

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
kommissarischer Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Flögel

**Über den Einfluss von CD73 auf subklinische
Entzündungsprozesse der juvenilen und adulten Aorta am
Beispiel eines Angiotensin II-Modells**

Dissertation

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

vorgelegt von

Timo Massold

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD. Dr. rer. nat. Sebastian Temme

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Alles vermag ich durch den, der mich stärkt (Phil 4,13)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Massold, T, Ibrahim, F, Niemann, V, Steckel, B, Becker K, Schrader J, Stegbauer J, Temme S, Grandoch M, Flögel U, Bouvain P. CD73 deficiency does not aggravate angiotensin II-induced aortic inflammation in mice. Scientific Reports. 2023;13(1):17125. doi:10.1038/s41598-023-44361-7

Massold, T, Simon, F, Flögel, U, Temme S, Bouvain P. Der extrazelluläre Adenosinstoffwechsel um CD73: ein neuer Therapieansatz bei entzündungsassoziierten Gefäßerkrankungen?. Gefässchirurgie. 2024;29(6):364-369. doi:10.1007/s00772-024-01135-3

Zusammenfassung (deutsch)

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Enzyms CD73 auf subklinische Entzündungsprozesse in der Aorta bei juvenilen und adulten Mäusen untersucht. CD73 ist ein Schlüsselenzym im extrazellulären Purinstoffwechsel und produziert Adenosin, das eine entzündungshemmende Wirkung entfaltet. Die Hypothese lautete, dass CD73 altersabhängige Effekte auf die vaskuläre Inflammation zeigt. Zur Untersuchung des kombinierten Einflusses von Alter, Angiotensin-II-Stimulation und CD73-Defizienz auf das Gefäßsystem wurde ein zehntägiges Angiotensin-II-Modell entwickelt, das subklinische Entzündungen induzierte. Es wurde eine umfassende morphologische, funktionelle und immunologische Analyse der Aorta durchgeführt, darunter Magnetresonanztomographie zur Bestimmung der Aortenfläche, Sonographie zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit sowie Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Immunzellpopulationen und der Ektoenzyme CD73, CD39 und CD38. Die Ergebnisse zeigten, dass die Angiotensin-II-Stimulation eine signifikante Erhöhung der Immunzellzahl in der Aortenwand bewirkt, ohne jedoch typische morphologische Veränderungen eines Aortenaneurysmas hervorzurufen. Dabei traten altersabhängige Unterschiede auf: Adulte Mäuse wiesen im Vergleich zu juvenilen Mäusen eine größere Aortenfläche und niedrigere Blutflussgeschwindigkeiten auf, was auf altersbedingte strukturelle Veränderungen der Gefäßwand hindeutete. Unter basalen Bedingungen führte die CD73-Defizienz zu keinen signifikanten Unterschieden in der Gefäßmorphologie, der Blutflussgeschwindigkeit oder der Immunzellzahl. Dies deutet darauf hin, dass CD73 ohne zusätzlichen Stimulus keine zentrale Rolle in der Gefäßhomöostase einnimmt. Nach Angiotensin-II-Stimulation zeigte sich jedoch eine signifikante Herunterregulation der CD73-Expression auf Immunzellen, was möglicherweise zu einem funktionellen CD73-Mangel führte. Dies könnte erklären, warum keine deutlichen Unterschiede zwischen Mäusen mit und ohne CD73-Defizienz festgestellt werden konnten. Darüber hinaus wurden veränderte Expressionsmuster der Enzyme CD39 und CD38 identifiziert. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass CD73 unabhängig vom Alter bei Gefäßentzündungen herunterreguliert wird. Daher sollten zukünftige und aufbauende Forschungen die gezielte Hochregulation von CD73 als potenzielle Therapie zur Behandlung von Gefäßentzündungen fokussieren.

Zusammenfassung (englisch)

This study investigated the influence of the enzyme CD73 on subclinical inflammatory processes in the aorta of young and adult mice. CD73 is a key enzyme in extracellular purine metabolism and produces adenosine, which has an anti-inflammatory effect. It was hypothesised that CD73 has age-dependent effects on vascular inflammation. To investigate the combined effects of age, angiotensin II stimulation and CD73 deficiency on the vasculature, a ten-day angiotensin II model was developed to induce subclinical inflammation. A comprehensive morphological, functional and immunological analysis of the aorta was performed, including magnetic resonance imaging to determine aortic area, sonography to measure blood flow velocity and flow cytometry to examine immune cell populations and the ectoenzymes CD73, CD39 and CD38. The results showed that angiotensin II stimulation caused a significant increase in the number of immune cells in the aortic wall, but without causing the morphological changes typical of an aortic aneurysm. There were age-related differences: Adult mice had a larger aortic area and lower blood flow velocities than juvenile mice, indicating age-related structural changes in the vessel wall. Under basal conditions, CD73 deficiency did not result in significant differences in vessel morphology, blood flow velocity or immune cell numbers. This suggests that CD73 does not play a central role in vascular homeostasis without an additional stimulus. However, after angiotensin II stimulation, there was a significant downregulation of CD73 expression on immune cells, possibly leading to a functional CD73 deficiency. This may explain why no clear differences were observed between mice with and without CD73 deficiency. Altered expression patterns of the enzymes CD39 and CD38 were also observed. The results of this thesis show that CD73 is downregulated in vascular inflammation independent of age. Therefore, future and follow-up research should focus on the targeted upregulation of CD73 as a potential therapy for the treatment of vascular inflammation.

Abkürzungsverzeichnis

A₁ Adenosin-Rezeptor Typ 1
A_{2A} Adenosin-Rezeptor Typ 2A
A_{2B} Adenosin-Rezeptor Typ 2B
A₃ Adenosin-Rezeptor Typ 3
ADAM17 *A Disintegrin And Metalloprotease 17*
ADP Adenosindiphosphat
AMP Adenosinmonophosphat
Ang II Angiotensin II
ApoE Apolipoprotein E
ATP Adenosintriphosphat
AT₁ Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT₂ Angiotensin II Rezeptor Typ 2
CD *Cluster of differentiation*
cm Zentimeter
cm² Quadratzentimeter
cm/s Zentimeter pro Sekunde
CRP C-Reaktives Protein
DAMP *Danger-Associated Molecular Pattern*
DAPI *4',6-Diamidino-2-phenylindole*
EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*
EKG Elektrokardiogramm
ESAM *Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*
F F-Wert des oneway-ANOVA
FACS *Fluorescence-Activated Cell Sorting*
FcR Fc Rezeptor
FSC *Forward Scatter*
G *Gravitational force unit*

H Kruskal-Wallis-Test Statistik
ICAM1 *Intercellular Adhesion Molecule 1*
IL Interleukin
JAM *Junctional Adhesion Molecule*
LFA1 *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1*
MAC1 *Macrophage Antigen 1*
MACS Magnetic-Activated Cell Sorting
MADCAM1 *Mucosal Vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule 1*
MFI *Mean Fluorescence Intensity*
MHz Megahertz
M Molar
mM Millimolar
mg/dl Milligramm pro Deziliter
ml Milliliter
mm Millimeter
mm² Quadratmillimeter
ms Millisekunde
m Meter
µl Mikroliter
µl/h Mikroliter pro Stunde
µm Mikrometer
n Anzahl
NAD⁺ Nicotinamidadenindinucleotid
NF-κB *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
p P-Wert
PECAM1 *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*

pH *potentia hydrogenii*

PI3K Phosphoinositid 3-Kinase

PSGL1 *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*

RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

ROS *Reactive Oxygen Species*

SD Standardabweichung

SSC *Side Scatter*

TGF- β *Transforming Growth Factor Beta*

TNF- α *Tumor Necrosis Factor Alpha*

t T-test Statistik

T/m Tesla pro Meter

U *Units*, Mann-Whitney-U-Test Statistik

V_{max} Maximalflussgeschwindigkeit

V_{mean} Durchschnittsgeschwindigkeit

V_{min} Minimalflussgeschwindigkeit

VCAM1 *Vascular Cell-Adhesion Molecule 1*

VLA4 *Very Late Antigen 4*

% Prozent

° Grad

°C Grad Celsius

+ positiv

- negativ

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Relevanz des Alterns im Kontext vaskulärer Erkrankungen.....	1
1.2 Vaskuläre Inflammation und ihre Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen	3
1.3 Extrazelluläre Nukleotide: ATP und Adenosin als Regulatoren inflammatorischer Prozesse	4
1.4 CD73: Ein Schlüsselmolekül in der Regulation vaskulärer Entzündung	8
1.5 Ziele der Arbeit	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Material	10
2.1.1 Geräte.....	10
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	12
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.4 Puffer und Medien	14
2.1.5 Antikörper	15
2.1.6 Mäusestämme	16
2.1.7 Software.....	16
2.2 Tierversuchgenehmigung und Tierwohl	16
2.3 Angiotensin II-Modell	16
2.3.1 Grundlagen des Modells.....	16
2.3.2 Präparation und Implantation einer osmotischen Minipumpe.....	17
2.3.3 Immunzellisolation aus der Aorta	17
2.4 Magnetresonanztomographie	18
2.4.1 Grundlagen der Technologie	18
2.4.2 Durchführung	20
2.5 Sonographie und Dopplersonographie	21
2.5.1 Grundlagen der Technologie	21

2.5.2 Durchführung	22
2.6 Durchflusszytometrie	24
2.6.1 Grundlagen der Technologie	24
2.6.2 Durchführung	24
2.7 Statistisches Vorgehen	26
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Charakterisierung des zehntägigen Angiotensin II-Modells	27
3.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Immunzellen in der Aortenwand.....	27
3.1.2 Charakterisierung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT	29
3.1.3 Charakterisierung des Strains der Aorta juveniler Mäuse mittels Ultraschalls	31
3.2 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse ohne Angiotensin II-Stimulation	32
3.2.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT	33
3.2.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls	34
3.2.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie	35
3.3 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse mit Angiotensin II-Stimulation	36
3.3.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT	36
3.3.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls	37
3.3.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie	38
3.4 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse mit und ohne CD73-Defizienz ohne Angiotensin II-Stimulation	40
3.4.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT	41
3.4.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls	42
3.4.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie	44

3.5 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse mit und ohne CD73-Defizienz mit Angiotensin II-Stimulation	46
3.5.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT	46
3.5.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls	47
3.5.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie	49
3.6 Charakterisierung der CD73-Expression und weiterer Oberflächenmoleküle des extrazellulären purinergen Stoffwechsels	52
3.6.1 Charakterisierung der CD73-Expression auf Immunzellen der Mäuse ohne CD73-Defizienz.....	52
3.6.2 Charakterisierung der CD39- und CD38-Expression auf Immunzellen der Mäusen ohne CD73-Defizienz.....	54
3.6.3 Charakterisierung der CD39- und CD38-Expression auf Immunzellen der CD73-defizienten Mäusen	57
4 Diskussion	61
4.1 Das Angiotensin II-Modell.....	61
4.2 Das Alter	64
4.3 Die CD73-Defizienz	67
4.4 Limitationen	70
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	71
5 Literaturverzeichnis.....	73
6 Anhang	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Hallmarks of Aging</i>	2
Abb. 2: Modell der Leukopedese von Immunzellen zur Infiltration der Gefäßwand .	4
Abb. 3: Abbau durch die extrazellulären Ektoenzyme CD39 und CD73 und ihr Einfluss auf verschiedene Zellarten.....	5
Abb. 4: Einfluss von ATP und Adenosin auf verschiedene Zellgruppen des Gefäßsystems.....	7
Abb. 5: Repräsentativer Teil der <i>Gatingstrategie</i> aus der Durchflusszytometrie	26
Abb. 6: Immunzellen in der Aortenwand juveniler und adulter Mäuse mit und ohne Angiotensin II-Stimulation	28
Abb. 7: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei juvenilen und adulten Mäusen mit und ohne Angiotensin II-Stimulation	30
Abb. 8: Gefäßelastizitätsmessung bei juvenilen Mäusen mit und ohne Angiotensin II-Stimulation.....	32
Abb. 9: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei juvenilen und adulten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation	33
Abb. 10: Verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Aorta bei juvenilen und adulten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation	34
Abb. 11: Verschiedene Immunzellgruppen in der Aortenwand juveniler und adulter Mäuse ohne Angiotensin II-Stimulation	36
Abb. 12: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei juvenilen und adulten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation	37
Abb. 13: Verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Aorta bei juvenilen und adulten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation	38
Abb. 14: Immunzellzahl in der Aortenwand von juvenilen und adulten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation	40
Abb. 15: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation	41

Abb. 16: Vergleich der Flussgeschwindigkeiten in der Aorta zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation	43
Abb. 17: Vergleich der Immunzellzahlen in der Aortenwand von Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation ..	45
Abb. 18: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation	47
Abb. 19: Vergleich der Flussgeschwindigkeiten in der Aorta zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation	49
Abb. 20: Vergleich der Immunzellzahlen in der Aortenwand von Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation	51
Abb. 21: MFI-Werte eines an CD73 gebundenen CD73-Antikörpers auf verschiedenen Immunzellsubgruppen der Mäuse ohne CD73-Defizienz.....	53
Abb. 22: MFI-Werte eines an CD39 bzw. CD38 gebundenen CD39- und eines CD38-Antikörpers auf verschiedenen Immunzellsubgruppen der Mäuse ohne CD73-Defizienz.....	55
Abb. 23: MFI-Werte eines an CD39 bzw. CD39 gebundenen CD39- und eines CD38-Antikörpers auf verschiedenen Immunzellsubgruppen CD73-defizienter Mäuse	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufstellung der Geräte mit Namen, Herstellerangaben und Modellbezeichnung.....	12
Tabelle 2: Aufstellung der Chemikalien und Reagenzien mit Namen, Herstellerangaben und Modellbezeichnung	12
Tabelle 3: Aufstellung der Verbrauchsmaterialien mit Namen, Herstellerangaben und Modellbezeichnung.....	14
Tabelle 4: Aufstellung der Puffer und Medien mit Namen, Hersteller/Inhalt und Menge.....	15
Tabelle 5: Aufstellung der Antikörper mit Namen, Fluorochrom, Klon, Wirtsspezies und Herstellerangaben	15

Anhangsverzeichnis

Tabelle 6: <i>post-hoc</i> -Analyse für MFI-Werte des CD73-Antikörpers bei Mäusen ohne CD73-Defizienz.....	85
Tabelle 7: <i>post-hoc</i> -Analyse für MFI-Werte des CD38-Antikörpers bei Mäusen ohne CD73-Defizienz.....	86
Tabelle 8: <i>post-hoc</i> -Analyse für MFI-Werte des CD39- und CD38-Antikörpers bei CD73-defizienten Mäusen	87

1 Einleitung

1.1 Relevanz des Alterns im Kontext vaskulärer Erkrankungen

Das Altern stellt einen zentralen biologischen Prozess dar, der alle Organismen betrifft und letztlich zum Tod führt. Trotz seiner universellen Bedeutung ist der Mechanismus des Alterns bislang nur unzureichend verstanden. Allgemein wird die progressive Akkumulation von Zellschäden im Laufe der Zeit als ursächlicher Faktor des Alterns betrachtet (1). In diesem Kontext präsentierten López-Otín et al. (2013) erstmals die sogenannten *Hallmarks of Aging*, angelehnt an die *Hallmarks of Cancer* (2). Aufbauend darauf folgten zahlreiche Studien, die diese Merkmale des Alterns untersuchten. Im Jahr 2023 veröffentlichten López-Otín et al. eine aktualisierte Version der *Hallmarks* (3). Diese Merkmale erfüllen drei definierte Kriterien: „(1) *the time-dependent manifestation of alterations accompanying the aging process*, (2) *the possibility to accelerate aging by experimentally accentuating the hallmark*, and—most decisively—(3) *the opportunity to decelerate, halt, or reverse aging by therapeutic interventions on the hallmark*.“ (3) Zu den derzeit bekannten zwölf *Hallmarks* zählen: genomische Instabilität, Telomerverschleiß, epigenetische Veränderungen, Verlust der Proteostase, gestörte Makroautophagie, gestörte Nährstofferkennung, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz, Stammzellenerschöpfung, veränderte interzelluläre Kommunikation, chronische Entzündung sowie Dysbiose (3) (siehe Abb. 1). Besonders hervorzuheben ist die chronische Entzündung, da diese sowohl ein Resultat als auch ein Treiber von Störungen darstellt, die durch andere *Hallmarks* bedingt sind (3).

Diese Entzündungen wirken als systemische Verstärker, wie durch den Anstieg von CRP- und IL-6-Werten im Plasma sowie durch eine gleichzeitige Abnahme der Immunzellfunktionen, etwa der T-Zellen, belegt wird (3–6). Darüber hinaus tragen diese zur Entwicklung von Erkrankungen wie Arteriosklerose bei, deren Häufigkeit mit steigendem Alter zunimmt (3,7,8). Arteriosklerose zählt zu den kardiovaskulären Erkrankungen, die in Europa und weltweit als führende Todesursachen im Alter gelten. Das Alter ist somit ein zentraler Risikofaktor für diese Krankheitsgruppe (9,10).

