde die RNA isoliert und eine quantitative Polymerasekettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) durchgeführt.

Tabelle 5. Verwendete Lösungsmittel für die in-vitro Monozytenexperimente.

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM Kultivierlösung	5,5 mmol/ml Glukose	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
	10 % FBS	
	100 U/ml Penicillin	
	100 µg/ml Streptomycin	
	15 mmol/ml HEPES	Lonza, Walkersville, USA
RPMI Primärlösung	RPMI 1640 medium	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
	10 % FBS	
	100 U/ml Penicillin	
	100 µg/ml Streptomycin	

2.7 Molekularbiologie

2.7.1 RNA-Isolation

Gemäß dem Herstellerprotokoll von RNeasy® Plus Universal Kit Mini 50 (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurde das Gewebe (Aorta und Knochenmark) lysiert und die RNA isoliert. Zur Qualitätskontrolle wurde die RNA-Konzentrationsbestimmung fotometrisch durch Messung der Absorption im UV-Bereich von 230, 260 und 280 nm mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes am Nanodrop (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

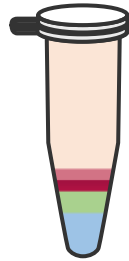
2.7.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde die mRNA des Gewebes verwendet, um anschließend als Matrize für die qPCR zu dienen. Es wurde 1 µg RNA in cDNA für jede Probe umgeschrieben. Zur Herstellung wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

2.7.3 Quantitative Realtime PCR

Tabelle 6. Zusammensetzung der für die qPCR benötigten Substanzen.

Puffer	Zusammensetzung	Volumen µl	
PCR-Reaktionslösung	Mastermix	5,00	
	forward Primer	0,45	
	reverse Primer	0,45	
	cDNA (Probe)	1,00	
	Wasser	3,10	
	Summe	10,00	



Die quantitative Realtime PCR wurde mit dem Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies, Eugene, OR, USA) in einem StepOnePlus™-Real-Time-PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) durchgeführt. Dazu wurden die cDNA in einer Mischung aus Polymerase, SYBR™ Green, dNTP und Puffer (Mastermix) in der PCR-Reaktionslösung gegeben (Tabelle 6). Die zugefügten Primer für das jeweilige Zielgen wurden in einer Konzentration von je 0,625 µM verwendet. Alle Proben wurden in Duplikaten vermessen. Als interne Kontrolle wurde Rn18s verwendet und die relative mRNA-Expression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode berechnet. Die verwendeten Primer für das jeweilige Gewebe sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7. Verwendete murine Gene mit dem Gensymbol, den forward und reverse Primersequenzen in der qPCR.

Gen	Forward	Reverse
<i>Ccr5</i>	AGACATCCGTTCCCCCTACA	GCAGGGTGCTGACATACCAT
<i>Cd44</i>	GACCGGTTACCATAACTATTGTC	CATCGATGTCTTCTTGGTGTG
<i>Col1a1</i>	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	AAACCTCTCTCGCCTCTTGC
<i>Col3a1</i>	GAGAAAGGGGTCCTAGTGGC	CACCGACTTCACCCTTTGGA
<i>Cx3cr1</i>	AGTGTGTCGGGTGTCCATTC	GGTAAGGCGAGTCAGCAGTT
<i>Has1</i>	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
<i>Has2</i>	CAAAAATGGGGTGGAAAGAG	ACAGATGAGGCAGGGTCAAG
<i>Has3</i>	CTCAGTGGACTACATCCAGG	GACATCTCCTCCAACACCTC
<i>Icam1</i>	TTCTCATGCCGCACAGAACT	TCCTGGCCTCGGAGAACATTA
<i>Il1β</i>	GGATGAGGACATGAGCACCT	CGTCACACACCAGCAGGTTA
<i>Mmp2</i>	CCCAGATGTGGCCAACTACA	TAAGGCCCGAGCAAAAGCAT
<i>Mmp8</i>	CACTGATCCTGGTGCCTTGA	GGTTGGATGGGGTTGTCTGA
<i>Mmp9</i>	CCTGAAAACCTCCAACCTCA	GCTTCTCTCCCATCATCTGG
<i>Rn18s</i>	GCAATTATTCCTCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>Tnfa</i>	TCGAGTGACAAGCCTGTAGC	AAGGTACAACCCATCGGCTG
<i>Vcam1</i>	GTCACGGTCAAGTGTGGC	TGTTTCATGAGCTGGTCACCC

2.8 Bulk-RNA Sequenzierung muriner Aorten

Die frei präparierten Aorten wurden mit einer Lösung aus Heparin und PBS gespült und vom perivaskulären Fett befreit. Im Anschluss erfolgte die RNA-Extraktion aus dem Gewebe und die darauffolgende Aufreinigung der RNA gemäß dem Herstellerprotokoll mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit (50) (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Quantifizierung der RNA wurde anschließend am Nanodrop (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) determiniert. Zur Bulk-Sequenzierung wurden die RNA Proben Dr. Patrick Petzsch überreicht. Zur Qualitätskontrolle wurde ein Fragmentanalysierer auf Basis einer Kapillarelektrophorese verwendet und zudem wurde ein Total RNA Standard Sensitivity Assay (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA) durchgeführt. Jede RNA-Probe wurde für die transkriptionelle Analyse mit dem Qubit RNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) quantifiziert. Für die Sequenzierung wurde zunächst eine Sequenzierungsbibliothek für die synthetisierte cDNA aus der RNA-Probe gemäß Herstelleranweisung nach dem VAHTS® Universal V6 RNA-seqLibrary Prep Kit (Vazyme Biotech Co., Ltd., San Diego, USA) vorbereitet. Für die Sequenzierung wurden 500 ng RNA benutzt. Durchgeführt wurde eine *paired-*

end Sequenzierung am NextSeq2000 System (Illumina Inc., San Diego, USA) mit einer Read Einstellung von 2x100 Basenpaaren. Bei der *paired-end* Sequenzierung handelt es sich um eine Methode, bei der sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende eines RNA-Fragments sequenziert wurde, sodass Informationen aus beiden Enden erfasst wurden. Während des Sequenzierungsprozesses wurde die cDNA-Fragmente in kürzere Fragmente fragmentiert. Diese Fragmente wurden als Reads bezeichnet und hatten eine Sequenz von 2x100 Basenpaaren.

Nach der Sequenzierung wurde die Datenanalyse von Dr. Patrick Petzsch durchgeführt. Hierbei wurden die bioinformatisch generierten bcl-Daten in ein fastq-Format mit dem BCL Convert tool (v3.8.4, Illumina Inc. San Diego, USA) umgeschrieben.

2.9 Multiplex Zytokin-Analyse

Die Multiplex-Analyse wurde zur Identifizierung und Quantifizierung von mehreren Chemokinen und Zytokinen aus einer Blutprobe herangezogen. Da das Blutplasma die löslichen Chemokine und Zytokine enthält, wurde dieses von den zellulären Bestandteilen getrennt. Dazu wurde zunächst das Vollblut bei 4 °C für 15 min bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, das Blutplasma, entnommen und dieser in einem nächsten Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 5 min und bei 13000 Umdrehungen/min aufgetrennt. Das auf diese Weise gewonnene Blutplasma wurde anschließend bei -80 °C weggefroren. Die Analyse erfolgte gemäß Herstellerangaben am Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Das Blutplasma wurde in einem Verhältnis von 1:4 verdünnt, damit die 23 Zytokine Eotaxin, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GCSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), Interferon Gamma (INF γ), Interleukin 1a (IL1 α), IL1b, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL12 (p40), IL12 (p70), IL13, IL17A, CXCL1, MCP1/CCL2, MIP1 α /CCL3, MIP1 β /CCL4, RANTES/CCL5, und TNF α vermessen werden konnten. Die Messung der Zytokine erfolgte am Bio-Plex® 200 System (BioRad, Hercules, CA, USA). Zur Bestimmung der Konzentration in pg/ml wurden die Daten mit Hilfe der Bio-Plex Manager Software™ (BioRad, Hercules, CA, USA) umgerechnet. Durchgeführt wurde die Messung von Dr. Stefan Lehr und Dr. Sanja Hartwig vom Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ, Düsseldorf, Deutschland).

2.10 Statistische Analysen

Alle statistischen Berechnungen wurden mit der Software Prism 10 für MacOS Version 10.0.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Zur Eliminierung von statistischen Ausreißern wurde der Grubb Ausreißer Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt. Wiederholte Messungen wurden mittels OneWay oder TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Sidak oder Tukey analysiert. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der D'Agostino-Pearson-Test verwendet. Zur Bestimmung der Signifikanz zwischen zwei normalverteilten Datengruppen wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test verwendet. Wenn die Datengruppen nicht normal verteilt waren, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Auswertung der RNA-Sequenzierungsergebnisse (Bulk-Sequenzierung) wurden die erwartete Fehlerrate (*false discovery rate*, FDR) und die Bonferroni-Korrektur zur Durchführung statistischer Tests verwendet. Das n in den Diagrammen steht für ein einzelnes Tier oder Gewebe.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der *Has3* auf die AngII-induzierte Entwicklung von AAA

3.1.1 Inzidenz für Aneurysmen, Rupturen und Mortalität

Zunächst wurde die Entwicklung eines AAs in beiden Genotypen vergleichend untersucht. Nach 28-tägiger AngII-Infusion entwickelten sowohl *Apoe*-KO als auch *Apoe/Has3*-DKO Mäuse ein AAA (Abbildung 9A).

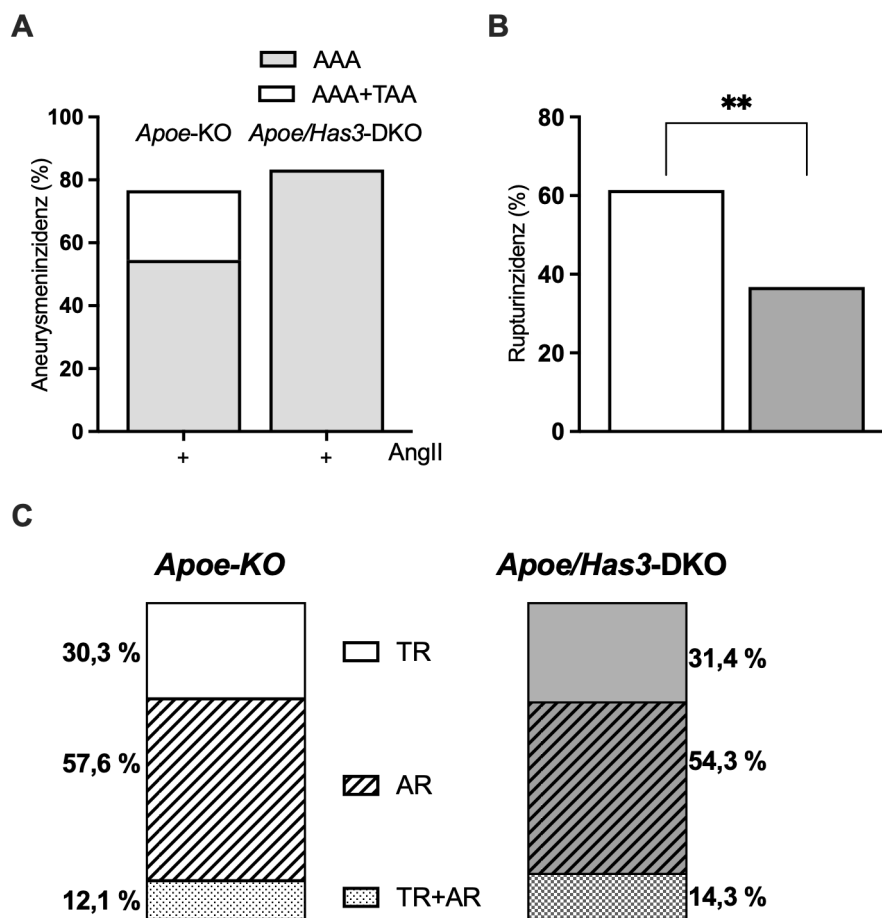


Abbildung 9. *Has3*-Defizienz mit erhöhter Inzidenz für AAA aber verringerter Rupturinzidenz nach 28-tägiger AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. **A.** *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Aorten wurden zum Zeitpunkt vor und 28 Tage nach der Behandlung mit AngII untersucht. Es erfolgte eine sonographische Beurteilung abdominaler (AAA) und thorakaler Aortenaneurysmen (TAA). Definitionsgemäß wurde ein Aneurysma ab einer Vergrößerung des Aortendurchmessers um das 1,5-fache festgestellt. Dargestellt sind die berechneten Inzidenzen; *Apoe*-KO (n=14), *Apoe/Has3*-DKO (n=14). **B.** Jede Maus wurde postmortal einer Nekropsie unterzogen, um die Todesursache festzustellen. *Apoe*-KO (n=58), *Apoe/Has3*-DKO (n=47). **p ≤ 0.01 nach exakter Test nach Fisher. **C.** Es erfolgte die Bestimmung der Rupturlokalisierung. Dabei wurde zwischen thorakalen (TR), abdominalen (AR) sowie kombinierten thorakalen und abdominalen (TR+AR) Aortenrupturen unterschieden. Dargestellt sind die Anteile der Rupturlokalisationen in Prozent aller Rupturen.

Es zeigte sich eine erhöhte Inzidenz zur Entwicklung eines AAA bei *Apoe/Has3*-DKO Mäusen im Vergleich zu den *Apoe*-KO Kontrolltieren (83,3 % vs. 54,5 %). Zusätzlich zum AAA entwickelten 22,2 % der untersuchten *Apoe*-KO Mäuse ein thorakales AA (TAA), während bei den *Apoe/Has3*-DKO Mäusen kein einziger Fall eines TAA beobachtet wurde (Abbildung 9A). Jedes verstorbene Tier wurde einer Nekropsie unterzogen. Die primäre Todesursache war sowohl bei den *Apoe*-KO als auch bei den *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine Ruptur der Aorta, die mit einer letalen Blutung einherging. In einem Zeitintervall von 28 Tagen nach AngII-Infusion verstarben signifikant mehr *Apoe*-KO als *Apoe/Has3*-DKO Mäuse an einer Ruptur (Abbildung 9B). Abhängig von der Lokalisation der Ruptur wurde zwischen abdominalen, thorakalen und eine Kombination aus abdominalen und thorakalen Rupturen differenziert, jedoch unterschieden sich die Genotypen hinsichtlich der Rupturlokalisierung nicht (Abbildung 9C).

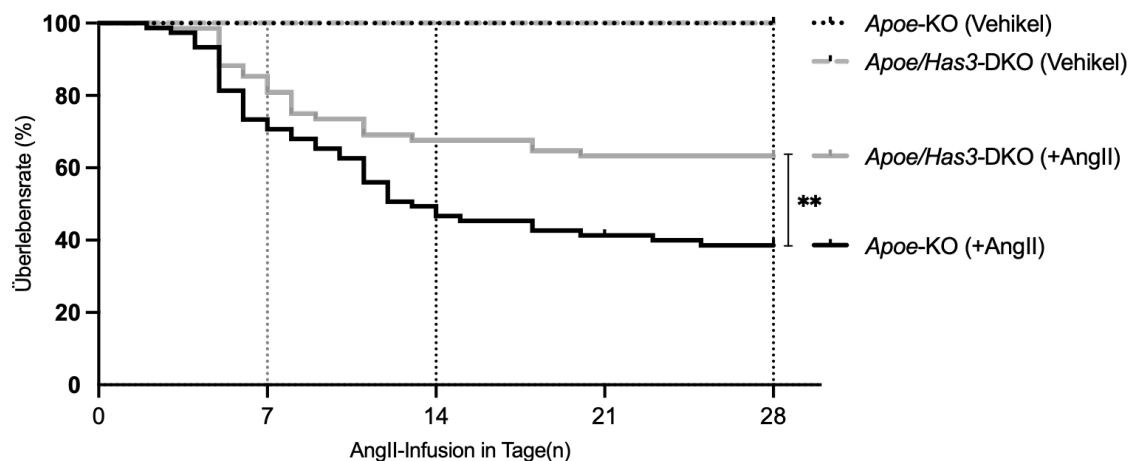


Abbildung 10. Has3-Defizienz führt nach AngII-Infusion zu einer reduzierten Überlebensrate. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min sowie mit einer Kontrolllösung (Vehikel) behandelt. In der Überlebensanalyse wurde die Überlebensrate für den gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen für beide Genotypen aufgeführt. *Apoe*-KO [n(Vehikel)=6; n(AngII)=75], *Apoe/Has3*-DKO [n(Vehikel)=6; n(AngII)=68]. Log-Rank-Test $\chi^2(1) = 7,835$, ** $p \leq 0.01$.

Innerhalb der 28-tägigen AngII-Infusion wurde jeder Todesfall registriert und in einem Kaplan-Meier-Kurve zusammengefasst, um die Überlebensrate beider Genotypen zu bestimmen (Abbildung 10). *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäuse, die eine Kontrolllösung (Vehikel) erhielten, überlebten den gesamten 28-tägigen Beobachtungszeitraum, sodass die Überlebensrate bei 100 % lag. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit AngII zu Todesfällen in beiden Genotypen. Am siebten Tag der AngII-Infusion fiel die Überlebensrate auf 73,2 % für *Apoe*-KO und 75,6 % für *Apoe/Has3*-DKO Mäuse. Nach 14-tägiger AngII-Infusionsdauer betrug die Überlebensrate 44,6 % vs. 62,2 % und nach 21 Tagen 37,5 % vs. 57,8 %. Nach 28

Tagen unterschied sich die Überlebensrate für *ApoE*-KO (37,9 %) von der für *ApoE/Has3*-DKO mit 59,6 %. Insgesamt war die Überlebensrate von *ApoE*-KO Mäusen nach einer 28-tägigen AngII-Infusion signifikant niedriger als die von *ApoE/Has3*-DKO Mäusen. Der Medianwert der Überlebenszeit von *ApoE*-KO Mäusen betrug 13 Tage, wohingegen bei *ApoE/Has3*-DKO Mäusen die Überlebensrate stets über 50 % lag.

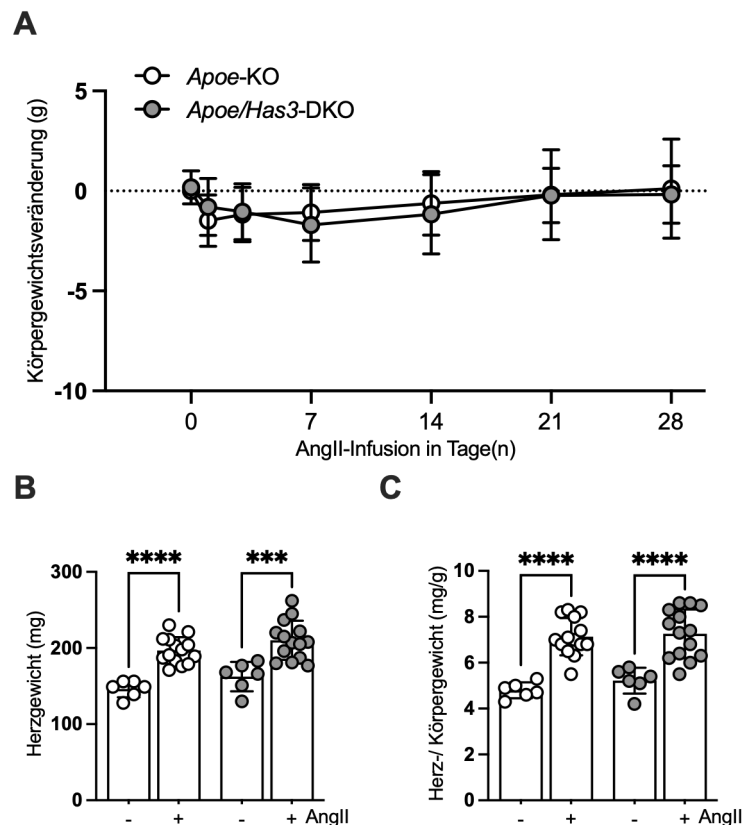


Abbildung 11. *Has3*-Defizienz ohne Einfluss auf Körper- oder Herzgewicht nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *ApoE*-KO und *ApoE/Has3*-DKO Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. **A.** Das Körpergewicht beider Genotypen wurde vor der Pumpenimplantation, sowie 24h, 72h, 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Pumpenimplantation erhoben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *ApoE*-KO (n=26), *ApoE/Has3*-DKO (n=24). **B.** Das Herzgewicht (mg) wurde sowohl von den Mäusen mit AngII (+) befüllten Pumpen als auch mit der Kontrollösung (-) nach 28 Tagen aufgetragen. **C.** Bestimmung des Verhältnisses aus Herzgewicht (mg) zum Körpergewicht (g). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *ApoE*-KO [n(-)=6, n(+)=14]; *ApoE/Has3*-DKO [n (-)=6, n (+)=14]; *** p \leq 0.001, **** p \leq 0.0001. TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Tukey.

Um das Ansprechen auf die AngII-Infusion zu monitoren, wurden Körper- und Herzgewicht überwacht. Wie in Abbildung 11A zu sehen, verloren sowohl *ApoE*-KO als auch *ApoE/Has3*-DKO Mäuse nach der Implantation der AngII-freisetzenden Minipumpen eingriffsbedingt kurzzeitig an Körpergewicht. Jedoch zeigte sich kein Unterschied der Genotypen im Verlauf der 28-tägigen AngII-Infusion. Die Behandlung mit AngII führte hingegen zu einem signifikant erhöhten Herzgewicht (von 146 mg auf 197 mg in *ApoE*-KO sowie von 162 mg auf 210 mg in *ApoE/Has3*-DKO), signifikant

erhöhten Herz- zu Körpergewicht (von 4,8 mg/g auf 7,1 mg/kg in *Apoe*-KO sowie von 5,2 mg/kg auf 7,3 mg/kg in *Apoe/Has3*-DKO) und somit zu einer kardialen Hypertrophie (Abbildung 11B, C). Jedoch war auch hier kein Unterschied zwischen den Genotypen detektierbar. Insgesamt zeigten die *Apoe/Has3*-DKO Mäuse nach einer 28-tägigen AngII-Infusionsdauer somit zwar eine erhöhte Inzidenz für die Entwicklung eines AAAs, jedoch war die Ruptur-bedingte Mortalität für *Apoe*-KO Mäuse signifikant höher.

3.1.4 Sonographische Untersuchungen der Aorta

Zur Detektion der Entwicklung und Progression des AAAs erfolgte die Bestimmung des maximalen Aortendurchmessers, der Lumenfläche sowie der maximalen Strömungsgeschwindigkeit des Blutes mittels sonographischer Untersuchung. Zum Zeitpunkt der Minipumpenimplantation zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des äußeren Aortendurchmessers (1,328 mm \pm 0,116 mm in *Apoe*-KO vs. 1,308 mm \pm 0,076 mm in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen) als auch der Lumenfläche (1,093 mm² \pm 0,118 mm² in *Apoe*-KO vs. 1,082 mm² \pm 0,156 mm² in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen) (Abbildung 12A, B).

Der maximale suprarenale Aortendurchmesser war am 14. (2,752 mm \pm 0,704 mm), 21. (3,402 \pm 1,104 mm) und am 28. (3,745 mm \pm 1,33 mm) AngII-Behandlungstag bei *Apoe/Has3*-DKO Mäusen signifikant größer als bei *Apoe*-KO Mäusen (2,017 mm \pm 0,345 mm; 2,387 mm \pm 0,512 mm; 2,493 mm \pm 0,481 mm) (Abbildung 12A). Nach einer 28-tägigen AngII-Infusion wies die Aorta von *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine vergrößerte Lumenfläche auf (16,692 mm² \pm 15,260 mm² vs. 4,618 mm² \pm 2,861 mm²) (Abbildung 12B). Die maximale systolische Strömungsgeschwindigkeit unterschied sich zu Beginn der AngII-Infusion zwischen den beiden Genotypen nicht voneinander (699,39 mm/s \pm 131,17 mm/s in *Apoe*-KO und 688,55 mm/s \pm 130,92 mm/s in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen) (Abbildung 12C). Am dritten Tag reduzierte sich diese signifikant für beide Genotypen im Vergleich zum Startzeitpunkt (427,91 mm/s \pm 112,96 mm/s in *Apoe*-KO und 408,02 mm/s \pm 92,26 mm/s in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen), jedoch ohne Unterschied zwischen den Genotypen. An den übrigen Tagen war die Strömungsgeschwindigkeit für beide Genotypen nicht unterschiedlich. In 3-dimensionalen rekonstruierten Volumenmessungen für die Aorten von *Apoe*-KO sowie *Apoe/Has3*-DKO Mäusen in Abbildung 12D ist repräsentativ das größere Volumen für *Apoe/Has3*-DKO Aorten im Vergleich zu den *Apoe*-KO Kontrolltieren nach einer 14-tägigen AngII-Infusion einander gegenübergestellt.

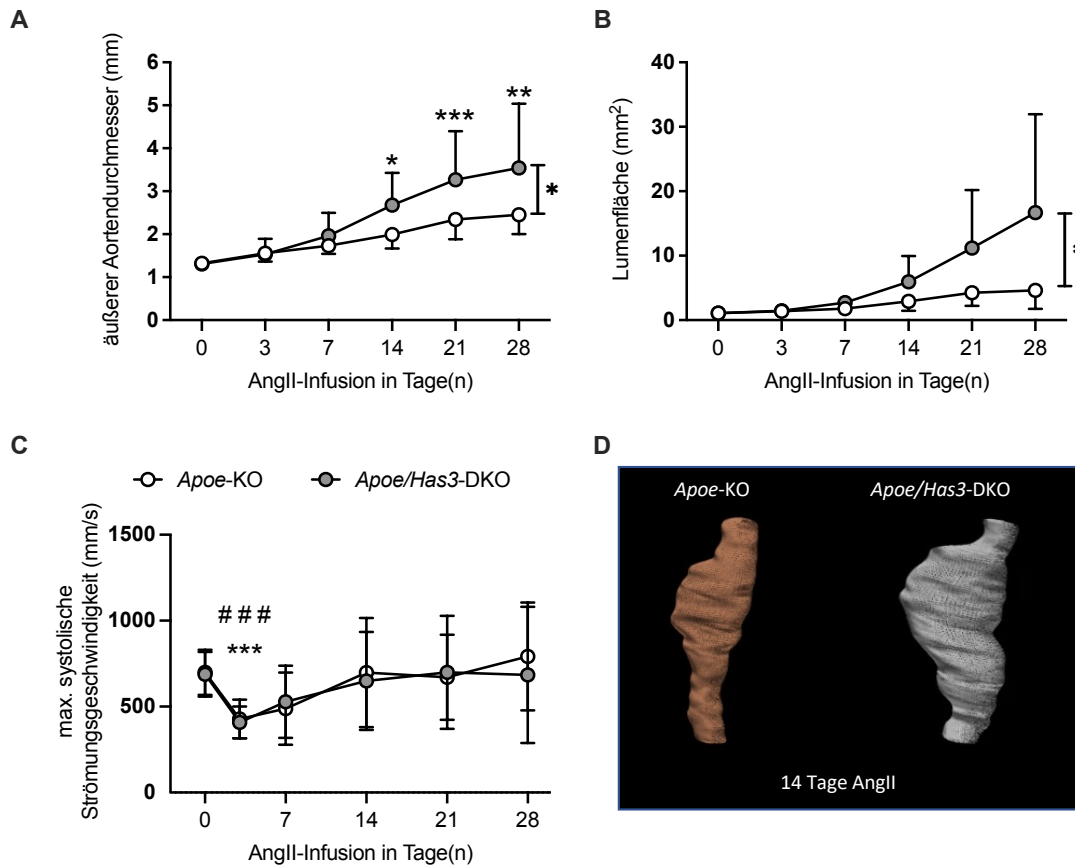


Abbildung 12. *Has3*-Defizienz führt zu vergrößertem Aortendurchmesser und zu vergrößerter Lumenflächen nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe-KO* und *Apoe/Has3-DKO* Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. **A.** Der äußere maximale Aortendurchmesser (mm) wurde mittels Ultraschallmessungen für *Apoe-KO* und *Apoe/Has3-DKO* Aorten an folgenden Tagen vermessen: vor, 3, 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Pumpenimplantation. **B.** Die Lumenfläche wurde anhand des gleichen Zeitintervalls wie in **A** berechnet. **C.** Die maximale (max.) systolische Strömungsgeschwindigkeit wurde unter Verwendung des gleichen Zeitintervalls wie in **A** bestimmt. In **D** sind repräsentative Illustrationen von 3-dimensionalen rekonstruierten Volumen für die Aorta von einer *Apoe-KO* (links) sowie einer *Apoe/Has3-DKO* (rechts) Maus nach einer 14-tägigen AngII-Behandlung abgebildet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *Apoe-KO* (n=14), *Apoe/Has3-DKO* (n=14); TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Sidak; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, #### $p \leq 0,001$.

Mittels Duplex-Sonographie konnte der Blutfluss in der abdominalen Aorta visuell für beide Genotypen dargestellt werden (Abbildung 13A, B). In dieser Abbildung sind repräsentative Aufnahmen für den zeitlichen Verlauf nach AngII-Infusion einer *Apoe-KO* sowie einer *Apoe/Has3-DKO* Aorta dargestellt. Mithilfe der roten Fläche wurde der Blutfluss im Aortenquerschnitt visualisiert. Zu Beginn der AngII-Infusion nahm der Blutfluss die gesamte Querschnittsfläche der Aorta bei beiden Genotypen ein. Im Verlauf der Infusionsdauer verringert sich der Aortenlumen infolge der Kompression, die vom falschen Lumen während der Entwicklung einer AD hervorgerufen wurde. Mithilfe der

repräsentativen Aufnahmen in Abbildung 13 wurden AAA mit einem echten sowie falschen Aortenlumen visualisiert.

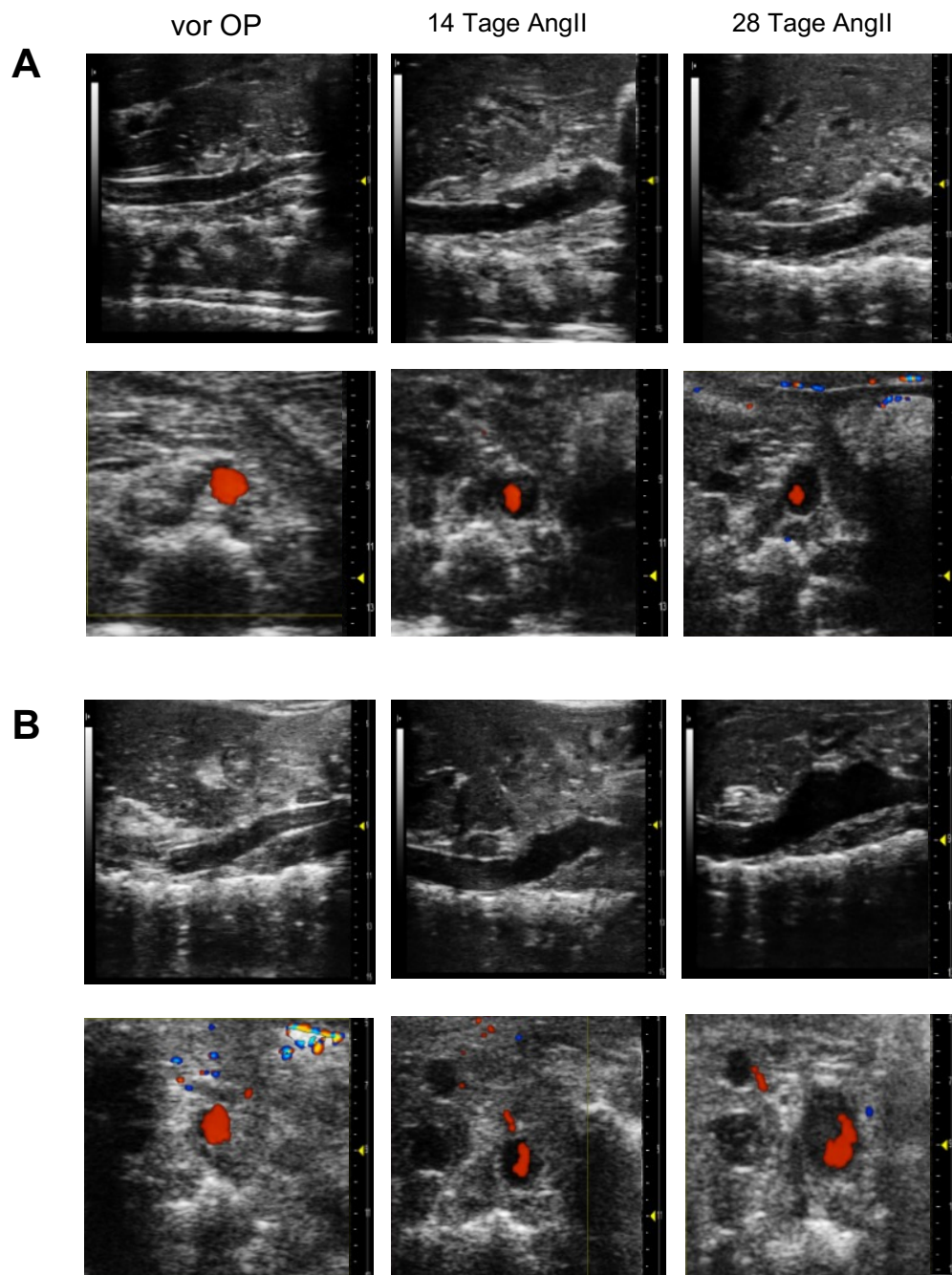


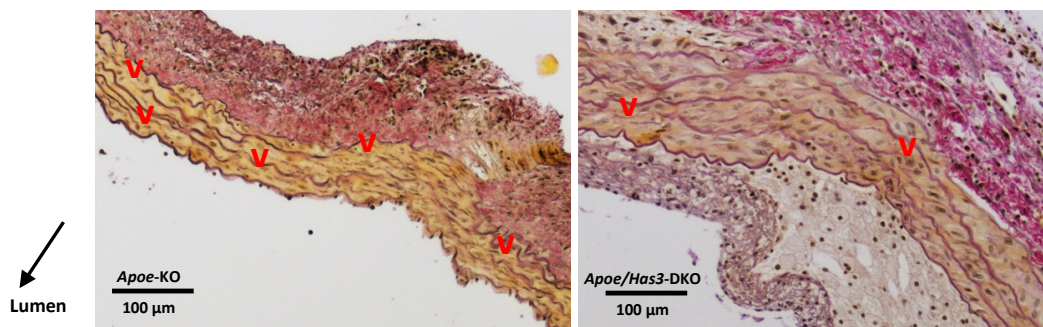
Abbildung 13. Repräsentative sonographische Aufnahmen zur Bestimmung der Lumenfläche sowie des maximalen Aortendurchmessers im B-Mode nach.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. **A.** *Apoe*-KO und **B.** *Apoe/Has3*-DKO Aorten wurden sonographisch vermessen, um Langachsenaufnahmen (obere Reihe) der abdominalen Aorta vor der Pumpenimplantation (OP), 14 und 28 Tage nach der Infusion mit AngII zu erhalten. In der unteren Reihe wurden die Lumenflächen im Kurzsachsenaufnahme im B-Mode aufgezeigt. Unter Ausnutzung des Doppler-Effekts wurde der Blutfluss in Rot visualisiert.

3.1.5 Struktureller Umbau der Aortenwand

Im Rahmen des strukturellen Umbaus der Aorta bei der Entstehung und Progression eines AAAs kommt es zu einer Zerstörung der elastischen Lamellen sowie des Kollagens. Zu diesem Zweck wurden die elastischen Lamellen nach einer 28-tägigen AngII-Infusion beider Genotypen untersucht. Die Identifizierung der elastischen Lamellen erfolgte mittels Elastika-van-Gieson Färbung, wonach eine Normierung der bei der AngII-Infusion entstehenden elastischen Lamellenbrüche auf die Mediafläche durchgeführt wurde⁶². Die repräsentativen Aufnahmen sind für die beiden Genotypen in Abbildung 14A als Aortenquerschnitt dargestellt. Die Brüche der ansonsten kontinuierlich verlaufenden elastischen Lamellen der *Tunica media* sind durch die roten Pfeilköpfe markiert.

A



B

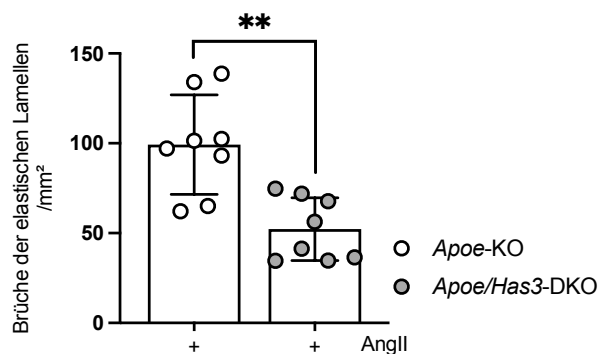
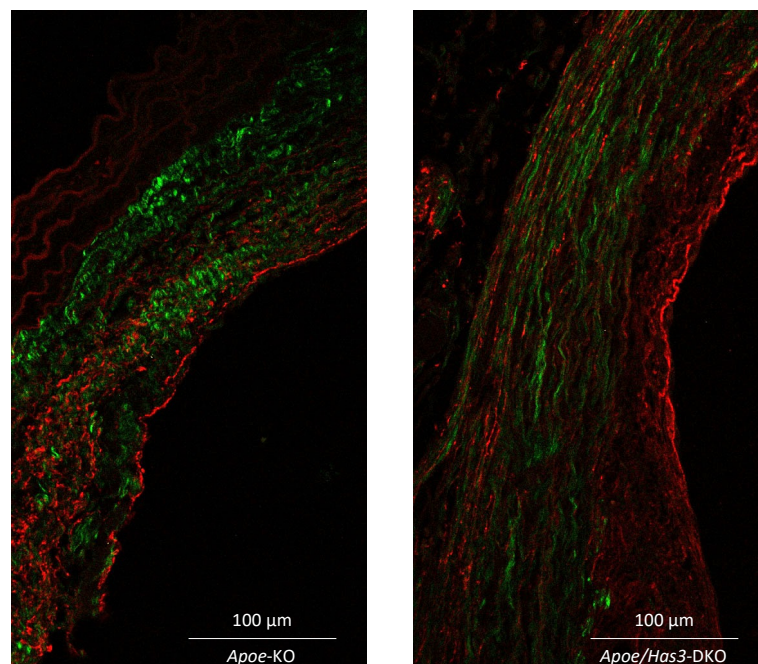


Abbildung 14. Has3-Defizienz führt zu einer reduzierten Anzahl an elastischen Lamellenbrüchen nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. Nach der Elastika-van-Gieson Färbung wurden die elastischen Lamellen der Aortenquerschnitte von *Apoe*-KO (links) und *Apoe/Has3*-DKO (rechts) angefärbt und lichtmikroskopisch aufgenommen. Die elastischen Lamellen sind schwarzviolett, die Zellkerne schwarzbraun, kollagene Fasern sind rot und die Muskulatur und das Zytoplasma sind gelb markiert. **A.** Repräsentative Aufnahmen der elastischen Lamellen nach Elastika-van-Gieson Färbung für *Apoe*-KO sowie *Apoe/Has3*-DKO Aorten. Die roten Pfeilkörper kennzeichnen die Brüche der elastischen Lamellen. **B.** Die Mediafläche der Aorta wurde bestimmt und gegen die Anzahl der elastischen Lamellenbrüche von 5 Ebenen der abdominalen Aorta normiert. Der angegebene Wert gibt die Anzahl der elastischen Lamellenbrüche pro μm^2 Mediafläche an. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=8), *Apoe/Has3*-DKO (n=8); ungepaarter zweiseitiger t-Test; ** $p \leq 0,01$.

Für die Auswertung der kollagenen Fasern wurde ein nichtlineares optisches Laserverfahren, die SHG-Methode, eingesetzt. Dabei wurden zwei Photonen mit doppelter Frequenz mittels Laserlicht auf ein nicht zentrosymmetrisches Gewebe, die Kollagenfasern, gelenkt. Die grün lumineszierenden Bereiche stellen die Kollagenablagerungen in der Aorta nach AngII-Infusion dar (Abbildung 15A). *Apoe/Has3-DKO* Aorten wiesen nach einer 28-tägigen AngII-Infusion eine signifikant geringere Ablagerung kollagenpositiver Fasern auf ($3,984 \% \pm 1,966 \%$ in *Apoe-KO* und $1,660 \% \pm 1,267 \%$ in *Apoe/Has3-DKO* Mäusen) (Abbildung 15B).

A



B

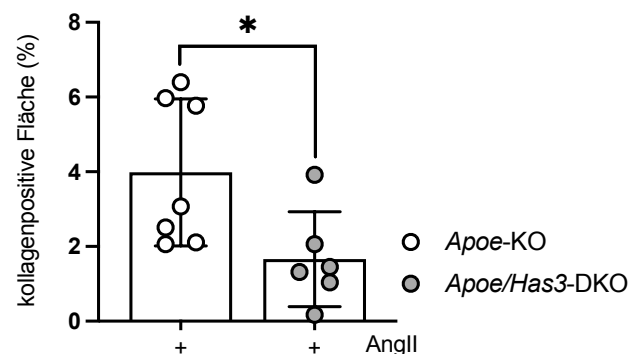


Abbildung 15. Has3-Defizienz mit einer reduzierten Kollagenakkumulation nach AngII-Infusion. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe-KO* und *Apoe/Has3-DKO* Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. Zur Darstellung der elastischen Lamellen (rot) wurde eine Tropoelastin Färbung durchgeführt. Alle Genotypen erhielten eine AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min. **A.** Repräsentative Aufnahmen der Kollagenablagerungen nach 28-tägiger AngII-Infusion. Dargestellt sind die elastischen Lamellen in *Apoe-KO* und *Apoe/Has3-DKO* Aortenquerschnitten mittels SHG-Methode und nach Tropoelastin Färbung. **B.** Berechnung der kollagenpositiven Mediafläche beider Genotypen in %. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe-KO* (n=7), *Apoe/Has3-DKO* (n=6); ungepaarter zweiseitiger t-Test; ** $p \leq 0,01$.

3.2 Einfluss der *Has3*-Defizienz auf die AngII-induzierte Entstehung von AAA

Um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären, welche für die phänotypischen Unterschiede in Entwicklung und Verlauf des AAAs beobachtet worden waren, wurden beide Genotypen nach 7-tägiger AngII-Infusion hinsichtlich des strukturellen Umbaus der Aorta und der Immunantwort untersucht. Insgesamt stellt die Inflammation, die sich durch eine verstärkte Migration von Immunzellen in die Aorta definiert, einen wichtigen Schritt in der frühen Phase der AAA-Pathogenese dar.

3.2.1 Inzidenz für Aneurysmen, Rupturen und Mortalität

Die sonographische Untersuchung wurde zur Bestimmung des maximalen Aortendurchmessers im Abdomen und im Thorax verwendet. Bei 26,9 % der *ApoE*-KO und 27,7 % der *ApoE/Has3*-DKO Aorten wurde eine Vergrößerung des abdominalen Durchmessers auf 150 % berechnet (Abbildung 16A). Nach 7 Tagen AngII wurde bei keinem Genotyp ein TAA festgestellt. Innerhalb der 7-tägigen AngII-Infusion verstarben 29 % der *ApoE*-KO und 33 % der *ApoE/Has3*-DKO Tiere aufgrund einer Aortenruptur (Abbildung 16B). Die Überlebensrate war zu diesem Zeitpunkt somit gleich (Abbildung 16C). Die Überlebensrate für *ApoE*-KO sowie *ApoE/Has3*-DKO Tiere, die eine Kontrolllösung erhielten, wiesen eine 100 %-ige Überlebensrate auf.

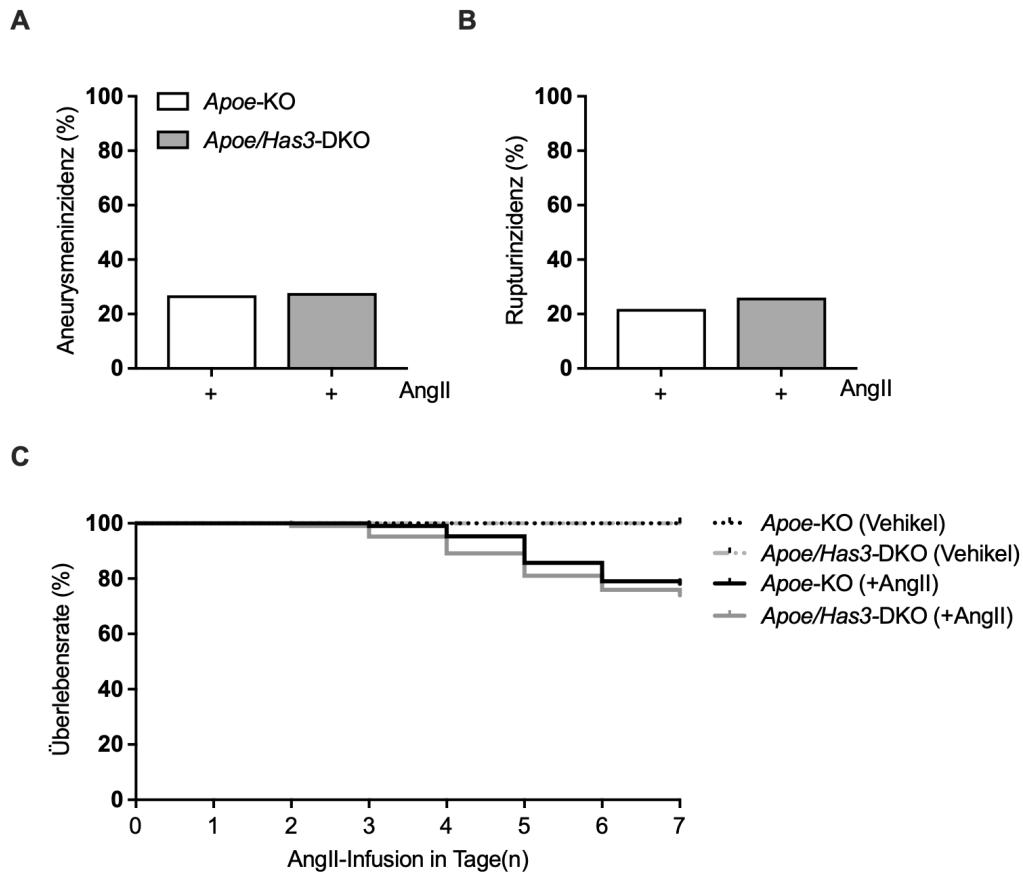


Abbildung 16. *Has3*-Defizienz ohne Einfluss auf AAA- und Ruptur Inzidenz nach 7-tägiger AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *ApoE*-KO und *ApoE/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min sowie mit einer Kontrolllösung (Vehikel) behandelt. **A.** *ApoE*-KO und *ApoE/Has3*-DKO Aorten wurden vor und 7 Tage nach der AngII-Behandlung sonographisch untersucht. Das Abdomen wurde auf AAA und der Thorax auf TAA untersucht. Ein Aneurysma ist definiert als 1,5-fache Vergrößerung des Aortendurchmessers. Dargestellt sind die berechneten Inzidenzen; *ApoE*-KO (n=20) und *ApoE/Has3*-DKO (n=13). **B.** Jede Maus wurde einer Nekropsie unterzogen und dabei die Rupturinzidenz ermittelt. **C.** In der Analyse der Überlebenszeit wurde die Überlebensrate für die 7-tägige Infusion mit AngII für beide Genotypen dargestellt. Die Abszisse stellt die Zeit dar und die Ordinate die kumulative Überlebensrate in %, *ApoE*-KO [n(Vehikel)=12; n(AngII)=95], *ApoE/Has3*-DKO [n(Vehikel)=8; n(AngII)=90]. Die Daten zur Ermittlung der Aneurysmen Inzidenz wurden von Dr. Tatsiana Suvorava erhoben.

Das Körpergewicht nahm nach der AngII-Infusion ab, unterschied sich aber nicht zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 17A). Außerdem wurde eine kardiale Hypertrophie nach 7-tägiger AngII-Infusion in *ApoE*-KO (von 134 mg auf 168 mg) und *ApoE/Has3*-DKO Herzen (von 142 mg auf 175 mg) beobachtet (Abbildung 17B). Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht war nach AngII-Infusion bei beiden Genotypen signifikant erhöht (von 5,0 mg/g auf 6,6 mg/kg in *ApoE*-KO sowie von 4,8 mg/kg auf 6,7 mg/kg in *ApoE/Has3*-DKO), unterschied sich jedoch nicht zwischen den Genotypen (Abbildung 17C).

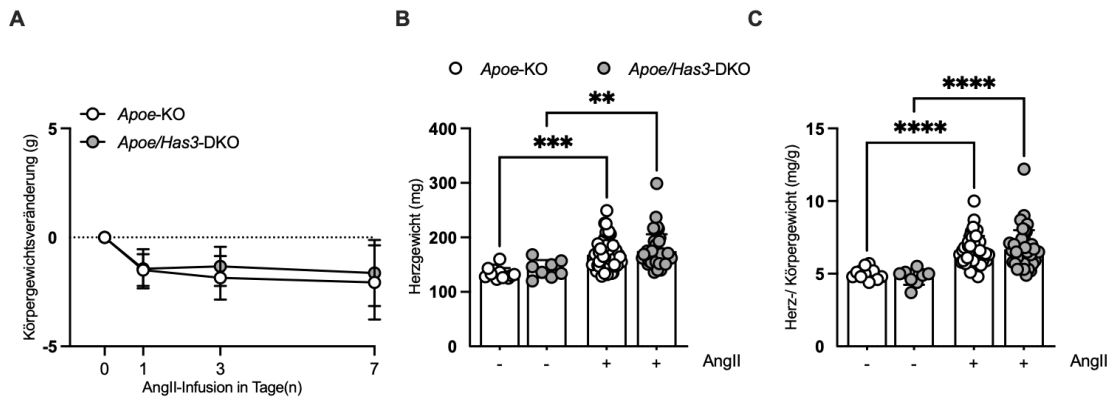


Abbildung 17. *Has3*-Defizienz ohne Einfluss auf Körper- und Herzgewicht nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min sowie mit einer Kontrolllösung (-) behandelt. **A.** Das Körpergewicht beider Genotypen wurde vor der, sowie 24 h, 72 h und 7 Tage nach der AngII-Behandlung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=55), *Apoe/Has3*-DKO (n=58) **B.** Darstellung des Herzgewichts (mg) nach AngII-Behandlung sowie einer Kontrolllösung. **C.** Bestimmung des Verhältnisses von Herzgewicht (mg) zu Körpergewicht (g). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n(-)=12, n(+)=63), *Apoe/Has3*-DKO (n(-)=8, n(+)=43); OneWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Tukey; ** p \leq 0,01, **** p \leq 0,001.

3.2.3 Sonographische Untersuchung der Aorta und des Herzens

Der äußere Aortendurchmesser und die Lumenfläche beider Genotypen wurden sowohl vor der Pumpenimplantation als auch 3 und 7 Tage nach AngII-Infusion sonographisch erfasst. Weder zu Beginn der Untersuchung noch im zeitlichen Verlauf hatte die *Has3*-Defizienz einen Einfluss auf die Veränderung des Aortendurchmessers oder der Lumenfläche (Abbildung 18A, B). In den 3-dimensionalen rekonstruierten Volumenmessungen für jeweils eine Aorta je Genotyp konnte in Abbildung 18C visualisiert werden, dass die Aorten ein ähnliches Volumen nach einer 7-tägigen AngII-Infusion aufweisen. Diese Aufnahmen dienen zur Repräsentation und verdeutlichen, dass nach der 7-tägigen AngII-Behandlung keine sichtbaren Unterschiede der Aorta zwischen den Genotypen unterscheiden.

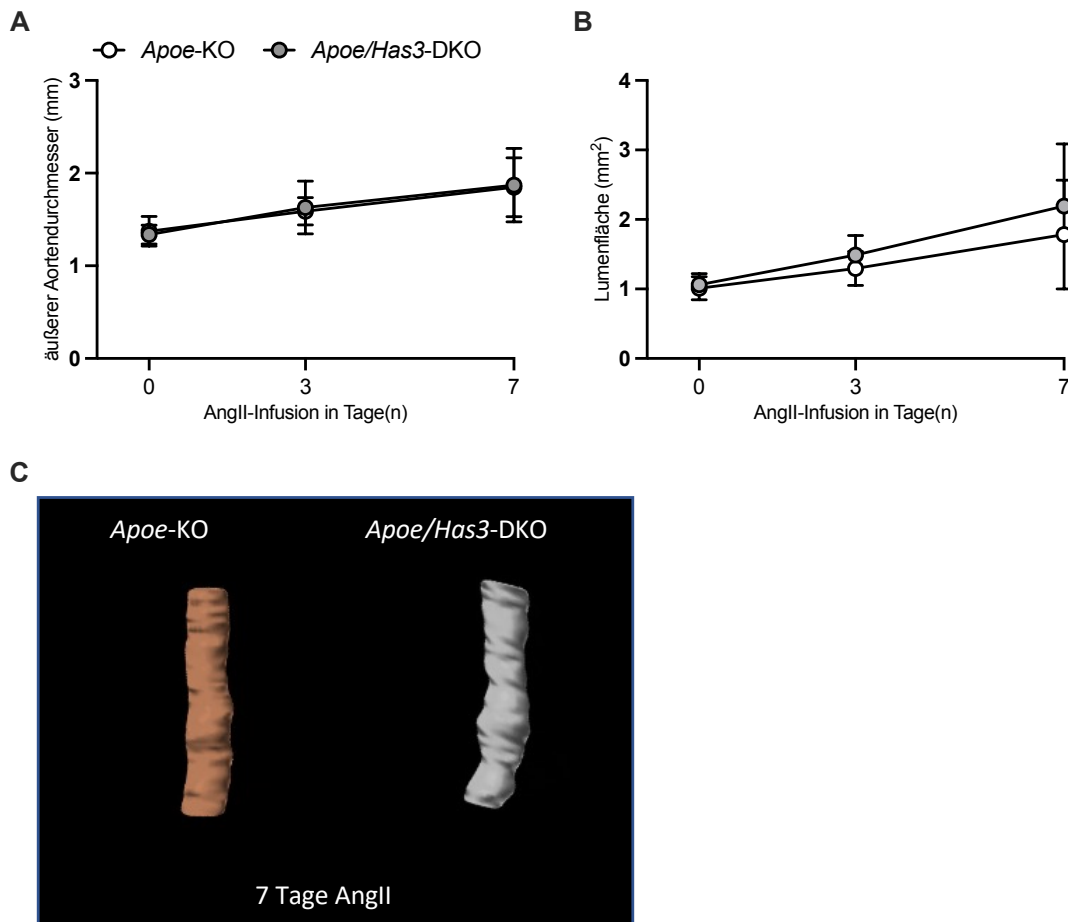


Abbildung 18. *Has3*-Defizienz ohne strukturelle Veränderung nach 7-tägiger AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. **A.** Der äußere Aortendurchmesser (mm) wurde mittels Ultraschallmessungen für *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Aorten vor der Pumpenimplantation, sowie 3 und 7 Tage danach vermessen. **B.** Die Lumenfläche wurde im gleichen Zeitintervall wie in **A** berechnet. In **C** sind repräsentative Illustrationen von 3-dimensionalen rekonstruierten Volumen für die Aorta von einer *Apoe*-KO (links) sowie einer *Apoe/Has3*-DKO (rechts) Maus nach einer 7-tägigen AngII-Behandlung abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=20), *Apoe/Has3*-DKO (n=13).

Echokardiographische Untersuchungen wurden durchgeführt, um das Gewicht des LVs, das EDV, das ESV, das SV, das HZV und die EF zu bestimmen (Abbildung 19A-F). Die *Has3*-Defizienz hatte zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf das Verhältnis zwischen dem Gewicht des LVs und dem Körpergewicht nach AngII-Infusion im Vergleich zu *Apoe*-KO Mäusen. Es zeigte sich eine Zunahme des Verhältnisses vom LV zum Körpergewicht nach 3- und 7-tägiger AngII-Infusion bei den *Apoe/Has3*-DKOs und nach 7 Tagen AngII bei den *Apoe*-KOs (Abbildung 19A). Eine 7-tägige AngII-Infusion reduzierte zwar das HZV in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen im Vergleich zum HZV vor der AngII-Infusion sowie nach 3 Tagen, jedoch zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen (Abbildung 19E). Zudem zeigten weder das EDV, das ESV, das SV noch die EF zu keinem Zeitpunkt der AngII-Infusion einen Unterschied in den beiden Genotypen.

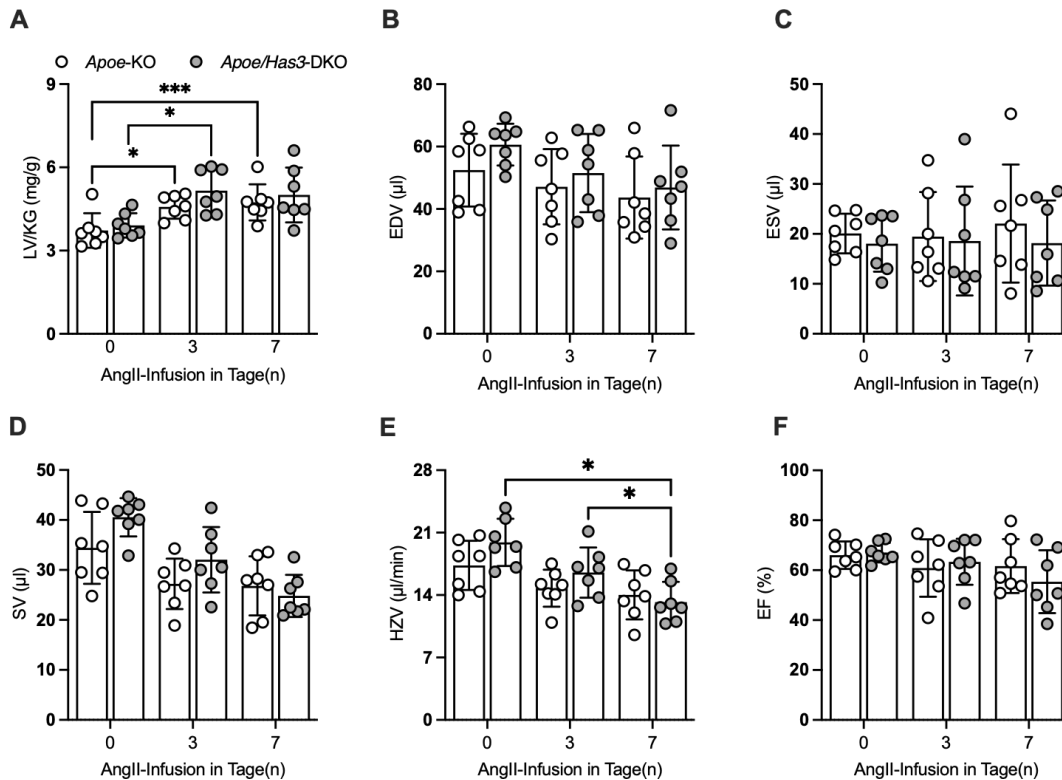


Abbildung 19. *Has3*-Defizienz ohne Einfluss auf Herzparameter nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. **A.** Das Verhältnis von LV zum Körpergewicht (KG), **B.** das EDV, **C.** das ESV, **D.** das SV, **E.** das HZV und **F.** die EF wurden sonographisch vor, 3 Tage und 7 Tage nach der AngII-Behandlung aufgezeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=7), *Apoe/Has3*-DKO (n=7). TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Tukey; * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01.

3.2.4 Einfluss der Hypertonie

Um eine AngII-induzierte Hypertonie in unserem Modell zu detektieren, wurde ein telemetrisches System in *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen verwendet, welches den Blutdruck kontinuierlich aufzeichnete. Abbildung 20 zeigt den mittleren arteriellen Blutdruck (*mean arterial pressure*, MAP) für beide Genotypen. Der MAP wurde sowohl vor als auch nach der AngII-Infusion gemessen. Es zeigte sich, dass unmittelbar nach der AngII-Infusion der MAP bei beiden Genotypen anstieg. Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnte kein Effekt der *Has3*-Deletion in den DKO-Mäusen im Vergleich zu den *Apoe*-KO Mäusen nachgewiesen werden. Ab dem dritten Tag der AngII-Infusion stieg der MAP sowohl tagsüber als nachts bei beiden Genotypen signifikant an (Abbildung 21). Zu keinem Zeitpunkt wurde eine Veränderung des MAP oder der HF zwischen den beiden Genotypen beobachtet.

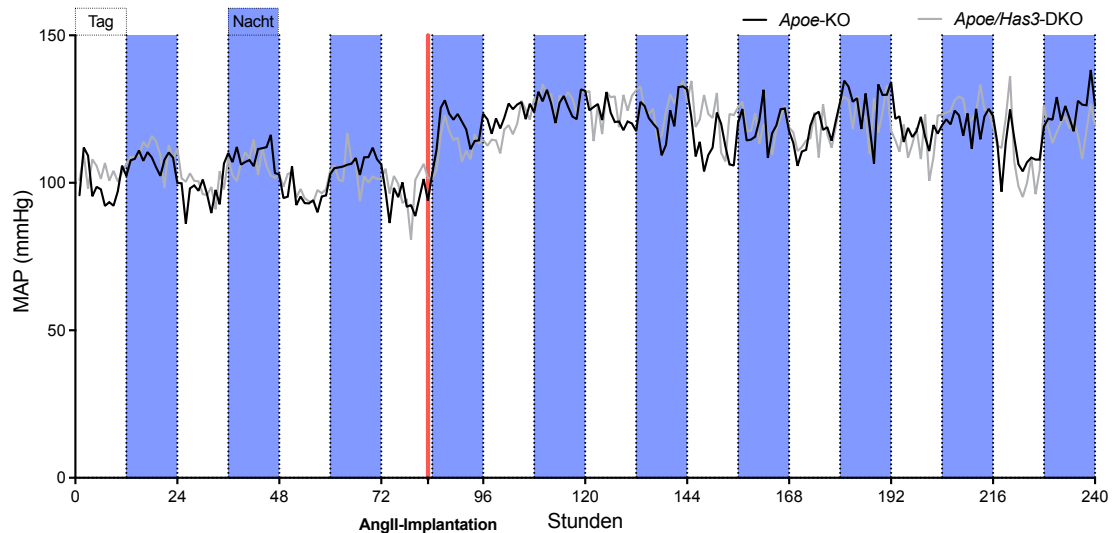


Abbildung 20. Has3-Defizienz ohne Auswirkung auf den Verlauf des MAP nach AngII-Infusion. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis von 1000 ng/kg/min behandelt. Der MAP wurde alle 20 min für 10 s mit einem Telemetriesystem gemessen. Die Mäuse befanden sich in einem 12-Stunden Rhythmus mit hellen (Tag) und dunklen (Nacht) Phasen. Für die Basalmessung wurde der Blutdruck für 72 h aufgezeichnet, danach erfolgte die AngII-Behandlung. Dargestellt ist der durchschnittliche MAP für *Apoe*-KO (n=5) in schwarz und für *Apoe/Has3*-DKO (n=2) Mäuse in grau.

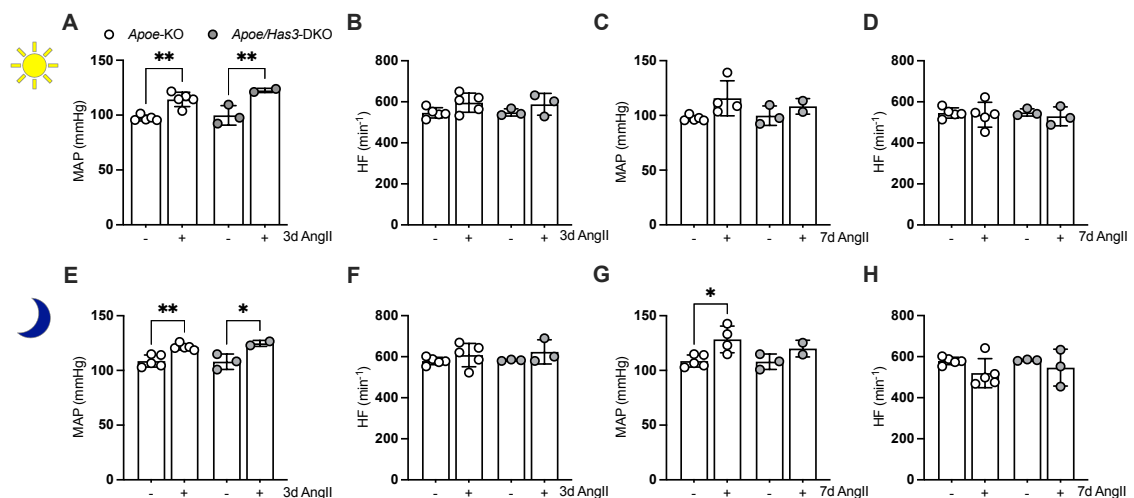


Abbildung 21. Has3-Defizienz ohne Einfluss auf den MAP und die HF nach AngII-Infusion. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Der systolische und diastolische Blutdruck sowie die HF wurden alle 20 min für 10 s mit einem Telemetriesystem gemessen. Zur Berechnung des MAP wurden der systolische und diastolische Blutdruck verrechnet. Die Mäuse befanden sich in einem 12-Stunden Rhythmus mit hellen (Sonne) und dunklen (Halbmond) Phasen. Für die Basalmessung wurde der Blutdruck für 72 h lang aufgezeichnet, bis zum Beginn der AngII-Behandlung. **A, B, E, F** zeigen den MAP und die HF nach 3 Tagen und **C, D, G, H** nach 7 Tagen mit AngII an. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=5), *Apoe/Has3*-DKO (n=3), TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Tukey; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.2.5 Struktureller Umbau der Aortenwand

Um die Veränderungen der Aorta nach einer 7-tägigen AngII-Infusion zu beurteilen, wurden Aortenquerschnitte für Kollagen und elastische Fasern angefärbt und mittels SHG analysiert (Abbildung 22A, B). Die Aortenquerschnitte der *Apoe/Has3*-DKO Mäuse zeigten sowohl weniger elastische Strangbrüche (Abbildung 22C) als auch weniger Kollagenablagerungen (Abbildung 22D).

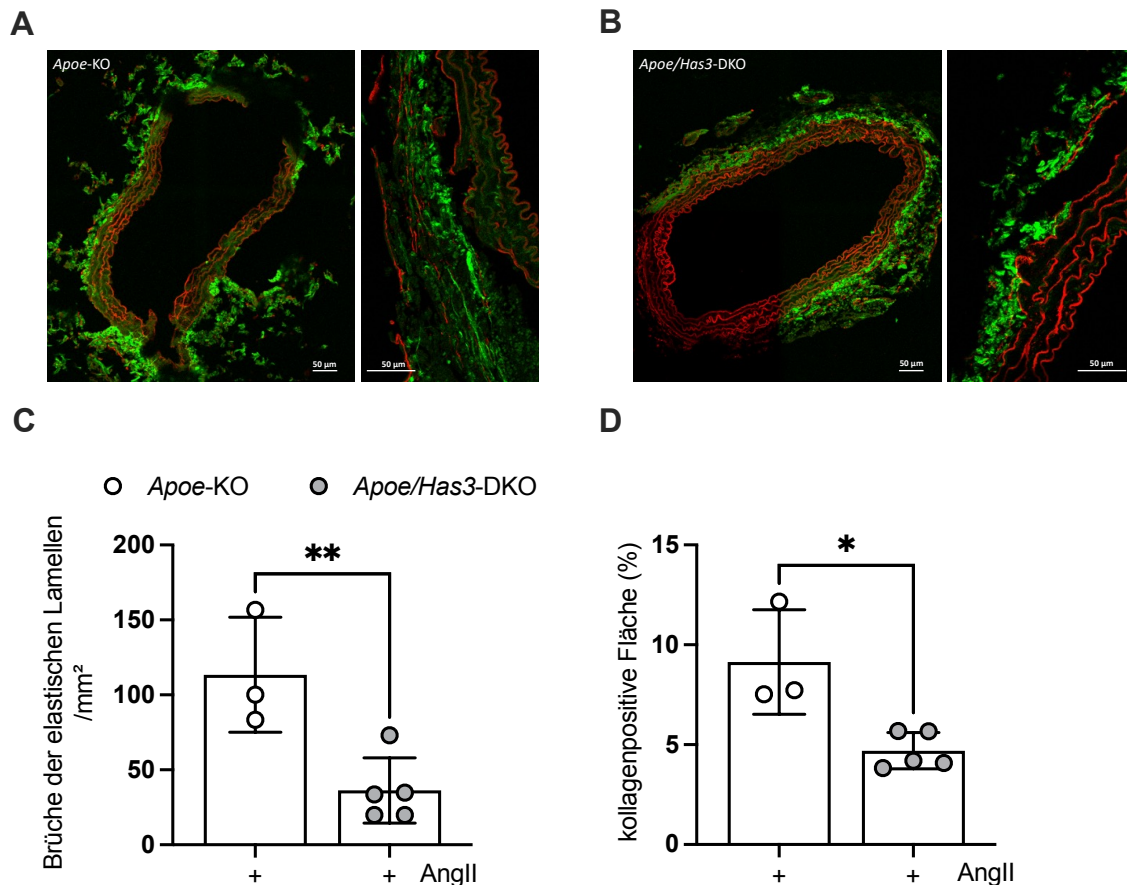


Abbildung 22. *Has3*-Defizienz führt zur reduzierten Anzahl an elastischen Lamellenbrüchen sowie einer verringerten Kollagenakkumulation nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Die elastischen Lamellen wurden mit der Tropoelastin Färbung (rot) und die kollagenpositiven Fasern mit der SHG (grün) nachgewiesen. Repräsentative Aufnahmen der Kollagenablagerungen und der elastischen Lamellen in **A** *Apoe*-KO und **B** *Apoe/Has3*-DKO Aortenquerschnitte mit der SHG und nach Tropoelastin Färbung. **C**. Zur Bestimmung der Strangbrüche wurden die Anzahl der Brüche gegen die Mediafläche aufgetragen. **D**. Berechnung der kollagenpositiven Fläche beider Genotypen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=3), *Apoe/Has3*-DKO (n=5); ungepaarter zweiseitiger t-Test; * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01.