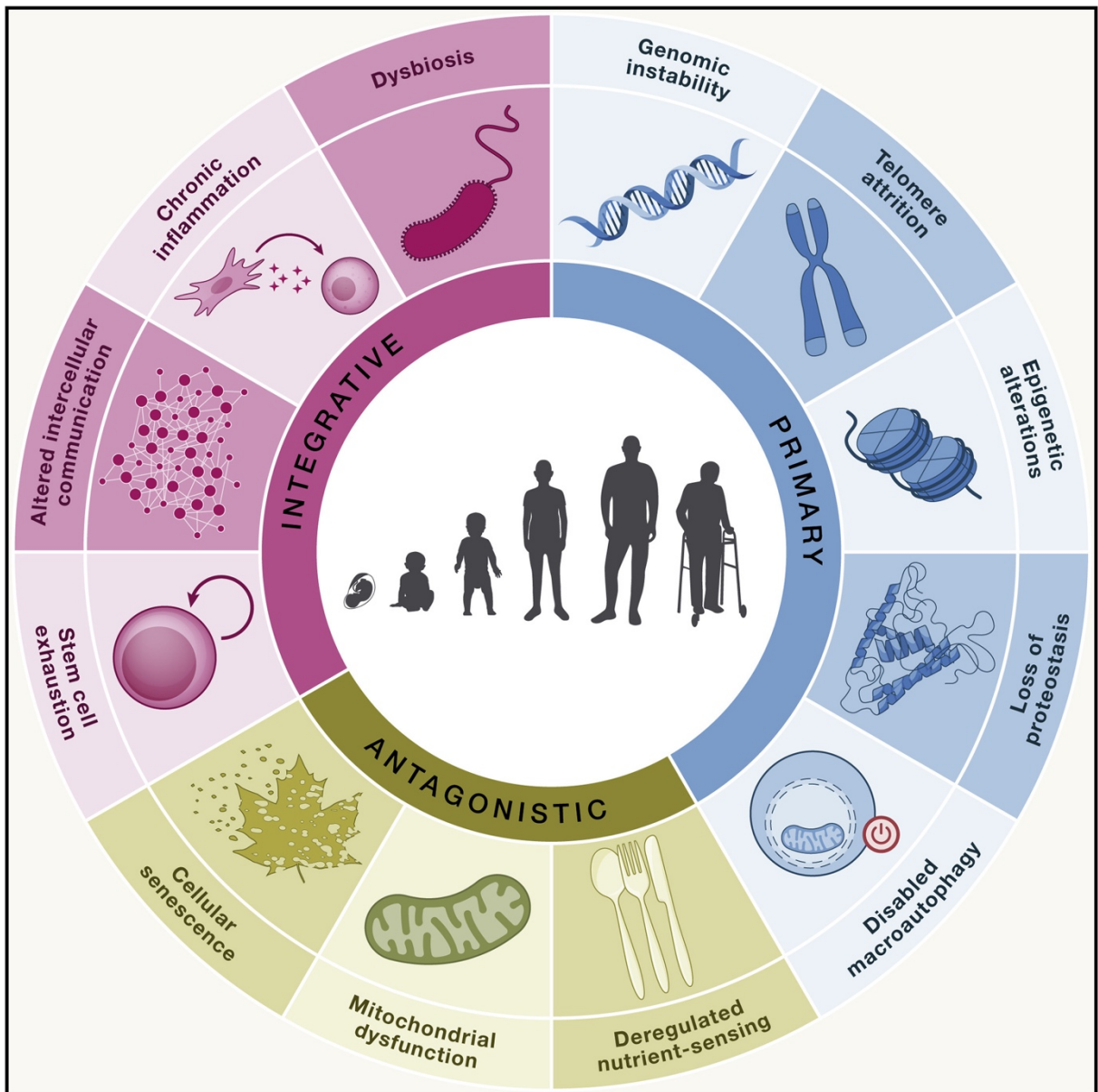


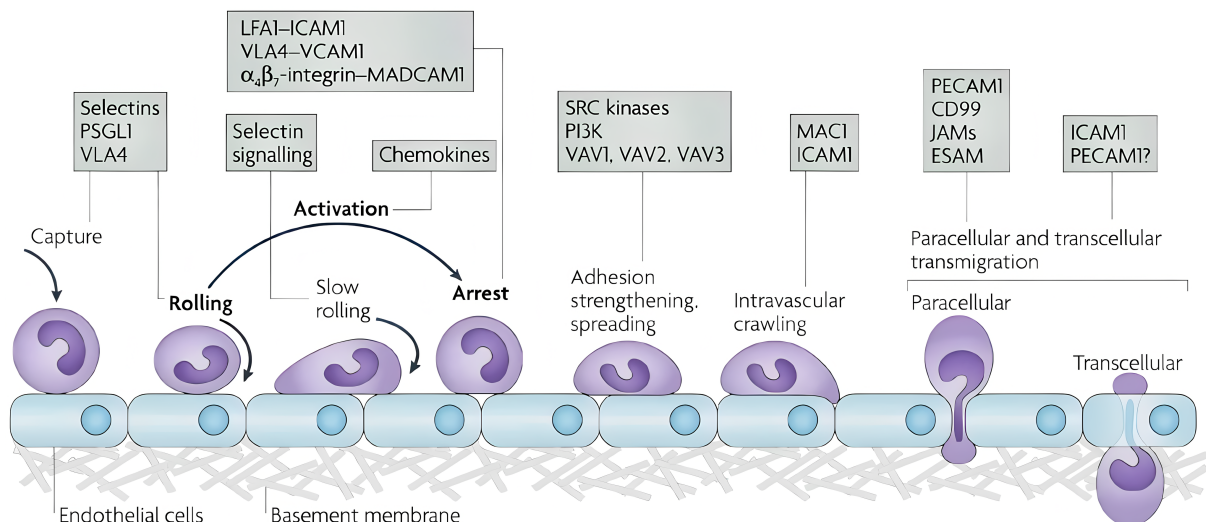
Abb. 1: Hallmarks of Aging

Die Abbildung 1 zeigt die zwölf Hallmarks of Aging, die als potenziell veränderbare Ursachen des Alterns betrachtet werden. Zu diesen zählen genomische Instabilität, Telomerverschleiß, epigenetische Veränderungen, Verlust der Proteostase, gestörte Makroautophagie, gestörte Nährstofferkennung, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz, Stammzellenerschöpfung, veränderte interzelluläre Kommunikation, chronische Entzündung und Dysbiose. Diese Hallmarks werden in primäre, antagonistische und integrative Kategorien unterteilt. Die Abbildung wurde aus (3) entnommen und mit Genehmigung von Elsevier verwendet.

1.2 Vaskuläre Inflammation und ihre Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen

Arteriosklerose, das abdominelle Aortenaneurysma sowie die Aortendissektion stehen in enger Verbindung mit vaskulären Entzündungsprozessen, die sowohl ihre Entstehung als auch ihren Verlauf maßgeblich beeinflussen (11). Diese Entzündungsreaktion stellt primär einen Abwehrmechanismus des Immunsystems dar, der auf chemische, biologische oder mechanische Reize reagiert. Gekennzeichnet ist diese durch die Freisetzung und Modulation zahlreicher extrazellulärer Mediatoren wie Chemokinen, Zytokinen sowie kleiner Moleküle wie Adenosin oder Adenosintriphosphat (11,12). Diese Mediatoren locken Immunzellen an, modulieren deren Aktivität und beeinflussen auch Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Gemeinsam ermöglichen diese Prozesse die klassische Immunzellinfiltration der Gefäßwand durch Leukapedese (siehe Abb. 2). Ein zentraler Mechanismus dabei ist die Hochregulation von Oberflächenmolekülen wie VCAM1, ICAM1 und E-Selectin auf den durch Mediatoren aktivierten Endothelzellen (11,13). Gleichzeitig wird die Interaktion zwischen VE-Cadherin und α -Catenin beeinflusst, was die Zell-Zell-Kontakte des Endothels lockert. Dadurch wird die Adhärenz und Diapedese von Immunzellen durch die Endothelbarriere ermöglicht (11,14).

Für die Rolle der Entzündung als *Hallmark of Aging* ist jedoch zu berücksichtigen, dass diese über die reine Eliminierung pathogener Mikroorganismen oder die Einleitung von Reparaturprozessen nach Gewebeschädigungen hinausgeht. Eine unkontrollierte und überschießende Gefäßentzündung, die durch hohe Konzentrationen gefährlicher Effektormoleküle wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Metalloproteasen ausgelöst wird, stellt eine erhebliche Gefahr für die Gefäßgesundheit dar. Diese Prozesse können die Gefäßwand nachhaltig schädigen und tragen damit zur Entstehung vaskulärer Erkrankungen bei (11,15,16).



Nature Reviews | Immunology

Abb. 2: Modell der Leukapedese von Immunzellen zur Infiltration der Gefäßwand

In Abbildung 2 ist der Prozess der Leukapedese dargestellt. Ursprünglich umfasste die Beschreibung dieses Vorgangs die drei Schritte Rolling, Activation und Arrest, die im Text hervorgehoben wurden. Im aktuellen Modell sind zusätzliche Phasen enthalten, darunter Capture, Slow Rolling, Adhesion Strengthening, Spreading, Intravascular Crawling sowie Paracellular und Transcellular Migration. Die relevanten Moleküle für diese Prozesse sind in den Kästen der Abbildung zugeordnet.

Beispiele für solche Moleküle sind ESAM, das endothelial cell-selective adhesion molecule, und ICAM1, das intercellular adhesion molecule 1. Weitere wichtige Faktoren sind LFA1, auch als lymphocyte function-associated antigen 1 oder $\alpha\text{L}\beta 2$ -Integrin bekannt, sowie VCAM1, das vascular cell-adhesion molecule 1. Zusätzlich spielen Moleküle wie PECAM1, das platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1, und JAM, das junctional adhesion molecule, eine entscheidende Rolle. Diese Moleküle vermitteln spezifische Schritte der Adhäsion und Migration und tragen zur Regulation der Immunantwort bei. Die Abbildung wurde aus (13) entnommen und mit Genehmigung von Springer Nature verwendet.

1.3 Extrazelluläre Nukleotide: ATP und Adenosin als Regulatoren inflammatorischer Prozesse

Um überschießende Immunreaktionen zu kontrollieren, nutzt der Organismus verschiedene Regulationssysteme. Eine wichtige Erkenntnis der letzten Jahre ist, dass extrazelluläre Nukleotide wie Adenosin und Adenosintriphosphat (ATP) ebenfalls Teil dieser Systeme sind (11,12,17,18). ATP, das intrazellulär als zentraler Energielieferant fungiert, wurde als proinflammatorisches *danger-associated molecular pattern* (DAMP) identifiziert. Dieses wird beispielsweise bei Zellnekrosen in den Extrazellulärraum freigesetzt. Im Gegensatz dazu wirkt extrazellulär vorhandenes Adenosin überwiegend antiinflammatorisch (11,18–20).

Der Abbau von ATP zu Adenosin im Extrazellulärraum erfolgt primär durch Ektoenzyme, die entweder auf der Zelloberfläche verschiedener Zelltypen exprimiert werden oder frei im Serum vorliegen. Zunächst wird ATP durch das Enzym CD39 zu Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt (18,21). Anschließend wird AMP durch die 5'-Ektonukleotidase CD73 zu Adenosin hydrolysiert (18,22) (siehe Abb. 3). Dieser Prozess verläuft sehr schnell, oft innerhalb von Sekunden, wodurch das extrazellulär vorhandene ATP und damit dessen proinflammatorische Wirkung effektiv eliminiert werden (18).

Interessanterweise bewirkt die Hydrolyse nicht nur die Neutralisierung eines proinflammatorischen Stimulus, sondern erzeugt gleichzeitig einen antiinflammatorischen Reiz (18,23). Adenosin ist unter physiologischen Bedingungen im Extrazellulärraum nur in nanomolarer Konzentration vorhanden und wird ebenfalls rasch abgebaut (18,23). Durch den verstärkten Abbau von ATP steigt die lokale Adenosinkonzentration jedoch deutlich an, was dessen antiinflammatorische Wirkung über die Bindung an spezifische Adenosinrezeptoren ermöglicht (18,24,25) (siehe Abb. 3).

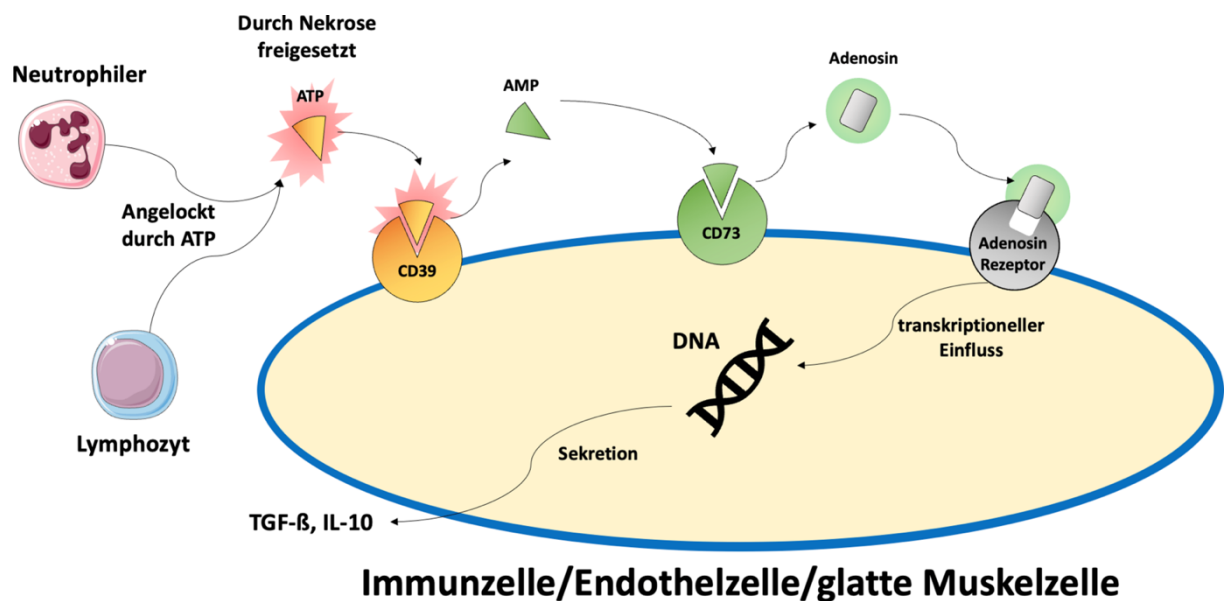


Abb. 3: Abbau durch die extrazellulären Ektoenzyme CD39 und CD73 und ihr Einfluss auf verschiedene Zellarten

Wenn nekrotische Prozesse auftreten, wird ATP aus den Zellen in den Extrazellulärraum freigesetzt. Dieses Nukleotid, das normalerweise als Energielieferant dient, entfaltet eine stark proinflammatorische Wirkung, die Immunzellen anzieht. Gemeinsam mit Endothelzellen und glatten Muskelzellen beginnt der Abbau von ATP zu AMP, welcher hauptsächlich durch das Ektoenzym CD39 katalysiert wird. Das

entstehende AMP wird anschließend durch die 5'-Ekto-Nukleotidase CD73 zu Adenosin umgewandelt. Während Adenosin unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Konzentrationen im nanomolaren Bereich vorliegt, können diese Werte in entzündlichen Geweben rasch auf mikromolare Mengen ansteigen. Über die Aktivierung von Adenosinrezeptoren übt Adenosin dann eine antiinflammatorische Wirkung aus, unter anderem durch die Förderung der Sekretion entzündungshemmender Moleküle wie IL-10 oder TGF- β . (18) Die Abbildung wurde aus (18) entnommen und mit Genehmigung von Springer Nature verwendet.

Derzeit sind die vier Adenosinrezeptoren A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ bekannt (24). Der G_i-Protein-gekoppelte A₁-Rezeptor spielt eine Rolle bei der Reduktion der zentralnervösen Aktivität und der Herzfrequenz (26), zeigt jedoch auch proinflammatorische Eigenschaften. Beispielsweise fördert dieser in Makrophagen die Sekretion von IL-6 und IL-10 (27). Auf Neutrophile wirkt der A₁-Rezeptor ebenfalls proinflammatorisch, indem dieser sowohl die Adhäsion (28) als auch die Bildung toxischer Metabolite unterstützt (29). Diese Effekte sind jedoch stark konzentrationsabhängig. Niedrige Adenosinkonzentrationen binden bevorzugt an den A₁-Rezeptor, während höhere Konzentrationen die A₂-Rezeptoren aktivieren, die vorwiegend antiinflammatorische Wirkungen entfalten (25).

Die A₂-Rezeptoren lassen sich in die Subtypen A_{2A} und A_{2B} unterteilen. Der G_s-Protein-gekoppelte A_{2A}-Rezeptor besitzt eine hohe Affinität zu Adenosin und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen. Seine Aktivierung führt unter anderem zu einer deutlichen Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine in CD4-positiven T-Helferzellen (30). Neben seiner entzündungshemmenden Wirkung unterstützt der A_{2A}-Rezeptor die Wundheilung durch Förderung der Kollagensynthese und der Angiogenese (24,31,32).

Der G_s- und G_q-Protein-gekoppelte A_{2B}-Rezeptor weist eine geringere Affinität auf, ist jedoch für das vaskuläre *Remodeling* von entscheidender Bedeutung. Dieser hemmt beispielsweise die Proliferation glatter Muskelzellen (33–35) und verhindert die Freisetzung von TNF- α und IL-1 β (33,36–38). Zusätzlich unterdrückt dieser die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 und E-Selectin (39,40).

Der G_i-Protein-gekoppelte A₃-Rezeptor wird häufig als kardioprotektiv beschrieben (24). Gleichzeitig zeigt dieser sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Eigenschaften. Dieser beeinflusst die Migrationsfähigkeit von Neutrophilen (41) und reduziert die Sekretion von IL-12 sowie Interferon-Gamma (42,43).

Die Funktionen der Adenosinrezeptoren verdeutlichen die immense Bedeutung von Adenosin. Seine Wirkungen, die vor allem antiinflammatorischer Natur sind, hängen maßgeblich von der Konzentration und dem aktivierten Rezeptor ab. CD73, das den letzten Schritt der Umwandlung von AMP zu Adenosin katalysiert, hat in diesem Prozess eine Schlüsselrolle. Neben der antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin ist CD73 auch deshalb von zentraler Bedeutung, weil es als limitierender Schritt in der Reaktionskette fungiert (44). Zusätzlich trägt CD73 durch die Umwandlung von AMP, das beispielsweise durch den Abbau von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) durch CD38 entsteht (45), wesentlich zur Schaffung eines antiinflammatorischen Milieus bei (46). Diese Funktion hat insbesondere in der Gefäßwand eine hohe Relevanz, da CD73 auf der Oberfläche vieler Zelltypen des Gefäßsystems exprimiert wird, darunter Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Immunzellen (18,47). Unter entzündlichen Bedingungen wird CD73 vermehrt exprimiert (48), was durch die Verstärkung der Endothelbarriere zur Verbesserung der Gefäßstabilität beiträgt (18,49–51) (siehe Abb. 4).

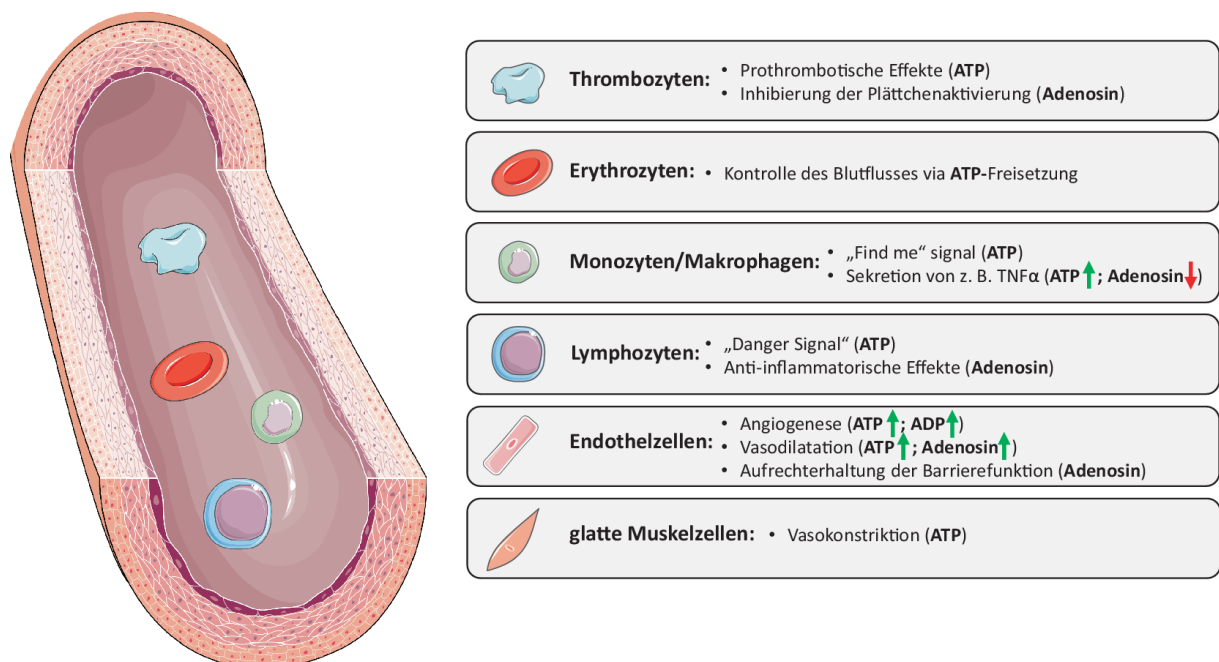


Abb. 4: Einfluss von ATP und Adenosin auf verschiedene Zellgruppen des Gefäßsystems

Unter pathophysiologischen Bedingungen im Gefäßsystem übernimmt der purinerge Signalweg eine zentrale Funktion. Freigesetztes ATP kann prothrombotische Effekte hervorrufen oder eine Vasodilatation fördern. Durch den weiteren Abbau von ATP zu Adenosin wird eine Inaktivierung der Blutplättchen unterstützt und die Funktion der Endothelbarriere stabilisiert. Des Weiteren werden Immunzellen im Gefäßsystem aktiviert, wobei freigesetztes ATP als Lockstoff dient und die Sekretion von Zytokinen wie TNFα angeregt wird (18). ATP, Adenosintriphosphat; TNFα, Tumor necrosis factor

alpha; ADP, Adenosindiphosphat. Die Abbildung wurde aus (18) entnommen und mit Genehmigung von Springer Nature verwendet.