3.3 Einfluss der *Has3*-Defizienz auf die PPE-induzierte Entwicklung von AAA

Um in einem weiteren Modell des induzierten AAA den Phänotyp einer *Has3*-Defizienz zu untermauern, erfolgte mittels aortaler PPE-Infusion eine Degradation der elastischen Lamellen innerhalb der *Tunica media*.

3.3.1 Einfluss auf das Körper- und Organgewicht

Sowohl *Apoe*-KO als auch *Apoe/Has3*-DKO Mäuse verloren nach der PPE-Infusion kurzzeitig an Körpergewicht. Das Anfangsgewicht wurde bei beiden Genotypen innerhalb der ersten drei Tagen nach der PPE-Infusion erreicht und blieb bei beiden Genotypen für die nächsten 7 bzw. 28 Tage nach der PPE-Infusion unverändert (Abbildung 23A, B). Nach einer Beobachtungszeit von 7 bzw. 28 Tagen wurden die Organe der Tiere entnommen. Es wurden keine Unterschiede im Herzgewicht, im Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht oder im Milzgewicht zwischen *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen festgestellt (Abbildung 23A, B).

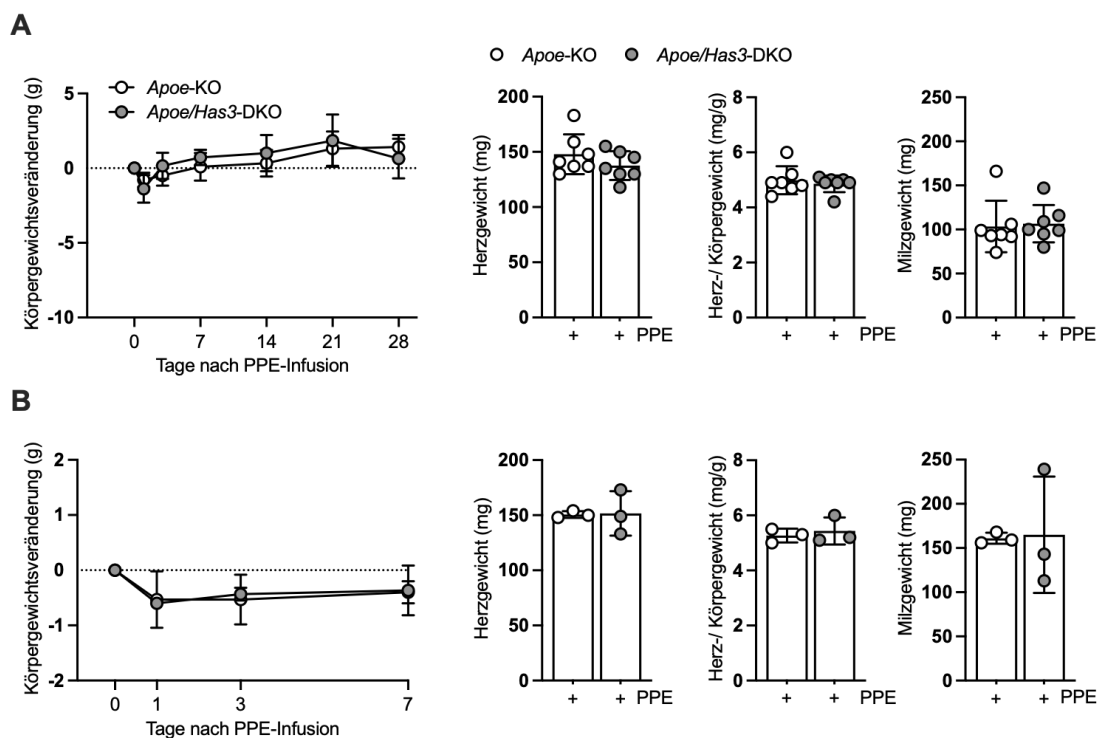


Abbildung 23. *Has3*-Defizienz ohne Einfluss auf Körper-, Herz- und Milzgewicht im PPE-Modell. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 28 (A.) und 7 (B.) Tage mit einer PPE-Dosis (+) von 4,5 U/ml behandelt. Die Veränderungen des Körpergewichts, des Herzgewichts, des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht und des Milzgewichts beider Genotypen wurden aufgezeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n (28 Tage post PPE)= 7, n(7 Tage post PPE)= 3), *Apoe/Has3*-DKO (n (28 Tage post PPE)= 7, n(7 Tage post PPE)= 3).

3.3.2 Sonographische Untersuchung der Aorta

Analog zu den Untersuchungen der Aorta nach einer AngII-Infusion, wurden die Analysen im PPE-Modell vorgenommen. Nach einem Zeitraum von 7 Tagen vergrößerten sich der äußere und der innere Aortendurchmesser bei beiden Genotypen signifikant. Im direkten Vergleich unterschieden sich die Durchmesser für *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Aorten nicht. Nach 28 Tagen blieb der Aortendurchmesser der *Apoe*-KO Mäuse im Vergleich nach 7 Tagen unverändert, während der Durchmesser der *Apoe/Has3*-DKO Aorten zunahm (Abbildung 24A). Die repräsentativen Aufnahmen in Abbildung 24B zeigen die größeren äußeren und inneren Aortendurchmesser der *Apoe/Has3*-DKO Mäuse im Vergleich zu den *Apoe*-KO Aorten.

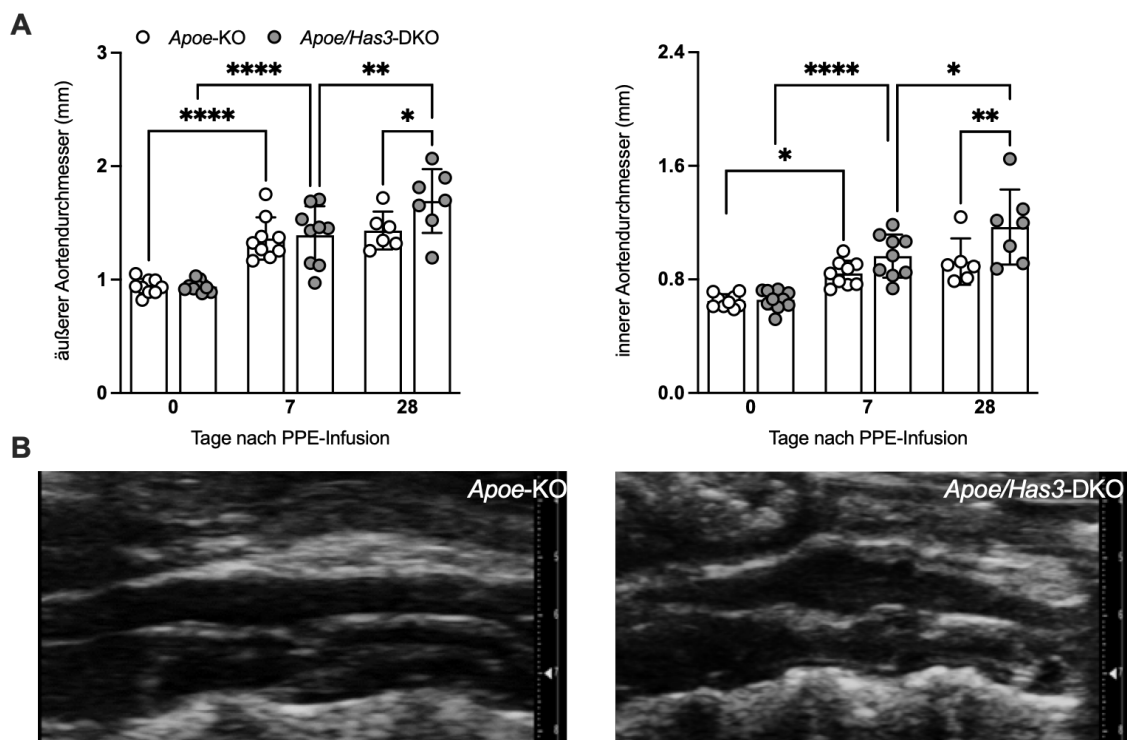


Abbildung 24. *Has3*-Defizienz führt zu größeren Aortendurchmesser nach PPE-Behandlung. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 und 28 Tage mit einer PPE-Dosis (+) von 4,5 U/ml behandelt. **A.** Der äußere und innere Aortendurchmesser (mm) wurde sonographisch bestimmt. **B.** Repräsentative Aufnahme im longitudinalen B-Modus von *Apoe*-KO (links) und *Apoe/Has3*-DKO Aorten (rechts) nach 28 Tagen *post* PPE-Infusion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=14), *Apoe/Has3*-DKO (n=14); TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Tukey; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.

3.3.3 Einfluss der Immunzellen

Die PPE-Infusion führt zu einer verstärkten Immunreaktion der infundierten Aorta, weshalb die Aorta und das Blut durchflusszytometrisch untersucht wurden. Die Immunzellen in der Aorta zeigten 7 Tage nach der PPE-Infusion keine Veränderungen der Leukozyten, Lymphozyten, myeloide Leukozyten, Neutrophile sowie Makrophagen im Genotyp (Abbildung 25). Tendenziell konnte eine erhöhte Immunzellkonzentration in *Apoe/Has3*-DKO Aorten festgestellt werden, jedoch sind diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Ein ähnliches Ergebnis zeichnet sich für die myeloiden Leukozyten (Abbildung 26) sowie für die lymphoiden Leukozyten (Abbildung 27) in der Zirkulation ab. 7 Tage nach einer PPE-Infusion waren die Leukozyten, myeloide Leukozyten, Neutrophile, Monozyten, Ly-6C^{high} und Ly-6C^{low} Monozyten zwischen den Genotypen unverändert (Abbildung 26). Die lymphoiden Populationen in der Zirkulation wurden ebenfalls bestimmt und zeigten keine Veränderungen der Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen, CD4⁺ und CD8a⁺ T-Zellen zwischen den Genotypen an (Abbildung 27).

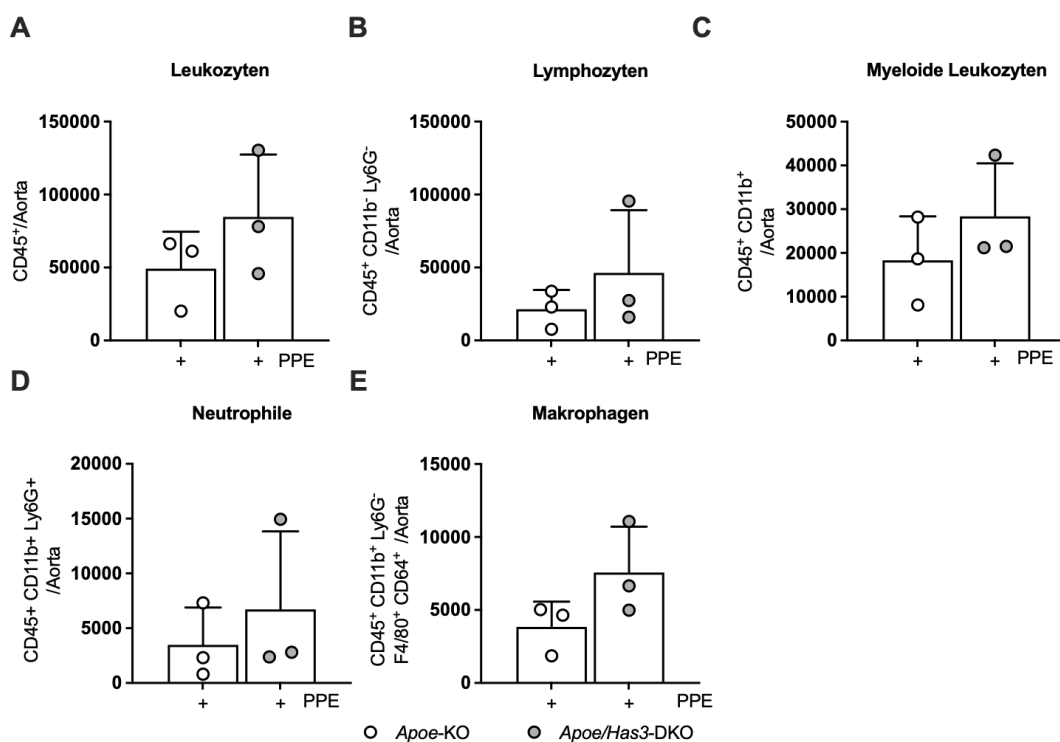


Abbildung 25. Has3-Defizienz ohne Veränderung der aortalen Immunzellen im PPE-Modell.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer PPE-Dosis (+) von 4,5 U/ml behandelt. Die Immunzellen von *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro mg Aorta für **A** Leukozyten, **B** Lymphozyten, **C** myeloide Leukozyten, **D** Neutrophile und **E** Makrophagen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=3), *Apoe/Has3*-DKO (n=3).

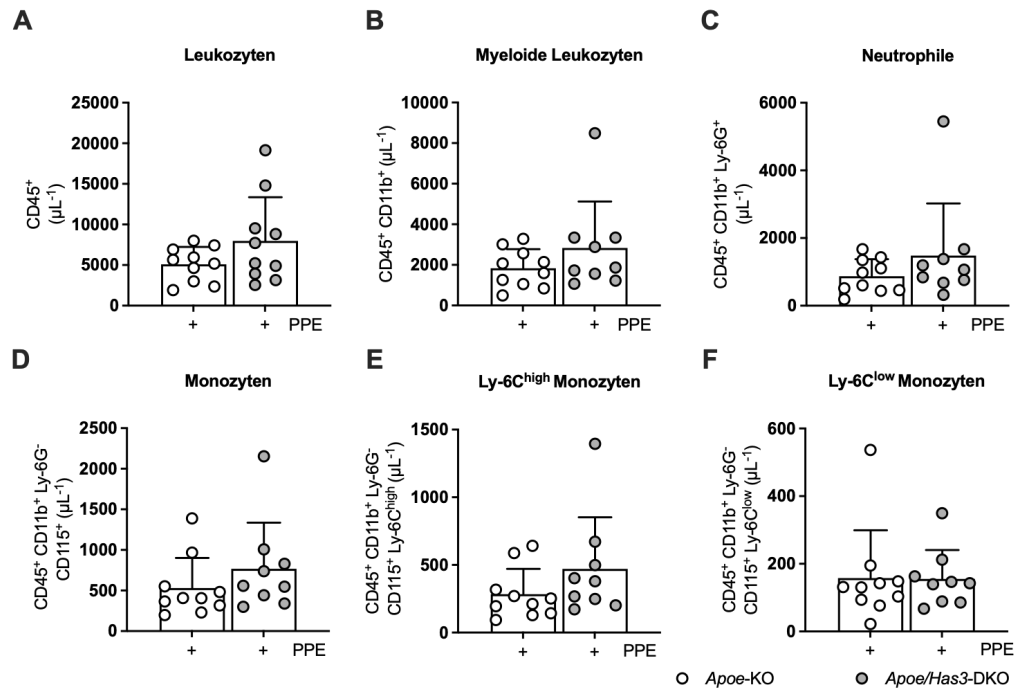


Abbildung 26. *Has3*-Defizienz ohne Einfluss auf zirkulierende Leukozyten im PPE-Modell. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer PPE-Dosis (+) von 4,5 U/ml behandelt. Die zirkulierenden Immunzellen von *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro μL Vollblut für **A** Leukozyten, **B** myeloide Leukozyten, **C** Neutrophile, **D** Monozyten, **E** Ly-6C^{high} und **F** Ly-6C^{low} Monozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=10), *Apoe/Has3*-DKO (n=9).

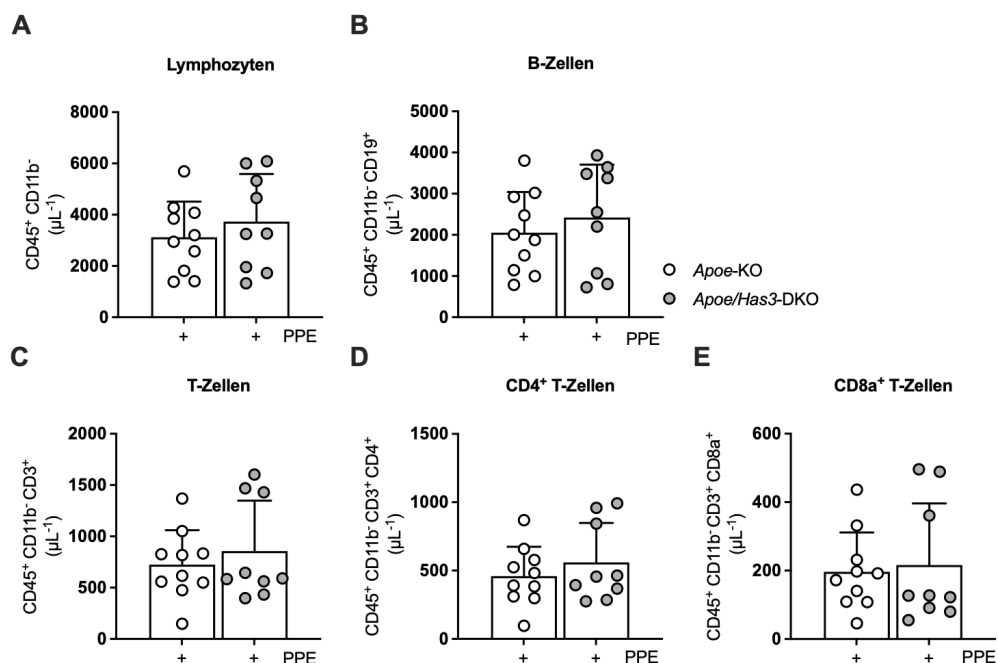


Abbildung 27. *Has3*-Defizienz ohne Einfluss auf zirkulierende lymphoide Immunzellen im PPE-Modell.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer PPE-Dosis (+) von 4,5 U/ml behandelt. Die zirkulierenden Immunzellen von *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro μL Vollblut für **A** Lymphozyten, **B** B-Zellen, **C** T-Zellen, **D** CD4⁺-T-Zellen und **E** CD8a⁺-T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=10), *Apoe/Has3*-DKO (n=9).

3.4 Einfluss der *Has3*-Defizienz auf die Inflammation im AngII-induzierten AAA

3.4.1 Zirkulierende Zytokine und Chemokine

Sowohl Chemokine als auch Zytokine stellen wichtige Moleküle für die Zellkommunikation im Immunsystem dar. AngII fördert proinflammatorische Prozesse und ist für die Aktivierung und Freisetzung von Zytokinen verantwortlich¹⁵². Nach einer 7-tägigen AngII-Infusion wurde die Konzentration einiger Makrophagen-assoziiierter sowie AAA-relevanter Zytokine im Blutplasma bestimmt (Abbildung 28, Abbildung 29). Im Rahmen der Untersuchung der Chemokine konnte spezifisch für MIP1 α (Ccl-3) eine signifikante Reduktion im Plasma der DKO Mäuse im Vergleich zu *Apoe*-KOs festgestellt werden (Abbildung 28C). CXCL1, CCL2, -4, -5 und -11 zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen nach einer 7-tägigen AngII-Infusion.

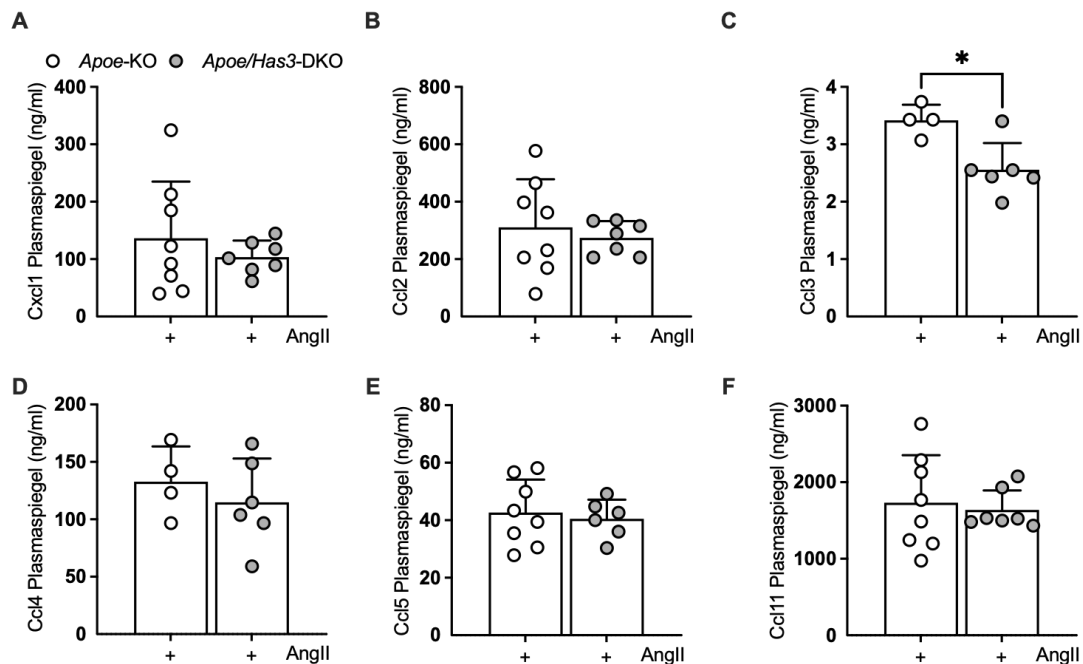


Abbildung 28. *Has3*-Defizienz mit erniedrigten Ccl3 Plasmaspiegel nach AngII-Infusion. Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Die Multiplex-Analyse umfasste die Bestimmung der Konzentration von **A** CXC-Chemokin 1 und **B – F** CC-Chemokinen (Ccl2, 3, 4, 5, 11) in beiden Genotypen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=4-8), *Apoe/Has3*-DKO (n=6-7); ungepaarter zweiseitiger t-Test; * p \leq 0,05.

Die Plasmakonzentration von Il12 (p40) war in den *Apoe/Has3*-DKO Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 29C), wohingegen die Il17A Plasmakonzentration signifikant erhöht war (Abbildung 29D). Dahingegen zeigten Il1 α , Il6, Tnf α sowie der Gcsf (Abbildung 29) nach einer 7-tägigen Infusion mit AngII im Vergleich zu den *Apoe*-KO Kontrolltieren keine Veränderungen.

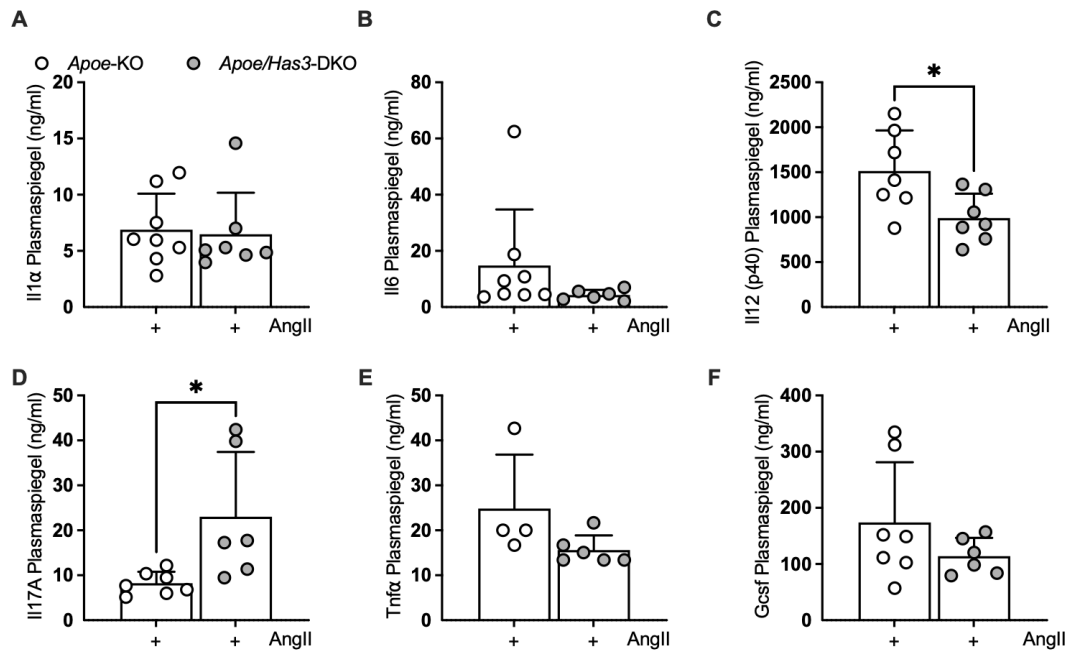


Abbildung 29. *Has3*-Defizienz mit reduzierten Il12 (p40), aber erhöhten Il17A Plasmaspiegel nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. In der Multiplex-Analyse wurden **A – D** die Il (1 α , 6, 12(p40) und 17A), **E** Tnf α sowie **F** Gcsf bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=8), *Apoe/Has3*-DKO (n=7); ungepaarter zweiseitiger t-Test; * $p \leq 0,05$.

3.4.2 Zirkulierende Immunzellen

Um die Immunantwort im Rahmen der Entwicklung und Progression der AAA genauer zu charakterisieren, wurden zirkulierende Immunzellen durchflusszytometrisch analysiert und so die Immunzellverteilung unter AngII in beiden Genotypen beleuchtet. Abbildung 30 zeigt die Anzahl der Gesamtleukozyten sowie der myeloiden Zellpopulationen, wohingegen Abbildung 31 die Lymphozyten darstellt. Nach einer 7-tägigen AngII-Infusion zeigten sich signifikante Änderungen der Immunzellkonzentrationen innerhalb der Zirkulation (Abbildung 30): so konnte eine signifikante Erhöhung der myeloiden Leukozyten sowie der Monozyten bei den *Apoe/Has3*-DKO Mäusen im Vergleich zu den *Apoe*-KO Mäusen festgestellt werden. Zudem waren auch Leukozyten, Neutrophile sowie Ly-6C Monozyten in *Has3*-deletierten Tieren erhöht, auch wenn das Signifikanzniveau hier nicht erreicht wurde. Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen, CD4⁺ sowie CD8a⁺ T-Zellen zeigten hingegen keine statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den Genotypen auf (Abbildung 31).

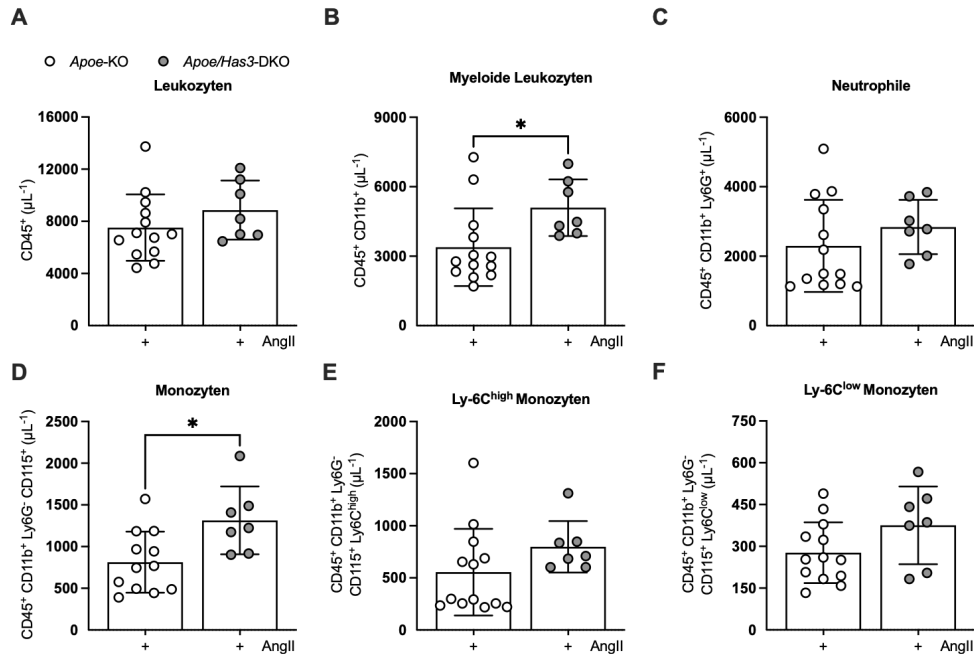


Abbildung 30. Has3-Defizienz mit Anstieg der zirkulierenden myeloiden Leukozyten und Monozyten nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Die zirkulierenden Immunzellen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen der Zellpopulationen pro μl Vollblut für **A** Leukozyten, **B** myeloide Leukozyten, **C** Neutrophile, **D** Monozyten, **E** Ly-6C^{high} und **F** Ly-6C^{low} Monozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=13), *Apoe/Has3*-DKO (n=7); ungepaarter zweiseitiger t-Test; * p \leq 0,05.

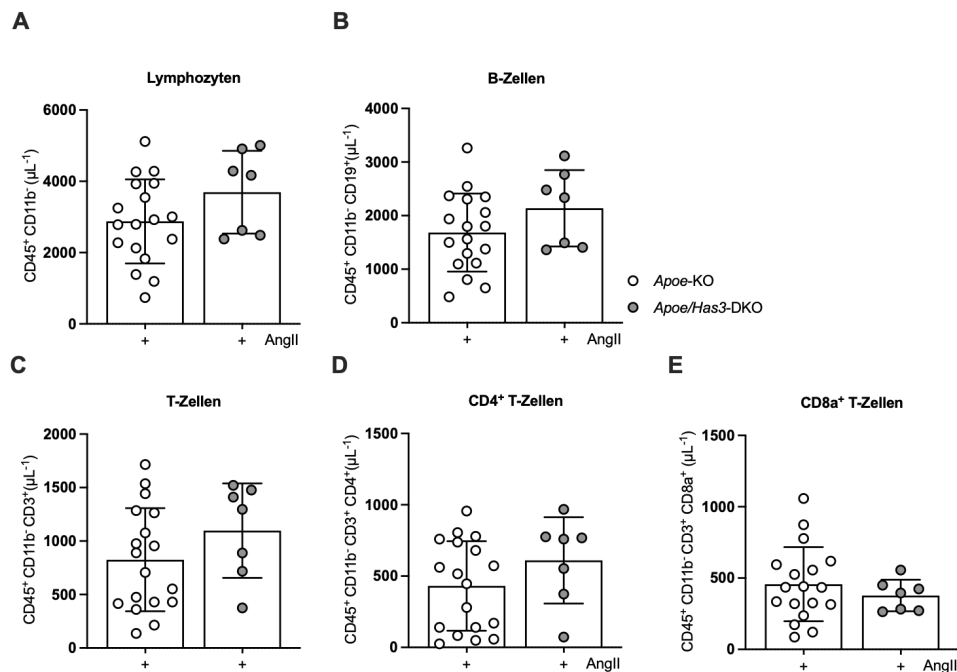


Abbildung 31. Has3-Defizienz ohne Einfluss auf zirkulierende lymphoide Populationen nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Die zirkulierenden Immunzellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen der Zellpopulationen pro μl Vollblut für **A** Lymphozyten, **B** B-Zellen, **C** T-Zellen, **D** CD4⁺-T-Zellen und **E** CD8a⁺-T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=13), *Apoe/Has3*-DKO (n=7); ungepaarter zweiseitiger t-Test; * p \leq 0,05.

3.4.3 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen

Um die Ursache der erhöhten Anzahl bestimmter zirkulierender Immunzellen zu beleuchten, wurde nachfolgend hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) des Knochenmarks untersucht. Die verschiedenen HSVZ-Populationen in Abbildung 32 zeigten keine signifikanten Veränderungen in den beiden Genotypen auf. Somit sind die langsam teilenden blutbildenden Stammzellen (*long-term hematopoietic stem cell*, LT-HSC), schnell teilende blutbildende Stamm- und multipotente Vorläuferzellen 4 (*short-term hematopoietic stem cell and multipotent progenitor 4*, ST-HSC und MPP4), MPP2, MPP3, Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer (*granulocyte-macrophage progenitor*, GMP) und erythroide megakaryotische Vorläufer (*megakaryocyte-erythroid progenitor*, MEP) für beide Genotypen unverändert.

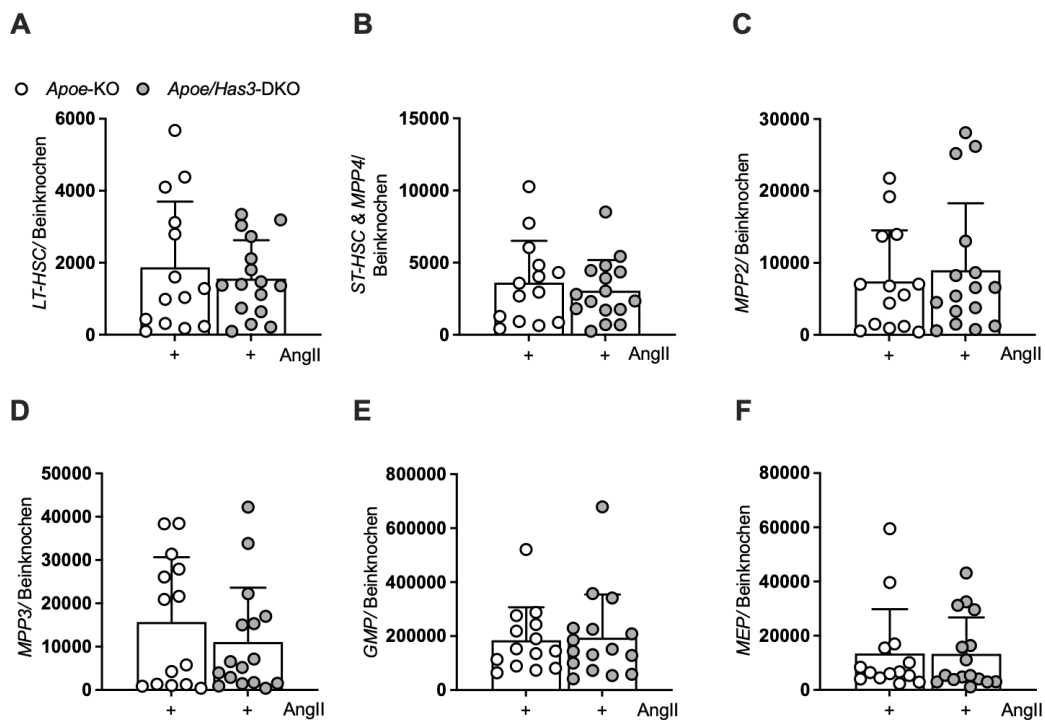


Abbildung 32. Has3-Defizienz ohne Veränderung der HSVZ nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Die aus Femur und Tibia isolierten Immunzellen wurden in folgenden Populationen quantifiziert: **A** LT-HSC, **B** ST-HSC & MPP4, **C** MPP2, **D** MPP3, **E** GMP und **F** MEP. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=14), *Apoe/Has3*-DKO (n=16); ungepaarter zweiseitiger t-Test; * $p \leq 0,05$.

3.4.4 Immunzellen aus der Milz

Als Ort der extramedullären Hämatopoese wurde auch die Milz in die Untersuchung eingeschlossen. Es konnte eine signifikante Reduktion der Leukozytenanzahl innerhalb

der Milz von *Apoe/Has3*-DKO Mäusen nach einer 7-tägigen AngII-Infusion im Vergleich zu den *Apoe*-KOs festgestellt werden (Abbildung 33A). Dieser Unterschied war vornehmlich auf eine Reduktion der Gesamtleukozyten beschränkt und es zeigte sich kein Unterschied der myeloiden Leukozyten, Neutrophile, Monozyten sowie Ly-6C^{high} und Ly-6C^{low} Monozyten zwischen den Genotypen (Abbildung 33B-F).

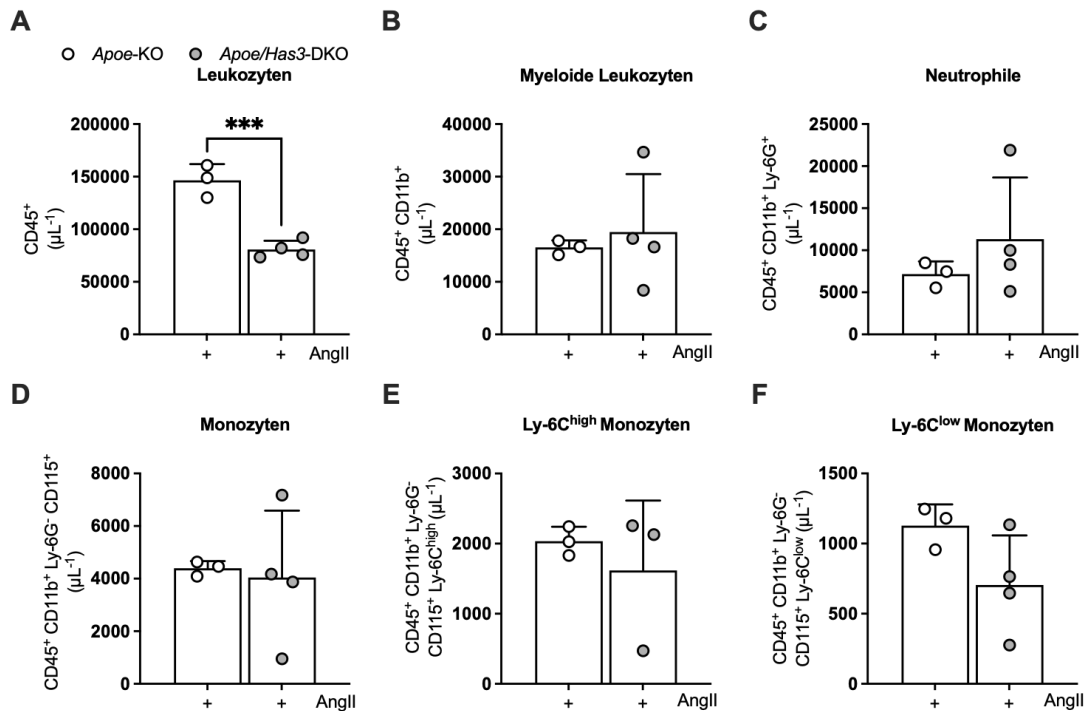


Abbildung 33. *Has3*-Defizienz führt zur gesteigerten Leukozytenanzahl in der Milz nach AngII-Infusion, aber ohne die myeloiden Leukozytenpopulationen zu regulieren.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Die Immunzellen aus der Milz wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen der Zellpopulationen pro µl der Milzsuspension für **A** Leukozyten, **B** myeloide Leukozyten, **C** Neutrophile, **D** Monozyten, **E** Ly-6C^{high} und **F** Ly-6C^{low} Monozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; *Apoe*-KO (n=3), *Apoe/Has3*-DKO (n=4); ungepaarter zweiseitiger t-Test; *** p ≤ 0,001.

Nach einer 7-tägigen AngII-Infusion konnte in der Milz von *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine Reduktion der Lymphozyten, B-, T- und CD4⁺-Zellen beobachtet werden (Abbildung 34). Die cytotoxischen CD8a⁺ T-Zellen in der Milz von *Apoe/Has3*-DKO Mäusen war im Vergleich zu den *Apoe*-KO Kontrolltiere unverändert.

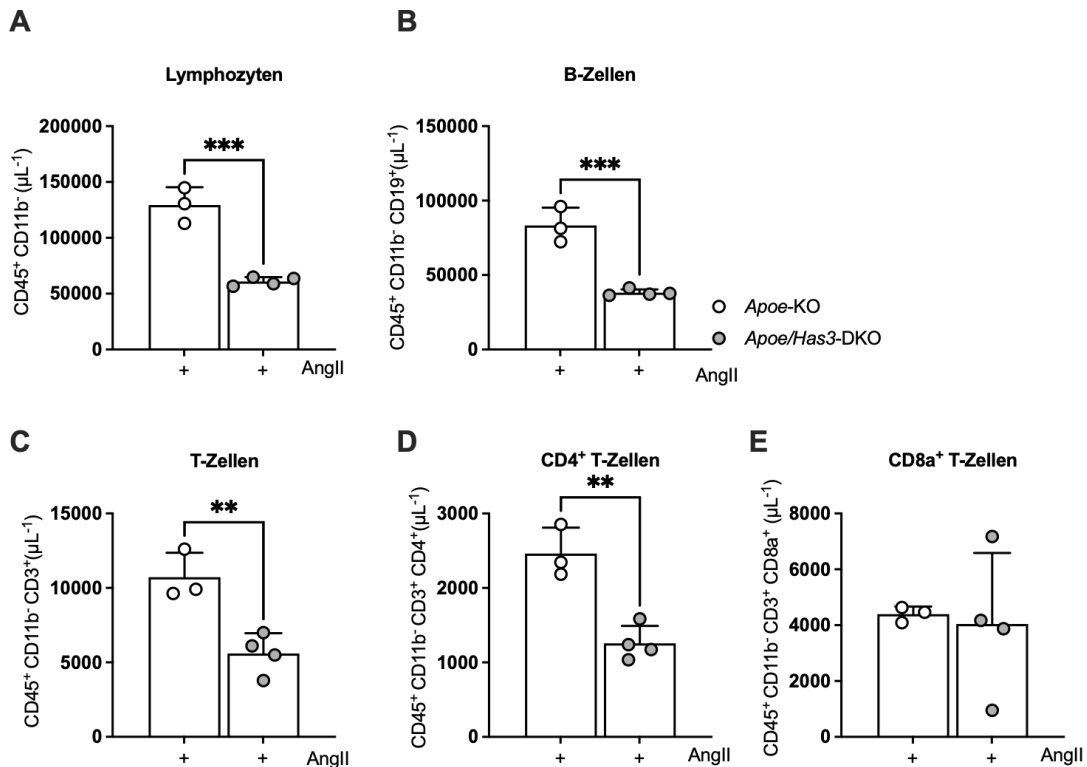


Abbildung 34. Has3-Defizienz führt zur reduzierten Anzahl an lymphoiden Immunzellen in der Milz nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Die extramedullären Immunzellen der Milz wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro µl der Milzsuspension für **A** Lymphozyten, **B** B-Zellen, **C** T-Zellen, **D** CD4⁺-T-Zellen und **E** CD8a⁺-T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; *Apoe*-KO (n=3), *Apoe/Has3*-DKO (n=4); ungepaarter zweiseitiger t-Test; ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001.

3.4.5 Immunzellen in der Aorta

Die Infiltration von Immunzellen in die Aorta trägt entscheidend zur Entstehung und Entwicklung von AAA bei. In Abbildung 35 wurden Leukozyten, Lymphozyten, myeloiden Leukozyten, Neutrophile sowie Makrophagen in der Aorta mittels der Durchflusszytometrie bestimmt. Der Vergleich der beiden Genotypen ergab keine Unterschiede in der Anzahl von Leukozyten, Lymphozyten sowie Neutrophilen in den Aorten. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion von aortalen myeloiden Leukozyten und Makrophagen in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen.

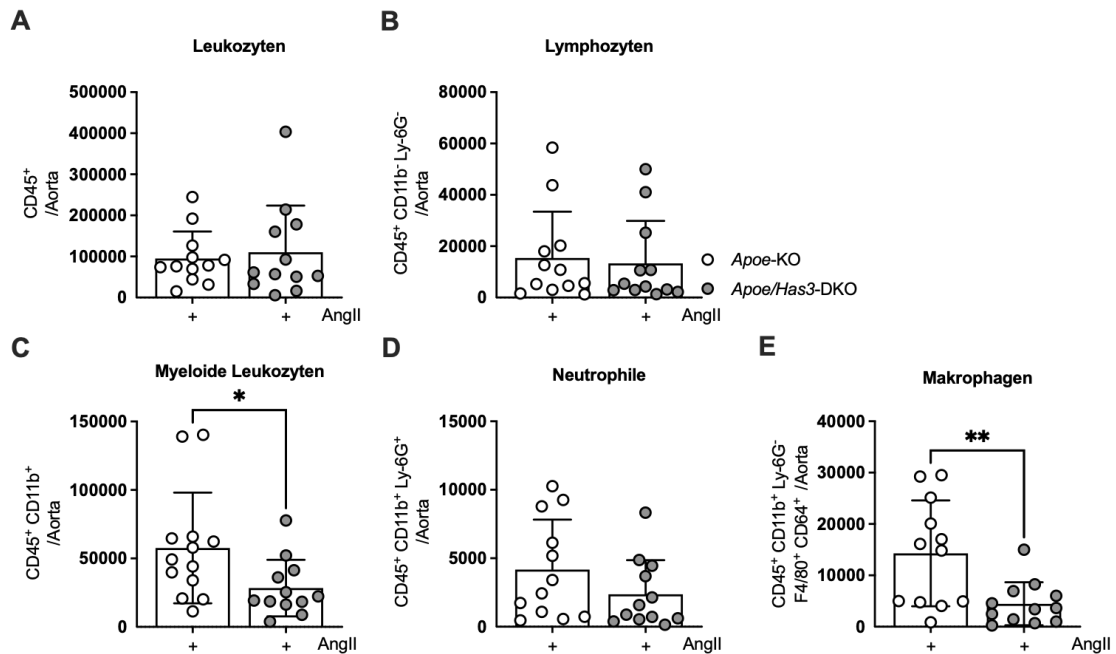


Abbildung 35. *Has3*-Defizienz führt zur reduzierten Ansammlung von myeloiden Leukozyten und Makrophagen nach AngII-Infusion.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro mg Aorta für **A** Leukozyten, **B** Lymphozyten, **C** myeloide Leukozyten, **D** Neutrophile und **E** Makrophagen. Die Dosis der AngII-Infusion betrug 1000 ng/kg/min. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=12), *Apoe/Has3*-DKO (n=12). ungepaarter zweiseitiger t-Test; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.5 Veränderung des aortalen Transkriptom

Um Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen der unterschiedlichen Phänotypen in *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen zu erhalten, wurden Transkriptomanalyse an Gewebeproben der Aorta durchgeführt. Um die aortale Genexpression im AAA zu charakterisieren, wurde eine Bulk-Analyse der Aorta AngII-Infusion für beide Genotypen durchgeführt. Es wurden fünf signifikante kanonische Signalwege in der Analyse beider Genotypen nach AngII-Infusion identifiziert (Abbildung 36). Folgende Signalwege wurden aufgeführt: Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten und Monozyten, Kalzium-Signalübertragung, dilatierter Kardiomyopathie-Signalweg, Rolle von Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*) bei der Bakterien- und Viruserkennung sowie Pathologie der Atemwege bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen. Am deutlichsten reguliert waren Signalwege zur Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten und Monozyten.

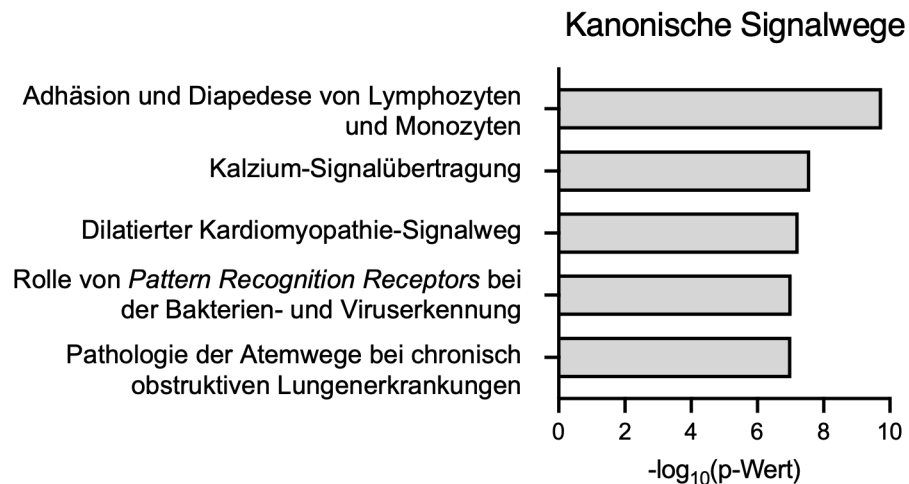


Abbildung 36. Kanonische Wege der Bulk-Sequenzierung der abdominalen Aorta nach AngII-Infusion.

Für die Darstellung der kanonischen Wege wurden die „Gene Ontology“ (GO) Signalwege definiert. Dargestellt sind die Ergebnisse in $-\log_{10}(\text{p-Werte})$ nach der FDR-Methode für $p(\text{FDR}) < 0,01$ und $\text{FC} > 1,5$.

Im Volcano-Plot ist die relative Änderung der Genexpression dargestellt (Abbildung 37A). Insgesamt waren in der Aorta der *Apoe/Has3*-DKO Mäuse im Vergleich zu den *Apoe*-KO Kontrolltieren 52 Gene signifikant reguliert, davon 45 Gene hoch- und 7 herunterreguliert. Diese Gene wurden für jede Probe in einer *Heatmap* dargestellt, wobei die hochregulierten Gene rot und die herunterregulierten Gene blau markiert wurden. Dabei entspricht die Farbintensität der Gene dem Ausmaß der Regulation (Abbildung 37B). Die sieben am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene sind in Abbildung 38 dargestellt. *Ifi208*, *Chst4*, *Arsk*, *Flnk*, *Gm38394*, *Sgms2* und *Atp1b1* wurden als herunterregulierte Gene identifiziert und sind in einer absteigenden Reihenfolge hinsichtlich der vielfachen Veränderung aufgetragen. *Ifi208* war das am stärksten herunterregulierte Gen, das für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die zelluläre $\text{IFN}\beta$ -Antwort wichtig ist (Abbildung 39)¹⁵³. *Acta1*, *Tnni2*, *Tnnc2*, *Slfn4*, *Atp2a1*, *Myh4* sowie *Cxcl3* wurden als hochregulierte Gene erkannt und sind aufsteigend aufgetragen. Das am stärksten hochregulierte Gen war *Cxcl3*, das für die Migration und Adhäsion von Monozyten wichtig ist¹⁵⁴.

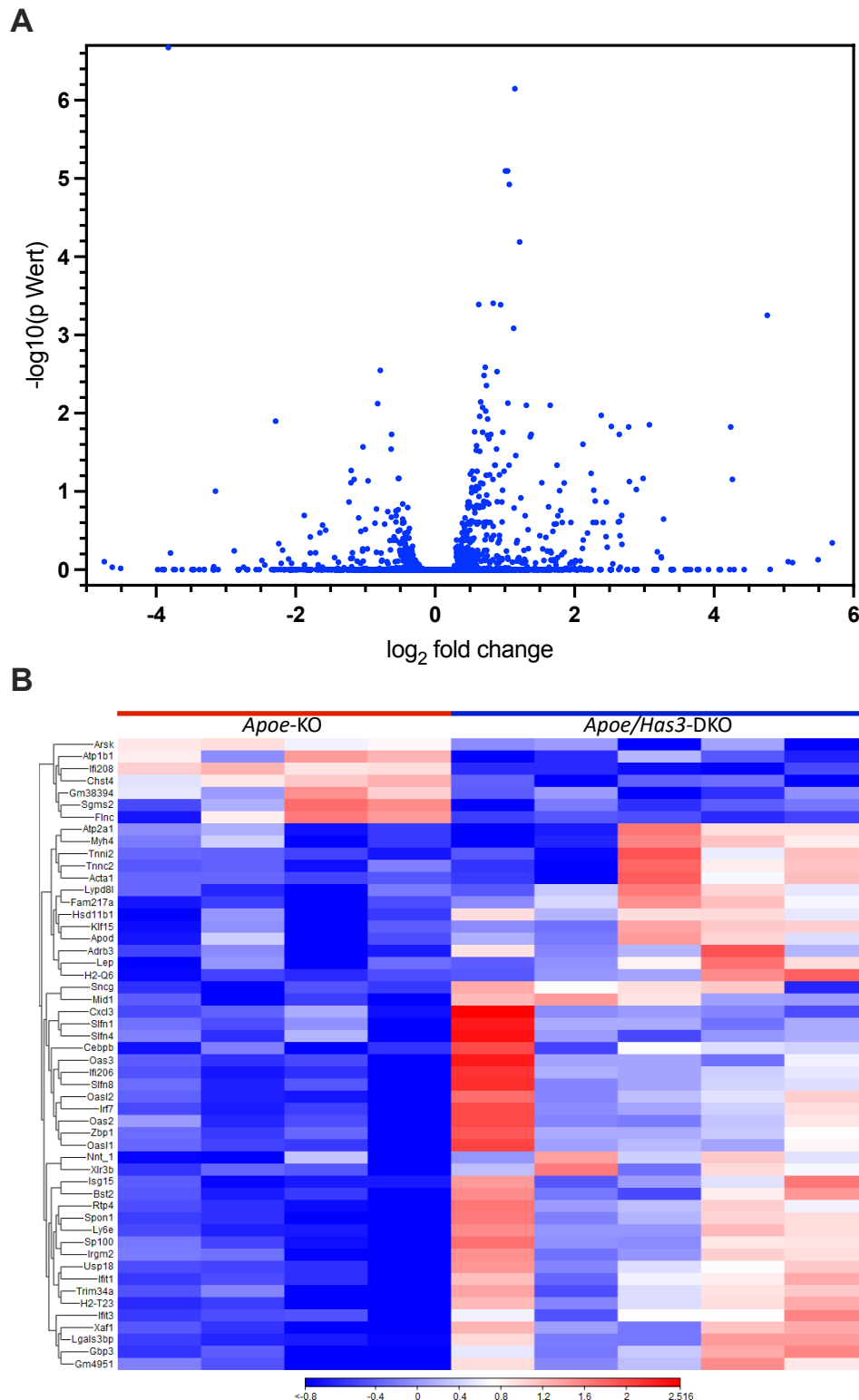


Abbildung 37. Volcano-Plot und Heatmap aller herunter- und hochregulierten aortalen Gene nach AngII-Infusion.

In **A** wurden alle signifikant exprimierten Gene aus der abdominalen Aorta nach AngII-Infusion im Volcano-Plot dargestellt. Die Punkte stellen das Produkt aus der \log_2 -transformierten *Fold Change* und der $-\log_{10}$ -transformierten p-Werte dar. Die Daten zur Darstellung der herunterregulierten (blau) und hochregulierten (rot) Gene stammen aus der Bulk-Analyse der abdominalen Aorten nach AngII-Infusion in *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen und sind als Heatmap in **B** dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse nach der FDR-Methode für p (FDR) < 0,01 und $FC > 1,5$. Das Ausmaß der Regulation wurde abhängig von der Farbintensität der Skala dargestellt.

Um die Veränderungen der Genexpression zwischen den Genotypen zu analysieren, wurden fünf vorhergeschaltete Regulatoren mit der niedrigsten Signifikanz analysiert (Tabelle 8A). Dabei waren die vorgeschalteten Regulatoren poly rI:rC-RNA, Lipopolysaccharid, IFN α und β -Rezeptoruntereinheit 1 (IFNAR1) sowie IFN regulierender Faktor 7 (IFR7) in der Analyse aktiviert, wohingegen Immunitätsbezogenes M-Protein der GTPase-Familie (*immunity related GTPase M*, IRGM1) als inhibierter Regulator berechnet wurde. Mit der Analyse der kausalen Netzwerke wurden Netzwerke zur Genexpressionskontrolle identifiziert. Dabei waren LPS Bindungsprotein (LBP), LPS, IFNAR sowie *homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1* (HERPUD1) aktiviert und *sterile α and TLR/ILR motif containing 1* (SARM1) war inhibiert (Tabelle 8B). Unter Berücksichtigung der vorgeschalteten Regulatoren sowie der kausalen Netzwerke wurden fünf Erkrankungen und Störungen mit der höchsten Signifikanz und damit mit der höchsten biologischen Funktion berechnet. Als signifikante Ergebnisse wurden die immunologische sowie entzündliche Erkrankung, die antimikrobielle sowie entzündliche Antwort und die Störung des Bindegewebes identifiziert (Tabelle 8C).

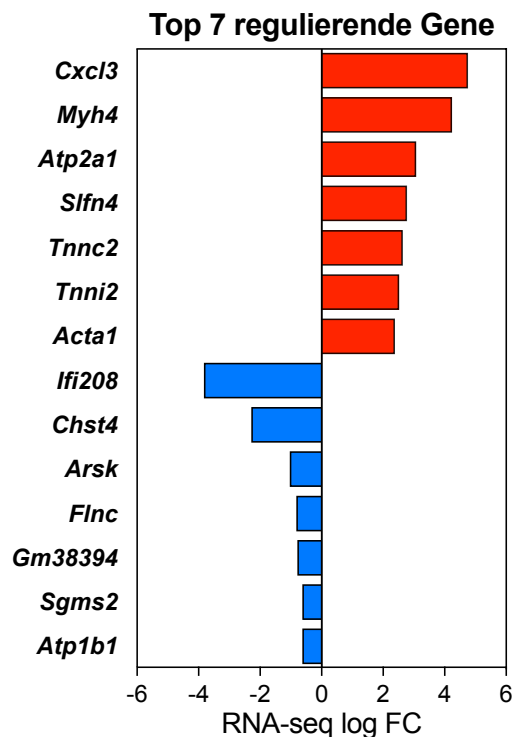


Abbildung 38. Die sieben am höchsten regulierten Gene der RNA-Bulk-Sequenzierung. Aufgetragen sind die am stärksten herunterregulierten (blau) und sieben am stärksten hochregulierten (rot) Gene. Dargestellt sind die Ergebnisse in FC Werte nach der FDR-Methode für p (FDR) < 0,01 und $\log FC > 1,5$.

Tabelle 8. Vorgeschaltete Regulatoren, kausales Netzwerk sowie Krankheiten und Störungen identifiziert in Aorten von *Apoe*-KO sowie *Apoe/Has3*-DKO Mäusen nach AngII-Infusion. Es wurden jeweils fünf mit den niedrigsten *p*-Werten bzw. *p*-Wertebereiche ausgewählt. Die vorhergesagte Aktivierung wurde für jeden vorgeschalteten Regulator (A.) bzw. für jedes kausale Netzwerk (B.) bestimmt. Die Gesamtzahl aller involvierten Moleküle wurde für die Krankheiten und Störungen (C.) aufgetragen. Die Daten wurden in IPA (Qiagen®) analysiert.

A. Vorgeschaltete Regulatoren	<i>p</i> -Wert	vorhergesagte Aktivierung
<i>poly rI:rC-RNA</i>	4,79E-36	Aktiviert
<i>LPS</i>	7,96E-34	Aktiviert
<i>IFNAR1</i>	1,53E-32	Aktiviert
<i>IRF7</i>	1,99E-31	Aktiviert
<i>IRGM1</i>	1,22E-30	Inhibiert

B. Kausales Netzwerk	<i>p</i> -Wert	vorhergesagte Aktivierung
<i>LBP</i>	1,65E-38	Aktiviert
<i>SARM1</i>	1,11E-36	Inhibiert
<i>LPS</i>	1,48E-35	Aktiviert
<i>IFNAR</i>	1,49E-35	Aktiviert
<i>HERPUD1</i>	4,86E-35	Aktiviert

C. Krankheiten und Störungen	<i>p</i> -Wertebereich	Anzahl Moleküle
Immunologische Erkrankungen	1,02E-03 - 3,27E-22	72
Antimikrobielle Antwort	3,31E-08 - 8,92E-19	28
Entzündliche Antwort	1,14E-03 - 8,92E-19	88
Bindegewebeerkrankung	8,82E-04 - 1,64E-15	53
Entzündliche Erkrankung	1,12E-03 - 1,64E-15	71

Mit Hilfe der grafischen Zusammenfassung wurde eine Übersicht aller signifikanten Vorgänge aus der Bulk-Sequenzierung dargestellt (Abbildung 39). So zeigte sich für den kanonischen Signalweg der Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten und Monozyten eine indirekte Beeinflussung durch die Zytokine TNF und IL1 β sowie durch Fibronectin 1. Die damit verbundenen Zytokine TNF und IL1 β aktivieren zudem die Immunantwort von Zellen, die mononukleären Leukozyten und die Immunantwort auf antigenpräsentierende Zellen. Als zentrale Zytokine wurden ebenfalls IFN β 1 und IL6 detektiert, da durch diese IFN γ , IL32 sowie TNF aktivieren und die Immunantwort von Leukozyten modulieren. Der angezeigte hochregulierte kanonische Signalweg für die Rolle der Hyperzytokinämie in der Pathogenese von Influenzaviren wurde mit der

3.6.1 Aortale mRNA-Expression

Die Expression der ausgewählten Gene ist für Aorten nach 7 Tagen (Abbildung 40) und nach 28 Tagen (Abbildung 41) dargestellt. Nach einer 7-tägiger AngII-Infusion konnte kein Unterschied in der Überlebensrate nach AngII-Infusion zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Es konnte dennoch eine strukturelle Veränderung der Aorta in Form von reduzierten elastischen Lammellenbrüchen sowie vermehrter Kollagenablagerung in der Aorta bei einer *Has3*-Defizienz in *Apoe*-KO Mäusen beobachtet werden. Zusätzlich wurde eine reduzierte Inflammation durch eine verminderte Infiltration von Makrophagen beobachtet. Im weiteren Verlauf wurde das Expressionsprofil der *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Aorten identifiziert. Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurde der HA-Rezeptor *Cd44* untersucht. Zudem wurde die mRNA-Expression der Zelladhäsionsmarker *Icam1* und *Vcam1* bestimmt, da diese mit der Adhärenz von Leukozyten an den EC während einer Entzündungsreaktion assoziiert sind¹⁵⁵. Für die Untersuchung der Kollagensynthese wurde die mRNA-Expression von *Col1a1* sowie *Col3a1* analysiert. Für den Matrixabbau sind die MMP verantwortlich, daher wurden *Mmp2* und *Mmp9* in den beiden Genotypen untersucht⁷⁷. Die aortale Genexpression für *Mmp9* in *Apoe*-KO Mäusen war im Vergleich zu den *Apoe/Has3*-DKO Mäusen nach einer 7-tägigen AngII-Behandlung signifikant hochreguliert. Wohingegen für *Mmp2* zu diesem Zeitpunkt keine Veränderung der Genexpression bestand. Ebenso wurde keine Veränderung der Genexpression für *Cd44*, *Icam1*, *Vcam1* und *Col1a1* sowie *Col3a1* im Vergleich der Genotypen nach AngII-Infusion festgestellt (Abbildung 40).

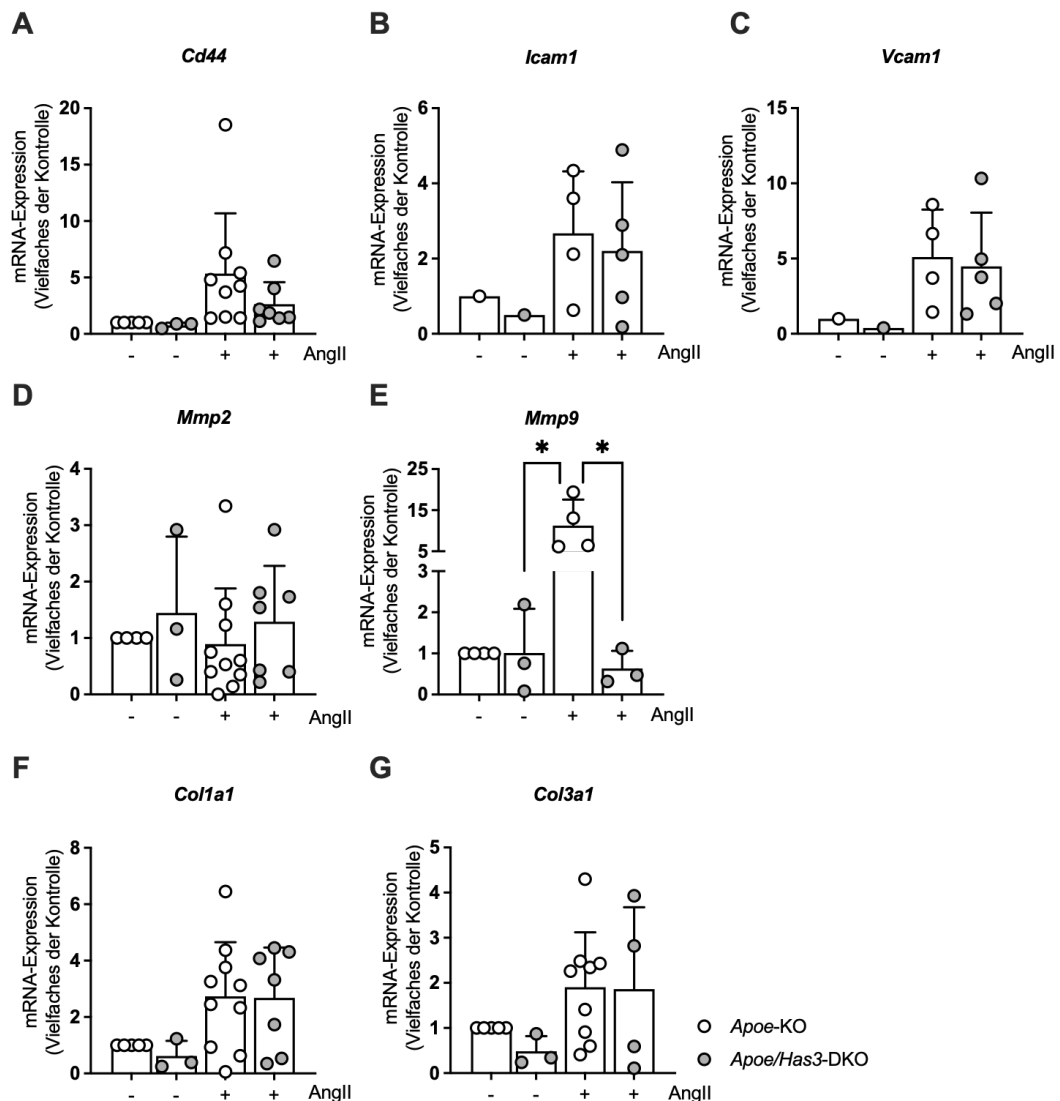


Abbildung 40. *Has3*-Defizienz führt zur erhöhten *Mmp9*-Expression in der Aorta nach AngII.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 7 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min und einer Kontrolllösung (-) behandelt. Es wurde die mRNA von **A** *Cd44*, **B** *Icam1*, **C** *Vcam1*, **D** *Mmp2*, **E** *Mmp9*, **F** *Col1a1* und **G** *Col3a1* bestimmt. Dargestellt sind die Werte als Vielfaches der Kontrolle (*Apoe*-KO, (-)). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=1-5; 4-10), *Apoe/Has3*-DKO (n=1-3; 4-7). TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Tukey; * $p \leq 0,05$.

Nach einer AngII-Infusion von 28 Tagen zeigten *Apoe*-KO Mäuse im Vergleich zu *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine geringere Überlebensrate. Darüber hinaus manifestierten sich strukturelle Umbauvorgänge in der Aorta. Es zeigten sich keine Veränderungen in der mRNA-Expression von *Cd44*, *Icam1*, *Mmp2* und *Col3a1*. Eine Reduktion der *Col1a1* mRNA-Expression wurde in *Apoe/Has3*-DKO im Vergleich zu den *Apoe*-KO Aorten beobachtet. Zusätzlich wurde eine signifikante Erhöhung der *Mmp9* mRNA-Expression in *Apoe*-KO Aorten festgestellt (Abbildung 41). Die aortale Genexpression von *Vcam1* war in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen im Vergleich zu den *Apoe*-KO Mäusen signifikant reduziert.