1.4 CD73: Ein Schlüsselmolekül in der Regulation vaskulärer Entzündung

Das therapeutische Potenzial von CD73 bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde bereits erkannt, und erste wissenschaftliche Arbeiten konnten zentrale Mechanismen und Effekte von CD73 auf Herz-Kreislauf- und Gefäßerkrankungen aufzeigen. So wurde eine hemmende Wirkung auf die Endotheladhäsion von Neutrophilen sowie eine Reduktion der Freisetzung von Sauerstoffradikalen und TNF- α nachgewiesen (21,52–54,18). Ebenso konnte eine verringerte Aktivierung, Proliferation und Expansion regulatorischer T-Zellen beobachtet werden (18,51,55). In einem Myokardmodell zeigte sich, dass CD73 sowohl das fibrotische Remodeling als auch die Infarktgröße positiv beeinflusst, indem es die Freisetzung von IL-6 reduziert (18,56–58). Überdies konnte die protektive Wirkung von CD73 gegen Neointimabildung und Gefäßentzündungen in einem Karotisdraht-Verletzungsmodell belegt werden (11,18,59). Eine weitere Studie zeigte, dass Mäuse mit einer ApoE- und CD73-Defizienz zu verstärkter Atherosklerose neigen, was die Bedeutung von CD73 in diesem Kontext unterstreicht (11,18,60). Interessanterweise stellten Sutton et al. 2020 fest, dass dieser Effekt bei älteren Mäusen umgekehrt ist, was auf altersabhängige Effekte von CD73 hinweist (11,18,61). Dieses Erkenntnis, kombiniert mit dem Wissen über veränderte Stoffwechselprozesse im Rahmen der *Hallmarks of Aging*, wirft die Frage auf, ob die Wirkung von CD73 auf die vaskuläre Inflammation altersabhängig ist. Derzeit sind die altersabhängigen Effekte von CD73 nur unzureichend erforscht. Insbesondere ist unklar, ob die pro- oder antiinflammatorischen Eigenschaften von CD73 durch das Alter beeinflusst werden.

1.5 Ziele der Arbeit

Daraus ergibt sich die zentrale Hypothese dieser Arbeit, dass CD73 altersabhängige Effekte auf die vaskuläre Inflammation ausübt. Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von CD73 auf altersabhängige inflammatorische Prozesse in der Aorta in einem subklinischen Entzündungsmodell zu untersuchen. Hierfür wurde ein modifiziertes Angiotensin-II-Modell etabliert, das eine reine Entzündungsreaktion ohne strukturellen Gefäßumbau induziert. Angiotensin-II-Modelle gelten als Standardansätze in der Aneurysmaforschung und zeigen vergleichbare Immunreaktionen wie jene, die bei menschlichen Aortenaneurysmen beobachtet werden (62). Während Aneurysmen in diesem Modell in der Regel erst nach längeren Zeiträumen auftreten, wird in dem hier beschriebenen Modell eine reine Entzündungsreaktion ohne strukturellen Gefäßumbau vermutet. Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit betreffen die Validierung des Modells, die altersabhängige Entzündungsreaktion und die Rolle von CD73 in diesem Prozess. Dafür wurden juvenile (3 Monate) und adulte (6 Monate) C57BL/6-Mäuse sowie CD73-defiziente Mäuse über einen Zeitraum von 10 Tagen mit Angiotensin II behandelt. Die Verabreichung erfolgte über eine osmotische Minipumpe. Zur Untersuchung der Aortenentzündung wurden morphologische Analysen, wie die Bestimmung der Aortenfläche mittels Magnetresonanztomographie (MRT), durchgeführt. Funktionale Analysen, darunter die Messung der Flussgeschwindigkeit und Elastizität der Aorta, erfolgten durch Sonographie und Dopplersonographie. Zusätzlich wurde die Zellzahl aortaler Immunzellen sowie die Expression extrazellulärer Enzyme des purinerger Stoffwechsels auf Immunzellen der Aorta mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2 Material und Methoden

Dieses Kapitel fasst alle Materialien und Methoden inklusive Methodengrundlagen zusammen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Sie dient der Nachvollziehbarkeit der im Ergebnisteil geschilderten Versuche.

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In der folgenden Tabelle sind alle für diese Arbeit genutzten Geräte mit Namen, Hersteller und Modellbezeichnung aufgelistet.

Name	Hersteller	Modellbezeichnung
Analysenwaage	Kern (Balingen, Deutschland)	AEJ
	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz)	PA214
Autoklav	F. & M. Lautenschläger (Köln, Deutschland)	5169
Durchflusszytometer	BD Biosciences (San Jose, USA)	FACSCANTO II
Gefrierschrank	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Forma 900 Series
Isoflurandosierer	Drägerwerk (Lübeck, Deutschland)	Vapor 19.3
Kaltlichtquelle	Schott (Mainz, Deutschland)	KL1500LCD
Kühlschrank	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)	CBNd 5223 Plus BioFresh NoFrost
MR-Microimagingssystem	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	Mini 0.5
MR-Resonatorspule	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	30mm-Birdcage

	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	45mm-Quadratur
MR-Spektrometer	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	MRT vertical 9.4 T Bruker AVANCEIII Wide Bore NMR 383 spectrometer
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Research
Rasierapparat	Wella (Darmstadt, Deutschland)	Contura
Schallkopf	Visualsonics (Toronto, Kanada)	MX550D
Stereomikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland)	Leica GZ6 ZOOM
Sterilbank	Labogene (Lyngø, Dänemark)	Scanlaf Mars Pro Cytosafe Class 2
Ultraschallgerät	Visualsonics (Toronto, Kanada)	Vevo 3100
Ultraschalltisch mit EKG	Visualsonics (Toronto, Kanada)	Vevo imaging station
Vakuum-Absaugsystem	HLC (Phorzheim, Deutschland)	AC 04
Vitalparameteranzeiger	SA Instruments (New York, USA)	M1025 system
Vortexer	VWR International (Darmstadt, Deutschland)	444-1372 (EU)
Wärmeschrank	Memmert (Schwabach, Deutschland)	Modell 100-800
Zelldissoziator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	gentleMACS
Zentrifugen	Beckman Coulter (Brea, USA)	Allegra X-30R

	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	5415R
	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Heraeus Megafuge 16R
	Thermo Fisher (Rockford, USA)	Heraeus Biofuge Primo P

Tabelle 1: Aufstellung der Geräte mit Namen, Herstellerangaben und Modellbezeichnung

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

In der folgenden Tabelle sind alle für diese Arbeit genutzten Chemikalien mit Namen und Hersteller aufgelistet.

Name	Hersteller
Adenosintriphosphat 20 mM	Tocris Bioscience (Bristol, Großbritannien)
Angiotensin II	R & D Systems (Minneapolis, USA)
Bovine Serum Albumin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Thermo Fisher (Rockford, USA)
FcR-Block murin	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Haarentfernungscreme	Reckitt Benckiser (Slough, Großbritannien)
Hautdesinfektionsmittel	Schülke & Mayr (Norderstedt, Deutschland)
Heparin	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Isofluran	Priamal critical care (Voorschoten, Niederlande)
Multi Tissue Kit 2	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Tabelle 2: Aufstellung der Chemikalien und Reagenzien mit Namen, Herstellerangaben und Modellbezeichnung

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle sind alle für diese Arbeit genutzten Verbrauchsmaterialien mit Namen und Hersteller aufgelistet.

Name	Hersteller
Chirurgische Schere spitz, gerade 13 cm	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
C-Tube gentleMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Durchflusszytometrieröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
EASYstrainer 40 µm, 70 µm, 100 µm	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Eclipse Nadel mit SmartSlip 0,8 mm x 40 mm	Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
Elektrodencreme	Vyair Medical Oy (Helsinki, Finnland)
Eppendorfgefäß 250 µl, 500 µl, 1,5 ml, 2 ml	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Falcon 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Fixierpflaster „Leukofix“ 2,5 cm x 5 m	BSN Medical (Hamburg, Deutschland)
Glasgefäße 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml	Duran (Wertheim, Deutschland)
Mikropinzette Uhrmacher 0,2 mm	Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)
Nachstarschere Vannas 85 mm aufgebogen	Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)
Osmotische Minipumpe 0,25 µl/h, 14 Tage	Durect (Cupertino, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Hamburg, Deutschland)
Plastiktubus für osmotische Minipumpe, 13 mm	Durect (Cupertino, USA)

Prolene 6-0 Faden	Ethicon (Raritan, USA)
Spritze 0,5 ml U-100 Insulin	BD Medical (Le Pont de Claix Cedex, Frankreich)
Spritze 20 ml	Braun (Melsungen, Deutschland)
Standardfutter Maus	Ssniff Spezialdiäten (Soest, Deutschland)
Standardpinzette Anatomisch gerade 14 cm	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Stumpfe Aufziehkanüle 1,2 mm x 50 mm	Sol-Millennium Medical (Lawrenceville, USA)
Ultraschallgel	Parker Laboratories (New Jersey, USA)
Wattestäbchen	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)

Tabelle 3: Aufstellung der Verbrauchsmaterialien mit Namen, Herstellerangaben und Modellbezeichnung

2.1.4 Puffer und Medien

In der folgenden Tabelle sind alle für diese Arbeit genutzten Puffer und Medien mit Namen, Hersteller oder Inhalt und Menge aufgelistet.

Name	Hersteller oder Inhalt	Menge
Angiotensin-II-Lösung	Angiotensin II	6 ml
	Jonosteril	1 ml
HBSS	Pan Biotech (Aidenbach, Deutschland)	500 ml
Heparin-PBS-Lösung	Heparin	2000 U
	PBS	20 ml
Jonosteril	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)	1000 ml

MACS-Puffer, pH 7,4	Bovine Serum Albumin	2 %
	EDTA	1 mM
	PBS	500 ml
RPMI 1640	Pan Biotech (Aidenbach, Deutschland)	500 ml
Enzymgemisch	Multi Tissue Kit 2	1
	RPMI 1640	2,3 ml

Tabelle 4: Aufstellung der Puffer und Medien mit Namen, Hersteller/Inhalt und Menge

2.1.5 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind alle für diese Arbeit genutzten Antikörper mit Namen, Fluorochrom, Klonnummer, Wirtsspezies und Hersteller aufgelistet.

Name	Fluorochrom	Klon	Wirtsspezies	Hersteller
B220	APC-Cy7	RA3-6B2	Ratte	Invitrogen (Waltham, USA)
CD3	FITC	17A2	Ratte	Invitrogen (Waltham, USA)
CD11b	PE-Cy7	M1/70	Ratte	Invitrogen (Waltham, USA)
CD38	BV510	90/CD38	Ratte	BD Bioscience (San Jose, USA)
CD39	BV510	Y23-1185	Ratte	BD Bioscience (San Jose, USA)
CD45	PerCP	30-F11	Ratte	BD Bioscience (San Jose, USA)
CD73	APC	TY/11.8	Ratte	Biolegend (San Diego, USA)
F4/80	PE	BM8	Ratte	Biolegend (San Diego, USA)

Tabelle 5: Aufstellung der Antikörper mit Namen, Fluorochrom, Klon, Wirtsspezies und Herstellerangaben

2.1.6 Mäusstämme

In dieser Studie werden etablierte C57BL/6-Mäuse verwendet, einschließlich Mäusen mit CD73-Defizienz (CD73^{-/-}) und solchen ohne CD73-Defizienz (CD73^{+/+}). Hierfür werden Untersuchungen sowohl an weiblichen als auch an männlichen Tieren im Alter von 3 und 6 Monaten durchgeführt.

2.1.7 Software

Zur Erstellung der Doktorarbeit wurde *Microsoft Word 365* genutzt. Abbildungen und Tabellen wurden mithilfe von *Microsoft PowerPoint 365* sowie *GraphPad Prism 10.4.1* erstellt. *Zotero 7.0.11* diente als Zitationssoftware. Die Analyse der MRT-Daten erfolgte mit *Paravision 2.0*, während die Sonographiedaten mit *VevoLab 5.5.1* ausgewertet wurden. Für die Analyse durchflusszytometrischer Daten wurde die Software *FACSDiva 7.0* verwendet. Statistische Analysen wurden ebenfalls mit *GraphPad Prism 10.4.1* durchgeführt.

2.2 Tierversuchgenehmigung und Tierwohl

Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen erforderten eine Tierversuchgenehmigung. Diese wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter den Aktenzeichen 81-02.04.2018.A408 und 81-02.04.2021.A401 erteilt. Der Fachkundenachweis für Versuchstierkunde sowie eine Sondergenehmigung zur Durchführung von Operationen an Mäusen im Rahmen des Angiotensin-II-Maus-Modells lagen vor.

Die Versorgung der Mäuse erfolgte in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität. Die Tiere wurden mit Standardfutter und Wasser *ad libitum* versorgt, um die Anforderungen an das Tierwohl zu gewährleisten.

2.3 Angiotensin II-Modell

2.3.1 Grundlagen des Modells

Das Angiotensin-II-Modell wird in unterschiedlichen Varianten häufig in der Aneurysmaforschung eingesetzt. In der Regel wird Mäusen mit ApoE-Defizienz über eine osmotische Minipumpe kontinuierlich Angiotensin II infundiert, meist für einen Zeitraum von mehreren Wochen bis zu 30 Tagen. Bei mehr als 80 % dieser Tiere entwickelt sich ein Aortenaneurysma. Abweichend hiervon wurde in der vorliegenden

Arbeit ein verkürztes Modell über 10 Tage etabliert. Dabei wurden Mäuse mit und ohne CD73-Defizienz und intaktem ApoE untersucht. Dieses Modell konzentriert sich primär auf die Untersuchung von Gefäßentzündungen, ohne dass sich ein Aneurysma ausbildet. Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen, Frühformen eines Aneurysmas und akute entzündliche Gefäßreaktionen detaillierter zu analysieren.

2.3.2 Präparation und Implantation einer osmotischen Minipumpe

Zur Induktion der Gefäßentzündung wurde jeder Maus eine osmotische Minipumpe implantiert. Vor der Implantation wurde die Pumpe zunächst mit einer 5%-igen bovinen Serumalbumin-Natriumchlorid-Lösung gespült, anschließend mit einer Angiotensin-II-Lösung befüllt und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C aktiviert. Für diesen Prozess wurde die Pumpe in einem 2-ml-Eppendorfgefäß mit Jonosteril aufbewahrt. Etwa 30 Minuten vor der Implantation erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht) zur Analgesie. Die Implantation selbst erfolgte unter kontinuierlicher Inhalationsanästhesie mit einem 3%-igen Isofluran-Luftgemisch, das über eine Atemmaske verabreicht wurde. Zur Vorbereitung wurde die Nackenbehaarung der Maus mit einem elektrischen Rasierer entfernt und die enthaarte Haut desinfiziert. Anschließend wurde ein 1 bis 2 cm langer Transversalschnitt durch Oberhaut und Lederhaut gesetzt. Danach folgte die stumpfe Präparation einer subkutanen Tasche in kaudaler Richtung, in die die Pumpe eingelegt wurde. Der Wundverschluss erfolgte mit Einzelknopfnähten unter Verwendung eines 6-0-Prolenefadens. Die gesamte Operationszeit, von der Einleitung der Inhalationsanästhesie bis zum Wundverschluss, betrug durchschnittlich 5 bis 7 Minuten pro Tier.

2.3.3 Immunzellisolation aus der Aorta

Zur Vorbereitung der Aortenentnahme wurde der Maus etwa 10 Minuten vor der Tötung intraperitoneal 200 µl einer 0,2 molaren Heparin-PBS-Lösung verabreicht. Die Tötung erfolgte durch die Verabreichung von 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin. Anschließend wurden Thorax und Abdomen zügig mit einer Schere geöffnet, um die linke *A. iliaca communis* freizulegen. Dieses Gefäß wurde durchtrennt, woraufhin die linke Herzkammer punktiert und mit 20 ml PBS durchspült wurde.

Nach der Spülung wurde die *Aorta ascendens* vom Herzen getrennt. Die Organe des Peritoneums und Thorax wurden entfernt, mit Ausnahme der Nieren und der Aorta. Die Aorta wurde von der Bifurkation ausgehend unter binokularer Vergrößerung mit Nachstarschere und Mikropinzette vom umgebenden Fettgewebe befreit und bis zum Aortenbogen gelöst. Anschließend erfolgte das Durchtrennen der Nierenarterien und verbleibender Gefäßabgänge. Die Aorta wurde etwa 1 mm kranial der Aortenbifurkation und 1 mm kaudal des Aortenbogens herausgeschnitten.

Die entnommene Aorta wurde mit dem in Kapitel 2.1.4 genannten Enzymgemisch behandelt, im Modus 37_mTDK_1 des in Kapitel 2.1.1 genannten Zelldissoziators zerkleinert und für 41,5 Minuten enzymatisch zersetzt. Die dadurch freigesetzten Immunzellen wurden durch Filtration mit einem 40-µm-Nylonfilter und anschließende Zentrifugation (5 Minuten bei 300 G und 4 °C) isoliert. Der Überstand wurde verworfen. Die gewonnene Zellfraktion wurde zur weiteren Aufreinigung in zwei Zyklen mit jeweils 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und erneut über 5 Minuten bei 4 °C und 300 G zentrifugiert.

2.4 Magnetresonanztomographie

2.4.1 Grundlagen der Technologie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht die noninvasive Darstellung von Körperstrukturen mithilfe von Magnetfeldern. Grundlage dieser Methode ist der sogenannte *Kernspin*, also der Eigendrehimpuls von Protonen um ihre eigene Achse, der ein magnetisches Dipolmoment erzeugt. Zudem spielt die Präzession eine zentrale Rolle, eine kreiselförmige Bewegung der Protonen, die bei Kernen mit ungerader Nukleonenzahl auftritt, insbesondere bei Wasserstoffprotonen im Wasser. Diese Bewegung erfolgt um eine Magnetfeldachse, die entweder durch den *Eigenkernspin* oder, im Fall der MRT, durch ein starkes externes Magnetfeld erzeugt wird.

Unter Einfluss eines externen Magnetfeldes richten sich die magnetischen Dipole entlang der Feldlinien aus. Dabei können diese entweder eine Parallel- oder eine Antiparallellposition einnehmen. Da die Parallelposition energetisch günstiger ist, entsteht ein Ungleichgewicht zugunsten dieser Position, was zu einer messbaren Längsmagnetisierung führt. Diese Längsmagnetisierung ist ein zentraler Aspekt für die Bildgebung.

Das externe Magnetfeld bewirkt zudem eine Synchronisierung der Rotationsfrequenzen der Protonen, die als Larmorfrequenz (ω_0) bezeichnet wird. Die Larmorfrequenz hängt von einer materialspezifischen Konstante (γ) und der Stärke des externen Magnetfeldes (B_0 , gemessen in Tesla) ab. Diese wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$(\omega_0) = \gamma * B_0$$

Wenn ein Hochfrequenzimpuls mit der berechneten Larmorfrequenz (bei Wasserstoff etwa 42 MHz pro Tesla) orthogonal zum externen Magnetfeld abgegeben wird, tritt eine Resonanz auf. Dabei werden die Protonen aus der Längsmagnetisierung (z-Ebene) in die Quermagnetisierung (xy-Ebene) ausgelenkt und führen synchron eine Präzessionsbewegung aus. Nach dem Abschalten des Hochfrequenzimpulses kehren die Protonen in die Ausrichtung der Längsmagnetisierung zurück. Dieser Vorgang, bekannt als Relaxation, geht mit der Abgabe der zuvor aufgenommenen Energie an die Umgebung (das sogenannte Gitter) in Form eines magnetischen Impulses einher. Dieser Prozess wird als Längsrelaxation bezeichnet. Gleichzeitig kommt es zur Desynchronisierung der Präzessionsbewegung, ein Vorgang, der als Querrelaxation bezeichnet wird und ohne Energieabgabe erfolgt.