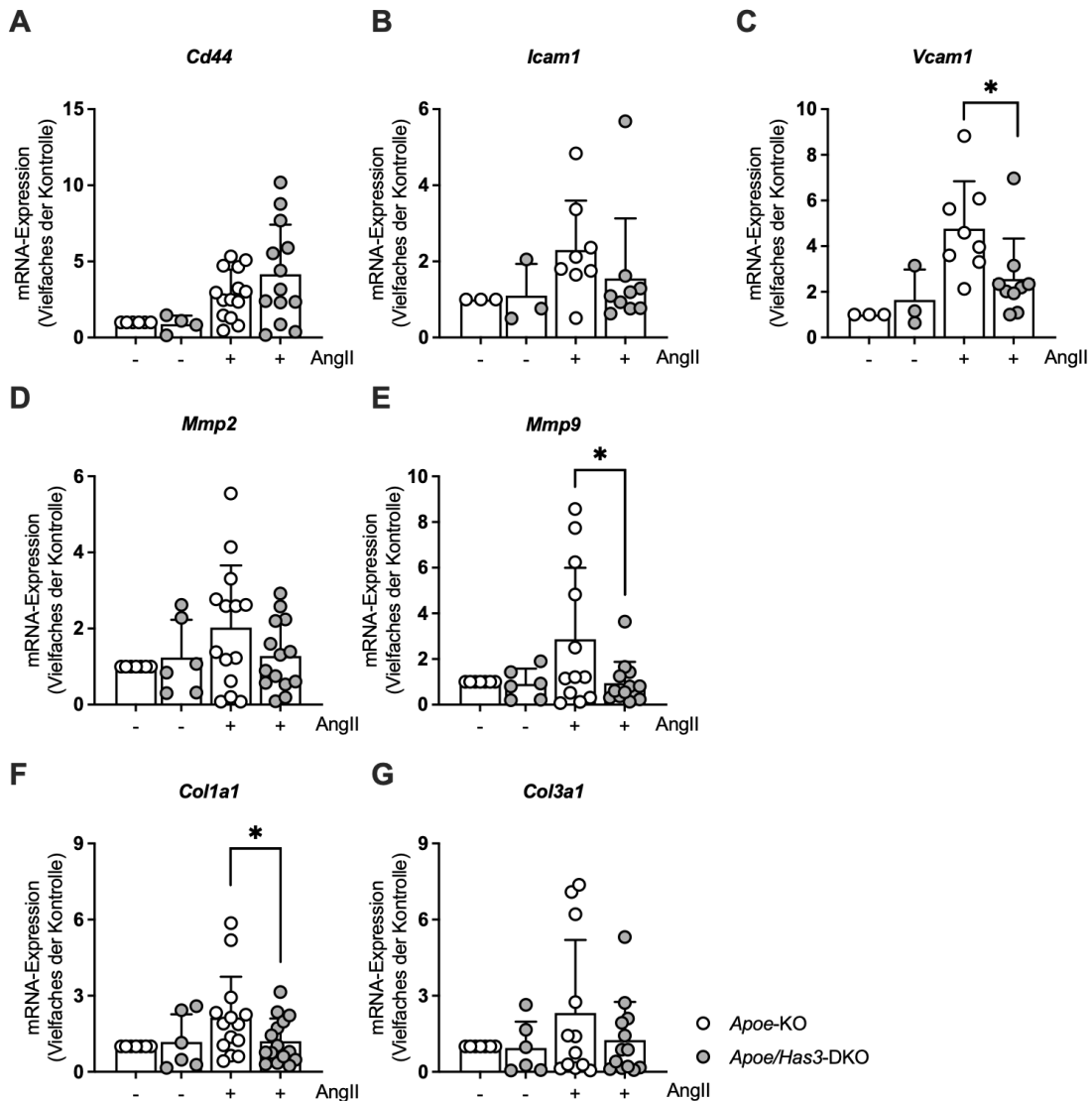


Abbildung 41. *Has3*-Defizienz führt zur erhöhten Expression von *Vcam1*, *Mmp9* sowie *Col1a1* in der Aorta nach AngII.

Männliche, 8-12 Wochen alte *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Tiere wurden für 28 Tage mit einer AngII-Dosis (+) von 1000 ng/kg/min behandelt. Es wurde die mRNA von **A** *Cd44*, **B** *Icam1*, **C** *Vcam1*, **D** *Mmp2*, **E** *Mmp9*, **F** *Col1a1* und **G** *Col3a1* bestimmt. Dargestellt sind die Werte als Vielfaches der Kontrolle (*Apoe*-KO, (-)). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=3-6; 5-14), *Apoe/Has3*-DKO (n=3-6; 8-13). TwoWay ANOVA mit anschließendem Fisher LSD-Test; * p ≤ 0,05.

3.6.2 mRNA-Expression isolierter Monozyten

Die erhöhte Immunzellpopulation in der Zirkulation und die gleichzeitig erniedrigte Immunzellkonzentration in der Aorta sowie die Daten der IPA Analyse veranlassten die vertiefte Untersuchung isolierter Monozyten aus *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen. Ziel hierbei war es, den Phänotyp der *Has3*-defizienten DKO-Monozyten zu bestimmen, und inwieweit dieser einen Einfluss auf die Migration von Immunzellen in die Aorta hat. Monozyten wurden *in vitro* mit AngII inkubiert und es wurden die

proinflammatorischen Zytokine *Il1b*, *Tnfa*, der HA-Rezeptor *Cd44*, die für die Gewebsinfiltration wichtigen Chemokinrezeptoren *Ccr2* und *Cx3cr1* sowie die Protease *Mmp9*, die zum Abbau der EZM beiträgt, untersucht (Abbildung 42). Es konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine *Il1b* und *Tnfa* sowie *Mmp9* in den aus *Apoe/Has3*-DKO isolierten und mit AngII stimulierten Monozyten signifikant reduziert waren (Abbildung 42A-C). Außerdem war die mRNA-Expression der Chemokinrezeptoren *Ccr2* sowie *Cx3cr1* und des HA-Rezeptors *Cd44* in den *Has3*-defizienten DKO-Monozyten im Vergleich zu den *Apoe*-KO Monozyten herunterreguliert (Abbildung 42D-F).

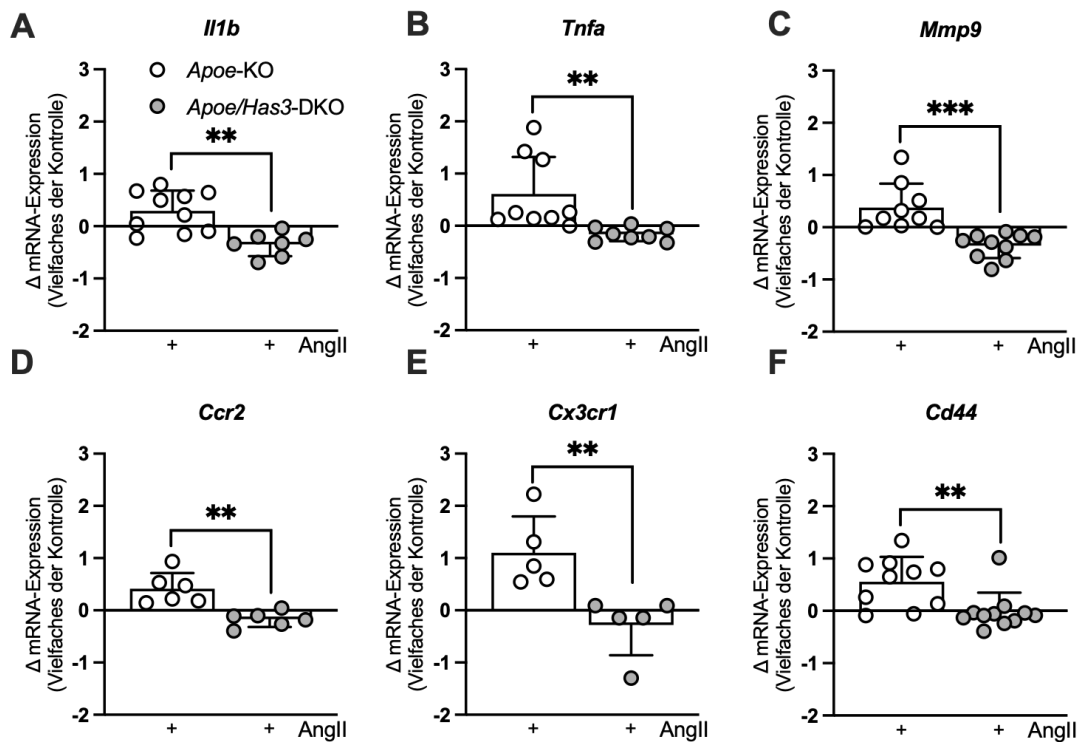


Abbildung 42. *Has3*-Expression in Monozyten führt zur Hochregulation der Immunzellinfiltration. Nach einer 6-stündigen Inkubation mit AngII der isolierten Monozyten aus 8-12 Wochen alten *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Knochenmarkszellen wurde die mRNA von **A** *Il1b*, **B** *Tnfa*, **C** *Mmp9*, **D** *Ccr2*, **E** *Cxcr1* und **F** *Cd44* bestimmt. Dargestellt sind die Werte als Vielfaches der Differenz der Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n=5-10), *Apoe/Has3*-DKO (n=5-11). Ungepaarter zweiseitiger t-Test; ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001.

3.7 Einfluss durch KMT und AngII in *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO

3.7.1 Zirkulierende Immunzellen

Der KMT zwischen *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen wurde herangezogen, um den Einfluss von Stroma- bzw. Immunzellen auf die Pathogenese des AAAs zu untersuchen. Die zirkulierenden Immunzellen wurden bei *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäusen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der KMT mit anschließender AngII-Infusion führte zu keiner Veränderung von zirkulierenden Immunzellen (Abbildung 43). So waren die Anzahl von Leukozyten, myeloiden Leukozyten, Neutrophile, Monozyten sowie Ly-6C^{high} und Ly-6C^{low} Monozyten in den vier Gruppen unverändert.

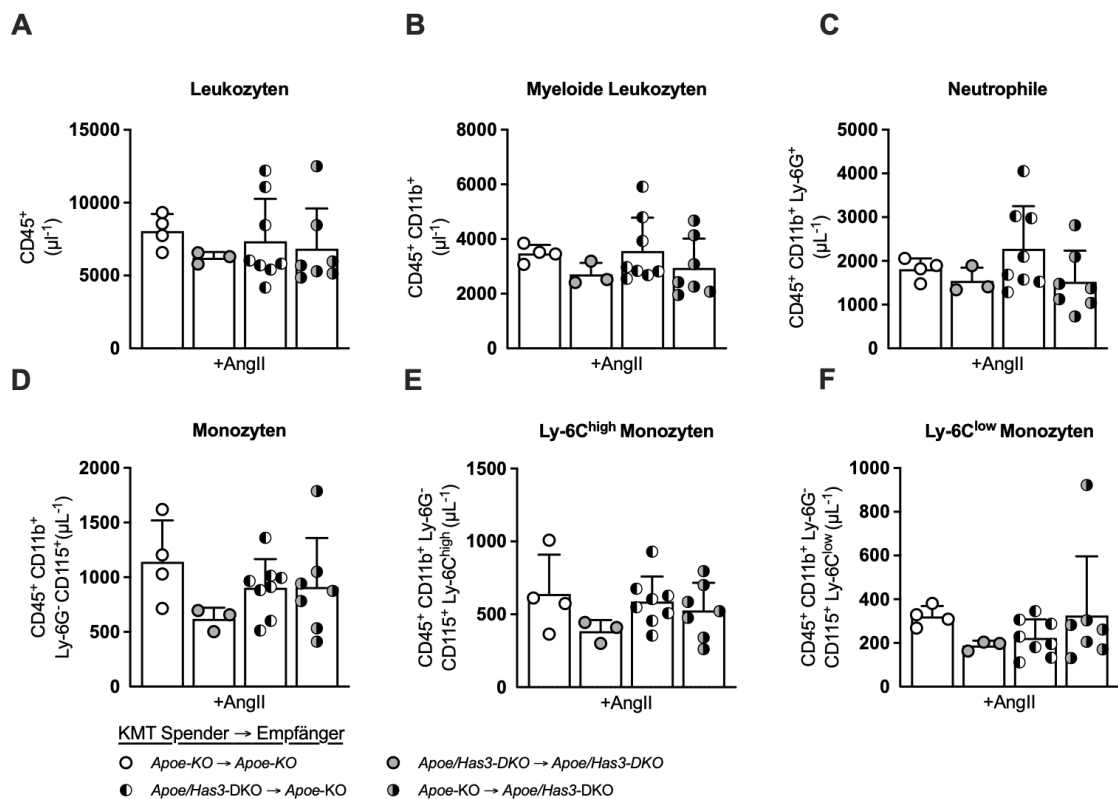


Abbildung 43. Keine Veränderung der Leukozyten sowie myeloiden Leukozytenpopulationen in der Zirkulation nach KMT und AngII-Infusion.

Für den KMT wurden vier Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen dienten zur Kontrolle und dabei wurden *Apoe*-KO Knochenmarkszellen in *Apoe*-KO sowie *Apoe/Has3*-DKO in *Apoe/Has3*-DKO übertragen. Zudem wurde der KMT von *Apoe/Has3*-DKO Spendern in *Apoe*-KO Empfänger sowie *Apoe*-KO Spendern in *Apoe/Has3*-DKO Empfänger durchgeführt. Die Dosis der AngII-Infusion betrug 1000 ng/kg/min. Die zirkulierenden Immunzellen der *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäuse wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro µl Vollblut für **A.** Leukozyten, **B.** myeloide Leukozyten, **C.** Neutrophile, **D.** Monozyten, **E.** Ly-6C^{high} und **F.** Ly-6C^{low} Monozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n(*Apoe*-KO in *Apoe*-KO)=4, n(*Apoe/Has3*-DKO in *Apoe*-KO)=8, n(*Apoe*-KO in *Apoe/Has3*-DKO)=3, n(*Apoe/Has3*-DKO in *Apoe/Has3*-DKO)=7.

Für die zirkulierenden Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen sowie $CD4^+$ und $CD8a^+$ T-Zellen wurde keine Unterschiede in den vier Gruppen nach KMT und AngII-Infusion festgestellt (Abbildung 44).

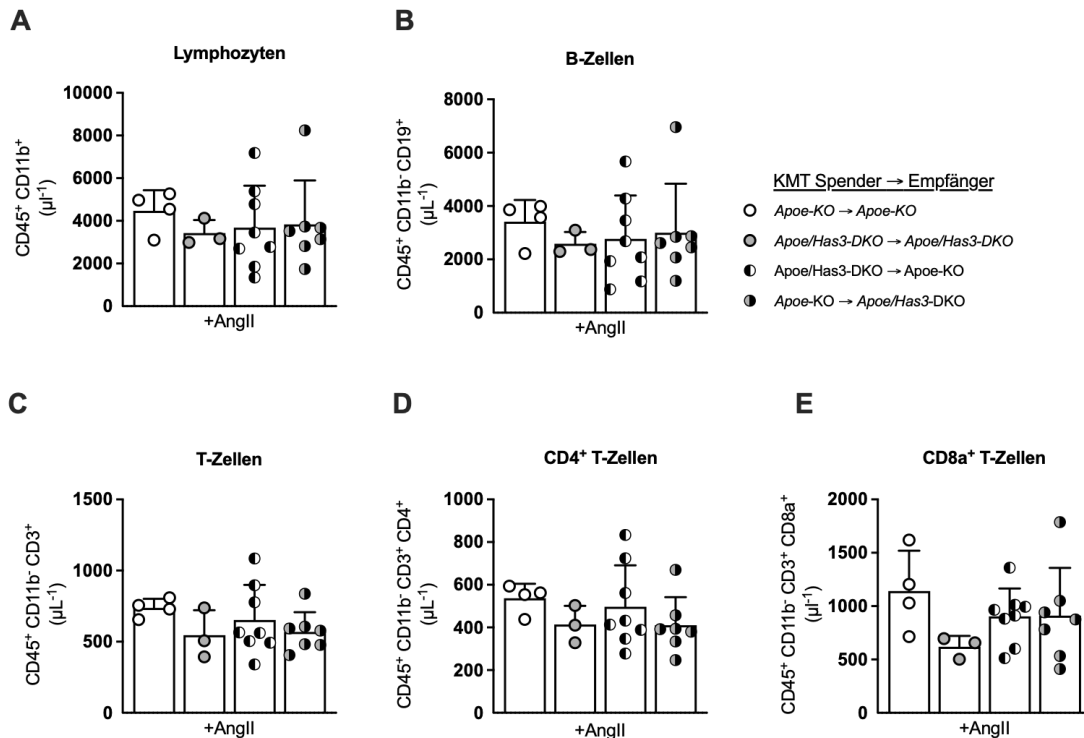


Abbildung 44. Keine Veränderung der Lymphozyten nach KMT und AngII-Infusion.

Für den KMT wurden vier Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen dienten zur Kontrolle und dabei wurden *Apoe*-KO Knochenmarkszellen in *Apoe*-KO sowie *Apoe/Has3-DKO* in *Apoe/Has3-DKO* übertragen. Zudem wurde der KMT von *Apoe/Has3-DKO* Spendern in *Apoe*-KO Empfänger sowie *Apoe*-KO Spendern in *Apoe/Has3-DKO* Empfänger durchgeführt. Die Dosis der AngII-Infusion betrug 1000 ng/kg/min. Die zirkulierenden Immunzellen der *Apoe*-KO und *Apoe/Has3-DKO* Mäuse wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro μL Vollblut für **A.** Lymphozyten, **B.** B-Zellen, **C.** T-Zellen, **D.** $CD4^+$ T-Zellen und **E.** $CD8a^+$ T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; $n(\text{Apoe-KO in Apoe-KO})=4$, $n(\text{Apoe/Has3-DKO in Apoe-KO})=8$, $n(\text{Apoe/Has3-DKO in Apoe/Has3-DKO})=3$, $n(\text{Apoe-KO in Apoe/Has3-DKO})=7$.

3.7.2 Immunzellen in der Aorta

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Aorta zeigte sich eine signifikante Reduktion der Makrophagenanzahl in *Apoe/Has3-DKO* Empfänger, die den KMT vom *Apoe/Has3-DKO* Spender erhielten, im Vergleich zu den *Apoe*-KO Empfänger, die die Knochenmarkszellen vom *Apoe*-KO Spender erhielten (Abbildung 45). Dementsprechend führte der KMT von *Apoe/Has3-DKO* Spender in *Apoe*-KO Empfänger zu keiner Veränderung der Makrophagenanzahl. Der KMT von *Apoe*-KO in *Apoe/Has3-DKO* führte in jeder Probe zu einer höheren Makrophagenanzahl als in der

Kontrollgruppe der *Apoe/Has3*-DKO. Jedoch waren diese Daten statistisch nicht signifikant. Dahingegen wurde keine Veränderung der Anzahl an Leukozyten, Neutrophile oder myeloide Leukozyten innerhalb der vier Gruppen nach KMT und AngII-Infusion beobachtet.

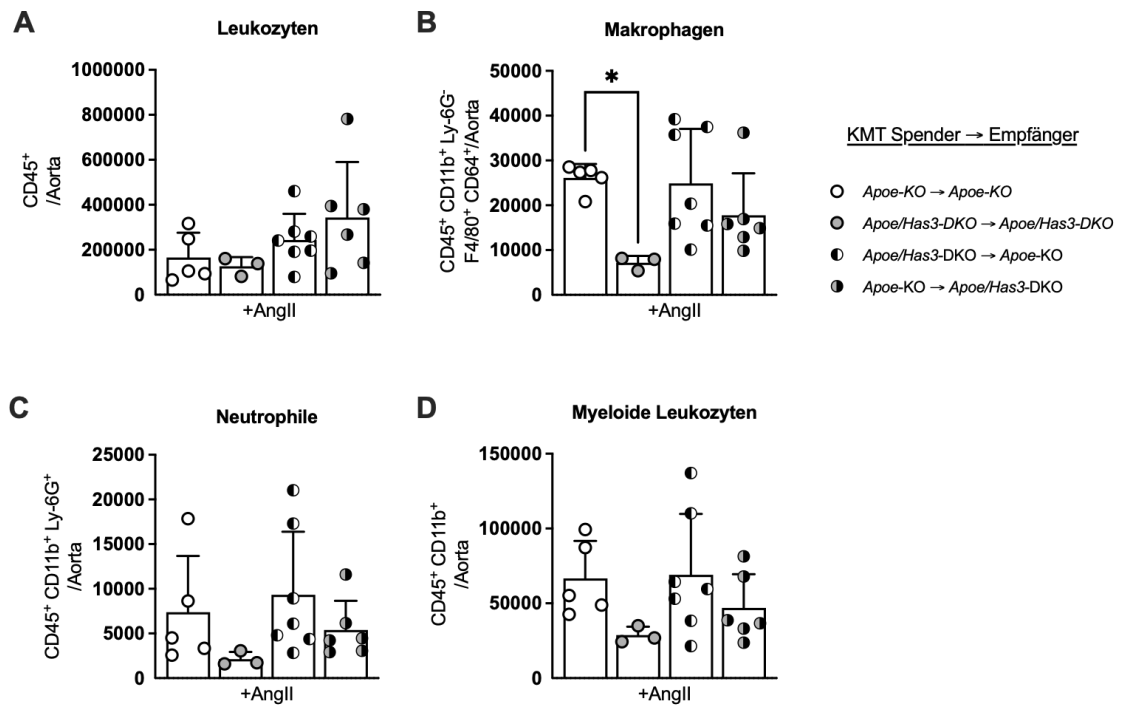


Abbildung 45. Reduktion der aortalen Makrophagenanzahl in der *Apoe/Has3*-DKO Kontrollgruppe und ein Trend zur gesteigerten Makrophagenanzahl nach KMT von *Apoe*-KO in *Apoe/Has3*-DKO. Für den KMT wurden vier Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen dienten zur Kontrolle und dabei wurden *Apoe*-KO Knochenmarkszellen in *Apoe*-KO sowie *Apoe/Has3*-DKO in *Apoe/Has3*-DKO übertragen. Zudem wurde der KMT von *Apoe/Has3*-DKO Spendern in *Apoe*-KO Empfänger sowie *Apoe*-KO Spendern in *Apoe/Has3*-DKO Empfänger durchgeführt. Die Dosis der AngII-Infusion betrug 1000 ng/kg/min. Die zirkulierenden Immunzellen der *Apoe*-KO und *Apoe/Has3*-DKO Mäuse wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Anzahl der Zellpopulationen pro mg Aorta für **A.** Leukozyten, **B.** Makrophagen, **C.** Neutrophile und **D.** myeloide Leukozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; *Apoe*-KO (n(Homo KMT)=4, n(Hetero KMT)=8), *Apoe/Has3*-DKO (n(Homo KMT)=4, n(Hetero KMT)=7). TwoWay ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Tukey * $p \leq 0,05$.

Die Ergebnisse des Kapitels 3 sind zu Teil als Vorabdruck publiziert:

Tatsiana Suvorava*, Fedor Brack*, Janet Kaczur, Patrick Petzsch, Karl Köhrer, Christine Quast, Nobert Gerdes, Katharina Voigt, Martina Krüger, Jens W. Fischer, Alexander Brückner, Bernd K. Fleischmann, Daniela Wenzel, Laura-Maria A. Zimmermann, Gerhard Sengle, Ulrich Flögel, Maria Grandoch. *Deficiency in hyaluronan synthase 3 attenuates ruptures in a murine model of abdominal aortic aneurysms by reduced aortic monocyte infiltration*. bioRxiv 2022.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der durch *Has3*-induzierten HA bei der Entstehung und Progression des AAAs untersucht. In einem AngII-induzierten murinen AAA konnte gezeigt werden, dass *Apoe/Has3*-DKO Mäuse trotz einer erhöhten Inzidenz von AAA sowie größeren maximale Aortendurchmesser eine reduzierte Mortalitätsrate aufgrund von Aortenrupturen aufwiesen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine verringerte Infiltration von Leukozyten in die Aortenwand und eine damit einhergehende verringerte Anzahl elastischer Lamellenbrüche eine zentrale Rolle in der pathologischen Umstrukturierung der Aorta spielen könnten. Ein weiterer wichtiger Befund ist die Auswertung der Bulk RNA Sequenzierungsdaten, die auf eine immunologische und inflammatorische Erkrankung hindeutet. Schließlich wurde der kanonische Signalweg der Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten und Monozyten im Vergleich der beiden Genotypen identifiziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine *Has3*-Defizienz eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunzelladhäsion und -infiltration sowie bei der Entzündungsreaktion und dem Fortschreiten eines AAAs einnimmt. Zudem legt die Herunterregulation des HA-Rezeptors CD44 in Monozyten von *Has3*-defizienten Mäusen nahe, dass *Apoe/Has3*-DKO Mäuse möglicherweise über eine reduzierte Inflammation via CD44 aufweisen.

Trotz der hohen Mortalitätsrate infolge einer Aortenruptur bei fortschreitendem AAA existiert derzeit keine pharmakologische Intervention, die die pathophysiologischen Veränderungen der Aorta wirksam hemmen oder verlangsamen kann. Die verfügbaren chirurgischen Eingriffe sind häufig mit erheblichen Risiken und Komplikationen verbunden, sodass eine Operation im Notfall zwar lebensrettend sein kann, jedoch noch weit davon entfernt ist, die Lebensqualität von Patienten signifikant zu verbessern und die Prognose nach Diagnosestellung wesentlich zu beeinflussen. Vor diesem Hintergrund ist es von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse, potenzielle pharmakologische Zielstrukturen zu identifizieren, die in die Pathogenese des AAAs eingreifen und somit neue therapeutische Ansätze ermöglichen könnten. Eine gezielte Forschung in diesem Bereich könnte nicht nur das Verständnis der Krankheitsmechanismen vertiefen, sondern auch zur Entwicklung innovativer Behandlungsmethoden beitragen, die langfristig die Morbidität und Mortalität von AAA-Patienten reduzieren könnten. Die Pathophysiologie des AAAs ist komplex und umfasst eine Entzündung der Aorta¹⁵⁶, die durch eine verstärkte Migration von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen in die Aortenwand und die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL1 β und TNF α charakterisiert ist⁹¹. Besonders

TNF α fördert die Polarisation von Makrophagen in den M1-Phänotyp, der IL1 β sezerniert und somit den Wechsel der VSMC zu einem synthetisierenden Phänotyp¹⁵⁷ begünstigt. Dies führt zu einer verstärkten MMP-induzierten Degradation der EZM¹⁵⁸. Interessanterweise hat die pharmakologische Inhibition von IL1 β im Mausmodell zu einer Reduktion des maximalen Aortendurchmessers geführt und konnte die Bildung von AAA sogar unterdrücken¹⁵⁹.

In all diesen Prozessen spielt die durch *Has3* induzierte HA eine tragende Rolle in der Pathophysiologie des AAAs. Sowohl *Has3* als auch HA sind an Entzündungsprozessen verschiedener chronischer Erkrankungen beteiligt, darunter chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, neointimale Hyperplasie und Atherosklerose. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass HAS3 eine durch T_H1-Lymphozyten/ Makrophagen vermittelte Entzündung in atherosklerotischen Plaques verstärkt¹¹². Des Weiteren fördert HA die Proliferation und Migration von VSMC und steigert die Entzündungsreaktion durch Bindung an den HA-Rezeptor CD44, dessen Expression unter inflammatorischen Bedingungen erhöht ist²⁷. In einem murinen AAA-Modell zeigen *Cd44*-KO Mäuse eine Reduktion der Proteasen MMP2 und MMP9 sowie der proinflammatorischen Zytokine IL6 und IL1 β auf, was sich protektiv auf die Entwicklung eines AAAs auswirkt¹²⁵.

Die vorliegenden Erkenntnisse legen nahe, dass HAS3 und HA eine wesentliche Rolle auch in der Pathogenese des AAAs spielen. Die Ergebnisse könnten somit neue Perspektiven für die Entwicklung pharmakologischer Strategien zur Behandlung und Prävention von AAA eröffnen, die über die derzeit verfügbaren operativen Maßnahmen hinausgehen.

4.1 *Has3*-Defizienz schützt vor Aortenrupturen

Um ein AAA zu induzieren, wurde allen Tiere gemäß dem etablierten Modell eine Dosis von 1000 mg/kg/min AngII subkutan appliziert¹⁶⁰. Parallel dazu wurde beiden Genotypen eine WD verabreicht, um die Inzidenz für die Entwicklung eines AAAs zu erhöhen. Mäuse mit normalen Cholesterinkonzentrationen im Blut, bei denen die Werte bei männlichen C57BL/6-Mäusen etwa 100 mg/dl betragen¹⁶¹, entwickeln nach einer AngII-Infusion eine Inzidenz von unter 20 % für die Entwicklung eines AAAs. Im Gegensatz dazu weisen Mäuse mit einem *Apoe*-KO Hintergrund und Hypercholesterinämie eine Inzidenz von über 80 % auf¹⁶⁰. In der vorliegenden Studie entwickelten *Apoe*-KO Mäuse

nach 28-tägiger AngII-Infusion eine niedrigere AAA-Inzidenz als in der Literatur beschrieben.

In ihrer Studie zeigen Homann *et al.*, dass kein Unterschied in den zirkulierenden LDL/VLDL (*very low density lipoprotein*, Lipoprotein mit sehr geringer Dichte)-Werten zwischen *Apoe/Has3*-DKO Mäusen und *Apoe*-KO Mäusen besteht¹¹². Die Inzidenzrate für AAA bei *Apoe/Has3*-DKO Mäusen nach AngII-Infusion betrug 83,3 %, was der in der Literatur beschriebenen Inzidenzrate für *Apoe*-KO Mäusen entspricht. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die *Has3*-Defizienz keinen Einfluss auf die Gesamtcholesterinkonzentration hat, welche als wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von AAA gilt.

Darüber hinaus resultierte die AngII-Infusion in einer Aneurysmenbildung in der thorakalen Aorta, wodurch *Apoe*-KO Mäuse ein TAA entwickelten. Um den Einfluss der *Has3*-Defizienz auf die Formation von TAA zu ergründen, ist eine weitere Untersuchung der Rolle von der *Has3*-Defizienz in einem spezifischen TAA-Modell erforderlich. Eine detaillierte Analyse könnte Aufschluss darüber geben, ob *Has3*-Defizienz ähnliche pathophysiologische Mechanismen im thorakalen Bereich beeinflusst wie im abdominalen Bereich.

Nach einer 28-tägigen AngII-Infusion zeigte sich ein signifikant besseres Überleben der *Apoe/Has3*-DKO Mäuse im Vergleich zu den *Apoe*-KO Mäusen, bei denen vermehrt Ruptur-bedingte Todesfälle registriert wurden. Die in der Literatur beschriebene Überlebensrate von 40 bis 60 % für *Apoe*-KO Mäuse nach einer 28-tägigen AngII-Infusion konnte in dieser Arbeit bestätigt werden¹⁶². Da der Einfluss der *Has3*-Defizienz auf die Pathogenese des AAAs bisher nicht untersucht wurde, existieren keine bekannten Überlebensraten für diesen Genotyp. Die Reduktion der Ruptur-bedingten Todesfälle durch die *Has3*-Deletion lässt jedoch auf einen protektiven Phänotyp im AngII-induzierten AAA-Modell schließen. Die Erforschung des zugrundeliegenden Mechanismus eröffnet die Möglichkeit, HAS3 zukünftig gezielt zu inhibieren. Nach der genetischen Deletion von *Has3* weist die Aorta vermutlich eine geringere Anfälligkeit für Rupturen auf, was einen vielversprechenden Ansatz zu Inhibition von HAS3 darstellt. HAS3 beeinflusst die Aortenwand auf vielfältige Weise, beispielsweise durch Veränderungen in der Entzündungsreaktion, der Zusammensetzung der EZM, der EC sowie der VSMC.

Die Lokalisation der Aortenrupturen wies in beiden Genotypen eine ähnliche Verteilung auf, sodass die *Has3*-Defizienz keinen Einfluss auf die Rupturstelle in der Aorta zu

nehmen scheint. AngII fördert die strukturelle Veränderung der Aorta, indem es eine Entzündungsreaktion durch Makrophagen in der *Tunica media* auslöst und die elastischen Lamellen durch die Hochregulation von MMP zerstört⁷⁹. Mit steigendem Aortendurchmesser kann die pathologisch umstrukturierte Aortenwand die Scherspannung und den Druck nicht aufrechterhalten, was letztlich zur Ruptur der Aorta führt¹⁶⁰.

In beiden Genotypen konnte eine Zunahme des maximalen Aortendurchmessers beobachtet werden. Dabei wies der Aortendurchmesser von *ApoE/Has3*-DKO Mäusen ab dem 14. Tag der AngII-Infusion eine signifikante Vergrößerung war. Dieser Befund steht im Widerspruch zur erhöhten Überlebensrate dieser Mäuse, da eine Zunahme des Aortendurchmessers üblicherweise mit einer erhöhten Inzidenzrate von Aortenrupturen korreliert¹⁶³. HA wird in sämtlichen Schichten der Aortenwand gebildet und stellt einen essenziellen Bestandteil der EZM dar, wobei die höchste Konzentration in der *Tunica media* nachgewiesen ist. Die Produktion von HA durch HAS3 erfolgt insbesondere in der frühen Entzündungsphase, wodurch die biomechanischen Eigenschaften der Aortenwand sowie die Inflammation beeinflusst werden⁹⁶. Ein genetisches Fehlen der *Has3*-Expression könnte zu einer unzureichenden HA-Produktion in der Aortenwand führen, was wiederum die viskoelastischen Eigenschaften der Aorta im AngII-Modell verändert. Aus der Literatur ist bekannt, dass HA mit Proteoglykanen Aggregate in der *Tunica media* bildet, um Wasser zu binden und dadurch mechanische Spannungen wie Scherkraft, Wandspannung oder den Druckgradienten aufrechtzuerhalten²⁷. In einem Mausmodell mit Überproduktion von aortaler HA war die Aorta durch eine erhöhte Steifigkeit gekennzeichnet⁹⁶. Es muss jedoch noch in nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden, ob die Aorta von *Has3*-defizienten Mäusen eine veränderte Zugfestigkeit aufweist und deswegen zu vergrößerten Aortendurchmessern während der Entwicklung eines AAAs neigt.

Im Einklang mit den vergrößerten Aortendurchmessern bei *ApoE/Has3*-DKO Mäusen wurden auch vergrößerte Lumenflächen festgestellt. In einem murinen Restenose-Modell nach Arterienverletzung wurde die Rolle von HA auf die adhäsive Interaktion zwischen VSMC und der EZM untersucht. Nach Bindung an den HA-Rezeptor RHAMM wurden konstriktive Arterienwände festgestellt, was darauf hindeutet, dass HA die vaskuläre Kontraktion durch Interaktion mit Kollagen beeinflusst¹⁶⁴. Ein vielversprechender Ansatz zur Rolle von HA in der Pathogenese des AAAs ist, dass sowohl in atherosklerotischen Läsionen als auch in AD eine erhöhte Menge an HA

nachgewiesen wurde^{27,112}. Innerhalb der *Tunica media* sind HAS2 und HAS3 in VSMC sowie HAS3 in EC an der HA-Synthese beteiligt¹⁶⁵.

Die strukturelle Veränderung der Aorta, die im Rahmen der Entwicklung eines AAAs stattfindet, geht mit einer Degradation der endothelialen Glykokalyx einher¹⁶⁶. Diese spielt eine wesentliche Rolle in der Funktion der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) sowie der Synthese von Stickstoffmonoxid und reguliert dadurch den Gefäßtonus¹⁶⁷. Im Rahmen der Pathogenese des AAAs kommt es zu einer Dysfunktion der endothelialen Glykokalyx, was letztlich zum Verlust der mechanosensitiven Eigenschaften der Aortenwand führt. HA beteiligt sich maßgeblich an der Aktivität von eNOS in der endothelialen Glykokalyx und fördert bei erhöhten Scherspannungen der Aorta die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, obwohl HA nur einen geringen Anteil von 5 – 20 % der gesamten Menge an GAG ausmacht¹⁶⁸. Die Reduktion des Stickstoffmonoxids führt zu einer Steigerung der Proliferation von VSMC und begünstigt hierdurch den synthetisierenden Phänotyp¹⁶⁶. In einem Arteriogenese-Modell konnte in *Has3*-KO Mäusen gezeigt werden, dass HAS3 in den EC scherstressbedingt eNOS aktiviert und somit zur Dilatation beiträgt¹¹³. Nachfolgend sollte die genaue Rolle der endothelialen Glykokalyx in *Has3*-defizienten Mäusen während der Entstehung und Entwicklung eines AAAs untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass die Aorten von *Apoe/Has3*-DKO Mäusen seltener ruptierten als die Aorten von *Apoe*-KO Mäusen. Dies deutet auf einen protektiven Effekt durch die genetische Deletion von *Has3* hin. Eine strukturelle Veränderung der Aortenwand, welche vermehrte Strangbrüche der elastischen Lamellen bedingt, geht mit einer Erhöhung des Rupturrisikos einher¹⁶⁹. In den *Apoe/Has3*-DKO Mäusen konnte demgegenüber eine reduzierte Anzahl von Brüchen der elastischen Lamellen im Vergleich zu *Apoe*-KO Mäusen beobachtet werden. Während der Atherosklerose ist die Rolle der HA gut dokumentiert, da eine gesteigerte HA-Synthese in der *Tunica intima* die Migration und Proliferation der VSMC moduliert¹⁷⁰. In der Folge differenzieren sich die VSMC zum synthetisierenden Phänotyp und produzieren vermehrt Komponenten der EZM wie HA, Kollagen sowie degradierende Enzyme wie MMP⁷³. Bulk-Analysen führten zu keiner Veränderung der Expression von MMP, rückten dafür die immunologische Antwort der Lymphozyten und Monozyten in den Mittelpunkt. Möglicherweise war der Zeitpunkt an dem die Bulk-Analysen durchgeführt wurden nicht der geeignete, um die Veränderung der MMP-Expression zwischen den Genotypen darzustellen. Zudem ist bekannt, dass die Synthese von MMP

ebenfalls durch Makrophagen, Fibroblasten und EC gesteuert wird¹⁷¹. Die erhöhte MMP-Aktivität führt zum enzymatischen Abbau der elastischen Lamellen und setzt dadurch die Integrität der Aortenwand herab, was das Rupturrisiko erhöht.

Darüber hinaus wurde in den Aorten von *Apoe*-KO Mäusen eine erhöhte Akkumulation von Kollagen festgestellt. In der Erforschung der mechanischen und biologischen Eigenschaften der Aortenwand mit einem AAA ist bekannt, dass die Menge an Kollagen, insbesondere von Kollagen Typ 1 und 3, mit der aortalen Wandspannung in der Entwicklung eines AAAs korreliert¹⁷². Die Kollagensynthese spielt eine entscheidende Rolle eine tragende Rolle bei der Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität der Aortenwand während der Entwicklung eines AAAs. Zudem bildet Kollagen Typ 1 und 3 die am häufigsten vorkommenden Komponenten der Aortenwand. Eine derartige erhöhte Akkumulation von Kollagen führt zu einer Veränderung der mechanosensitiven Eigenschaften der Aorta, wodurch diese steifer wird¹⁷³. In humanen Studien mit AAA-Patienten ist eine vermehrte Kollagenablagerung mit einem Funktionsverlust der Aorta, Druckschwankungen und Scherspannungen entgegenzuwirken, nachgewiesen, was zu einer erhöhten Rupturanfälligkeit führte¹⁷⁴. Schließlich ist bekannt, dass Kollagen mit HA und seinen Proteoglykanen Aggregate bildet und somit die biomechanischen Eigenschaften der Aortenwand verändert¹⁷⁵. Jedoch ist in der Entwicklung eines AAAs dieser Zusammenhang noch nicht untersucht worden und könnte in zukünftigen Arbeiten näher beleuchtet werden.

Des Weiteren bestätigte das PPE-Modell die durch die *Has3*-Defizienz verursachten aortalen Veränderungen. Die PPE-Behandlung führte bei beiden Genotypen zur Entwicklung von AAA, jedoch waren die maximalen Aortendurchmesser der *Apoe/Has3*-DKO nach 28 Tagen signifikant größer. Die durch die PPE-Behandlung induzierte Scherspannung führte zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx sowie der EC¹⁷⁶. Die Schädigung der endothelialen Glykokalyx und die direkte Exposition der PPE fördern in der Folge die Entzündungsreaktion in der Aortenwand, die zu einer Degradation der EZM während des AAAs führt¹⁶⁶. Es ist möglich, dass die *Has3*-Defizienz zu einer reduzierten Schichtdicke der endothelialen Glykokalyx führt, was wiederum die Kontaktfläche der PPE mit den EC vergrößert. Diese Überlegung würde zu einer stärkeren Degradation der elastischen Lamellen durch die PPE-Behandlung in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen führen und somit die größeren Aortendurchmesser durch die *Has3*-Defizienz erklären. Um die strukturellen Veränderungen der PPE-behandelten Aorten zu quantifizieren, sollten weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der endothelialen Glykokalyx, der elastischen Lamellenbrüche sowie der Kollagen-

akkumulation durchgeführt werden, um die Rolle der *Has3*-Defizienz im PPE-induzierten AAA-Modell näher zu beleuchten.

Der strukturelle Umbau der Aorta ist eine der drei Säulen zur Beschreibung der Pathogenese eines AAAs, zu welchen weiterhin der Phänotypwechsel und Apoptose der VSMC, die verstärkte Inflammation innerhalb der Aortenwand sowie die Degradation der EZM zählen¹⁵⁸. Nach 28-tägiger AngII-Infusion führte die Deletion von *Has3* in DKO-Mäusen zwar zu Aorten mit größerem Durchmesser, die Rupturinzidenz und damit die Mortalität war jedoch im Vergleich zu den AngII-behandelten *ApoE*-KO Kontrollmäusen signifikant reduziert. Trotz dieser vermeintlich widersprüchlichen Ergebnisse waren die Aorten von *ApoE/Has3*-DKO Mäusen im AngII-Modell im Vergleich zu den *ApoE*-KO Aorten mit einer reduzierten Anzahl an zerstörten elastischen Lamellen assoziiert. Hier wurde eine verminderte Entzündungsreaktion in der Aorta von *ApoE/Has3*-DKO Mäusen vermutet. Frühere Arbeiten mit HA und HAS3 haben hauptsächlich die Inflammation als Ursache der Pathogenese von Atherosklerose, Myokardinfarkt nach Ischämie und Reperfusion, neointimaler Hyperplasie, Arteriogenese und experimentellen Kolitis beschrieben^{110–113,177}.

Der zugrundeliegende Pathomechanismus bei der Entstehung von AAA wurde durch die Analyse beider Genotypen nach einer 7-tägiger AngII-Infusion näher untersucht. Bei beiden Genotypen unterschied sich die sonographisch ermittelte Inzidenz von AAA nicht. Zudem waren die Überlebensraten bei beiden Genotypen gleich. Die ermittelten Überlebensraten für *ApoE*-KO (78,12 %) und *ApoE/Has3*-DKO (73,93 %) sind vergleichbar mit denen aus der Literatur für *ApoE*-KO Mäuse (81,54 %) nach einer 7-tägigen AngII-Infusion¹⁷⁸. Der arterielle Blutdruck stellt einen Risikofaktor für die Entstehung eines AAAs dar und wurde daher bei beiden Genotypen bestimmt. Frühere Arbeiten konnten eine Assoziation zwischen dem arteriellen Blutdruck und der Menge an HA zeigen. 4-Methylumbelliferon stört den intrazellulären Anteil der aktivierten UDP-Zucker und hemmt die Expression aller HAS-Isoenzyme sowie UDP-Glukose-Phosphorylasen und -Dehydrogenasen¹⁰⁶. *ApoE*-KO Mäuse weisen nach einer Behandlung mit 4-Methylumbelliferon einen erhöhten arteriellen Blutdruck auf, da es zu einer endothelialen Dysfunktion sowie einer proinflammatorischen Antwort durch die Inhibition der HAS-Isoenzyme kommt¹⁷⁹. Während der 7-tägigen AngII-Infusion wurde kein Einfluss der *Has3*-Defizienz auf den Blutdruck beobachtet. Piroth *et al.* schreiben der HAS3-Expression einen protektiven Effekt auf den adaptiven Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt zu, indem es zu einer T-Zellaktivierung kommt¹¹⁴. Im AngII-

induzierten AAA-Modell konnte keine Veränderung der kardialen Herzfunktionen durch die *Has3*-Defizienz festgestellt werden.

Zusammengefasst führt die *Has3*-Defizienz während der frühen Phase des AAAs zu einer Reduktion der Immunzellakkumulation in die Aortenwand. Dies resultiert vermutlich in der Bildung von Elastin-degradierenden Enzymen und einer Veränderung der mechanosensitiven Eigenschaften der Aorta, da es zur vermehrten Degradation von elastischen Lamellen kommt. Es wird daher angenommen, dass HA einen wesentlichen Einfluss auf die Umstrukturierung der EZM während der Pathogenese des AAAs aufweist.

4.2 *Has3*-Defizienz hemmt die Immunantwort in der Aorta

4.2.1 *Has3*-Defizienz verringert die Immunzellinfiltration

Der zugrundeliegende Mechanismus für den Einfluss der *Has3*-Defizienz wurde in der Immunantwort vermutet, da frühere Publikationen die Rolle von HA und insbesondere der HAS3 in inflammatorischen Prozessen bei der experimentellen neointimalen Hyperplasie¹¹¹, der experimentellen Kolitis¹¹⁰, der Arteriogenese¹¹³ oder der Atherosklerose¹¹² beschrieben haben. Das AngII-Modell führt zu einem proinflammatorischen Phänotyp durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM1 und VCAM1 in den EC sowie von Zytokinen wie MCP1 sowie IL6 in den VSMC¹⁸⁰⁻¹⁸³. In der frühen Phase der AAA-Entstehung führt AngII zu einer Infiltration von B- und T-Lymphozyten, Neutrophilen und Makrophagen in die Aorta. Insbesondere die Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des AAAs, da AngII die Einwanderung von Makrophagen in die *Tunica media* fördert¹⁸⁴.

In der Aorta von *ApoE/Has3*-DKO Aorten wurde eine signifikante Reduktion von myeloiden Leukozyten und Makrophagen nachgewiesen. Diese Befunde legen nahe, dass die *Has3*-Defizienz zu einer verminderten aortalen Akkumulation von Makrophagen beiträgt. Homann *et al.* konnte eine Assoziation zwischen *Has3* und einer verstärkten Makrophagen-vermittelten Entzündung während der Atherosklerose nachweisen¹¹². Während der Inflammation kann die perizelluläre HA-Matrix der EC durch IL1 β , TNF α sowie TNF β zu einer vermehrten Adhäsion sowie Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten führen¹³⁰. Durchflusszytometrische Untersuchungen des Blutes von *ApoE/Has3*-DKO-Mäuse ergaben eine erhöhte Konzentration von myeloiden Leukozyten und Monozyten bei einer gleichzeitig reduzierten Anzahl an aortalen

myeloiden Leukozyten und Makrophagen, was möglicherweise auf eine verminderte Infiltration von Monozyten in die Aorta aufgrund einer reduzierten perizelluläre HA-Matrix hindeutet.

Der HA-Rezeptor CD44 spielt eine besondere Rolle für die Immunantwort, da er unter inflammatorischen Bedingungen auf den Immunzellen hochreguliert wird und die Infiltration von Immunzellen in das Gewebe fördert¹⁸⁵. Die Bindung von HA an CD44 führt zu einer Infiltration von Makrophagen in die Aortenwand, wodurch die Entstehung atherosklerotischer Läsionen wesentlich beeinflusst ist¹⁸⁶. In einem globalen *Cd44*-defizienten Mausmodell ist sogar ein Schutz vor TAA durch eine reduzierte Neutrophileninfiltration in die thorakale Aorta beobachtet worden¹²⁵. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde zum Zeitpunkt der 7-tägigen AngII-Behandlung kein Einfluss der *Has3*-Defizienz auf die Neutrophilen-Population in der Aorta festgestellt. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass Neutrophile zu einem früheren Zeitpunkt in die Aorta infiltrieren. Demnach lässt sich nicht sicher ableiten, dass der protektive Phänotyp, der mit der *Has3*-Defizienz assoziiert wurde, nicht mit der Infiltration von Neutrophilen im murinen AAA-Modell korreliert. In einige Studien konnte zudem ein Effekt von *Has3* auf T-Zellen gezeigt werden. Homann *et al.* berichten in *Has3*-defizienten Mäusen über eine Reduktion der durch T_H1-Zellen vermittelten Plaque-Entzündung¹¹². Piroth *et al.* konnten nachweisen, dass HAS3 für eine physiologische T-Zell-Antwort nach Myokardinfarkt erforderlich ist, da *Has3*-defiziente kardiale T-Zellen eine verminderte Aktivierung und eine erhöhte Apoptose aufweisen¹¹⁴. Die Deletion von *Has3* resultiert in einer verminderten Expression von CD44 in T-Zellen, was mit einer verminderten Aktivität des HA-Rezeptors assoziiert ist¹¹⁴. Im AngII-Modell wurde jedoch nach 7-tägiger Behandlung keine Assoziation zwischen *Has3*-defizienten Mäusen und T-Lymphozyten in Bezug auf die Entstehung oder Entwicklung des AAAs festgestellt.

Das Zytokin IL12-p40 ist wesentlich an der Rekrutierung von M2-Makrophagen beteiligt, was die Steifigkeit der Aorta erhöht und die Fibrose fördert¹⁸⁷. Die Aktivierung von Makrophagen führt über den NF- κ B-Signalweg zu einer erhöhten Produktion von IL12¹⁸⁸. Ein Mausmodell mit globalem *Il12p40*-Mangel bestätigt das proinflammatorische Profil dieses Zytokins, das die Entwicklung eines AAAs fördert¹⁸⁷. Homann *et al.* konnten in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine reduzierte aortale Expression von IL12-p40 im Vergleich zu *Apoe*-KO Mäusen nachweisen. Die Aorten von *Has3*-defizienten Mäusen ist im atherosklerotischen Modell mit einer geringeren proinflammatorischen Reaktion assoziiert¹¹². In dieser Arbeit wurde eine signifikante Reduktion von IL12-p40 in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen festgestellt, was auf eine reduzierte Inflammation der Aorta

hindeutet. Humane AAA-Patienten weisen ebenfalls über eine erhöhte Konzentrationen dieses proinflammatorischen Zytokins auf¹⁸⁹. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von IL12-p40 in AAA-Mäusen zu einer reduzierten Akkumulation von Makrophagen beiträgt und dadurch verschiedene assoziierte Mediatoren wie IL6, TNF α und MMP9 weniger freigesetzt werden¹⁹⁰.

Im Gegensatz dazu wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von IL17A in den *ApoE/Has3*-DKO Mäusen festgestellt. IL17A wird hauptsächlich von T-Zellen produziert und ist ein wichtiger Regulator während der vaskulären Immunantwort¹⁹¹, da das proinflammatorische IL17A zur Rekrutierung von Monozyten in die atherosklerotische Aorta von *ApoE*-KO Mäusen führt¹⁹². In *Il17a*-KO Mäusen wurde die Rekrutierung von Monozyten über die Induktion von MCP1 der EC festgestellt¹⁹³. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Reduktion von CCL3 im Blutplasma der *ApoE/Has3*-DKO Mäuse nach AngII-Infusion. CCL3 ist ein wichtiger Mediator für die Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen¹⁹⁴. McKee *et al.* konnten in einer früheren Arbeit nachweisen, dass HA für die Induktion von CCL3 in Makrophagen verantwortlich ist¹⁹⁵. Die *Has3*-Defizienz ist somit mit reduzierten CCL3-Konzentrationen im Blutplasma im AngII-Modell assoziiert, was vermutlich mit einer erniedrigten Makrophagenakkumulation in der Aorta zusammenhängt. Dieser Zusammenhang könnte weiterhin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp durch die *Has3*-Defizienz in der AAA-Pathogenese beitragen. Obwohl IL6 als eines der prominentesten proinflammatorischen Zytokinen gilt und in humanen Patienten sogar als Biomarker mit der pathologischen Entwicklung der Aorta assoziiert ist¹⁹⁶, waren die IL6 Plasmakonzentrationen bei beiden Genotypen unverändert. Ähnliches galt für TNF α , IL1 α und GCSF. Allerdings waren die Konzentrationen dieser Zytokine in den *ApoE/Has3*-DKO tendenziell, wenn auch nicht signifikant, erniedrigt, was grundsätzlich für einen antiinflammatorisches Profil der *Has3*-Defizienz entspricht.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese der antiinflammatorischen Effekte der *Has3*-Defizienz in der Zirkulation sowie in der Aorta im Rahmen einer AngII-Infusion. Demgegenüber konnte im PPE-Modell weder in der Aorta noch in der Zirkulation ein Unterschied in den Immunzellen zu den untersuchten Zeitpunkten festgestellt werden. Neutrophile sind auch im PPE-Modell an der Infiltration der Aorta beteiligt und setzten dabei MMP9 frei, was zur Degradation der elastischen Lamellen und damit zur Umstrukturierung der Aorten führt¹⁹⁷. Bisher konnte kein Zusammenhang der *Has3*-Defizienz mit einer veränderten Infiltration von Neutrophilen oder anderen Immunzellen im PPE-Modell nach 7 Tagen nachgewiesen werden. Zudem tragen aktivierte CD8⁺ T-

Zellen zur Inflammation im PPE-Modell bei, da diese IFN γ freisetzen und dadurch zu einer verstärkten Rekrutierung von Makrophagen in die Aorta beitragen¹⁹⁸. Zwischen den Genotypen wurde weder eine Veränderung der T-Lymphozyten noch eine Akkumulation von Makrophagen im PPE-Modell beobachtet. 28 Tagen nach der PPE-Behandlung war der maximale Aortendurchmesser in *Has3*-defizienten Aorten größer als von den *Apoe*-KO Aorten und entsprach dem Ergebnis im AngII-Modell, dass die Aneurysmen der *Apoe/Has3*-DKO Mäuse größer als die der *Apoe*-KO Mäuse waren. Die genetische *Has3*-Defizienz könnte mit einer veränderten viskoelastischen Eigenschaft der Aorta im PPE-Modell zusammenhängen. Zunächst führt die PPE-Behandlung zur Degradation der elastischen Lamellen, die anschließend in eine verstärkten Immunantwort und schließlich zur Dilatation zum AAA resultiert¹⁹⁹. Der Grund für die größeren Aneurysmen in *Apoe/Has3*-DKO Mäusen im Vergleich zu *Apoe*-KO Mäusen ist nicht genau ermittelt, könnte möglicherweise aber mit den biomechanischen Eigenschaften der HA innerhalb der *Tunica media* erklärt werden⁹⁶. Demnach könnte vermutlich die Aorta von *Apoe*-KO Mäusen durch die *Has3*-Expression zu einer steiferen Aorta führen.

Zusammenfassend wurden im PPE-Modell nach 7 Tagen keine antiinflammatorischen Effekte der *Has3*-Defizienz beobachtet. Um einen möglichen antiinflammatorischen Phänotyp in *Apoe/Has3*-DKO Mäuse im PPE-Modell zu identifizieren, könnten andere Zeitpunkte zur Untersuchung gewählt werden. Darüber hinaus könnte die chronische Inflammation, die nach der PPE-Behandlung initiiert wird, durch Identifizierung der Zellpopulationen bestimmt werden. Bekanntermaßen führen MMP sowohl zur Entstehung als auch zur Entwicklung eines AAAs bei, sodass die Aktivität dieser Proteine ermittelt werden sollte. Außerdem weisen die Aorten von *Apoe/Has3*-DKO größere Aneurysmen auf, was ebenfalls im AngII-Modell ermittelt wurde. Für die genaue Rolle der HA sowie *Has3* sollten tieferegehende strukturelle Untersuchungen vorgenommen werden, um die Entwicklung des AAAs im PPE-Modell zu verstehen. Hierzu könnte sowohl eine Quantifizierung der HA und dessen Aggregate sowie die Zugfestigkeit der Aorta in beiden Genotypen bestimmt werden.

4.2.2 *Has3*-Defizienz reduziert die lymphoide Immunzellpopulation der Milz

Der protektive sowie antiinflammatorische Phänotyp der *Has3*-defizienten Mäuse wurde mit einer reduzierten Akkumulation von Makrophagen in der Aorta assoziiert. Neben dem Knochenmark ist auch die Milz an der Bildung von Monozyten beteiligt. In der Literatur ist beschrieben, dass Monozyten aus der Milz auf vaskuläre Entzündungen reagieren und an der Pathogenese von Atherosklerose, Myokardinfarkt und AAA beteiligt sind^{88,200}. Die durchflusszytometrische Untersuchung beider Genotypen ergab keine Unterschiede

zwischen myeloiden Leukozyten sowie Monozyten in der Milz. Daher lässt sich ableiten, dass die antiinflammatorischen Effekte der *Has3*-Defizienz nicht in der Milz lokalisiert sind. Als sekundäres lymphatisches Organ ist die Milz in erster Linie für die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten nach Antigenerkennung verantwortlich. Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben eine reduzierte Konzentration von Lymphozyten, B-, T- und CD4⁺ T-Zellen in *ApoE/Has3*-DKO Mäusen im Vergleich zu *ApoE*-KO Kontrolltieren. In einer Studie konnten Piroth *et al.* eine reduzierte Anzahl an T-Zellen in der Milz von *Has3*-KO Mäusen nach 7 Tagen vorheriger Ischämie und Reperfusion nachweisen¹¹⁴. Dieses Ergebnis steht mit einer T-Zellaktivierung von *Has3*-KO Mäusen nach einem Herzinfarkt in Verbindung. Obwohl die Lymphozyten in der Milz der *ApoE/Has3*-DKO Mäusen signifikant reduziert waren, hatte dies weder einen Einfluss auf die Zellzahlen in der Zirkulation noch in der Aorta. Die fehlende Korrelation zwischen einer Reduktion lymphoider Zellen in der Milz und Veränderungen ihrer Anzahl in der Zirkulation oder in der Aorta lässt vermuten, dass die Bedeutung lymphoider Zellen für die Erklärung des Pathomechanismus von AAA zu diesem Zeitpunkt möglicherweise nicht durch die *Has3*-Defizienz kontrolliert wird.

4.2.3 Immunzellen und nicht Stromazellen begünstigen aortale Inflammation nach KMT

Durch die AngII-Infusion wird die Myelopoese im Knochenmark aktiviert, sodass unter anderem Monozyten aus HSPC differenzieren²⁰¹. Außerdem sind Monozyten aus dem Knochenmark die dominierende Population, die innerhalb der AAA-Pathogenese zu Makrophagen reifen und für die Inflammation beitragen²⁰². Aufgrund der erhöhten Anzahl von Monozyten in der Zirkulation durch die *Has3*-Defizienz wurde eine verstärkte Myelopoese erwartet²⁰³. Erst kürzlich haben Zhang *et al.* gezeigt, dass die Regulation von HSC durch HA über einen G-Protein-gekoppelten Signalweg der Familie C, Gruppe 5C reguliert wird²⁰⁴. Zudem fördert die Interaktion von HA an CD44 die Adhäsion sowie Migration von HSC in die Stromazellen²⁰⁵. Die Analyse der Stammzellen ergab jedoch keinen Einfluss der *Has3*-Defizienz auf die Myelopoese im Knochenmark.

Der KMT bestätigte die Beteiligung der Immunzellen an der Inflammation während der AAA-Entwicklung in der Aorta. Zum einen bestätigte sich eine erhöhte Akkumulation von Makrophagen in der Aorta von *ApoE*-KO Mäusen, die das Knochenmark von *ApoE*-KO Mäusen erhalten haben, im Vergleich zu *ApoE/Has3*-DKO Mäusen, die die Knochenmarkszellen von *ApoE/Has3*-DKO Mäusen erhielten. Hingegen wurde in *ApoE/Has3*-DKO Empfängern, welche nach dem KMT das Knochenmark von *ApoE*-KO Spendertieren bekommen hatten, eine erhöhte Makrophagen-Akkumulation in der Aorta

festgestellt. Insgesamt deutet dies auf einen *Has3*-vermittelten Effekt der aus dem Knochenmark stammenden Immunzellen selbst, im Gegensatz zu Stromazellen der Gefäßwand hin, die Inflammation der Aorta zu beeinflussen.

4.3 *Has3*-Defizienz deutet auf einen proinflammatorischen Phänotyp anhand aortaler Expressions- sowie Transkriptionsänderungen

4.3.1 *Has3*-Defizienz führt zur aortalen Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten und Monozyten

Mit Hilfe der RNA-Bulksequenzierung wurden pathologische Signalwege im Vergleich der beiden Genotypen identifiziert. Die Adhäsion und Diapedese der Lymphozyten und Monozyten zeigte einen kanonischen Signalweg in der Analyse aortaler RNA-Bulksequenzierung an. Dieser Signalweg beschreibt den Prozess der Extravasation der Immunzellen in die Aorta. Dieser Vorgang umfasst die Annäherung, das Einfangen, das Rollen, die Aktivierung der Leukozyten an den EC, sodass eine Adhäsion nach Bindung über ICAM1 und VCAM1 entsteht. Daraufhin erfolgt die Diapedese der Leukozyten bis zur EZM der Aorta²⁰⁶. Bereits zuvor konnte für HAS2 gezeigt werden, dass durch IL1 β die Adhäsion von Monozyten über CD44 an humanen EC über den proinflammatorischen NF κ B-Signalweg vermittelt wurde⁷³. Zudem wurde eine Hochregulation der *Cxcl3*-Expression analysiert, die für die Migration von Neutrophilen und Monozyten über CXCR2 zu proinflammatorischen Effekten führt. CXCL3 führt zur Kontrolle der Migration und Adhäsion von Monozyten über den Chemokinrezeptor *Cxcr2*. Die Bedeutung von CXCL3 ist in der Literatur bei humanen Patienten sowohl in intakten²⁰⁷ als auch in rupturierten²⁰⁸ Aorten beschrieben. Erhöhte Expressionen von CXCR2 sind sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen mit einem erhöhten Entzündungsgeschehen assoziiert^{209,210}. Nach Bindung von HA an CD44 wurde indirekt über CXCR2 eine verstärkte endotheliale Monozyteninfiltration entdeckt²¹¹. Es ist zudem unbekannt ob eine HAS-Isoform dieses Chemokin direkt reguliert. Warum in der Bulk-Sequenzierung der Aorta von *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine erhöhte Expression von CXCL3 vorliegt, obwohl sich weniger Makrophagen in der Aorta anreichern, sollte hinsichtlich der Rolle der *Has3*-Defizienz in der Pathogenese des AAAs weiter untersucht werden. Ähnliches gilt für die Identifikation von IFI208, welches am stärksten hochreguliert war, da dieses Gen in der Literatur in keinem Zusammenhang mit einer vaskulären Erkrankung steht. Ebenso konnte in der Literatur kein Einfluss der HAS-Isoenzyme mit diesem Gen hergestellt werden. Zusammenfassend deuten die

Auswertung der aortalen Bulksequenzierungsdaten darauf hin, dass die Migration sowie Diapedese von Monozyten ein vielversprechender Ansatz zur Erklärung der Pathogenese ist. Damit wurde ein Fokus vor allem für die Inflammation über die Adhäsionsmoleküle ICAM1 sowie VCAM1, die Migration über CD44, die proinflammatorischen Zytokine IL1 β sowie TNF α , die Chemokinrezeptoren CCR2 sowie CX3CR1 und der Matrixabbauenden Enzyme MMP2 sowie MMP9 gelegt.

4.3.2 *Has3*-Defizienz führt zum antiinflammatorischen aortalen Expressionsprofil

Für die Migration von Immunzellen sind die Adhäsionsmoleküle VCAM1 und ICAM1 von zentraler Bedeutung. Diese Transmembranproteine auf den EC ermöglichen es Leukozyten, an ihnen zu adhären, durch das Endothel zu migrieren und im umliegenden Gewebe eine Immunantwort auszulösen. In einem AngII-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Injektion eines neutralisierenden VCAM1-Antikörpers den Blutdruckanstieg sowie die Umstrukturierung der Aorta verhinderte²¹². Cuff *et al.* zeigten im atherosklerotischen Mausmodell mit *Apoe*-KO Tieren, dass HA die Expression von VCAM1 und ICAM1 erhöhte^{96,134}. Zudem führte die Bindung von HA an ICAM1 zu einer vermehrten Immunzellinfiltration während einer Atherosklerose²¹³. Obwohl die *Icam1*-Expression unverändert blieb, wurde nach einer 28-tägiger AngII-Infusion in *Apoe*-KO Mäusen eine signifikante Erhöhung der *Vcam1*-Expression in der Aorta festgestellt.

Zusätzlich zeigten die Aorten von *Has3*-deletierten DKO-Mäusen nach einer AngII-Behandlung eine signifikant reduzierte Expression von *Mmp9*. MMP9 wurde mit der Entstehung von AAA assoziiert, da es die Spaltung verschiedener Proteine der EZM fördert und somit zu deren Degradation beiträgt²¹⁴. In diesem Kontext spielen insbesondere MMP2, 9 und 12 eine wichtige Rolle bei der Degradation elastischer Fasern in der EZM²¹⁵. Studien an humanen Patienten mit AAA belegen zudem erhöhte Konzentrationen von MMP9²¹⁴. Weiterhin ist bekannt, dass HA die Aktivität von MMP9 über einen NF- κ B Signalweg moduliert²¹⁶. Bei der Untersuchung des Nierenzellkarzinoms wurde festgestellt, dass CD44 die intrazelluläre HA-Synthese über HAS1 steigert und dadurch die Expression von MMP9 erhöht²¹⁷. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die genetische Deletion von *Cd44* die Aktivität von MMP9 reduziert und somit die Mäuse vor der Entwicklung eines thorakalen AD schützt¹²⁵. Aus Monozytengereifte Makrophagen sind in der Lage, MMP9 zu produzieren und dadurch die Degradation der EZM zu fördern²¹⁸. Im nächsten Schritt sollten die Zellen ermittelt werden, die für die MMP9-Synthese verantwortlich sind. Zudem ist neben der Ermittlung der reinen Genexpression ebenfalls die Bestimmung der biologischen Aktivität von

MMP9 von großer Bedeutung, um diesem Protein eine Rolle bei der AngII-vermittelten AAA-Pathogenese zuzuschreiben. Darüber hinaus wurde eine *Has3*-Defizienz mit einer Abnahme der aortalen mRNA-Expression von *Col1a1* assoziiert. Bei der Degradation der elastischen Lamellen sezernieren MMP2 oder MMP9 das proinflammatorische Zytokin TGF β , was zur Migration und Proliferation von VSMC und schließlich zur vermehrten Produktion von Kollagen führt²¹⁹. Die vermehrte Kollagensynthese soll die mechanosensitiven Eigenschaften der Aorta nach Degradation der elastischen Lamellen kompensieren. COL1a1 tritt insbesondere in der späten Phase der aortalen Umstrukturierung auf. Frühere Publikationen haben gezeigt, dass eine erhöhte CD44-Expression mit einer gesteigerten Expression von Kollagen Typ 1 assoziiert ist²²⁰.

4.3.3 *Has3*-Defizienz in Endothelzellen nicht für die gestiegene Infiltration verantwortlich

Die Rolle der EC bei der Entstehung des AAAs ist weitgehend bekannt. Dysfunktionelle EC wurden bei der Entstehung von AAA identifiziert. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für diesen EC-Defekt. Eine verminderte Stickstoffmonoxid-Produktion und eNOS-Entkopplung²²¹, eine ROS-induzierte Suszeptibilität der Aortenwand der EC für die Entwicklung einer AD²²² oder eine Störung der Tight Junctions, die eine Entzündungsreaktion und Ödembildung in der Aorta begünstigt²²³, unterstreichen die Bedeutung funktionaler EC zum Schutz einer AAA. Stickstoffmonoxid wirkt antioxidativ, antithrombotisch, antiproliferativ und antihypertensiv. HAS3 in den EC fördert die Arteriogenese über die HAS3/HA/CD44/NO-Achse^{113,179}. In der vorliegenden Studie wurden jedoch keine Veränderungen des Blutdruckes oder der Endothelfunktion bei *Apoe/Has3*-DKO-Mäusen nach AngII-Infusion im Vergleich zu *Apoe*-KO Mäusen beobachtet. Darüber hinaus zeigten isolierte abdominale EC aus *Apoe/Has3*-DKO und *Apoe*-KO keine unterschiedliche Genexpression²²⁴ (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Ergebnisse unterstützen nicht die Beteiligung von HAS3/HA-abhängigen Effekten auf die EC bei der Entwicklung von AAA im AngII-Modell.