Beide Relaxationsprozesse können detektiert und mithilfe stoffspezifischer Zeitkonstanten beschrieben werden, die durch natürliche Exponentialfunktionen charakterisiert sind. Die Längsrelaxation wird durch die sogenannte T1-Zeit beschrieben, während die Querrelaxation mit der T2-Zeit erfasst wird. Diese Zeitkonstanten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Messdauer und ihrer Darstellung von Körperflüssigkeiten: In der T1-Gewichtung erscheinen Flüssigkeiten dunkel, in der T2-Gewichtung hingegen hell.

Für die Erzeugung anatomisch verwendbarer Bilder ist eine präzise Ortskodierung erforderlich. Diese wird durch Gradientenfelder erreicht, also zusätzliche Magnetfelder, die es ermöglichen, Protonen eines spezifischen Schnittbereichs durch die Larmorfrequenz anzuregen. Zudem wird der Hochfrequenzimpuls mehrfach ausgesandt, und die Ergebnisse werden gemittelt, um die Bildqualität zu verbessern. Weitere wichtige Parameter sind die Repetitionszeit (TR), also der Zeitraum zwischen zwei Hochfrequenzimpulsen, und die Echozeit (TE), die den Zeitraum zwischen der Abgabe des Hochfrequenzimpulses und der Messung des Signals beschreibt.

Eine besondere Bedeutung kommt den Sequenztypen zu, wobei im Folgenden ausschließlich die MR-Angiographie beschrieben wird, da diese sich von den zuvor

erläuterten Verfahren unterscheidet. Bei der MR-Angiographie werden Protonen in so kurzen Repetitionszeiten angeregt, dass diese nicht ausreichend Zeit zur vollständigen Relaxation haben. Dadurch entsteht im ortsfesten Gewebe nur ein schwaches Signal. Anders verhält es sich mit dem Blutfluss in den Gefäßen: Hier werden die angeregten Protonen durch die Strömung des Blutes weggeschwemmt, während gleichzeitig nicht angeregte Protonen in den Messbereich gelangen. Dieser Mechanismus erzeugt einen deutlich stärkeren Kontrast im Vergleich zum ortsfesten Gewebe, der detektiert werden kann.

Der Kontrast des Blutflusses kann anschließend mit einer normalen *Spinechosequenzmessung* kombiniert werden. Diese Messung nutzt ausreichend lange Repetitionszeiten, um die zuvor beschriebenen physikalischen Grundlagen vollständig auszunutzen und eine präzise Darstellung des Blutflusses in den Gefäßen zu ermöglichen.

2.4.2 Durchführung

Für die Durchführung einer MRT-Untersuchung der Mauseaorta wurde die Maus zunächst mithilfe eines 1,5-prozentigen Isofluran-Luftgemisches über eine Atemmaske in Hypnose versetzt. Anschließend wurde das Tier im 25-mm-¹H-Resonator platziert, wobei die Körperkerntemperatur konstant bei 37 °C gehalten wurde. Die Atemfrequenz wurde mithilfe eines Luftkissens, das am Rücken der Maus angebracht war, überwacht. Die Maus wurde sorgfältig fixiert und mit dem Resonator in den MR-Tomographen eingeführt.

Die Bildaufnahmen erfolgten bei einer Frequenz von 400,21 MHz für ¹H-Messungen unter Verwendung der *Bruker Microimaging Unit Micro 2.5* mit aktiv abgeschirmten Gradientensets (1,5 T/m). Nach einer axialen Übersichtsaufnahme wurde die Aorta im Längsverlauf über 36 Schnitte dargestellt. Dabei wurden 24 Schnitte oberhalb der rechten Nierenarterie und 12 darunter aufgenommen. Die Aorta wurde zudem in einem *Angio Flash Scan* untersucht. Hierbei betrug die Repetitionszeit (TR) 10.000 ms. Innerhalb eines Sichtfeldes von 2,56 x 2,56 cm² und einer Matrix von 192 x 192 wurden Schnittbilder mit einer Dicke von 0,5 mm über eine Aufnahmezeit von 5 Minuten erstellt.

Nach Abschluss der Bildgebung wurde die Maus aus dem MR-Tomographen entfernt, vom Resonator gelöst und das Isofluran-Luftgemisch abgestellt, um die Hypnose zu

beenden. Das Tier erwachte unter einer Wärmelampe, während es im Käfig beobachtet wurde.

Die anschließende Bestimmung des Schnittvolumens der Aorta wurde mithilfe der Software *Paravision 2.0* durchgeführt.

2.5 Sonographie und Dopplersonographie

2.5.1 Grundlagen der Technologie

Die Sonographie ermöglicht die noninvasive Darstellung von Weichteilstrukturen mithilfe von Ultraschall. Dabei werden hochfrequente Schallwellen durch einen Schallkopf ausgesendet und über ein Schallgel in den Körper geleitet. An Impedanzsprüngen innerhalb und zwischen unterschiedlichen Geweben werden diese Schallwellen teilweise oder vollständig reflektiert. Die reflektierten Schallwellen werden vom Schallkopf empfangen und ausgewertet.

Das Ultraschallgerät berechnet auf Basis der Zeitdifferenz zwischen Aussendung und Empfang der Schallwellen, dem Empfangsort auf dem Schallkopf und der Intensität der reflektierten Schallwellen einen unterschiedlich hellen Bildpunkt. Die Gesamtheit dieser Bildpunkte ergibt ein Ultraschallbild, das einem anatomischen Schnittbild an der Aufsetzstelle des Schallkopfes entspricht. Diese Darstellungsform wird als B-Bild oder *B-Mode* bezeichnet.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, eine einzelne Bildzeile des Ultraschallbildes über die Zeit hinweg darzustellen. Diese Methode wird als *M-Mode* bezeichnet. Wird der *M-Mode* bei der Darstellung eines Gefäßes im Sagittalschnitt rechtwinklig zum Gefäß angelegt und das Gefäß in seiner größten Ausdehnung dargestellt, kann die Verformung (*strain*) der Gefäßwand während des Herzzyklus analysiert werden. Aus dieser Verformung lassen sich Rückschlüsse auf die Dehnbarkeit des Gefäßes und die Druckbelastung innerhalb des Gefäßes ziehen. Für die Berechnung wird folgende Formel verwendet (63,64):

$$\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{\text{Durchmesser}_{\text{Systole}}}{\text{Durchmesser}_{\text{Diastole}}} \right)^2 - 1 \right] * 100 \%$$

Die Dopplersonographie erweitert die herkömmliche Sonographie, indem diese den Dopplereffekt nutzt. Dieser Effekt beschreibt die Veränderung der Laufzeit von Schallwellen, die durch eine Änderung der Entfernung zwischen Sender und

Empfänger während der Aussendung entsteht. Diese Veränderung geht mit einer Frequenzverschiebung Δf einher, die sich aus der Differenz zwischen der ausgesendeten Frequenz f_0 und der empfangenen Frequenz f_e ergibt.

Durch die pulsatile Aussendung von Schallwellen und die Messung von Δf ermöglicht die Dopplersonographie die Bestimmung von Flussrichtung und Strömungsgeschwindigkeit von Flüssigkeiten im Körper. Für die vorliegende Studie wurde diese eingesetzt, um die Blutströmung in aortalen Gefäßen zu analysieren. Die Berechnung der Strömungsgeschwindigkeit hängt vom Beobachtungswinkel α ab, also dem Winkel zwischen den ausgesendeten Schallwellen und der Flussrichtung des Blutes im Gefäß. Für die Berechnung gilt folgende Formel:

$$\Delta f = f_e - f_0 = 2 \cdot f_0 \cdot \frac{V}{C} \cdot \cos(\alpha)$$

Da die Schallgeschwindigkeit C im menschlichen Gewebe etwa 1500 m/s beträgt, kann unter Berücksichtigung des Beobachtungswinkels α die Blutflussgeschwindigkeit V berechnet werden. Die Genauigkeit der Messung ist jedoch stark von $\cos(\alpha) = 1$ abhängig. Bei Beobachtungswinkeln von 90° oder 270° führt $\cos(\alpha)$ zu null, wodurch unabhängig von der tatsächlichen Blutflussgeschwindigkeit das Ergebnis der Berechnung immer null beträgt. Optimale Messungen werden bei Winkeln von 0° oder 180° erreicht, bei denen $\cos(\alpha) = 1$ gilt. Daher wird empfohlen, Beobachtungswinkel von maximal 60° und idealerweise mindestens 45° einzuhalten, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten.

Das Ultraschallgerät ermöglicht durch den Dopplereffekt die Darstellung von Flussrichtung und -geschwindigkeit in zwei zusätzlichen Modi. Im sogenannten *C-Mode* wird die Flussrichtung und -geschwindigkeit innerhalb eines Gefäßes farbkodiert dargestellt, während im *PW-Mode* (Pulswellenmodus) die Flussrichtung und Flussgeschwindigkeit innerhalb eines definierten Messfensters als Diagramm über die Zeit dargestellt werden. Beide Modi eignen sich zur Analyse intravasaler Flussprofile. Um korrekte Darstellungen zu erhalten, müssen die Pulsrepetitionsfrequenz sowie die Sensitivität, das sogenannte *Farbgain* (*Gain*), manuell angepasst werden.

2.5.2 Durchführung

Zur Durchführung der sonographischen Untersuchung der Aorta wurde die Maus initial durch ein dreiprozentiges Isofluran-Luftgemisch in einer Narkosekammer sediert. Im

Anschluss wurde sie auf einem Heiztisch positioniert, während die Anästhesie durch ein 1,5%-iges Isofluran-Luftgemisch über eine Atemmaske aufrechterhalten wurde. Elektrokardiogramm (EKG), Atemfrequenz und Körpertemperatur wurden kontinuierlich mittels an den Extremitäten befestigter Elektroden sowie einer rektal eingeführten Temperatursonde überwacht. Ein Absinken der Körperkerntemperatur wurde durch den Einsatz einer Wärmelampe verhindert.

Zur Vorbereitung der sonographischen Untersuchung wurde die Bauchregion der Maus mit einer Haarentfernungscreme depiliert. Danach wurde die Maus zusammen mit dem Heiztisch in einem Winkel von 30° kopfwärts geneigt. Mit einem 40-MHz-Schallkopf wurde die Aorta zunächst transversal im epigastischen Winkel lokalisiert, dann um 90° im Uhrzeigersinn in eine sagittale Ebene gedreht. Die optimale Darstellung der Aorta wurde durch Anpassung der Bildhelligkeit und Vergrößerung erreicht, woraufhin der Bereich detailliert untersucht wurde.

Im nächsten Schritt wurde der Abschnitt zwischen der *Arteria coeliaca* und der *Arteria mesenterica cranialis* im maximalen Durchmesser dargestellt und ein Bild gespeichert. Dieser Bereich wurde zusätzlich im *M-Mode* abgebildet, wobei die Bildzeile in einem rechten Winkel zum Gefäßverlauf positioniert wurde. Über mehrere Herzzyklen wurde ein Bewegtbild des aortalen Querschnitts im *M-Mode* aufgenommen.

Anschließend wurde die Bildhelligkeit reduziert und der *C-Mode* aktiviert. Ein Messfenster wurde im Bereich zwischen der *Arteria coeliaca* und der *Arteria mesenterica cranialis* platziert, und sowohl die Pulsrepetitionsfrequenz als auch das *Farbgain* wurden so eingestellt, dass die Gefäßdarstellung optimiert war. Auch hier wurden eine Videosequenz aufgenommen und ein Bild gespeichert. Im *PW-Mode* wurde ein Messbereich innerhalb der zuvor genannten Gefäßabgänge festgelegt, sodass die Analyse etwa der Hälfte bis zwei Drittel des Gefäßdurchmessers umfasste. Die Einstellungen für Pulsrepetitionsfrequenz und *Gain* wurden entsprechend angepasst, um den Blutfluss präzise abzuleiten und zu dokumentieren.

Abschließend wurden das Schallgel sowie die rektale Temperatursonde entfernt, und die Maus wurde unter einer Wärmelampe behutsam aus der Hypnose aufgeweckt.

Die Analyse der Parameter wie Durchmesser, *Strain* und Flussgeschwindigkeit wurde mit der Software *VevoLab 5.5.1* durchgeführt.

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Grundlagen der Technologie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse der Größe und Granularität einer großen Zellpopulation. Dabei werden die in einer Flüssigkeit suspendierten Zellen in laminarer Strömung einzeln an Lasern vorbeigeführt, die aus verschiedenen Winkeln auf die Zellen treffen. Diese Laserstrahlen werden gestreut, wodurch Rückschlüsse auf die Zellmorphologie ermöglicht werden.

Die Zellgröße wird mithilfe des Vorwärtstreulichts (*forward scatter*, FSC) ermittelt, während die Granularität der Zellen durch das Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) bestimmt werden kann. Aufgrund der hohen Verarbeitungsgeschwindigkeit, bei der mehrere tausend Zellen pro Sekunde analysiert werden, eignet sich die Methode besonders für die quantitative und semiquantitative Differenzierung großer Zellmengen, beispielsweise von Blutzellen.

Eine Weiterentwicklung der Durchflusszytometrie ist die Fluoreszenzmessung, die unter der Bezeichnung FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) bekannt ist. Hierbei werden Zielstrukturen, häufig über antikörpervermittelte Markierungen, mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Nach der Anregung durch spezifische Laser können die emittierten Signale detektiert werden. Diese Methode ermöglicht eine qualitative Differenzierung der Zellen basierend auf spezifischen Eigenschaften, wie etwa dem Nachweis eines bestimmten Oberflächenmoleküls.

2.6.2 Durchführung

Die Immunzellen der Aorta, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wurden zunächst mit 100 µl MACS-Puffer und einem 1:100 verdünnten FcR-*Blocking*-Reagenz resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl MACS-Puffer hinzugefügt, und die Immunzellen wurden in zwei Röhrchen für die Durchflusszytometrie aufgeteilt. Diese Röhrchen wurden bei 300 G und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung der beiden Zellproben durch Resuspension mit 200 µl eines spezifischen Farbstoff-Antikörper-MACS-Puffers. Optimierte Verdünnungen der Antikörper wurden in Voruntersuchungen etabliert und am Durchflusszytometer kompensiert:

Färbeschema Probe 1		
Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung
CD45	PerCP	1:100
CD11b	PE-Cy7	1:100
CD3	FITC	1:100
B220	APC-Cy7	1:100
F4/80	PE	1:400
CD39	BV510	1:100
CD73	APC	1:100

Färbeschema Probe 2		
Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung
CD45	PerCP	1:100
CD11b	PE-Cy7	1:100
CD3	FITC	1:100
B220	APC-Cy7	1:100
F4/80	PE	1:400
CD38	BV510	1:100

Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Nach der Färbung wurden die Proben drei Waschzyklen unterzogen, bei denen jeweils 250 µl MACS-Puffer hinzugefügt, die Zellen bei 4 °C und 300 G für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen wurden. Im Anschluss daran wurden die Proben mit 250 µl MACS-Puffer und einem 1:1000 verdünnten DAPI versetzt und für 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte anschließend im *Highflow*-Modus des Durchflusszytometers mit einer Flussrate von 120 µl/min für 90 Sekunden. Die Datenauswertung wurde mithilfe der Software *FACSDiva* durchgeführt. Hierbei wurden die Zellzahlen beider Proben addiert. Die *Gatingstrategie* begann mit der Auswahl der DAPI-negativen Zellen, aus denen die CD45-positiven Zellen als Immunzellen identifiziert wurden (siehe Abb. 5). Anschließend wurden die Immunzellen in CD11b-positive und CD11b-negative Zellen unterteilt. Innerhalb der CD11b-positiven Population wurden F4/80-positive Zellen differenziert. In der CD11b-

negativen Population erfolgte die Unterscheidung in CD3-positive und B220-positive Zellen.

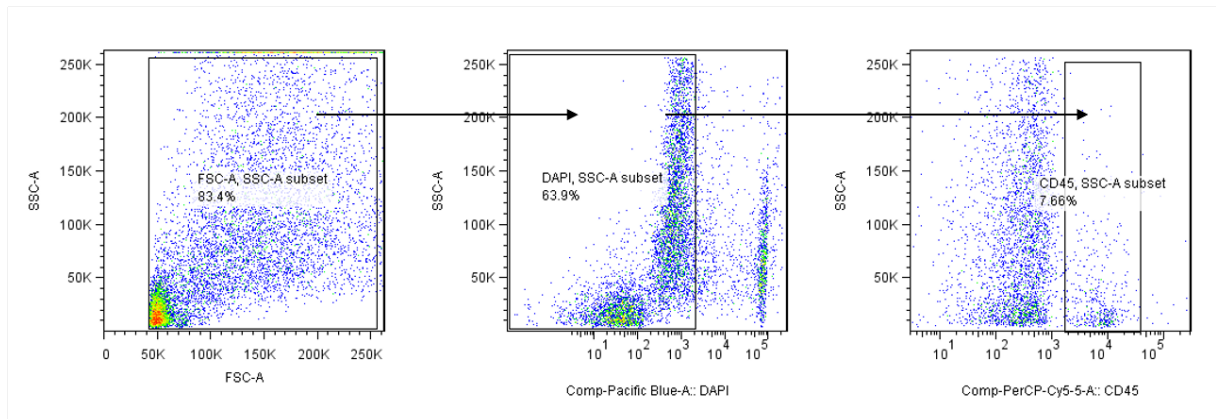


Abb. 5: Repräsentativer Teil der Gatingstrategie aus der Durchflusszytometrie

Die Gesamtzahl der Zellen wurde ermittelt, wobei nekrotische Zellen durch eine DAPI-Färbung identifiziert und ausgeschlossen wurden. Aus der Gruppe der DAPI-negativen Zellen wurden anschließend die CD45-positiven Zellen selektiert und weiter unterteilt: SSC-A, side scatter A; FSC-A, forward scatter A; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; CD45, Cluster of differentiation 45.

2.7 Statistisches Vorgehen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software *GraphPad Prism*. Untersucht wurden verschiedene Werte in Bezug auf die Variablen genetischer Hintergrund, Angiotensin-II-Behandlung und Alter. Da die Stichproben unabhängig waren, wurden Unterschiede zunächst durch den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Normalverteilte Daten wurden bei einem zweistufigen Aufbau mit dem *Student's t-Test* analysiert, während bei mehr als zwei Stufen eine einfaktorielle Varianzanalyse (*oneway-ANOVA*) durchgeführt wurde. Nichtnormalverteilte Daten wurden bei einem zweistufigen Aufbau mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht, während bei mehr als zwei Stufen der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung kam. Für Mehrfachtestungen wurde der *Dunn's multiple comparisons test* als *post-hoc*-Test verwendet. Ergebnisse wurden als signifikant (*) betrachtet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) war. Sehr signifikante Ergebnisse (**) lagen vor, wenn der p-Wert kleiner als 0,01 ($p < 0,01$) war, und hoch signifikante Ergebnisse (***) wurden bei einem p-Wert kleiner als 0,001 ($p < 0,001$) festgestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des zehntägigen Angiotensin II-Modells

Im Rahmen der Methodenetablierung wurde untersucht, ob das verwendete Mausmodell mit zehntägiger Angiotensin-II-Stimulation für die Beantwortung der Forschungsfrage geeignet ist. Dazu wurden Experimente durchgeführt, die die Auslösung einer subklinischen Entzündung sowie den Einfluss von Angiotensin II auf die Expression relevanter Enzyme des extrazellulären Purinstoffwechsels analysierten.

3.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Immunzellen in der Aortenwand

Eine akute und lokale Entzündungsreaktion wird klassischerweise durch die Kardinalsymptome *Rubor* (Rötung), *Calor* (Überwärmung), *Dolor* (Schmerz), *Tumor* (Schwellung) und *Functio laesa* (eingeschränkte Funktion) charakterisiert. Diese Symptome beruhen auf adaptiven Prozessen des Organismus, die der Bekämpfung von Entzündungsauslösern, wie Bakterien oder Parasiten, dienen und häufig mit einer Einwanderung von Immunzellen in das betroffene Gewebe einhergehen. Die lokale Zunahme von Immunzellen dient daher als indirekter Marker für Entzündungen innerhalb eines Gewebes.

Zur Überprüfung, ob die zehntägige Angiotensin-II-Stimulation eine Entzündung auslöst, wurden juvenile (3 Monate alte) und adulte (6 Monate alte) Mäuse mit oder ohne Angiotensin-II-Stimulation untersucht. Nach Spülung des Blutgefäßlumens zur Entfernung von Blut wurde das Gewebe der Aortenwand mithilfe des *GentleMACS*-Systems und unter Zugabe des *Tumor Dissociation Kits* verdaut (siehe Kapitel 2.3.3). Die Anzahl der daraus freigesetzten Immunzellen wurde anschließend nach DAPI- und CD45-Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abb. 6).

Die Ergebnisse zeigten hochsignifikante Unterschiede. Bei juvenilen Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation ($n = 31$) wurden durchschnittlich 1671 ± 1307 Immunzellen gemessen. Dagegen wurden bei juvenilen Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation ($n = 24$) signifikant mehr Immunzellen, nämlich 3031 ± 1727 , nachgewiesen (Mann-Whitney-U-Test, $U = 165$, $p = 0,0003$). Bei adulten Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation ($n = 18$) wurden im Durchschnitt $1134 \pm 695,9$ Immunzellen gemessen, während bei adulten Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation ($n = 21$) die Anzahl mit

2852 ± 1669 Immunzellen mehr als doppelt so hoch war (Mann-Whitney-U-Test, $U = 52$, $p < 0,0001$).

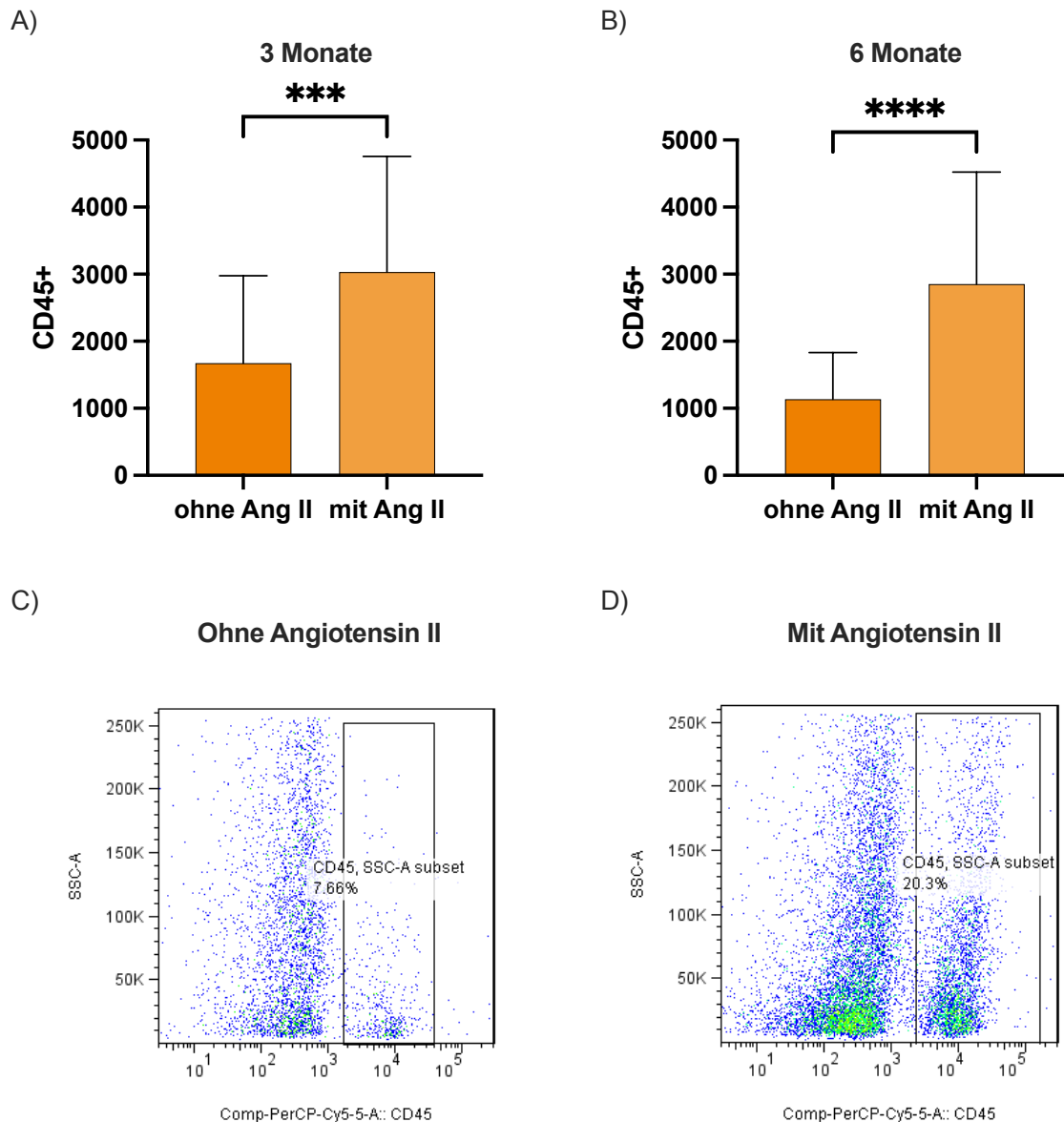


Abb. 6: Immunzellen in der Aortenwand juveniler und adulter Mäuse mit und ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 6 ist die Anzahl aller lebenden Immunzellen (DAPI-negativ, CD45-positiv) dargestellt, die aus der Aortenwand extrahiert wurden. A) Bei den juvenilen Mäusen (3 Monate) zeigt sich unter Angiotensin-II-Stimulation eine hochsignifikante Verdoppelung der Immunzellzahl im Vergleich zu den Mäusen ohne Stimulation. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 24-31$ pro Subgruppe. B) Auch bei den adulten Mäusen (6 Monate) führt die Angiotensin-II-Stimulation zu einer hochsignifikanten Verdoppelung der Immunzellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Stimulation. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 18-21$ pro Subgruppe. C) Die beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Auswertung einer 3 Monate alten Maus ohne Angiotensin-II-Stimulation verdeutlicht die Ausgangssituation ohne Stimulation. D) Im Vergleich dazu zeigt die

durchflusszytometrische Auswertung einer 3 Monate alten Maus mit Angiotensin-II-Stimulation eine deutliche Zunahme der CD45-positiven Zellen. SSC-A, side scatter A.

3.1.2 Charakterisierung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT

Nachdem durch die zehntägige Angiotensin-II-Stimulation eine Entzündung nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob diese Entzündung mit strukturellen Veränderungen an der Aorta einhergeht. Ein Beispiel hierfür wäre ein Aortenaneurysma, das durch eine entzündungsbedingte Durchmesserzunahme von 50 % des normalen Durchmessers definiert ist (16). Dies entspricht einer rechnerischen Flächenzunahme von etwa 125 %.

Um solche strukturellen Veränderungen zu detektieren, wurden von den Aorten juveniler und adulter Mäuse mit und ohne Angiotensin-II-Stimulation *in vivo* transversale MRT-Aufnahmen angefertigt. Die Schichtdicke betrug 0,5 mm. Insgesamt wurden 36 Schnittbilder ausgewertet, davon 12 Schnitte kaudal der unteren Nierenarterie und 24 Schnitte kranial. In jedem Schnitt wurde das durchflossene Lumen bestimmt, aus dessen Werten die mittlere Fläche pro Aorta berechnet wurde (siehe Abb. 7). Bei den juvenilen Mäusen zeigte sich eine signifikant größere mittlere Aortenfläche unter Angiotensin-II-Stimulation. Konkret betrug die mittlere Aortenfläche bei juvenilen Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation ($n = 17$) $1,19 \pm 0,19 \text{ mm}^2$, während sie bei juvenilen Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation ($n = 17$) $1,34 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ betrug (t-Test, $t(2,494) = 32$, $p = 0,0180$). Dies entspricht einer Flächenzunahme von etwa 12 %.

Bei den adulten Mäusen zeigte sich hingegen kein signifikanter Anstieg der mittleren Aortenfläche. Die mittlere Aortenfläche betrug bei adulten Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation ($n = 21$) $1,26 \pm 0,233 \text{ mm}^2$, während diese bei adulten Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation ($n = 15$) bei $1,29 \pm 0,299 \text{ mm}^2$ lag (Mann-Whitney-U-Test, $U = 135$, $p = 0,4851$).

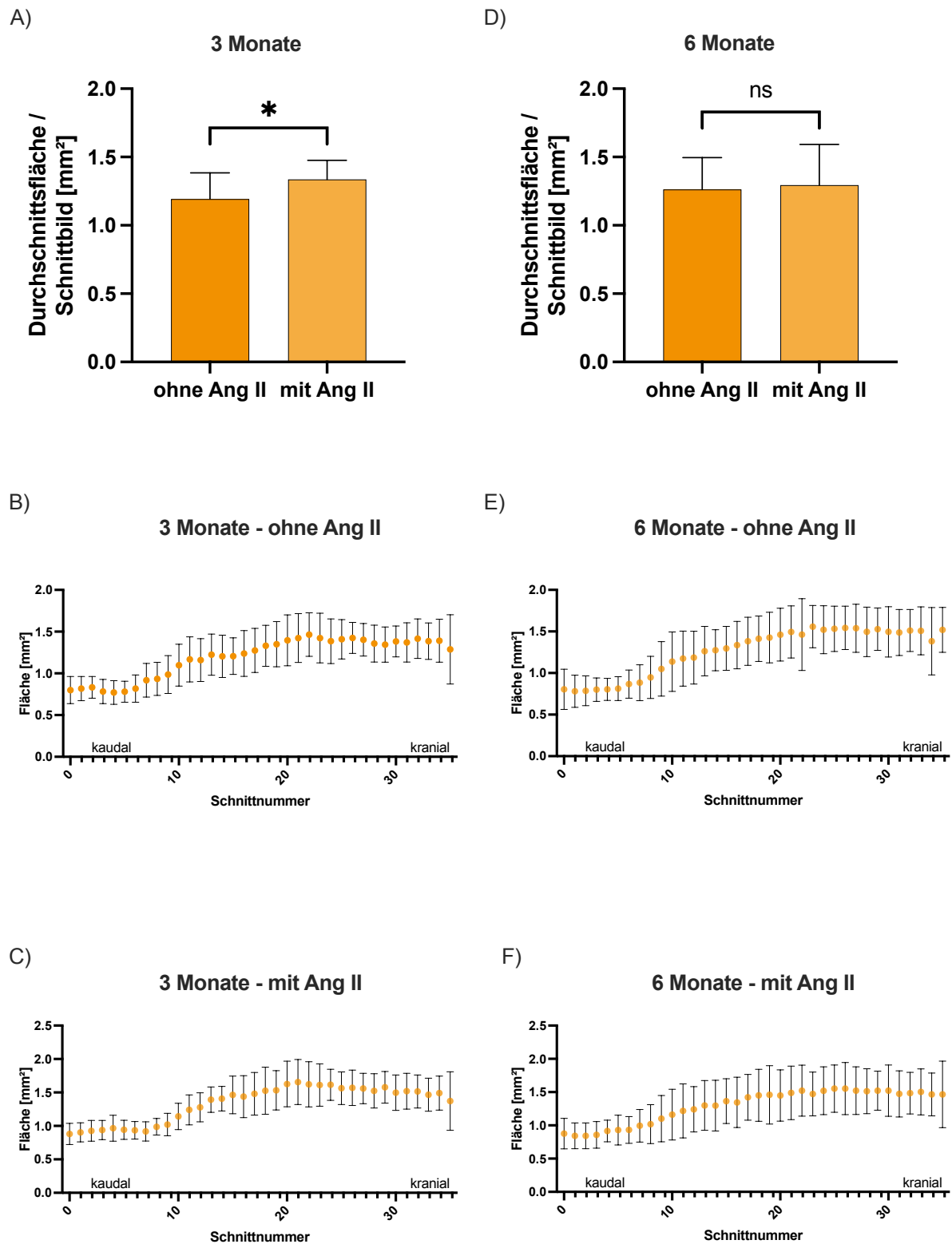


Abb. 7: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei juvenilen und adulten Mäusen mit und ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 7 sind die mittlere Aortenfläche sowie der Flächenverlauf des aortalen Lumens dargestellt, die bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen mit und ohne Angiotensin-II-Stimulation (Ang II) mithilfe von MRT ermittelt wurden.

A) Bei juvenilen Mäusen führte die Angiotensin-II-Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der mittleren Fläche des durchflossenen Lumens. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 17$ pro Subgruppe.

B) – C) Der Flächenverlauf des Aortenlumens bei juvenilen Mäusen veranschaulicht ein anatomisches Verständnis des Gefäßverlaufs. Suprarenal und juxtrarenal ist die Fläche größer, während sie sich infrarenal verjüngt. Mittelwert und Standardabweichung pro Schnittnummer, $n = 17$ pro Subgruppe.

D) Bei adulten Mäusen führte die Angiotensin-II-Stimulation zu einem milden, jedoch nicht signifikanten Anstieg der mittleren Aortenfläche. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 15-21$ pro Subgruppe.

E) – F) Der Flächenverlauf des Aortenlumens bei adulten Mäusen zeigt ebenfalls eine infrarenale Verjüngung, jedoch mit einer breiteren Streuung der Werte. Mittelwert und Standardabweichung pro Schnittnummer, $n = 15-21$ pro Subgruppe. mm^2 , Quadratmillimeter.

3.1.3 Charakterisierung des *Strains* der Aorta juveniler Mäuse mittels Ultraschalls

Da bei juvenilen Mäusen eine signifikante morphologische Veränderung festgestellt wurde, sollte geprüft werden, ob die Entzündung ursächlich für diese Veränderung ist. Morphologische Veränderungen des Gefäßlumens im Zusammenhang mit der Aneurysmenentstehung werden durch eine entzündungsbedingte Zerstörung elastischer Fasern in der Gefäßwand verursacht. Dies führt zu einer Reduktion der Elastizität der Gefäßwand und einer Ausdünnung der *Tunica media*.

Um die Gefäßelastizität zu beurteilen, wurde bei juvenilen Mäusen mit und ohne Angiotensin-II-Stimulation die Elastizität der aortalen Gefäßwand zwischen der *A. coeliaca* und der *A. mesenterica cranialis* als dimensionslose Einheit *Strain* mithilfe von Ultraschall bestimmt (siehe Abb. 8). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Bei juvenilen Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation ($n = 24$) betrug der Strain $0,17 \pm 0,11$, während dieser bei juvenilen Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation ($n = 23$) $0,16 \pm 0,09$ betrug (t-Test, $t(0,3512) = 4$, $p = 0,7271$).

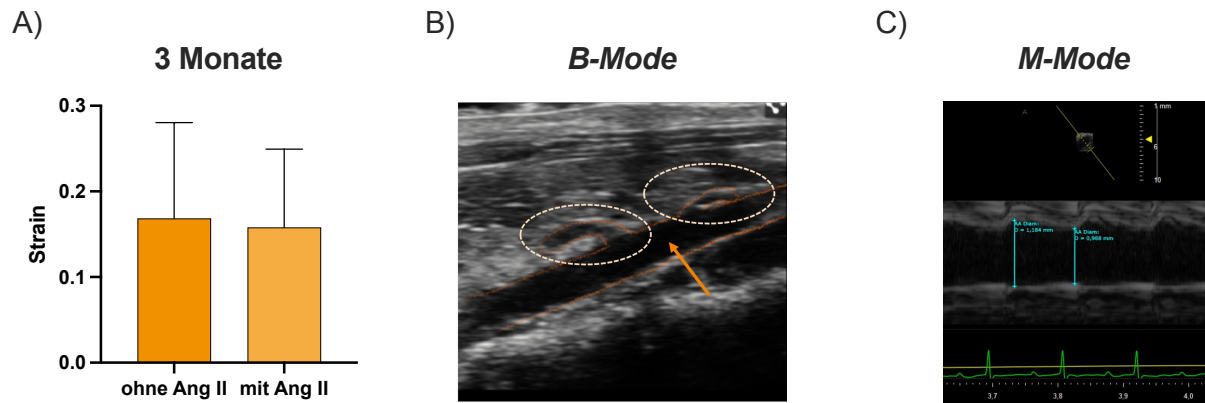


Abb. 8: Gefäßelastizitätsmessung bei juvenilen Mäusen mit und ohne Angiotensin II-Stimulation

A) Die Elastizität der Aortenwand bei juvenilen Mäusen (3 Monate) wurde mittels Ultraschall als Strain bestimmt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Rückgang der Gefäßelastizität. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 23\text{--}24$ pro Subgruppe.

B) Ein beispielhaftes Ultraschallbild (B-Mode) zeigt die Aorta und ihre im Bild sichtbaren Abgänge (orange Linie). Die Messstelle (orangener Pfeil) ist zwischen der A. coeliaca (linke gestrichelte Umkreisung) und der A. mesenterica cranialis (rechte gestrichelte Umkreisung) hervorgehoben. In diesem Bereich wurden sowohl die Gefäßelastizitätsmessung als auch die Flussgeschwindigkeitsmessung mittels Farbdoppler durchgeführt.

C) Der M-Mode des Ultraschallbildes stellt eine Bildzeile des Ultraschallbildes über die Zeit dar. Durch die gleichzeitige Erfassung der Herzerregungsausbreitung mittels EKG konnten die Phasen der Systole und Diastole identifiziert werden. Die Maximal- und Minimalausdehnung wurden gemessen, um den Strain zu berechnen.

3.2 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse ohne Angiotensin II-Stimulation

Das Alter stellt einen wichtigen Risikofaktor für zahlreiche Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar, da mit zunehmendem Alter die Immunseneszenz fortschreitet und die Gefäßgesundheit abnimmt. Gleichzeitig ist das Altern ein unvermeidbarer und für das Individuum wünschenswerter Prozess, da es mit einem Zugewinn an Lebenszeit verbunden ist. Angesichts der Unvermeidbarkeit des Alterns ist es sinnvoll, dessen Auswirkungen auf den Organismus zu untersuchen, um altersbedingte Anpassungsprozesse positiv beeinflussen zu können.

Nachdem die Modelleignung der Angiotensin-II-Stimulation zur Induktion einer subklinischen Entzündung nachgewiesen wurde, erfolgte eine Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse ohne entzündlichen Stimulus. Dabei wurden die Aortenmorphologie anhand der mittleren Aortenfläche, die Aortenfunktion durch die

intravasale Blutflussgeschwindigkeit und die immunologische Aktivität durch die Anzahl der Immunzellen in der Aortenwand untersucht.