4.4 *Has3*-Defizienz in Monozyten mit protektivem Effekt

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals über den Einfluss der HAS3-Defizienz auf eine verminderte Monozytenantwort bei der Entwicklung eines murinen AAAs berichtet. Im AngII-Modell wurde eine erhöhte Monozytenadhäsion bereits mit der Pathophysiologie der Hypertonie in Verbindung gebracht^{182,183}. Frühere Studien

belegen, dass die proinflammatorischen Zytokine IL1 β und TNF α die HA-Synthese in den EC über HAS2 steigern, was die Infiltration und Rekrutierung von Monozyten fördert²²⁵. Diese Arbeit belegt die wichtige Rolle der *Has3*-defizienten Monozyten als Regulator der Entzündungsreaktion innerhalb der Aorta während der AngII-Infusion. Monozyten, die aus dem Knochenmark isoliert wurden, exprimieren alle drei Isoformen des HAS-Enzyms und produzieren im Vergleich zu differenzierten Makrophagen unter basalen Konditionen eine höhere Menge an HA¹⁷⁷. Dies lässt den Schluss zu, dass Monozyten über eine perizelluläre Matrix verfügen. Die HA-reiche Matrix der Monozyten moduliert nach der Infiltration in die Aorta deren Zellfunktion. Diese Hypothese wird durch die herunterregulierte mRNA-Expression des HA-Rezeptors *Cd44* in *ApoE/Has3*-DKO Monozyten gestützt, da die Interaktion von CD44 mit HA einen chronischen Entzündungsprozess durch die Rekrutierung von Immunzellen in die Gefäßwand fördert¹³⁴. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei T-Zellen nach Ischämie und Reperfusion gemacht. Dabei wurde bei isolierten Monozyten aus *Has3*-defizienten DKO-Mäusen eine verminderte *Cd44*- Expression beobachtet¹¹⁴. Des Weiteren konnte eine Herunterregulation der mRNA-Expression der Gene *Ccr2* und *Cx3cr1* in isolierten *ApoE/Has3*-DKO-Monozyten im Vergleich zu *ApoE*-KO-Monozyten beobachtet werden. CCR2 fördert die Migration von Leukozyten in die Aortenwand sowie deren Akkumulation im AngII-induzierten AAA-Modell²²⁶. CX3CR1, ein auf Monozyten exprimiert Molekül, ist für die Rekrutierung von Leukozyten in EC²²⁷ verantwortlich und verstärkt die Immunantwort in der Aorta während eines AAAs²²⁸. Zusätzlich wiesen isolierte Monozyten aus *ApoE/Has3*-DKO-Mäusen eine verminderte mRNA-Expression von *Il1 β* und *Tnfa* auf, was auf eine reduzierte Immuninfiltration hindeutet. Die Reduktion dieser proinflammatorischen Zytokine führt zudem zu einer verminderten Produktion des matrixdegradierenden Enzyms MMP9²²⁹. Die Herunterregulation dieser Gene in isolierten *ApoE/Has3*-DKO-Monozyten resultiert möglicherweise in einer reduzierten Migration und Akkumulation von Immunzellen in der Aorta während der Pathogenese des AAAs. Diese Hypothese müsste noch in weiteren Experimenten näher untersucht werden, damit die biologische Aktivität für die Regulation der mRNA-Expression in Verbindung gebracht werden kann.

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, welches eine globale *Has3*-Defizienz im *ApoE*-Hintergrund aufweist. Diese Arbeit ist die Erste, die die wichtige Rolle der *Has3*-Defizienz bei der Entstehung und Entwicklung von AAA in Mäusen aufzeigt.

HAS3 und HA spielen eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion und sind daher wesentliche Bestandteile der Pathophysiologie des AAAs. Um die Effekte der *Has3*-Defizienz besser zu verstehen, ist der Einsatz von zelltypspezifischen *Has3*-KO-Mäusen entscheidend. Ein spezifischer *Has3*-KO in Monozyten könnte dazu beitragen, die genaue Rolle von HAS3 und der HAS3-induzierten Produktion von HA bei der Migration und Akkumulation in der Aorta aufzuklären. Zudem könnte eine pharmakologische Depletion der zirkulierenden Monozyten in *ApoE*-KO Mäusen die Relevanz dieser Zellen in der Pathogenese des AAAs verdeutlichen.

Darüber hinaus sollte die biologische Aktivität der mRNA-Expressionsmuster von MMP9 untersucht werden, da die Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression nicht immer gegeben ist. Um den Phänotypwechsel der VSMC und schließlich deren Apoptose aufzuzeigen, sollte die Expression von kontraktiven Genen sowie Marker der Apoptose untersucht werden. Für die Erforschung eines Arzneistoffes ist zudem die Untersuchung in weiblichen Mäusen notwendig. Denn die geschlechtsspezifischen Einflüsse auf die Entstehung und Entwicklung eines AAAs müssen berücksichtigt werden, da das weibliche Geschlecht zwar eine geringere Inzidenz für ein Aneurysma aufweist, diese jedoch mit einem höheren Rupturrisiko als männlichen Patienten einhergehen. Aus diesem Grund ist die Berücksichtigung der *Has3*-Defizienz in Hinblick auf die Erforschung von AAA in weiblichen Mäusen dringend geboten. Die Identifizierung eines Arzneistoffes, der spezifisch HAS3 inaktiviert und somit die Entzündung vermutlich durch eine verringerte Immunzellinfiltration in der Aorta reduziert, könnte eine bedeutende Säule in der Therapie des AAAs darstellen. Hierzu steht noch die Ergreifung des genauen Mechanismus zwischen der *Has3*-Defizienz und dem protektiven Phänotyp im AAA-Modell aus. Ein vielversprechender Ansatz für eine pharmakologische Behandlung könnten miRNA-Moleküle sein. Sie stellen kurze, nicht-kodierende RNA Moleküle dar, die an die Ziel-mRNA binden, um die Genexpression zu unterbinden²³⁰. Mit Hilfe der pharmakologischen Oligonukleotiden könnte die Biosynthese von HAS3 inhibiert werden, um damit den protektiven Phänotyp während der AAA-Pathogenese weiter zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Aortenerkrankungen wie das abdominale Aortenaneurysma (AAA) gehören zu den kardiovaskulären Erkrankungen mit hoher Letalität. Die einzige Behandlungsmöglichkeit für ein AAA ist ein chirurgischer Eingriff, der mit einer Reihe von Komplikationen einhergeht. Da es weder eine symptomatische noch eine kausale und somit zugelassene pharmakologische Therapie zur Verlangsamung oder Linderung eines AAAs gibt, ist die Identifizierung der Pathophysiologie von höchstem Interesse.

Die Hyaluronsäure (HA) ist nicht nur ein essentieller Bestandteil der extrazellulären Matrix der Gefäßwand, sondern zeigt einen direkten Einfluss auf den Phänotyp glatter Muskelzellen (SMC) und ist in der Lage, die Immunantwort zu beeinflussen. Insbesondere wurde der Einfluss von Hyaluronsäuresynthase 3 (HAS3) bei entzündlichen Erkrankungen wie der experimentellen Kolitis, der neointimalen Hyperplasie oder der Arteriogenese gezeigt. Dabei wurden Effekte der HAS3-synthetisierten HA auf SMC oder Endothelzellen identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden *Has3*-defiziente Mäuse (*Apoe/Has3*-DKO) sowie *Apoe*-KO Mäuse hinsichtlich der Entstehung und Entwicklung eines induzierten AAAs untersucht. *Apoe/Has3*-DKO Mäuse zeigten eine reduzierte Rate an letalen Aortenrupturen, die mit einer reduzierten Anzahl an Strangbrüchen der elastischen Lamellen einherging. Außerdem war die Anzahl der infiltrierenden myeloiden Immunzellen in der Aorta reduziert, während die Zahl der myeloiden Zellen in der Zirkulation erhöht war. Die Bulk-RNA-Sequenzierung der Aorta beider Genotypen ergab eine verminderte Infiltration von Immunzellen in die Aortenwand. Die EC zeigten im Vergleich der Genotypen keine Unterschiede im Expressionsprofil. Die Ergebnisse des Knochenmarktransfers belegen, dass der Effekt durch die Immunzellen selbst, nicht durch die Stromazellen vermittelt wird. Anschließend ergaben Monozyten aus *Apoe/Has3*-DKO Mäusen eine reduzierte Expression von proinflammatorischen Zytokinen sowie des HA-Rezeptors *Cd44*, der sowohl für die Adhäsion und Migration von Immunzellen in der Aorta als auch an der Migration und Proliferation der SMC verantwortlich ist.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit eine Schlüsselrolle der *Has3*-Defizienz für eine reduzierte Immunzellinfiltration in die Aorta und nachfolgend für ein erniedrigtes Rupturrisiko von Aortenaneurysmen. Die hier erhaltenen murinen Ergebnisse müssen noch an humanen Proben bestätigt werden, um den vielversprechenden Ansatz der pharmakologischen Hemmung von HAS3 zur Behandlung eines AAAs weiter zu verfolgen.

6. Summary

Aortic disease, such as abdominal aortic aneurysm (AAA), is one of the most lethal cardiovascular diseases. The only treatment option for AAA is surgical repair, which is associated with a number of complications. There is neither a symptomatic nor a causal (and therefore approved) pharmacological therapy to slow down or alleviate AAAs. Therefore, the identification of new approaches is of great interest.

Hyaluronan (HA) is not only a filler of the extracellular matrix but also exerts a direct influence on the phenotype of smooth muscle cells (SMCs) and is able to modulate the immune response. In particular, the influence of hyaluronan synthase 3 (HAS3) has been demonstrated in inflammatory diseases such as experimental colitis ulcerosa, neointimal hyperplasia or arteriogenesis. The effect of HAS3 on SMCs or endothelial cells (ECs) was determined. In the present work, *ApoE/Has3*-double deficient mice (*ApoE/Has3*-DKO) as well as *ApoE*-KO were examined for the onset and development of induced AAA. *ApoE/Has3*-DKO mice showed a reduced rate of lethal aortic rupture, which was associated with a reduced number elastic lamellae disruption. Furthermore, the number of myeloid immune cells in the aorta was reduced, whereas the number of myeloid cells in the circulation was increased. Bulk-RNA sequencing of aorta from both genotypes revealed a reduction in immune cells infiltration into the aortic wall. Gene expression in the EC were unaltered in both genotypes. Finally, the results of the bone marrow transfer show that the effect is mediated by the immune cells themselves, not by the stromal cells. Subsequently, monocytes from *ApoE/Has3*-DKO mice showed reduced expression of proinflammatory cytokines and the HA receptor *Cd44*, which is responsible for the adhesion and migration of immune cells in the aorta as well as the migration and proliferation of SMCs.

In conclusion, this study demonstrates a key role for *Has3* deficiency in reducing aortic immune cell accumulation and subsequently in reducing the risk of aortic aneurysm rupture. The murine results obtained here still need to be confirmed in human samples to further pursue the promising approach of pharmacological inhibition of HAS3 for the treatment of AAA.

7. Appendix

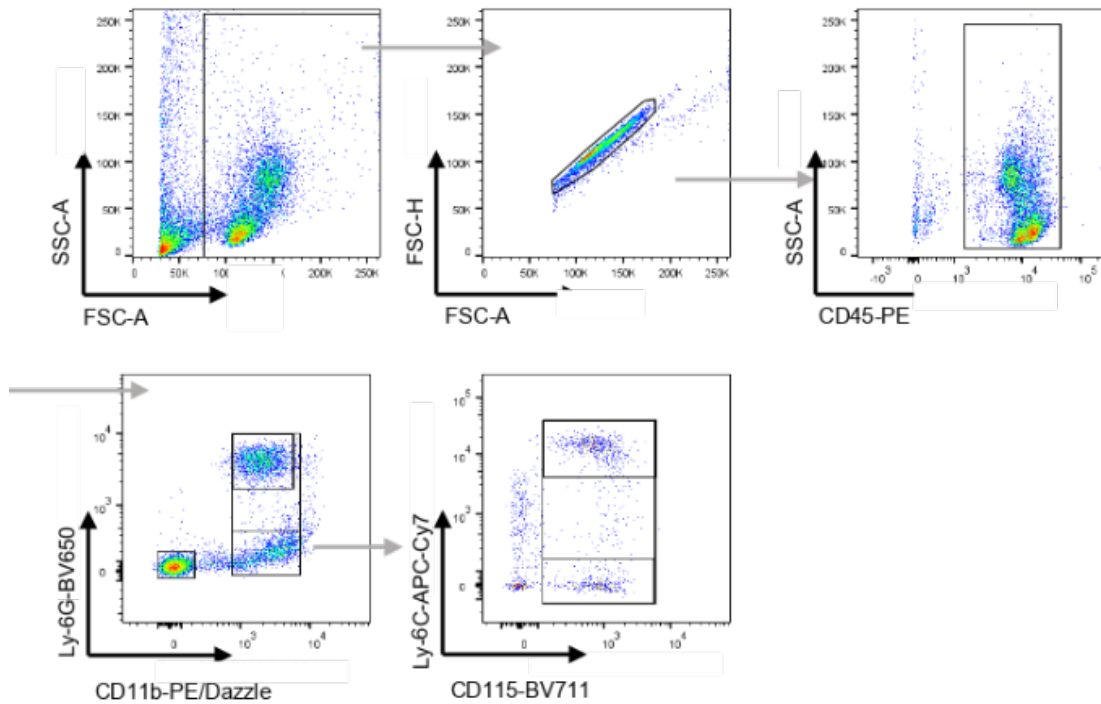


Abbildung 46. Gatingstrategie für die Bestimmung myeloider Immunzellen aus Blut und Milz.

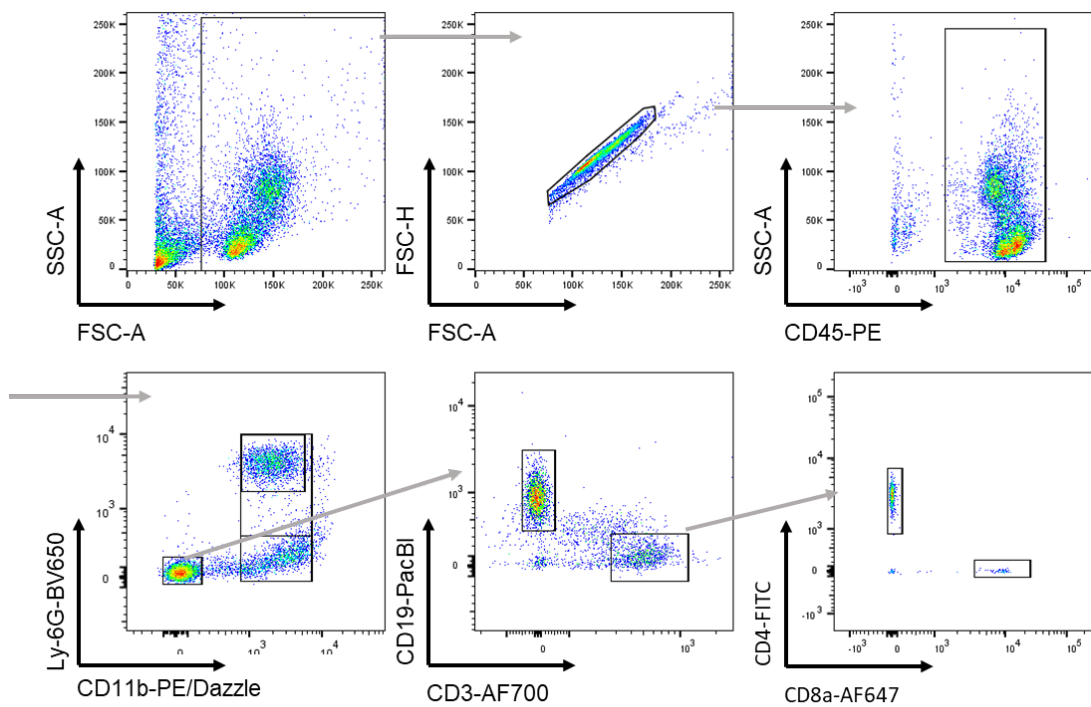


Abbildung 47. Gatingstrategie für die Bestimmung von Lymphozyten aus Blut und Milz.

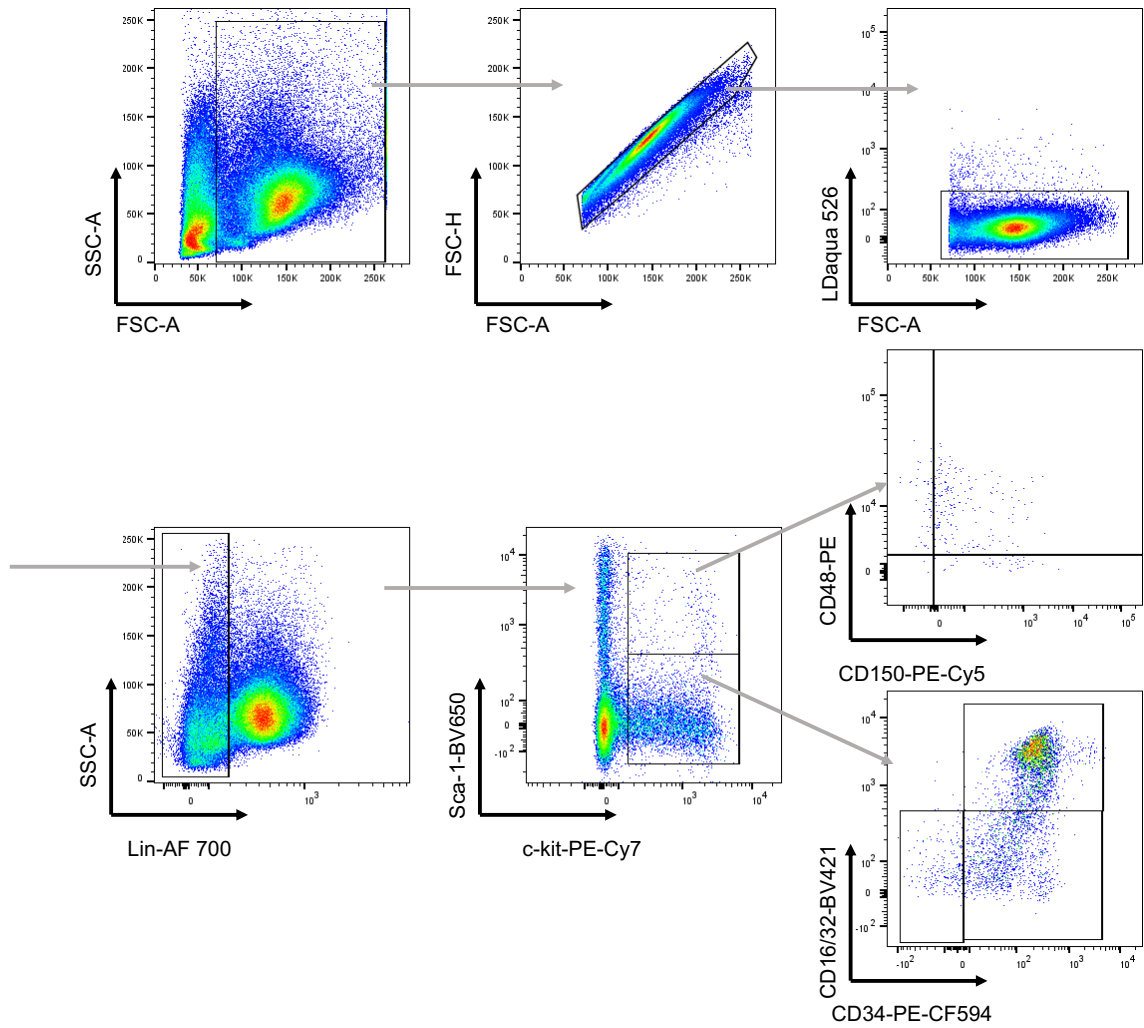


Abbildung 48. Gatingstrategie für die Bestimmung der HSPC im Knochenmark.

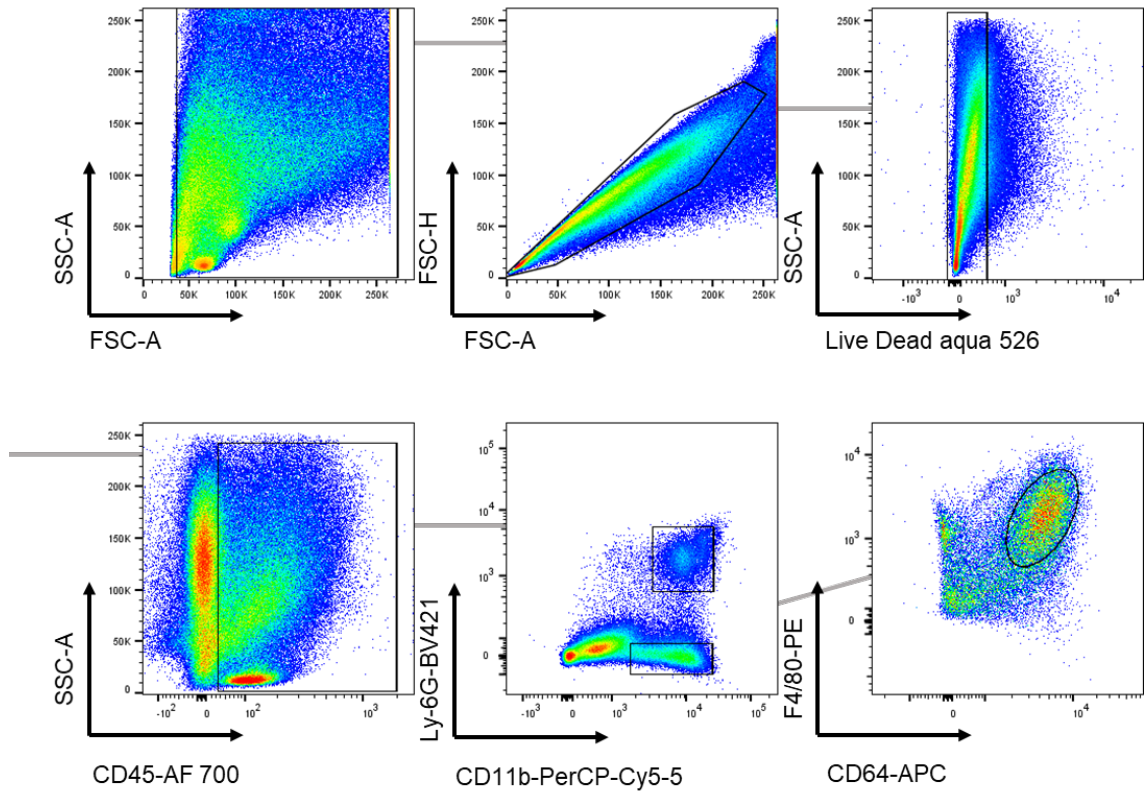


Abbildung 49. Gatingstrategie für die Bestimmung der Immunzellen in der Aorta.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Schematische Illustration einer gesunden Aorta (links), eines abdominalen Aortenaneurysmas (mittig) und einer abdominalen Aortenruptur mit dem Austritt von Blut (rechts).	2
Abbildung 2.	Schematische Darstellung einer Aorta im Querschnitt mit dem pathologischen Zustand einer Aortendissektion.	3
Abbildung 3:	Todesfälle der Arterien, Arteriolen und Kapillaren (2021) in Deutschland.	4
Abbildung 4.	Molekulare Strukturformel von Hyaluronsäure in der Sesselkonformation.	14
Abbildung 5.	Schematische Darstellung der Hyaluronsäuresynthese sowie die Synthese an den Isoenzymen HAS1, 2 und 3.	15
Abbildung 6.	Schematische Darstellung der HAS Translokation zur HA-Synthese als Pendel-Modell.	16
Abbildung 7.	Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Untersuchung von AAA.	25
Abbildung 8.	Schematische Darstellung des Knochenmarkstransfers (KMT) nach Bestrahlung mit anschließender Implantation der Minipumpe.	26
Abbildung 9.	<i>Has3</i> -Defizienz mit erhöhter Inzidenz für AAA aber verringerter Rupturinzidenz nach 28-tägiger AngII-Infusion.	42
Abbildung 10.	<i>Has3</i> -Defizienz führt nach AngII-Infusion zu einer reduzierten Überlebensrate.	43
Abbildung 11.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf Körper- oder Herzgewicht nach AngII-Infusion.	44
Abbildung 12.	<i>Has3</i> -Defizienz führt zu vergrößertem Aortendurchmesser und zu vergrößerter Lumenflächen nach AngII-Infusion.	46
Abbildung 13.	Repräsentative sonographische Aufnahmen zur Bestimmung der Lumenfläche sowie des maximalen Aortendurchmessers im B-Mode nach.	47
Abbildung 14.	<i>Has3</i> -Defizienz führt zu einer reduzierten Anzahl an elastischen Lamellenbrüchen nach AngII-Infusion.	48
Abbildung 15.	<i>Has3</i> -Defizienz mit einer reduzierten Kollagenakkumulation nach AngII-Infusion.	49
Abbildung 16.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf AAA- und Ruptur Inzidenz nach 7-tägiger AngII-Infusion.	51
Abbildung 17.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf Körper- und Herzgewicht nach AngII-Infusion.	52
Abbildung 18.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne strukturelle Veränderung nach 7-tägiger AngII-Infusion.	53
Abbildung 19.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf Herzparameter nach AngII-Infusion.	54
Abbildung 20.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Auswirkung auf den Verlauf des MAP nach AngII-Infusion.	55
Abbildung 21.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf den MAP und die HF nach AngII-Infusion.	55
Abbildung 22.	<i>Has3</i> -Defizienz führt zur reduzierten Anzahl an elastischen Lamellenbrüchen sowie einer verringerten Kollagenakkumulation nach AngII-Infusion.	56
Abbildung 23.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf Körper-, Herz- und Milzgewicht im PPE-Modell.	57
Abbildung 24.	<i>Has3</i> -Defizienz führt zu größeren Aortendurchmesser nach PPE-Behandlung.	58
Abbildung 25.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Veränderung der aortalen Immunzellen im PPE-Modell.	59
Abbildung 26.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf zirkulierende Leukozyten im PPE-Modell.	60
Abbildung 27.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf zirkulierende lymphoide Immunzellen im PPE-Modell.	60
Abbildung 28.	<i>Has3</i> -Defizienz mit erniedrigten Ccl3 Plasmaspiegel nach AngII-Infusion.	61
Abbildung 29.	<i>Has3</i> -Defizienz mit reduzierten Il12 (p40), aber erhöhten Il17A Plasmaspiegel nach AngII-Infusion.	62
Abbildung 30.	<i>Has3</i> -Defizienz mit Anstieg der zirkulierenden myeloiden Leukozyten und Monozyten nach AngII-Infusion.	63
Abbildung 31.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Einfluss auf zirkulierende lymphoide Populationen nach AngII-Infusion.	63
Abbildung 32.	<i>Has3</i> -Defizienz ohne Veränderung der HSVZ nach AngII-Infusion.	64
Abbildung 33.	<i>Has3</i> -Defizienz führt zur gesteigerten Leukozytenanzahl in der Milz nach AngII-Infusion, aber ohne die myeloiden Leukozytenpopulationen zu regulieren.	65

Abbildung 34. <i>Has3</i> -Defizienz führt zur reduzierten Anzahl an lymphoiden Immunzellen in der Milz nach AngII-Infusion.....	66
Abbildung 35. <i>Has3</i> -Defizienz führt zur reduzierten Ansammlung von myeloiden Leukozyten und Makrophagen nach AngII-Infusion.	67
Abbildung 36. Kanonische Wege der Bulk-Sequenzierung der abdominalen Aorta nach AngII-Infusion.....	68
Abbildung 37. Volcano-Plot und Heatmap aller herunter- und hochregulierten aortalen Gene nach AngII-Infusion.	69
Abbildung 38. Die sieben am höchsten regulierten Gene der RNA-Bulk-Sequenzierung.	70
Abbildung 39. Im Fokus steht die Inflammation in der grafischen Zusammenfassung aller beteiligten Netzwerke der RNA-Bulk-Sequenzierung.	72
Abbildung 40. <i>Has3</i> -Defizienz führt zur erhöhten <i>Mmp9</i> -Expression in der Aorta nach AngII. .	74
Abbildung 41. <i>Has3</i> -Defizienz führt zur erhöhten Expression von <i>Vcam1</i> , <i>Mmp9</i> sowie <i>Col1a1</i> in der Aorta nach AngII.	75
Abbildung 42. <i>Has3</i> -Expression in Monozyten führt zur Hochregulation der Immunzellinfiltration.	76
Abbildung 43. Keine Veränderung der Leukozyten sowie myeloiden Leukozytenpopulationen in der Zirkulation nach KMT und AngII-Infusion.....	77
Abbildung 44. Keine Veränderung der Lymphozyten nach KMT und AngII-Infusion.	78
Abbildung 45. Reduktion der aortalen Makrophagenanzahl in der <i>Apoe/Has3</i> -DKO Kontrollgruppe und ein Trend zur gesteigerten Makrophagenanzahl nach KMT von <i>Apoe</i> -KO in <i>Apoe/Has3</i> -DKO.	79
Abbildung 46. Gatingstrategie für die Bestimmung myeloider Immunzellen aus Blut und Milz.	100
Abbildung 47. Gatingstrategie für die Bestimmung von Lymphozyten aus Blut und Milz.	100
Abbildung 48. Gatingstrategie für die Bestimmung der HSPC im Knochenmark.	101
Abbildung 49. Gatingstrategie für die Bestimmung der Immunzellen in der Aorta.	102

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Zusammensetzung der WD.	24
Tabelle 2.	Beschreibung der verschiedenen Immunzellen aus Blut und Aorta mithilfe der verwendeten Antikörper beim FACS.....	32
Tabelle 3.	Verwendete Lösungsmittel für die durchflusszytometrischen Untersuchungen..	33
Tabelle 4.	Verwendete Antikörper zur Identifizierung von Leukozyten, Lymphozyten und hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen für die durchflusszytometrische Untersuchung.....	34
Tabelle 5.	Verwendete Lösungsmittel für die in-vitro Monozytenexperimente.	37
Tabelle 6.	Zusammensetzung der für die qPCR benötigten Substanzen.....	38
Tabelle 7.	Verwendete murine Gene mit dem Gensymbol, den forward und reverse Primersequenzen in der qPCR.	39
Tabelle 8.	Vorgeschaltete Regulatoren, kausales Netzwerk sowie Krankheiten und Störungen identifiziert in Aorten von <i>ApoE</i> -KO sowie <i>ApoE/Has3</i> -DKO Mäusen nach AngII-Infusion. Es wurden jeweils fünf mit den niedrigsten <i>p</i> -Werten bzw. <i>p</i> -Wertbereiche ausgewählt. Die vorhergesagte Aktivierung wurde für jeden vorgeschalteten Regulator (A.) bzw. für jedes kausale Netzwerk (B.) bestimmt. Die Gesamtzahl aller involvierten Moleküle wurde für die Krankheiten und Störungen (C.) aufgetragen. Die Daten wurden in IPA (Qiagen®) analysiert.....	71

10. Literatur

1. Michallek, R. & Michallek, F. Gefäßmedizin in der ägyptischen Antike. *Gefäßchirurgie* **22**, 195–204 (2017).
2. Larena-Avellaneda, A. & von Campenhausen, J. Geschichtliche Entwicklung der arteriellen Gefäßchirurgie. in *Operative und interventionelle Gefäßmedizin* (eds. Debus, E. S. & Gross-Fengels, W.) 1–9 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2016). doi:10.1007/978-3-662-45856-3_2-1.
3. Czerny, M. *et al.* EACTS/STS Guidelines for Diagnosing and Treating Acute and Chronic Syndromes of the Aortic Organ. *Ann. Thorac. Surg.* S0003497524000778 (2024) doi:10.1016/j.athoracsur.2024.01.021.
4. Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=2&levelid=1679576850484&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0001&auswahltext=&werteabruf=Werteabruf#abreadcrumb> (2023).
5. Song, P. *et al.* The Global and Regional Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review and Modeling Analysis. *Ann. Surg.* **277**, 912–919 (2023).
6. Gao, J. *et al.* The mechanism and therapy of aortic aneurysms. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, 1–20 (2023).
7. Sandiford, P. *et al.* The population prevalence of undetected abdominal aortic aneurysm in New Zealand Māori. *J. Vasc. Surg.* **71**, 1215–1221 (2020).
8. Reimerink, J. J., van der Laan, M. J., Koelemay, M. J., Balm, R. & Legemate, D. A. Systematic review and meta-analysis of population-based mortality from ruptured abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **100**, 1405–1413 (2013).
9. Gesundheit. Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland. 2021. *Gesundh. Ergeb. Todesursachenstatistik Für Dtschl. Ausführliche 4-Stellige ICD-Klassif.* (2022).
10. Sampson, U. K. A. *et al.* Estimation of Global and Regional Incidence and Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysms 1990 to 2010. *Glob. Heart* **9**, 159–170 (2014).
11. Carter, J. L. *et al.* Sex-Specific Associations of Vascular Risk Factors With Abdominal Aortic Aneurysm: Findings From 1.5 Million Women and 0.8 Million Men in the United States and United Kingdom. *J. Am. Heart Assoc.* **9**, e014748 (2020).
12. Svensjö, S., Björck, M. & Wanhainen, A. Current prevalence of abdominal aortic aneurysm in 70-year-old women. *Br. J. Surg.* **100**, 367–372 (2013).
13. Sex differences in abdominal aortic aneurysms | American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00519.2017>.
14. Sakalihan, N. *et al.* Family Members of Patients with Abdominal Aortic Aneurysms Are at Increased Risk for Aneurysms: Analysis of 618 Proband and Their Families from the Liège AAA Family Study. *Ann. Vasc. Surg.* **28**, 787–797 (2014).