3.2.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT

Zur Untersuchung der Aortenmorphologie wurden *in vivo* transversale MRT-Aufnahmen der Aorten juveniler und adulter Mäuse ohne Angiotensin-II-Stimulation mit einer Schichtdicke von 0,5 mm angefertigt. Insgesamt wurden 36 Schnittbilder ausgewertet, davon 12 Schnitte kaudal der unteren Nierenarterie und 24 Schnitte kranial. In jedem Schnitt wurde das durchflossene Lumen bestimmt, aus dem die mittlere Fläche pro Aorta berechnet wurde (siehe Abb. 9). Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied in der mittleren Aortenfläche zwischen juvenilen und adulten Mäusen. Bei juvenilen Mäusen ($n = 21$) betrug die mittlere Aortenfläche $0,9682 \pm 0,5050 \text{ mm}^2$. Im Vergleich dazu wiesen adulte Mäuse ($n = 21$) eine um 30 % größere mittlere Aortenfläche von $1,26 \pm 0,23 \text{ mm}^2$ auf (t-Test, $t(2,426) = 40$, $p = 0,0199$).

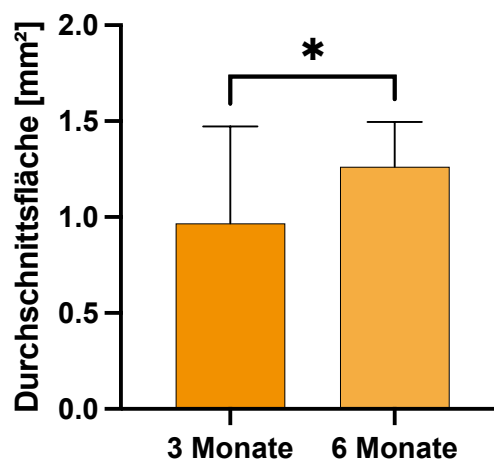


Abb. 9: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei juvenilen und adulten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 9 sind die mittlere Aortenfläche und der Flächenverlauf des aortalen Lumens dargestellt, die bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation mithilfe von MRT erhoben wurden. Bereits vor der Angiotensin-II-Stimulation wiesen adulte Mäuse eine signifikant größere mittlere Aortenfläche im durchflossenen Lumen auf. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 21$ pro Subgruppe. mm^2 , Quadratmillimeter.

3.2.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls

Zur funktionellen Untersuchung wurde die Blutflussgeschwindigkeit in der Aorta von juvenilen und adulten Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation zwischen der *A. coeliaca* und der *A. mesenterica cranialis* mittels Dopplersonographie untersucht. Dabei wurden aus der abgeleiteten Flusskurve die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$), die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) und die Minimalflussgeschwindigkeit ($V_{\min}$) bestimmt (siehe Abb. 10). Die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$) war bei juvenilen Mäusen sehr signifikant höher und zeigte eine etwa 29-prozentige Differenz. Sie lag bei juvenilen Mäusen ($n = 25$) bei $646,8 \pm 154,5$ cm/s und bei adulten Mäusen ($n = 20$) bei $501,9 \pm 188,4$ cm/s (t-Test, $t(2,837) = 43$, $p = 0,0069$). Auch die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) war bei juvenilen Mäusen signifikant höher, mit einer etwa 24-prozentigen Differenz. Sie lag bei juvenilen Mäusen ($n = 25$) bei $297,5 \pm 69,38$ cm/s und bei adulten Mäusen ($n = 20$) bei $240,6 \pm 97,22$ cm/s (t-Test, $t(2,290) = 43$, $p = 0,0270$).

Die Minimalflussgeschwindigkeit ($V_{\min}$) zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Diese lag bei juvenilen Mäusen ($n = 25$) bei $109,6 \pm 57,31$ cm/s und bei adulten Mäusen ($n = 20$) bei $121,0 \pm 58,76$ cm/s (t-Test, $t(0,6545) = 43$, $p = 0,5163$).

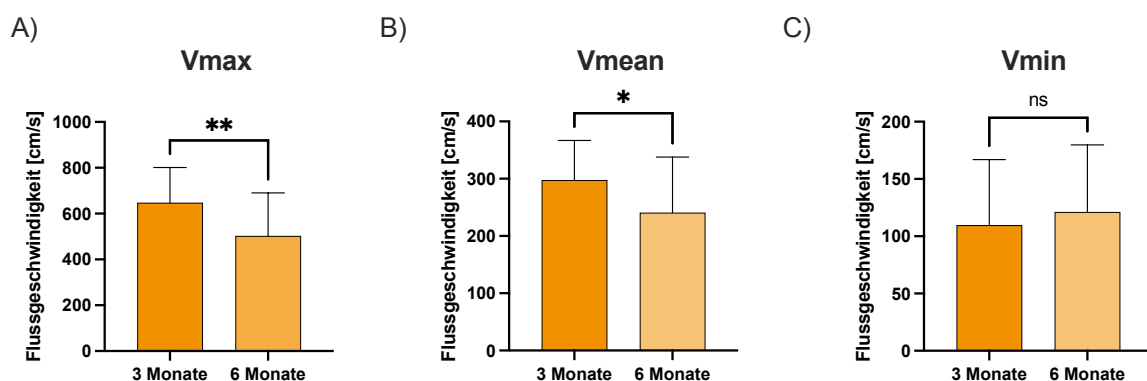


Abb. 10: Verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Aorta bei juvenilen und adulten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 10 sind verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Aorta juveniler (3 Monate) und adulter (6 Monate) Mäuse ohne Angiotensin-II-Stimulation dargestellt.

A) Die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$) war bei juvenilen Mäusen sehr signifikant höher als bei adulten Mäusen. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 20-25$ pro Subgruppe.

B) Auch die Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{mean}) war bei juvenilen Mäusen signifikant höher als bei adulten Mäusen. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 20-25$ pro Subgruppe.

C) Die Minimalflussgeschwindigkeit (V_{min}) zeigte zwischen juvenilen und adulten Mäusen keine signifikanten Unterschiede. Dennoch war die Flussgeschwindigkeit bei adulten Mäusen tendenziell um 10 % niedriger. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 20-25$ pro Subgruppe cm/s, Zentimeter pro Sekunde.

3.2.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der immunologischen Aktivität wurden Aorten juveniler und adulter Mäuse entnommen, nachdem deren intraluminale Blutbestandteile entfernt worden waren. Das Aortenwandgewebe wurde anschließend mithilfe des *GentleMacs*-Systems und des *Tumor Dissociation Kits* zerkleinert und zersetzt (siehe Kapitel 2.3.3). Die dabei freigesetzten Immunzellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Für die Analyse wurden ausschließlich DAPI-negative Zellen berücksichtigt (siehe Abb. 11). In keiner der untersuchten Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Immunzellzahl, wenngleich die Werte bei juvenilen Mäusen tendenziell höher waren, mit Ausnahme der F4/80-positiven Makrophagen. Die Gesamtimmunzellzahl lag bei juvenilen Mäusen ($n = 31$) bei 1671 ± 1307 , während sie bei adulten Mäusen ($n = 18$) bei $1134 \pm 695,9$ lag (Mann-Whitney-U-Test, $U = 211$, $p = 0,1631$).

Die Lymphozytenzahl war bei juvenilen Mäusen ($n = 31$) mit $589,9 \pm 585,5$ höher als bei adulten Mäusen ($n = 18$) mit $347,7 \pm 243,5$ (Mann-Whitney-U-Test, $U = 190$, $p = 0,0653$). Die Zahl der T-Zellen betrug bei juvenilen Mäusen ($n = 31$) $285,9 \pm 383,9$, während sie bei adulten Mäusen ($n = 19$) $200,5 \pm 151,6$ betrug (Mann-Whitney-U-Test, $U = 271$, $p = 0,6452$).

Die B-Zellen waren bei juvenilen Mäusen ($n = 31$) mit $96,35 \pm 196,5$ leicht höher als bei adulten Mäusen ($n = 18$) mit $76,94 \pm 51,42$ (Mann-Whitney-U-Test, $U = 242,5$, $p = 0,4559$). Myeloische Zellen lagen bei juvenilen Mäusen ($n = 31$) bei $954,1 \pm 884,6$ und bei adulten Mäusen ($n = 19$) bei $757,9 \pm 589,7$ (Mann-Whitney-U-Test, $U = 266$, $p = 0,5791$).

Die Zahl der F4/80-positiven Makrophagen zeigte hingegen bei adulten Mäusen ($n = 18$) mit $93,61 \pm 123,7$ höhere Werte als bei juvenilen Mäusen ($n = 31$) mit $84,29 \pm 83,66$ (Mann-Whitney-U-Test, $U = 234$, $p = 0,3568$).

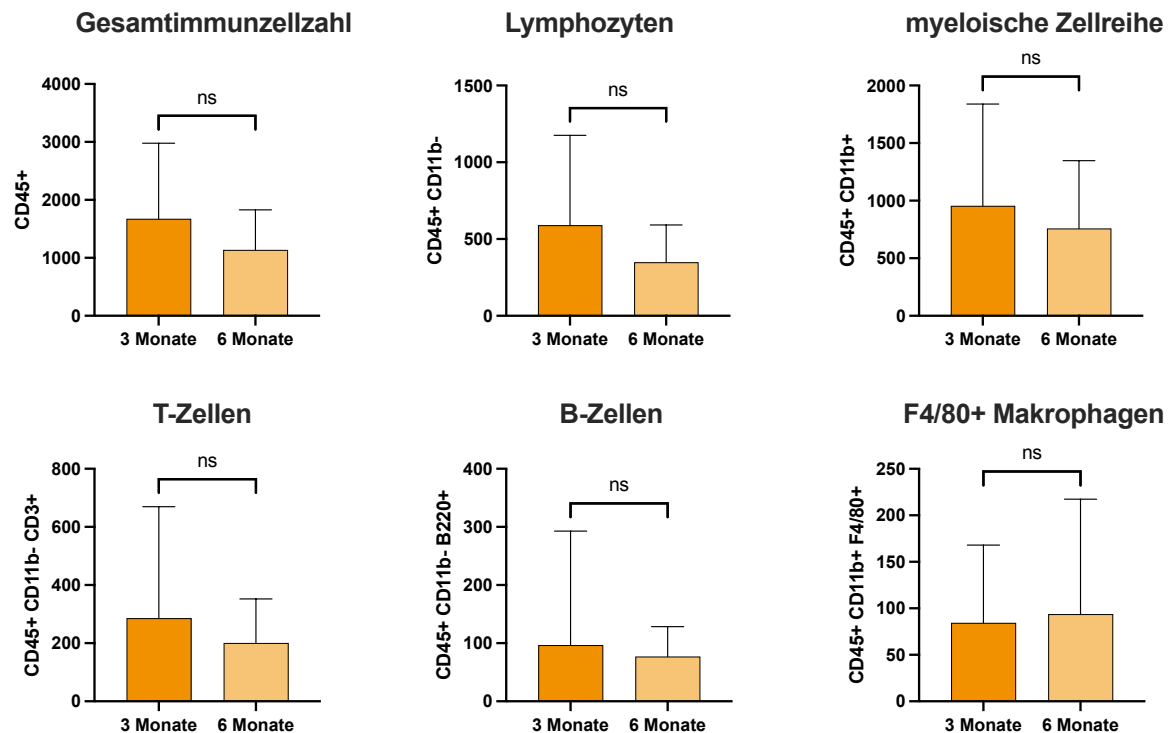


Abb. 11: Verschiedene Immunzellgruppen in der Aortenwand juveniler und adulter Mäuse ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 11 sind die Gesamtimmunzellzahl (DAPI-negativ, CD45-positiv), die Lymphozyten (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ), die myeloische Zellreihe (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv), T-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, CD3-positiv), B-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, B220-positiv) sowie F4/80-positive Makrophagen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv) bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation dargestellt. In keiner der Immunzellgruppen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden.

3.3 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse mit Angiotensin II-Stimulation

Nachdem in den ohne Angiotensin-II-Stimulation durchgeführten Untersuchungen morphologische und funktionelle Unterschiede, jedoch keine immunologischen Unterschiede zwischen juvenilen und adulten Mäusen identifiziert wurden, erfolgte im nächsten Schritt die Charakterisierung der Mäuse unter Angiotensin-II-Stimulation.

3.3.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT

Auch bei dieser Untersuchung wurde zunächst die Morphologie der Aorta betrachtet. Hierzu wurden *in vivo* transversale MRT-Aufnahmen der Aorten von juvenilen und

adulten Mäusen unter Angiotensin-II-Stimulation angefertigt. Die Schichtdicke der Aufnahmen betrug 0,5 mm. Ausgewertet wurden insgesamt 36 Schnittbilder, darunter 12 Schnitte kaudal der unteren Nierenarterie und 24 Schnitte kranial, wobei jeweils das durchflossene Lumen bestimmt wurde. Aus den Daten wurde die mittlere Fläche pro Aorta berechnet (siehe Abb. 12). Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied in der mittleren Aortenfläche zwischen juvenilen und adulten Mäusen nach der Angiotensin-II-Stimulation. Bei juvenilen Mäusen ($n = 17$) betrug die mittlere Aortenfläche $1,34 \pm 0,14 \text{ mm}^2$, während diese bei adulten Mäusen ($n = 15$) $1,29 \pm 0,30 \text{ mm}^2$ betrug (t-Test, $t(0,5184) = 30$, $p = 0,6080$).

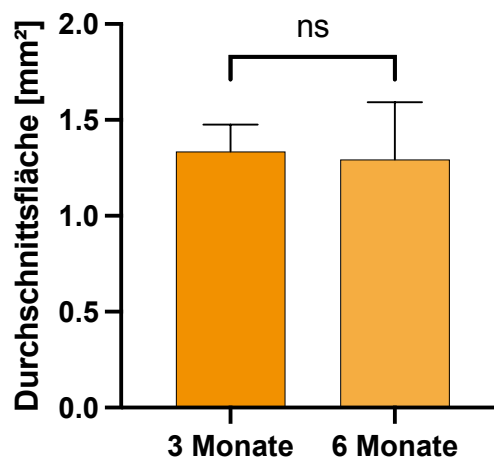


Abb. 12: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei juvenilen und adulten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 12 sind die mittlere Aortenfläche und der Flächenverlauf des aortalen Lumens dargestellt, die bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation mittels MRT erhoben wurden. Nach der Angiotensin-II-Stimulation zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den juvenilen und adulten Mäusen. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 15-17$. mm^2 , Quadratmillimeter.

3.3.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls

Zur funktionellen Charakterisierung wurde erneut die Flussgeschwindigkeit des Blutes in der Aorta von juvenilen und adulten Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation zwischen der *A. coeliaca* und der *A. mesenterica cranialis* mittels Dopplersonographie untersucht. Aus der abgeleiteten Flusskurve wurden die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$), die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) und die Minimalflussgeschwindigkeit

($V_{\min}$) bestimmt. Bei allen Parametern konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Abb. 13).

Die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$) lag bei juvenilen Mäusen ($n = 23$) bei $436,9 \pm 177,4$ cm/s, während sie bei adulten Mäusen ($n = 21$) $500,4 \pm 264,7$ cm/s betrug (Mann-Whitney-U-Test, $U = 224$, $p = 0,6925$). Die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) betrug bei juvenilen Mäusen ($n = 23$) $201,2 \pm 82,53$ cm/s, während sie bei adulten Mäusen ($n = 21$) $230,7 \pm 115,0$ cm/s betrug (Mann-Whitney-U-Test, $U = 216$, $p = 0,5606$).

Die Minimalflussgeschwindigkeit ($V_{\min}$) lag bei juvenilen Mäusen ($n = 23$) bei $85,46 \pm 32,17$ cm/s, während sie bei adulten Mäusen ($n = 21$) $90,73 \pm 48,59$ cm/s betrug (Mann-Whitney-U-Test, $U = 230$, $p = 0,7981$).

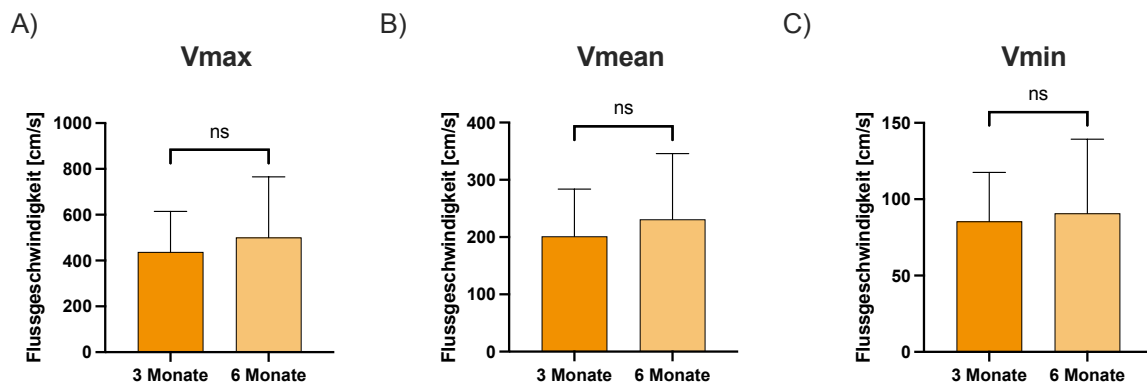


Abb. 13: Verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Aorta bei juvenilen und adulten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 13 sind verschiedene Flussgeschwindigkeiten in der Aorta juveniler (3 Monate) und adulter (6 Monate) Mäuse mit Angiotensin-II-Stimulation dargestellt. A) – C) Weder die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$), noch die Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{mean}), noch die Minimalflussgeschwindigkeit ($V_{\min}$) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 21\text{--}23$ pro Subgruppe.

3.3.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der immunologischen Aktivität wurden erneut Aorten juveniler und adulter Mäuse mit Angiotensin-II-Stimulation entnommen, nachdem diese von intraluminalen Blutbestandteilen befreit worden waren. Das Aortenwandgewebe wurde mithilfe des *GentleMacs*-Systems und des *Tumor Dissociation Kits* zerkleinert und zersetzt (siehe Kapitel 2.3.3). Die dabei freigesetzten Immunzellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und in der Durchflusszytometrie

quantifiziert (siehe Abb. 14). Bezüglich der Gesamtimmunzellzahl konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Juvenile Mäuse ($n = 24$) wiesen eine Zellzahl von 3031 ± 1727 auf, während adulte Mäuse ($n = 21$) eine Zellzahl von 2852 ± 1669 zeigten (Mann-Whitney-U-Test, $U = 231$, $p = 0,6441$).

Im Bereich der Lymphozyten zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede. Juvenile Mäuse ($n = 24$) wiesen mit $820,4 \pm 665,8$ signifikant weniger Zellen auf als adulte Mäuse ($n = 21$), deren Zellzahl etwa 61 % höher bei 1317 ± 1019 lag (Mann-Whitney-U-Test, $U = 158$, $p = 0,0324$). Dieser Unterschied war sowohl bei den T-Zellen als auch bei den B-Zellen nachweisbar.

Bei den T-Zellen zeigten juvenile Mäuse ($n = 24$) eine Zellzahl von $324,2 \pm 388,8$, die signifikant niedriger war als bei adulten Mäusen ($n = 21$) mit $475,2 \pm 324,2$ (Mann-Whitney-U-Test, $U = 153$, $p = 0,0236$).

Bei den B-Zellen wiesen juvenile Mäuse ($n = 24$) mit $107,6 \pm 117,5$ signifikant weniger Zellen auf als adulte Mäuse ($n = 21$), deren Zellzahl etwa anderthalbfach höher bei $270 \pm 254,7$ lag (Mann-Whitney-U-Test, $U = 123$, $p = 0,0028$).