15. Joergensen, T. M. M. *et al.* Editor's Choice – High Heritability of Liability to Abdominal Aortic Aneurysms: A Population Based Twin Study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **52**, 41–46 (2016).
16. Mangum, K. D. & Farber, M. A. Genetic and epigenetic regulation of abdominal aortic aneurysms. *Clin. Genet.* **97**, 815–826 (2020).
17. Zalewski, D. P. *et al.* Dysregulation of microRNA Modulatory Network in Abdominal Aortic Aneurysm. *J. Clin. Med.* **9**, 1974 (2020).
18. Wu, Z., Trenner, M., Boon, R. A., Spin, J. M. & Maegdefessel, L. Long noncoding RNAs in key cellular processes involved in aortic aneurysms. *Atherosclerosis* **292**, 112–118 (2020).
19. Lederle, F. A. *et al.* The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch. Intern. Med.* **160**, 1425–1430 (2000).
20. Kent, K. C. *et al.* Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J. Vasc. Surg.* **52**, 539–548 (2010).
21. Sex-Specific Associations of Vascular Risk Factors With Abdominal Aortic Aneurysm: Findings From 1.5 Million Women and 0.8 Million Men in the United States and United Kingdom. <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/JAHA.119.014748>
doi:10.1161/JAHA.119.014748.
22. Lederle, F. A., Nelson, D. B. & Joseph, A. M. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review. *J. Vasc. Surg.* **38**, 329–334 (2003).
23. Oliver-Williams, C. *et al.* Lessons learned about prevalence and growth rates of abdominal aortic aneurysms from a 25-year ultrasound population screening programme. *Br. J. Surg.* **105**, 68–74 (2018).
24. Iribarren, C. *et al.* Traditional and Novel Risk Factors for Clinically Diagnosed Abdominal Aortic Aneurysm: The Kaiser Multiphasic Health Checkup Cohort Study. *Ann. Epidemiol.* **17**, 669–678 (2007).
25. Sidloff, D. *et al.* Aneurysm Global Epidemiology Study. *Circulation* **129**, 747–753 (2014).
26. Meta-Analysis of Abdominal Aortic Aneurysm in Patients With Coronary Artery Disease - American Journal of Cardiology. [https://www.ajconline.org/article/S0002-9149\(15\)01779-8/fulltext](https://www.ajconline.org/article/S0002-9149(15)01779-8/fulltext).
27. Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195–4200 (2010).
28. Quintana, R. A. & Taylor, W. R. Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ. Res.* **124**, 607–618 (2019).
29. Toghiani, B. J., Saratzis, A. & Bown, M. J. Abdominal aortic aneurysm—an independent disease to atherosclerosis? *Cardiovasc. Pathol.* **27**, 71–75 (2017).
30. Gianfagna, F. *et al.* Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysms in the General Population and in Subgroups at High Cardiovascular Risk in Italy. Results of the RoCAV Population Based Study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **55**, 633–639 (2018).

31. Bahia, S. S. *et al.* Cardiovascular risk prevention and all-cause mortality in primary care patients with an abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **103**, 1626–1633 (2016).
32. Abdominal Aortic Aneurysm Expansion | Circulation. https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000133279.07468.9F?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed#d1e1145.
33. Takagi, H. & Umemoto, T. Association of Hypertension with Abdominal Aortic Aneurysm Expansion. *Ann. Vasc. Surg.* **39**, 74–89 (2017).
34. Bhak, R. H. *et al.* Factors associated with small abdominal aortic aneurysm expansion rate. *JAMA Surg.* **150**, 44–50 (2015).
35. Li, R., Zhang, C., Du, X. & Chen, S. Genetic Association between the Levels of Plasma Lipids and the Risk of Aortic Aneurysm and Aortic Dissection: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. *J. Clin. Med.* **12**, 1991 (2023).
36. Takagi, H., Manabe, H., Kawai, N., Goto, S.-N. & Umemoto, T. Serum high-density and low-density lipoprotein cholesterol is associated with abdominal aortic aneurysm presence: a systematic review and meta-analysis. *Int. Angiol. J. Int. Union Angiol.* **29**, 371–375 (2010).
37. Stather, P. W. *et al.* Meta-analysis and meta-regression analysis of biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **101**, 1358–1372 (2014).
38. Xiong, J., Wu, Z., Chen, C., Wei, Y. & Guo, W. Association between diabetes and prevalence and growth rate of abdominal aortic aneurysms: A meta-analysis. *Int. J. Cardiol.* **221**, 484–495 (2016).
39. Takagi, H. & Umemoto, T. Diabetes and Abdominal Aortic Aneurysm Growth. *Angiology* **67**, 513–525 (2016).
40. Negative association of diabetes with rupture of abdominal aortic aneurysm. <https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/1479164116651389>
doi:10.1177/1479164116651389.
41. Rango, P. D., Farchioni, L., Fiorucci, B. & Lenti, M. Diabetes and Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **47**, 243–261 (2014).
42. Golledge, J. *et al.* Association between metformin prescription and growth rates of abdominal aortic aneurysms. *Br. J. Surg.* **104**, 1486–1493 (2017).
43. Xu, B. *et al.* Mechanisms and efficacy of metformin-mediated suppression of established experimental abdominal aortic aneurysms. *JVS-Vasc. Sci.* **4**, 100102 (2023).
44. Yao, L. *et al.* Association of carotid atherosclerosis and stiffness with abdominal aortic aneurysm: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* **270**, 110–116 (2018).
45. Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 1605–1612 (2000).
46. Golledge, J. & Norman, P. Atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm: Cause, response or common risk factors? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1075–1077 (2010).

47. Key Points From the 2019 ACC/AHA Guidelines on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *American College of Cardiology* <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2019/04/29/07/42/http%3a%2f%2fwww.acc.org%2flatest-in-cardiology%2farticles%2f2019%2f04%2f29%2f07%2f42%2fkey-points-from-the-2019-acc-aha-guidelines-on-the-primary-prevention-of-cvd>.
48. Tsao, C. W. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **147**, e93–e621 (2023).
49. Ference, B. A. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **38**, 2459–2472 (2017).
50. van der Valk, F. M. *et al.* Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans. *Circulation* **134**, 611–624 (2016).
51. Gimbrone, M. A. & García-Cardeña, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**, 620–636 (2016).
52. Libby, P. & Hansson, G. K. Inflammation and Immunity in Diseases of the Arterial Tree: Players and Layers. *Circ. Res.* **116**, 307–311 (2015).
53. Nus, M. & Mallat, Z. Immune-mediated mechanisms of atherosclerosis and implications for the clinic. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **12**, 1217–1237 (2016).
54. Mineo, C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **116**, 1254–1274 (2020).
55. Zani, I. A. *et al.* Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells* **4**, 178–201 (2015).
56. Chattopadhyay, A. *et al.* Cholesterol-Induced Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells to Macrophage/Fibroblast-like Cells Is Driven by an Unfolded Protein Response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **41**, 302–316 (2021).
57. Furie, M. B. & Mitchell, R. N. Plaque Attack: One Hundred Years of Atherosclerosis in The American Journal of Pathology. *Am. J. Pathol.* **180**, 2184–2187 (2012).
58. Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. & Schwartz, S. M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1262–1275 (2000).
59. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463–516 (2001).
60. Cho, M. J., Lee, M.-R. & Park, J.-G. Aortic aneurysms: current pathogenesis and therapeutic targets. *Exp. Mol. Med.* **55**, 2519–2530 (2023).
61. Johnsen, S. H., Forsdahl, S. H., Singh, K. & Jacobsen, B. K. Atherosclerosis in Abdominal Aortic Aneurysms: A Causal Event or a Process Running in Parallel? The Tromsø Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1263–1268 (2010).

62. Saraff, K., Babamusta, F., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1621–1626 (2003).
63. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 13–40 (2012).
64. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **75**, 487–517 (1995).
65. Chen, R., McVey, D. G., Shen, D., Huang, X. & Ye, S. Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* **12**, e031121 (2023).
66. Gadue, P., Huber, T. L., Paddison, P. J. & Keller, G. M. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16806–16811 (2006).
67. Doyle, A. J. *et al.* Differential expression of Hedgehog/Notch and transforming growth factor- β in human abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **62**, 464–470 (2015).
68. Yamanouchi, D. *et al.* Accelerated Aneurysmal Dilation Associated with Apoptosis and Inflammation in a Newly Developed Calcium Phosphate Rodent Abdominal Aortic Aneurysm Model. *J. Vasc. Surg. Off. Publ. Soc. Vasc. Surg. Int. Soc. Cardiovasc. Surg. North Am. Chapter* **56**, 455–461 (2012).
69. Jana, S., Hu, M., Shen, M. & Kassiri, Z. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–15 (2019).
70. Ruiz-Rodríguez, M. J. *et al.* Versican accumulation drives Nos2 induction and aortic disease in Marfan syndrome via Akt activation. *EMBO Mol. Med.* **16**, 132–157 (2024).
71. Garantziotis, S. & Savani, R. C. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **78–79**, 1–10 (2019).
72. Nagy, N. *et al.* Hyaluronan in immune dysregulation and autoimmune diseases. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **78–79**, 292–313 (2019).
73. Parnigoni, A. *et al.* Hyaluronan in pathophysiology of vascular diseases: specific roles in smooth muscle cells, endothelial cells, and macrophages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **323**, C505–C519 (2022).
74. Atkinson, G., Bianco, R., Di Gregoli, K. & Johnson, J. L. The contribution of matrix metalloproteinases and their inhibitors to the development, progression, and rupture of abdominal aortic aneurysms. *Front. Cardiovasc. Med.* **10**, 1248561 (2023).
75. Rombouts, K. B. *et al.* The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections. *Eur. J. Clin. Invest.* **52**, e13697 (2022).
76. Gurung, R., Choong, A. M., Woo, C. C., Foo, R. & Sorokin, V. Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation in Abdominal Aortic Aneurysm. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6334 (2020).
77. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8691515/>.

78. Shen, M. *et al.* Divergent Roles of Matrix Metalloproteinase 2 in Pathogenesis of Thoracic Aortic Aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 888–898 (2015).
79. Howatt, D. A. *et al.* Relaxin and Matrix Metalloproteinase-9 in Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **81**, 888–890 (2017).
80. DeRoo, E. *et al.* Endothelial Dysfunction in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm. *Biomolecules* **12**, 509 (2022).
81. Hoefler, I. E., den Adel, B. & Daemen, M. J. A. P. Biomechanical factors as triggers of vascular growth. *Cardiovasc. Res.* **99**, 276–283 (2013).
82. Platt, M. O. & Shockey, W. A. Endothelial cells and cathepsins: biochemical and biomechanical regulation. *Biochimie* **122**, 314–323 (2016).
83. Sunderland, K., Jiang, J. & Zhao, F. Disturbed flow's impact on cellular changes indicative of vascular aneurysm initiation, expansion, and rupture: A pathological and methodological review. *J. Cell. Physiol.* **237**, 278–300 (2022).
84. Brückner, A. *et al.* Site-specific genetic and functional signatures of aortic endothelial cells at aneurysm predilection sites in healthy and AngII ApoE^{-/-} mice. *Angiogenesis* (2024) doi:10.1007/s10456-024-09933-9.
85. Ocana, E., Bohórquez, J.-C., Pérez-Requena, J., Brieva, J. A. & Rodríguez, C. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* **170**, 39–48 (2003).
86. Dale, M. A., Ruhlman, M. K. & Baxter, B. T. Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1746–1755 (2015).
87. Rosales, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* **9**, 113 (2018).
88. Mellak, S. *et al.* Angiotensin II Mobilizes Spleen Monocytes to Promote the Development of Abdominal Aortic Aneurysm in ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 378–388 (2015).
89. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 750–761 (2011).
90. Gao, J., Liang, Y. & Wang, L. Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, 888713 (2022).
91. Raffort, J. *et al.* Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 457–471 (2017).
92. MA3RS Study Investigators. Aortic Wall Inflammation Predicts Abdominal Aortic Aneurysm Expansion, Rupture, and Need for Surgical Repair. *Circulation* **136**, 787–797 (2017).
93. Ashida, S. *et al.* Administration of anti-inflammatory M2 macrophages suppresses progression of angiotensin II-induced aortic aneurysm in mice. *Sci. Rep.* **13**, 1380 (2023).
94. Harkness, M. L., Harkness, R. D. & McDONALD, D. A. The collagen and elastin content of the arterial wall. *J. Physiol.* **127**, 33-34P (1955).

95. Robert, L., Jacob, M. P. & Fülöp, T. Elastin in blood vessels. *Ciba Found. Symp.* **192**, 286–299; discussion 299–303 (1995).
96. NOBLE, P. W., LIANG, J. & JIANG, D. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiol. Rev.* **91**, 221–264 (2011).
97. Grandoch, M., Bollyky, P. L. & Fischer, J. W. Hyaluronan. *Circ. Res.* **122**, 1341–1343 (2018).
98. Hascall, V. & Esko, J. D. Hyaluronan. in *Essentials of Glycobiology* (eds. Varki, A. et al.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2015).
99. Jouon, N., Rinaudo, M., Milas, M. & Desbrières, J. Hydration of hyaluronic acid as a function of the counterion type and relative humidity. *Carbohydr. Polym.* **26**, 69–73 (1995).
100. Fraser, J. R., Laurent, T. C. & Laurent, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242**, 27–33 (1997).
101. Weigel, P. H. & DeAngelis, P. L. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **282**, 36777–36781 (2007).
102. Weigel, P. H. Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior. *Int. J. Cell Biol.* **2015**, 367579 (2015).
103. Itano, N. & Kimata, K. Mammalian Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life* **54**, 195–199 (2002).
104. Itano, N. *et al.* Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties *. *J. Biol. Chem.* **274**, 25085–25092 (1999).
105. Spicer, A. P. *et al.* Chromosomal Localization of the Human and Mouse Hyaluronan Synthase Genes. *Genomics* **41**, 493–497 (1997).
106. Fischer, J. W. Role of hyaluronan in atherosclerosis: Current knowledge and open questions. *Matrix Biol.* **78–79**, 324–336 (2019).
107. Liang, J., Jiang, D. & Noble, P. W. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 186–203 (2016).
108. Arranz, A. M. *et al.* Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34**, 6164–6176 (2014).
109. Heldin, P., Lin, C.-Y., Koliopoulos, C., Chen, Y.-H. & Skandalis, S. S. Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biol.* **78–79**, 100–117 (2019).
110. Hundhausen, C. *et al.* Endothelial hyaluronan synthase 3 aggravates acute colitis in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Matrix Biol.* **102**, 20–36 (2021).
111. Kiene, L. S. *et al.* Deletion of hyaluronan synthase 3 inhibits neointimal hyperplasia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, e9–16 (2016).
112. Homann, S. *et al.* Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprotection. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **66**, 67–80 (2018).

113. Schneckmann, R. *et al.* Endothelial Hyaluronan Synthase 3 Augments Postischemic Arteriogenesis Through CD44/eNOS Signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **41**, 2551–2562 (2021).
114. Piroth, M. *et al.* Hyaluronan synthase 3 is protective after cardiac ischemia-reperfusion by preserving the T cell response. *Matrix Biol.* **112**, 116–131 (2022).
115. Spataro, S. *et al.* CEMIP (HYBID, KIAA1199): structure, function and expression in health and disease. *FEBS J.* **290**, 3946–3962 (2023).
116. Csoka, A. B., Frost, G. I. & Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **20**, 499–508 (2001).
117. Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 317–325 (2004).
118. Jadin, L. *et al.* Skeletal and hematological anomalies in HYAL2-deficient mice: a second type of mucopolysaccharidosis IX? *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 4316–4326 (2008).
119. Hofinger, E. S. A., Hoechstetter, J., Oettl, M., Bernhardt, G. & Buschauer, A. Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases. *Glycoconj. J.* **25**, 101–109 (2008).
120. Kobayashi, T., Chanmee, T. & Itano, N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules* **10**, 1525 (2020).
121. Picker, L. J., Nakache, M. & Butcher, E. C. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J. Cell Biol.* **109**, 927–937 (1989).
122. Idzerda, R. L. *et al.* Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 4659–4663 (1989).
123. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 33–45 (2003).
124. Thorne, R. F., Legg, J. W. & Isacke, C. M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J. Cell Sci.* **117**, 373–380 (2004).
125. Hatipoglu, O. F. *et al.* Deficiency of CD44 prevents thoracic aortic dissection in a murine model. *Sci. Rep.* **10**, 6869 (2020).
126. Misra, S., Hascall, V. C., Markwald, R. R. & Ghatak, S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* **6**, 201 (2015).
127. Jackson, D. G. Hyaluronan in the lymphatics: The key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **78–79**, 219–235 (2019).
128. Karamanos, N. K. *et al.* Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chem. Rev.* **118**, 9152–9232 (2018).

129. Day, A. J. & de la Motte, C. A. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.* **26**, 637–643 (2005).
130. Caravà, E. *et al.* HA and HS Changes in Endothelial Inflammatory Activation. *Biomolecules* **11**, 809 (2021).
131. Dogné, S. & Flamion, B. Endothelial Glycocalyx Impairment in Disease: Focus on Hyaluronan Shedding. *Am. J. Pathol.* **190**, 768–780 (2020).
132. Lévesque, H. *et al.* Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis* **105**, 51–62 (1994).
133. Gisterå, A. & Hansson, G. K. The immunology of atherosclerosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 368–380 (2017).
134. Cuff, C. A. *et al.* The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J. Clin. Invest.* **108**, 1031–1040 (2001).
135. Campo, G. M. *et al.* Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes. *Biochimie* **92**, 204–215 (2010).
136. Jiang, D. *et al.* Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat. Med.* **11**, 1173–1179 (2005).
137. Romo, M. *et al.* Small fragments of hyaluronan are increased in individuals with obesity and contribute to low-grade inflammation through TLR-mediated activation of innate immune cells. *Int. J. Obes.* **46**, 1960–1969 (2022).
138. Kessler, S. P., Obery, D. R. & de la Motte, C. Hyaluronan Synthase 3 Null Mice Exhibit Decreased Intestinal Inflammation and Tissue Damage in the DSS-Induced Colitis Model. *Int. J. Cell Biol.* **2015**, 745237 (2015).
139. Grandoch, M. *et al.* Novel effects of adenosine receptors on pericellular hyaluronan matrix: implications for human smooth muscle cell phenotype and interactions with monocytes during atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.* **108**, 340 (2013).
140. Humphrey, J. D. Possible Mechanical Roles of Glycosaminoglycans in Thoracic Aortic Dissection and Associations with Dysregulated TGF- β . *J. Vasc. Res.* **50**, 1–10 (2013).
141. Nataatmadja, M., West, J. & West, M. Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation* **114**, 1371–377 (2006).
142. Biros, E. *et al.* Differential gene expression in the proximal neck of human abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* **233**, 211–218 (2014).
143. Liu, Y., Wang, X., Wang, H. & Hu, T. Identification of key genes and pathways in abdominal aortic aneurysm by integrated bioinformatics analysis. *J. Int. Med. Res.* **48**, 0300060519894437 (2019).
144. Mohamadzadeh, M., DeGrendele, H., Arizpe, H., Estess, P. & Siegelman, M. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J. Clin. Invest.* **101**, 97–108 (1998).

145. Trachet, B. *et al.* Angiotensin II infusion into ApoE^{-/-} mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm? *Cardiovasc. Res.* **113**, 1230–1242 (2017).
146. Pyo, R. *et al.* Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **105**, 1641–1649 (2000).
147. Azuma, J., Asagami, T., Dalman, R. & Tsao, P. S. Creation of murine experimental abdominal aortic aneurysms with elastase. *J. Vis. Exp. JoVE* 1280 (2009) doi:10.3791/1280.
148. Phillips, E. H. *et al.* Morphological and Biomechanical Differences in the Elastase and AngII apoE^{-/-} Rodent Models of Abdominal Aortic Aneurysms. *BioMed Res. Int.* **2015**, 413189 (2015).
149. Borgbjerg, J. *et al.* Superior Reproducibility of the Leading to Leading Edge and Inner to Inner Edge Methods in the Ultrasound Assessment of Maximum Abdominal Aortic Diameter. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **55**, 206–213 (2018).
150. Freund, I., Deutsch, M. & Sprecher, A. Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophys. J.* **50**, 693–712 (1986).
151. Williams, R. M., Zipfel, W. R. & Webb, W. W. Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophys. J.* **88**, 1377–1386 (2005).
152. Angiotensin II Activates Nuclear Transcription Factor κ B Through AT1 and AT2 in Vascular Smooth Muscle Cells | Circulation Research. <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.RES.86.12.1266>.
153. Ifi208 (interferon activated gene 208) - Rat Genome Database. <https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=2311273>.
154. Ahuja, S. K. & Murphy, P. M. The CXC Chemokines Growth-regulated Oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , Neutrophil-activating Peptide-2, and Epithelial Cell-derived Neutrophil-activating Peptide-78 Are Potent Agonists for the Type B, but Not the Type A, Human Interleukin-8 Receptor *. *J. Biol. Chem.* **271**, 20545–20550 (1996).
155. Sans, M. *et al.* VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* **116**, 874–883 (1999).
156. Newman, K. M., Jean-Claude, J., Li, H., Ramey, W. G. & Tilson, M. D. Cytokines that activate proteolysis are increased in abdominal aortic aneurysms. *Circulation* **90**, 11224–227 (1994).
157. Henderson, E. L. *et al.* Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* **99**, 96–104 (1999).
158. Sakalihan, N., Heyeres, A., Nusgens, B. V., Limet, R. & Lapière, C. M. Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *Eur. J. Vasc. Surg.* **7**, 633–637 (1993).

159. Wortmann, M. *et al.* Inflammasomes in the Pathophysiology of Aortic Disease. *Cells* **10**, 2433 (2021).
160. Sawada, H., Lu, H. S., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Twenty Years of Studying AngII (Angiotensin II)-Induced Abdominal Aortic Pathologies in Mice: Continuing Questions and Challenges to Provide Insight Into the Human Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **42**, 277–288 (2022).
161. Liu, J. *et al.* Associations of ApoAI and ApoB-containing Lipoproteins with AngII-induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1826–1834 (2015).
162. Amin, H. Z. *et al.* CTLA-4 Protects against Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice. *Sci. Rep.* **9**, 8065 (2019).
163. Golledge, J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 225–242 (2019).
164. Ma, X. *et al.* Loss of the Hyaluronan Receptor RHAMM Prevents Constrictive Artery Wall Remodeling. *J. Vasc. Surg.* **59**, 804–813 (2014).
165. Papakonstantinou, E. *et al.* The differential distribution of hyaluronic acid in the layers of human atheromatic aortas is associated with vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Atherosclerosis* **138**, 79–89 (1998).
166. Rabia, B., Thanigaimani, S. & Golledge, J. The potential involvement of glycocalyx disruption in abdominal aortic aneurysm pathogenesis. *Cardiovasc. Pathol.* **70**, 107629 (2024).
167. Dragovich, M. A. *et al.* Mechanotransduction of the endothelial glycocalyx mediates nitric oxide production through activation of TRP channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **311**, C846–C853 (2016).
168. Kumagai, R., Lu, X. & Kassab, G. S. Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 600–607 (2009).
169. Golledge, J., Thanigaimani, S., Powell, J. T. & Tsao, P. S. Pathogenesis and management of abdominal aortic aneurysm. *Eur. Heart J.* **44**, 2682–2697 (2023).
170. Viola, M. *et al.* Oxidized low density lipoprotein (LDL) affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 29595–29603 (2013).
171. Domagała, D. *et al.* Cellular, Molecular and Clinical Aspects of Aortic Aneurysm—Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* **13**, 274 (2024).
172. Tanios, F. *et al.* Interaction of Biomechanics with Extracellular Matrix Components in Abdominal Aortic Aneurysm Wall. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **50**, 167–174 (2015).
173. Wang, X. *et al.* Increased Collagen Deposition and Elevated Expression of Connective Tissue Growth Factor in Human Thoracic Aortic Dissection. *Circulation* **114**, I200–I205 (2006).
174. Carmo, M. *et al.* Alteration of elastin, collagen and their cross-links in abdominal aortic aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **23**, 543–549 (2002).

175. Cikach, F. S. *et al.* Massive aggrecan and versican accumulation in thoracic aortic aneurysm and dissection. *JCI Insight* **3**, e97167, 97167 (2018).
176. Bappoo, N. *et al.* Low Shear Stress at Baseline Predicts Expansion and Aneurysm-Related Events in Patients With Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **14**, 1112–1121 (2021).
177. Petz, A. *et al.* Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury. *Circ. Res.* **124**, 1433–1447 (2019).
178. Cao, R. Y., Amand, T., Ford, M. D., Piomelli, U. & Funk, C. D. The Murine Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Model: Rupture Risk and Inflammatory Progression Patterns. *Front. Pharmacol.* **1**, 9 (2010).
179. Nagy, N. *et al.* Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. *Circulation* **122**, 2313–2322 (2010).
180. Schieffer, B. *et al.* Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* **101**, 1372–1378 (2000).
181. Brasier, A. R., Recinos, A. & Eledrisi, M. S. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1257–1266 (2002).
182. Mateo, T. *et al.* Angiotensin II-Induced Mononuclear Leukocyte Interactions with Arteriolar and Venular Endothelium Are Mediated by the Release of Different CC Chemokines1. *J. Immunol.* **176**, 5577–5586 (2006).
183. Nabah, Y. N. A. *et al.* CXCR2 Blockade Impairs Angiotensin II-Induced CC Chemokine Synthesis and Mononuclear Leukocyte Infiltration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2370–2376 (2007).
184. Yin, L., Kent, E. W. & Wang, B. Progress in murine models of ruptured abdominal aortic aneurysm. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 950018 (2022).
185. Johnson, P. & Ruffell, B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **8**, 208–220 (2009).
186. Dong, Y. *et al.* The survival of fetal and bone marrow monocyte-derived alveolar macrophages is promoted by CD44 and its interaction with hyaluronan. *Mucosal Immunol.* **11**, 601–614 (2018).
187. Sharma, N. *et al.* Deficiency of IL12p40 (Interleukin 12 p40) Promotes Ang II (Angiotensin II)-Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 212–223 (2019).
188. Chen, S. *et al.* Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, 1–35 (2023).
189. Jedynek, M. *et al.* [Serum concentration of interleukin-12 (IL-12) in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair--preliminary report]. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **112**, 1173–1179 (2004).

190. Puchenkova, O. A. *et al.* Cytokines in Abdominal Aortic Aneurysm: Master Regulators With Clinical Application. *Biomark. Insights* **17**, 11772719221095676 (2022).
191. Madhur, M. S. *et al.* Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1565–1572 (2011).
192. Smith, E. *et al.* Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **121**, 1746–1755 (2010).
193. Gatsiou, A., Sopova, K., Tselepis, A. & Stellos, K. Interleukin-17A Triggers the Release of Platelet-Derived Factors Driving Vascular Endothelial Cells toward a Pro-Angiogenic State. *Cells* **10**, 1855 (2021).
194. Mukaida, N. & Baba, T. Chemokines in tumor development and progression. *Exp. Cell Res.* **318**, 95–102 (2012).
195. McKee, C. M. *et al.* Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.* **98**, 2403–2413 (1996).
196. Paige, E. *et al.* Interleukin-6 Receptor Signaling and Abdominal Aortic Aneurysm Growth Rates. *Circ. Genomic Precis. Med.* **12**, e002413 (2019).
197. Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503–3521 (1997).
198. Zhou, H. *et al.* CD43-mediated IFN- γ production by CD8⁺ T cells promotes abdominal aortic aneurysm in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 5078–5085 (2013).
199. Busch, A. *et al.* Translating mouse models of abdominal aortic aneurysm to the translational needs of vascular surgery. *JVS-Vasc. Sci.* **2**, 219–234 (2021).
200. Dutta, P. *et al.* E-selectin inhibition mitigates splenic HSC activation and myelopoiesis in hypercholesterolemic mice with myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1802–1808 (2016).
201. Peshkova, I. O. *et al.* IL-27 receptor-regulated stress myelopoiesis drives abdominal aortic aneurysm development. *Nat. Commun.* **10**, 5046 (2019).
202. Zhao, G. *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals the cellular heterogeneity of aneurysmal infrarenal abdominal aorta. *Cardiovasc. Res.* **117**, 1402–1416 (2020).
203. Xu, Y., Murphy, A. J. & Fleetwood, A. J. Hematopoietic Progenitors and the Bone Marrow Niche Shape the Inflammatory Response and Contribute to Chronic Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2234 (2022).
204. Zhang, Y. W. *et al.* Hyaluronic acid–GPC5C signalling promotes dormancy in haematopoietic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **24**, 1038–1048 (2022).
205. Zöller, M. CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
206. Muller, W. A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet. Pathol.* **50**, 7–22 (2013).
207. Lenk, G. M. *et al.* Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Genomics* **8**, 237 (2007).

208. Choke, E. *et al.* Whole genome-expression profiling reveals a role for immune and inflammatory response in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **37**, 305–310 (2009).
209. Breland, U. M. *et al.* A potential role of the CXC chemokine GROalpha in atherosclerosis and plaque destabilization: downregulatory effects of statins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1005–1011 (2008).
210. Boisvert, W. A., Santiago, R., Curtiss, L. K. & Terkeltaub, R. A. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 353–363 (1998).
211. Olofsson, B., Porsch, H. & Heldin, P. Knock-Down of CD44 Regulates Endothelial Cell Differentiation via NFκB-Mediated Chemokine Production. *PLOS ONE* **9**, e90921 (2014).
212. Yin, L. *et al.* Blocking VCAM-1 Prevents Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Remodeling in Mice. *Front. Pharmacol.* **13**, (2022).
213. McCourt, P. A., Ek, B., Forsberg, N. & Gustafson, S. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **269**, 30081–30084 (1994).
214. Longo, G. M. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **110**, 625–632 (2002).
215. Daugherty, A. & Cassis, L. A. Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *Curr. Atheroscler. Rep.* **4**, 222–227 (2002).
216. Alaniz, L. *et al.* Modulation of matrix metalloproteinase-9 activity by hyaluronan is dependent on NF-kappaB activity in lymphoma cell lines with dissimilar invasive behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 736–743 (2004).
217. Du, T. *et al.* CD44 Is Associated with Poor Prognosis of ccRCC and Facilitates ccRCC Cell Migration and Invasion through HAS1/MMP9. *Biomedicines* **11**, 2077 (2023).
218. Lepidi, S. *et al.* MMP9 production by human monocyte-derived macrophages is decreased on polymerized type I collagen. *J. Vasc. Surg.* **34**, 1111–1118 (2001).
219. Rai, P. *et al.* Is There Enough Evidence to Support the Role of Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection?—A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 9200 (2022).
220. Damodarasamy, M. *et al.* Hyaluronan enhances wound repair and increases collagen III in aged dermal wounds. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **22**, 521–526 (2014).
221. Gao, L. *et al.* Role of uncoupled endothelial nitric oxide synthase in abdominal aortic aneurysm formation: treatment with folic acid. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **59**, 158–166 (2012).
222. Fan, L. M. *et al.* Endothelial cell-specific reactive oxygen species production increases susceptibility to aortic dissection. *Circulation* **129**, 2661–2672 (2014).
223. Yang, X. *et al.* Targeting endothelial tight junctions to predict and protect thoracic aortic aneurysm and dissection. *Eur. Heart J.* **44**, 1248–1261 (2023).

224. Suvorava, T. *et al.* Deficiency in hyaluronan synthase 3 attenuates ruptures in a murine model of abdominal aortic aneurysms by reduced aortic monocyte infiltration. 2022.12.01.518480 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2022.12.01.518480> (2022).
225. Vigetti, D. *et al.* Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 24639–24645 (2010).
226. Zhang, J. *et al.* Chemokine (C-C motif) receptor 2 mediates mast cell migration to abdominal aortic aneurysm lesions in mice. *Cardiovasc. Res.* **96**, 543–551 (2012).
227. Landsman, L. *et al.* CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* **113**, 963–972 (2009).
228. Patel, A., Jagadesham, V. P., Porter, K. E., Scott, D. J. A. & Carding, S. R. Characterisation of fractalkine/CX3CL1 and fractalkine receptor (CX3CR1) expression in abdominal aortic aneurysm disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **36**, 20–27 (2008).
229. Maguire, E. M., Pearce, S. W. A., Xiao, R., Oo, A. Y. & Xiao, Q. Matrix Metalloproteinase in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Dissection. *Pharmaceuticals* **12**, 118 (2019).
230. Zhang, H., Zhang, K., Gu, Y., Tu, Y. & Ouyang, C. Roles and Mechanisms of miRNAs in Abdominal Aortic Aneurysm: Signaling Pathways and Clinical Insights. *Curr. Atheroscler. Rep.* **26**, 273–287 (2024).

11. Originalarbeiten

N. Ale-Agha, P. Jakobs, C. Goy, M. Zurek, J. Rosen, N. Dyballa-Rukes, S. Metzger, J. Greulich, F. von Ameln, O. Eckermann, K. Unfried, **F. Brack**, M. Grandoch, M. Thielmann, M. Kamler, N. Gedik, P. Kleinbongard, A. Heinen, G. Heusch, A. Gödecke, J. Altschmied, J. Haendeler; *Mitochondrial telomerase reverse transcriptase protects from myocardial ischemia/reperfusion injury by improving complex I composition and function.*

Circulation. 2021 Dec 7;144(23):1876-1890.

12. Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

Fedor Brack, Jens W. Fischer, Maria Grandoch

Importance of hyaluronan-rich extracellular matrix for inflammation and structural remodeling in abdominal aortic aneurysms

Basics Science Poster, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herztage 2021, World Conference Center Bonn (Online-Posterpräsentation)

Fedor Brack, Tatsiana Suvorava, Luca Rolauer, Janet Kaczur, Patrick Petzsch, Karl Köhrer, Gerhard Sengle, Jens W. Fischer, Maria Grandoch

Hyaluronan synthase 3-derived hyaluronan promotes aortic immune cell infiltration in a mouse model of an abdominal aortic aneurysm

3rd international symposium of the TRR259, "New mechanistic insights into aortic diseases", Universitätsclub Bonn, 2022 (Posterpräsentation)

Fedor Brack, Tatsiana Suvorava, Luca Rolauer, Janet Kaczur, Patrick Petzsch, Karl Köhrer, Gerhard Sengle, Jens W. Fischer, Maria Grandoch

Hyaluronan-rich extracellular matrix promotes immune cell infiltration in a mouse model of an abdominal aortic aneurysm

Basic Vascular Science 3rd Meeting, *Translating advanced therapies for treatment of vein graft disease*, 2022, Leiden (Niederlande) (Kongressbeitrag)

13. Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Maria Grandoch. Sie hat mich während meiner gesamten Promotion mit ihrer Geduld und wertvollen Förderung begleitet und immer unterstützt. Ohne ihre Anleitung und ihr Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Durch die Möglichkeit der Arbeit im TRR259 wurde mir ein einzigartiger wissenschaftlicher Austausch für eine multidisziplinäre Zusammenarbeit geboten. Ich danke auch PD Dr. Tatsiana Suvorava für ihre Expertise und ihre stets konstruktive Unterstützung. Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Kalscheuer möchte ich mich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken. Ein weiterer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Translationale Pharmakologie und des Instituts für Pharmakologie. Das freundliche Arbeitsumfeld, die Unterstützung und die wertvollen Beiträge haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Vielen Dank an alle, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben. Für das Korrekturlesen und seine stets freundliche Art bedanke ich mich bei Dr. Christan Hundhausen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während der gesamten Promotion motiviert hat. Abschließend gilt mein größter Dank Lana Zabri. Danke für deine ehrlichen Worte und deine unermüdliche Unterstützung, die für mich von unschätzbarem Wert sind.

14. Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 12.01.2025

Fedor Brack