In der myeloischen Zellreihe zeigte sich ein entgegengesetzter Trend. Juvenile Mäuse ($n = 24$) wiesen mit 2104 ± 1252 sehr signifikant mehr Zellen auf als adulte Mäuse ($n = 21$) mit 1395 ± 1013 (Mann-Whitney-U-Test, $U = 152$, $p = 0,0225$).

Dieser Effekt war auch bei den F4/80-positiven Makrophagen zu beobachten. Juvenile Mäuse ($n = 24$) wiesen mit $232,1 \pm 233,5$ etwa zweieinhalbfach mehr Zellen auf als adulte Mäuse ($n = 21$) mit $65,52 \pm 86,15$ (Mann-Whitney-U-Test, $U = 129,5$, $p = 0,0046$).

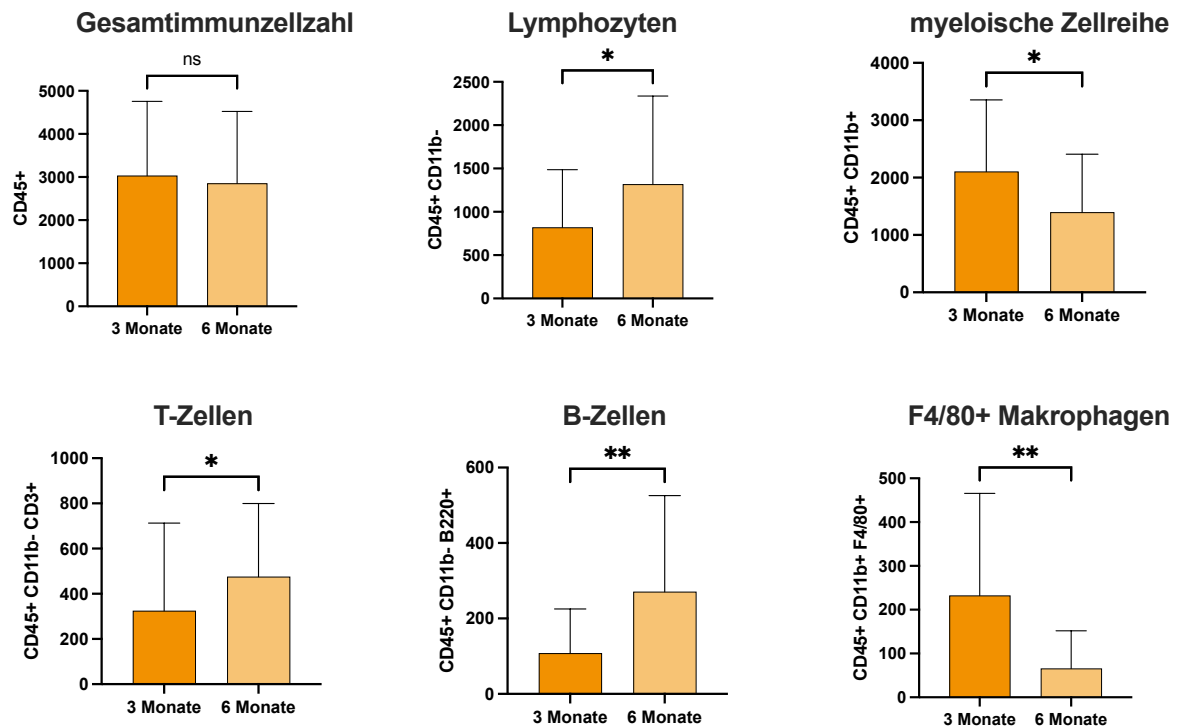


Abb. 14: Immunzellzahl in der Aortenwand von juvenilen und adulten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 14 sind die Gesamtimmunzellzahl (DAPI-negativ, CD45-positiv) dargestellt, die Lymphozyten (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ), die myeloische Zellreihe (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv), T-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, CD3-positiv), B-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, B220-positiv) sowie F4/80-positive Makrophagen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv) bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen mit Angiotensin-II-Stimulation. Juvenile Mäuse wiesen signifikant weniger Zellen bei den Lymphozyten sowie den Subpopulationen der T- und B-Zellen auf, jedoch eine signifikant höhere Zellzahl in der myeloischen Zellreihe und bei F4/80-positiven Makrophagen. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 21-24$ pro Subgruppe.

3.4 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse mit und ohne CD73-Defizienz ohne Angiotensin II-Stimulation

Eine CD73-Defizienz wird in zahlreichen Publikationen als proinflammatorischer genetischer Hintergrund beschrieben. Nachdem juvenile und adulte Mäuse mit und ohne Angiotensin-II-Stimulation charakterisiert worden waren, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob und inwieweit eine CD73-Defizienz altersabhängige Auswirkungen auf die Angiotensin-II-Reaktion zeigt.

3.4.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT

Zur Untersuchung der Aortenmorphologie juveniler und adulter Mäuse mit und ohne CD73-Defizienz ohne Angiotensin-II-Stimulation wurden *in vivo* transversale MRT-Aufnahmen mit einer Schichtdicke von 0,5 mm angefertigt. Insgesamt wurden 36 Schnittbilder ausgewertet, darunter 12 Schnitte kaudal der unteren Nierenarterie und 24 Schnitte kranial. Das durchflossene Lumen wurde in jedem Schnitt bestimmt, und daraus wurde die mittlere Fläche pro Aorta berechnet (siehe Abb. 15). Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) betrug die mittlere Aortenfläche $1,18 \pm 0,19 \text{ mm}^2$, während CD73-defiziente juvenile Mäuse ($n = 8$) eine mittlere Fläche von $1,21 \pm 0,21 \text{ mm}^2$ aufwiesen.

Adulte Mäuse ohne CD73-Defizienz ($n = 13$) wiesen eine mittlere Aortenfläche von $1,25 \pm 0,21 \text{ mm}^2$ auf, während adulte CD73-defiziente Mäuse ($n = 8$) eine mittlere Fläche von $1,28 \pm 0,28 \text{ mm}^2$ zeigten (oneway-ANOVA, $F(3,34) = 0,3611$, $p = 0,7815$).

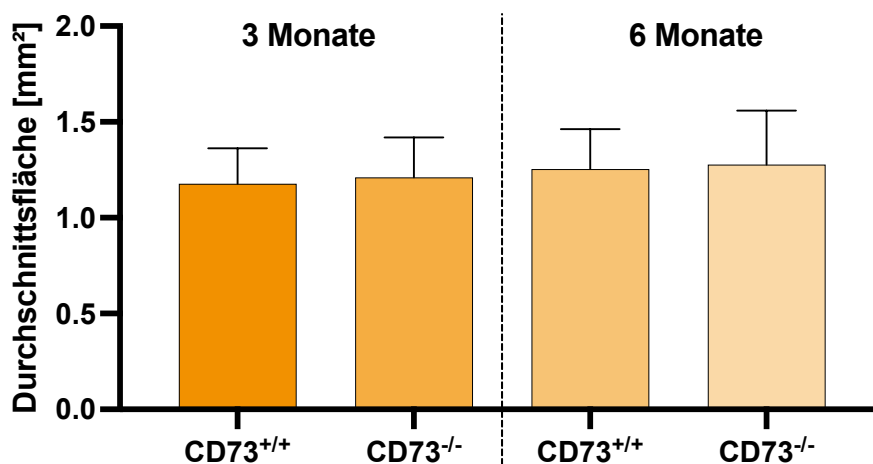


Abb. 15: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 15 sind die mittlere Aortenfläche und der Flächenverlauf des aortalen Lumens dargestellt, die bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen sowohl ohne CD73-Defizienz (CD73^{+/+}) als auch CD73-defizient (CD73^{-/-}) ohne Angiotensin-II-Stimulation mittels MRT erhoben wurden. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 15-17$. mm^2 , Quadratmillimeter.

3.4.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls

Zur funktionalen Charakterisierung wurde die Flussgeschwindigkeit des Blutes in der Aorta von juvenilen und adulten Mäusen mit und ohne CD73-Defizienz ohne Angiotensin-II-Stimulation zwischen der *A. coeliaca* und der *A. mesenterica cranialis* mittels Dopplersonographie untersucht (siehe Abb. 16). Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied bei der Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$) (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 10,32$, $p = 0,0160$). Die *post-hoc*-Analyse mittels *Dunn's multiple comparisons test* zeigte, dass dieser Unterschied auf den Vergleich der juvenilen Mäuse ohne CD73-Defizienz mit den adulten CD73-defizienten Mäusen zurückzuführen war ($p = 0,0173$), während alle anderen *post-hoc*-Vergleiche keine Signifikanz zeigten. Die übrigen Parameter, darunter die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) und die Minimalflussgeschwindigkeit ($V_{\min}$), blieben ohne signifikante Unterschiede, mit p-Werten zwischen $p = 0,0876$ und $p = 0,9869$.

Die Maximalflussgeschwindigkeit lag bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz bei $673,7 \pm 104,7$ cm/s und bei adulten CD73-defizienten Mäusen bei $484,2 \pm 135,3$ cm/s. Die mittlere Flussgeschwindigkeit betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz $309,7 \pm 46,48$ cm/s und bei adulten CD73-defizienten Mäusen $233,3 \pm 73,37$ cm/s. Die Minimalflussgeschwindigkeit zeigte mit Werten wie $106,9 \pm 64,43$ cm/s bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz und $118,3 \pm 45,66$ cm/s bei adulten CD73-defizienten Mäusen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

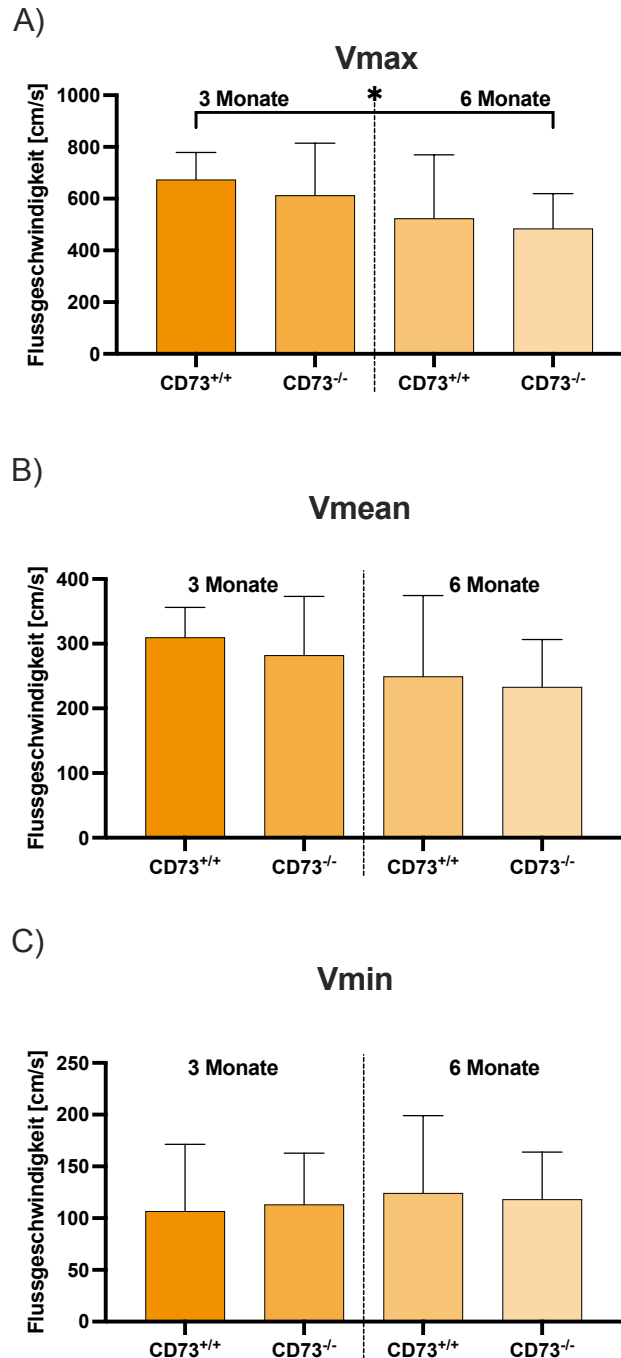


Abb. 16: Vergleich der Flussgeschwindigkeiten in der Aorta zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 16 sind verschiedene Flussgeschwindigkeiten bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen dargestellt, sowohl ohne CD73-Defizienz (CD73^{+/+}) als auch CD73-defizient (CD73^{-/-}) ohne Angiotensin-II-Stimulation. Die Maximalflussgeschwindigkeit (V_{max}) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz und adulten CD73-defizienten Mäusen ($p = 0,0173$). Mittelwert und Standardabweichung, $n = 9-14$ pro Subgruppe. Obwohl bei der Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{mean}) kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde ($p = 0,0876$), zeigten juvenile Mäuse ohne CD73-Defizienz tendenziell höhere Werte (309,7 cm/s) im Vergleich zu adulten CD73-defizienten Mäusen. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 9-14$ pro Subgruppe. Bei

der Minimalflussgeschwindigkeit (V_{min}) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 9-14$ pro Subgruppe. cm/s, Zentimeter pro Sekunde.

3.4.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der immunologischen Aktivität wurden erneut Aorten von juvenilen und adulten Mäusen mit und ohne CD73-Defizienz ohne Angiotensin-II-Stimulation entnommen, nachdem diese von intraluminalen Blutbestandteilen befreit worden waren. Das Aortenwandgewebe wurde mithilfe des *GentleMacs*-Systems und des *Tumor Dissociation Kits* zerkleinert und zersetzt (siehe Kapitel 2.3.3). Die freigesetzten Immunzellen aus der Aortenwand wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und anschließend in der Durchflusszytometrie quantifiziert (siehe Abb. 17). Zwischen keiner der untersuchten Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Gesamtimmunzellzahl betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) 1567 ± 868 , bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 19$) 1737 ± 1541 , bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) $761,8 \pm 383,7$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 9$) $1506 \pm 755,3$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 6,163$, $p = 0,1039$). Die Zellzahl der Lymphozyten lag bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) bei $616,1 \pm 504,9$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 19$) bei $573,4 \pm 644$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) bei $288,2 \pm 224,5$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 9$) bei $407,2 \pm 260,1$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 4,874$, $p = 0,1812$). Die Zellzahl der T-Zellen betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) $276 \pm 143,7$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 19$) $292,2 \pm 482,6$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) $181,6 \pm 174,3$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 9$) $221,4 \pm 128,9$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 3,103$, $p = 0,3760$). Die Zellzahl der B-Zellen lag bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) bei $71,33 \pm 37,75$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 19$) bei $112,2 \pm 250,7$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) bei $56 \pm 35,17$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 9$) bei $97,89 \pm 58,27$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 3,688$, $p = 0,2972$). In der myeloischen Zellreihe betrug die Zellzahl bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) $899,2 \pm 744,3$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 19$) $988,8 \pm 981,1$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) $420,6 \pm 312,6$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 10$) $1061 \pm 626,4$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 5,480$, $p =$

0,1398). Die Zellzahl der F4/80-positiven Makrophagen lag bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) bei $52,83 \pm 48,22$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 19$) bei $104,2 \pm 95,75$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) bei $29,78 \pm 27,94$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 9$) bei $157,4 \pm 150,3$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 5,937$, $p = 0,1147$).

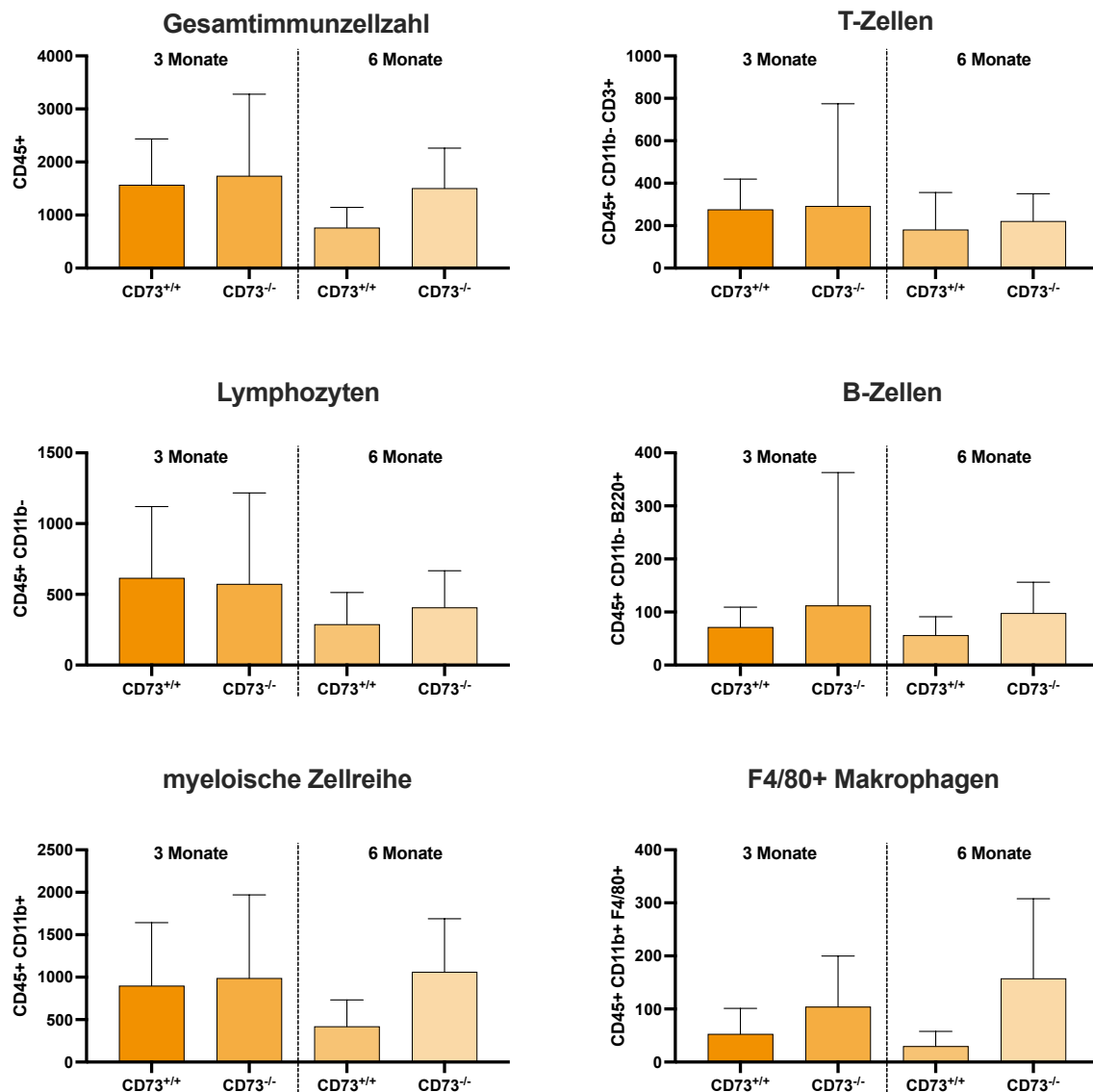


Abb. 17: Vergleich der Immunzellzahlen in der Aortenwand von Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen ohne Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 17 sind die Gesamtimmunzellzahl (DAPI-negativ, CD45-positiv), die Lymphozyten (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ), die myeloische Zellreihe (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv), T-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, CD3-positiv), B-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, B220-positiv) sowie F4/80-positive Makrophagen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv) bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen ohne CD73-Defizienz

(CD73+/+) sowie CD73-defizienten (CD73-/-) Mäusen dargestellt. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, jedoch zeigten sich tendenzielle Abweichungen in der Zellzahl. Mittelwert und Standardabweichung, n = 9-19 pro Subgruppe.

3.5 Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse mit und ohne CD73-Defizienz mit Angiotensin II-Stimulation

Die Untersuchungen ohne Angiotensin-II-Stimulation ergaben, mit Ausnahme der Maximalflussgeschwindigkeit, keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Parametern zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen, unabhängig vom Alter. In einem nächsten Schritt wurde die Charakterisierung juveniler und adulter Mäuse mit und ohne CD73-Defizienz unter Angiotensin-II-Stimulation durchgeführt.

3.5.1 Bestimmung der mittleren Fläche der Aorta mittels MRT

Zunächst wurde die Morphologie der Aorta untersucht. Hierzu wurden *in vivo* transversale MRT-Aufnahmen der Aorten von Mäusen mit einer Schichtdicke von 0,5 mm angefertigt. Ausgewertet wurden insgesamt 36 Schnittbilder, davon 12 Schnitte kaudal der unteren Nierenarterie und 24 Schnitte kranial. In jedem Schnitt wurde das durchflossene Lumen bestimmt, aus dessen Werten die mittlere Fläche pro Aorta berechnet wurde (siehe Abb. 18). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Juvenile Mäuse ohne CD73-Defizienz ($n = 9$) wiesen eine mittlere Fläche von $1,36 \pm 0,15 \text{ mm}^2$ auf, während juvenile CD73-defiziente Mäuse ($n = 8$) eine Fläche von $1,31 \pm 0,13 \text{ mm}^2$ zeigten. Bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 7$) betrug die mittlere Fläche $1,23 \pm 0,32 \text{ mm}^2$, während bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 8$) eine Fläche von $1,35 \pm 0,29 \text{ mm}^2$ gemessen wurde (oneway-ANOVA, $F(3, 28) = 0,5127$, $p = 0,6769$).

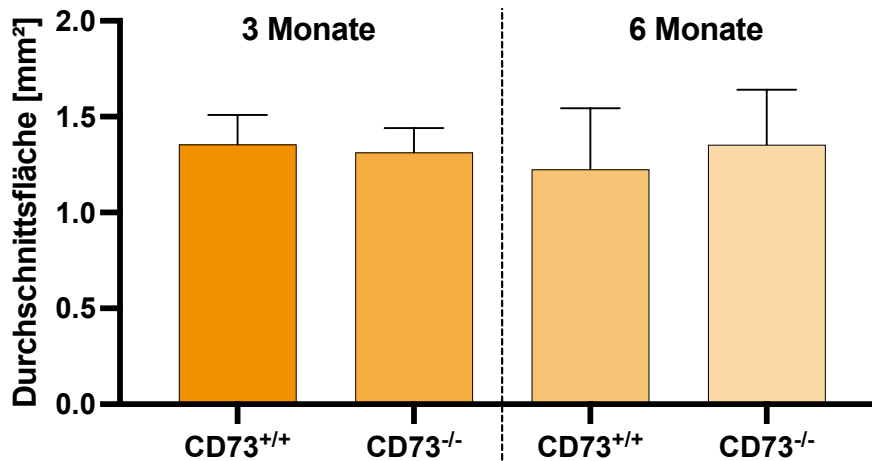


Abb. 18: Mittlere Aortenfläche und Flächenverlauf des Aortenlumens bei Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 18 sind die mittlere Aortenfläche und der Flächenverlauf des aortalen Lumens dargestellt, die bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen, sowohl ohne CD73-Defizienz (CD73^{+/+}) als auch CD73-defizient (CD73^{-/-}), unter Angiotensin-II-Stimulation mittels MRT untersucht wurden. Zwischen den untersuchten Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 15-17$. mm², Quadratmillimeter.

3.5.2 Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten in der Aorta mittels Ultraschalls

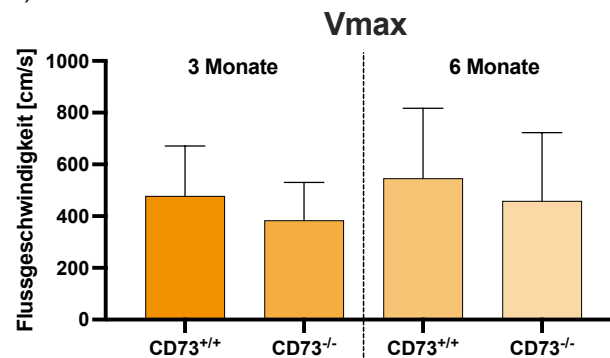
Zur funktionalen Charakterisierung wurde erneut die Flussgeschwindigkeit des Blutes in der Aorta von juvenilen und adulten Mäusen mit und ohne CD73-Defizienz unter Angiotensin-II-Stimulation untersucht. Mittels Dopplersonographie wurden die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$), die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) und die Minimalflussgeschwindigkeit ($V_{\min}$) aus der abgeleiteten Flusskurve bestimmt (siehe Abb. 19). In keiner der untersuchten Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Maximalflussgeschwindigkeit ($V_{\max}$) betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 13$) $477,6 \pm 193,7$ cm/s, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 10$) $383,9 \pm 146,4$ cm/s, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) $546,4 \pm 271,0$ cm/s und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) $458,6 \pm 264,6$ cm/s (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 2,315$, $p = 0,5096$).

Die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 13$) $219,7 \pm 88,43$ cm/s, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 10$) $177,2 \pm 71,33$ cm/s, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) $247,0 \pm 113,2$

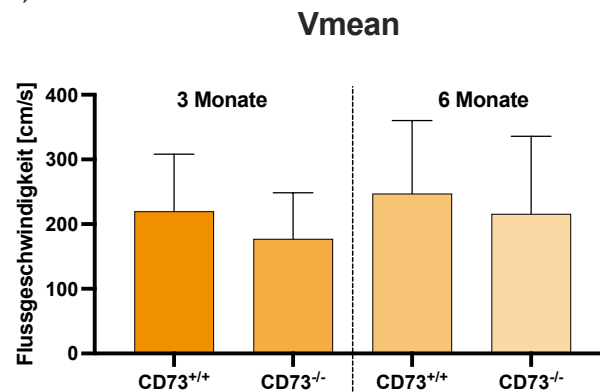
cm/s und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) $215,9 \pm 120,0$ cm/s (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 2,325$, $p = 0,5078$).

Die Minimalflussgeschwindigkeit ($V_{\min}$) lag bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 13$) bei $86,89 \pm 33,98$ cm/s, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 10$) bei $83,59 \pm 31,36$ cm/s, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) bei $86,08 \pm 45,55$ cm/s und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) bei $94,95 \pm 53,04$ cm/s (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 0,1143$, $p = 0,9901$).

A)



B)



C)

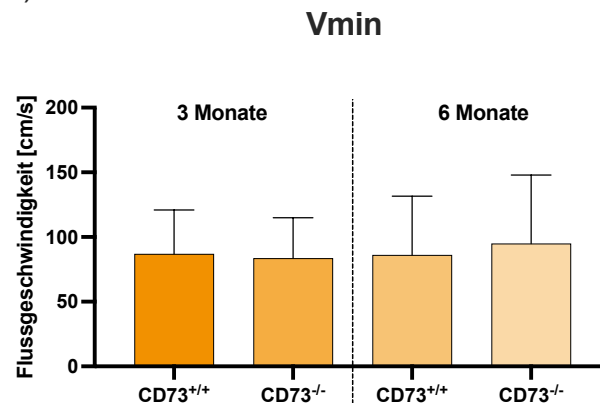


Abb. 19: Vergleich der Flussgeschwindigkeiten in der Aorta zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 19 sind die Maximalflussgeschwindigkeit (V_{max}) dargestellt, die mittlere Flussgeschwindigkeit (V_{mean}) und die Minimalflussgeschwindigkeit (V_{min}) bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen ohne CD73-Defizienz (CD73+/+) sowie CD73-defizienten (CD73-/-) Mäusen nach Angiotensin-II-Stimulation. In keiner der untersuchten Gruppen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (p -Werte zwischen $p = 0,5078$ und $p = 0,9901$). Mittelwert und Standardabweichung, $n = 10-13$ pro Subgruppe. cm/s, Zentimeter pro Sekunde.

3.5.3 Bestimmung der Immunzellen in der Aorta mittels Durchflusszytometrie

Zur abschließenden Charakterisierung der immunologischen Aktivität wurden die Aorten von juvenilen und adulten Mäusen, sowohl mit als auch ohne CD73-Defizienz unter Angiotensin-II-Stimulation, entnommen. Nach der Entfernung intraluminaler Blutbestandteile wurde das Aortenwandgewebe mithilfe des *GentleMacs*-Systems und des *Tumor Dissociation Kits* zerkleinert und zersetzt (siehe Kapitel 2.3.3). Die dabei freigesetzten Immunzellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (siehe Abb. 20).

Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede ausschließlich bei den B-Zellen und den F4/80-positiven Makrophagen. Die Gesamtimmunzellzahl betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) 3288 ± 2094 , bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 12$) 2773 ± 1306 , bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) 3263 ± 2171 und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) 2477 ± 1003 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 0,9935$, $p = 0,8028$). Die Zellzahl der Lymphozyten lag bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) bei $824,6 \pm 842,5$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 12$) bei $816,3 \pm 465,9$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) bei 1432 ± 1349 und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) bei $1213 \pm 644,7$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 5,436$, $p = 0,1425$). Die Zellzahl der T-Zellen betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) $406,2 \pm 494,6$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 12$) $242,2 \pm 238,1$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) $479,8 \pm 356,2$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) $471,1 \pm 309,7$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 6,583$, $p = 0,0865$). Bei den B-Zellen lag die Zellzahl bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) bei $112,3 \pm 157$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 12$) bei $103 \pm 64,4$, bei adulten Mäusen ohne

CD73-Defizienz ($n = 10$) bei $245,2 \pm 196,7$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) bei $294,3 \pm 306$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 9,148$, $p = 0,0274$). Die Zellzahl der myeloischen Zellreihe betrug bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) 2325 ± 1496 , bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 12$) $1883 \pm 967,6$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) 1694 ± 1375 und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) $1123 \pm 425,6$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 6,364$, $p = 0,0952$). Die Zellzahl der F4/80-positiven Makrophagen lag bei juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 12$) bei $195,4 \pm 196$, bei juvenilen CD73-defizienten Mäusen ($n = 12$) bei $268,8 \pm 269,6$, bei adulten Mäusen ohne CD73-Defizienz ($n = 10$) bei $32,5 \pm 37,27$ und bei adulten CD73-defizienten Mäusen ($n = 11$) bei $95,55 \pm 107,3$ (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 9,895$, $p = 0,0195$).

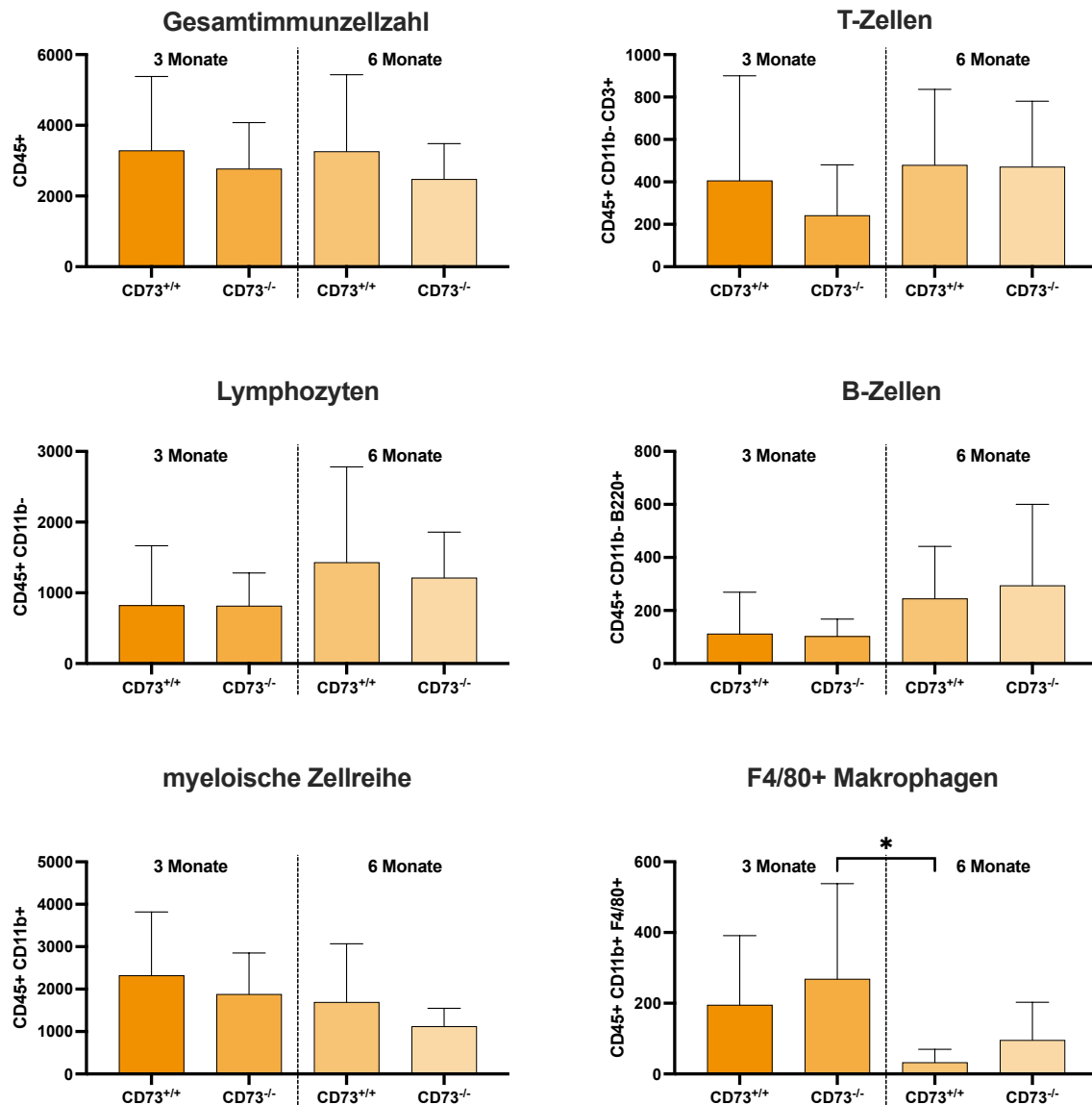


Abb. 20: Vergleich der Immunzellzahlen in der Aortenwand von Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen mit Angiotensin II-Stimulation

In Abbildung 20 sind die Gesamtimmunzellzahl (DAPI-negativ, CD45-positiv), die Lymphozyten (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ), die myeloische Zellreihe (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv), T-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, CD3-positiv), B-Zellen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-negativ, B220-positiv) sowie F4/80-positive Makrophagen (DAPI-negativ, CD45-positiv, CD11b-positiv) bei juvenilen (3 Monate) und adulten (6 Monate) Mäusen ohne CD73-Defizienz (CD73^{+/+}) sowie CD73-defizienten (CD73^{-/-}) Mäusen nach Angiotensin-II-Stimulation dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden bei den B-Zellen ($p = 0,0274$) und den F4/80-positiven Makrophagen ($p = 0,0195$) festgestellt, während bei den übrigen Zellgruppen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden. Mittelwert und Standardabweichung, $n = 10-12$ pro Subgruppe.

3.6 Charakterisierung der CD73-Expression und weiterer Oberflächenmoleküle des extrazellulären purinergen Stoffwechsels

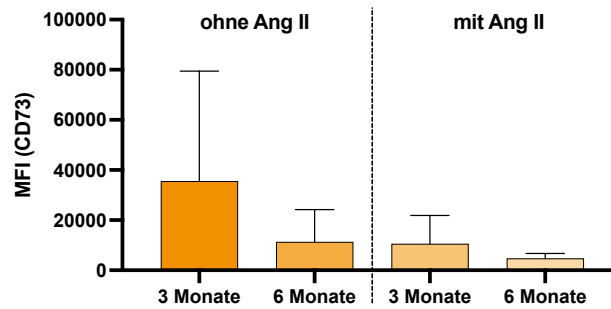
Da die CD73-Defizienz als proinflammatorischer Reiz bekannt ist, jedoch in den Charakterisierungen zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen nach Inflammationsstimulus nur wenige Unterschiede festgestellt wurden, stellte sich die Frage, ob Veränderungen in der Oberflächenexpression von CD73 und weiteren Molekülen des extrazellulären purinergen Stoffwechsels aufgetreten sind. Daher wurde die Expression von CD73, CD38 und CD39 auf Immunzellen vor und nach Angiotensin-II-Stimulation durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Aufgrund der begrenzten Immunzellzahl wurden ausschließlich CD45-positive Zellen (Immunzellen) sowie CD45-positive, CD11b-negative (Lymphozyten) und CD45-positive, CD11b-positive (myeloische Zellreihe) Zellen in die Analyse einbezogen.

3.6.1 Charakterisierung der CD73-Expression auf Immunzellen der Mäuse ohne CD73-Defizienz

Die CD73-Expression auf Immunzellen der Mäuse ohne CD73-Defizienz wurde charakterisiert. Hierfür wurden die Aorten juveniler und adulter Mäuse ohne CD73-Defizienz mit und ohne Angiotensin-II-Stimulation entnommen, nach Entfernung intraluminaler Blutbestandteile mit dem *GentleMacs*-System und dem *Tumor Dissociation Kit* zerkleinert und zersetzt (siehe Kapitel 2.3.3). Die dabei freigesetzten Immunzellen aus der Aortenwand wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Die mittlere Fluoreszenzintensität des an CD73 gebundenen Antikörpers auf den Immunzellen wurde anschließend bestimmt (siehe Abb. 21).

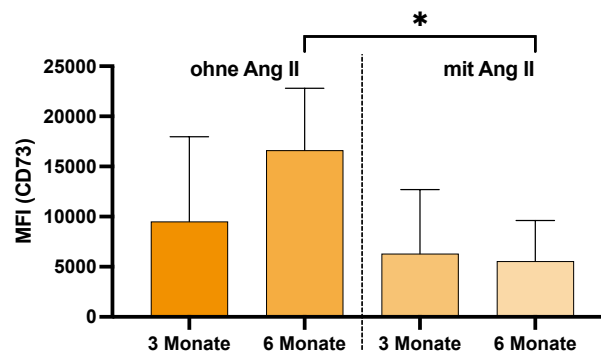
A)

Gesamtimmunzellzahl



B)

Lymphozyten



C)

myeloische Zellreihe

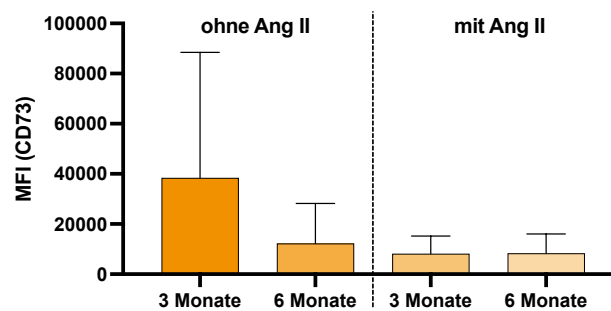


Abb. 21: MFI-Werte eines an CD73 gebundenen CD73-Antikörpers auf verschiedenen Immunzellsubgruppen der Mäuse ohne CD73-Defizienz

In Abbildung 21 sind die mittleren MFI-Werte eines an CD73 gebundenen CD73-Antikörpers dargestellt, die auf aus der Aortenwand gewonnenen Immunzellen (CD45-positiv), Lymphozyten (CD45-positiv, CD11b-negativ) und myeloischen Zellen (CD45-positiv, CD11b-positiv) bestimmt wurden. Es wurden juvenile (3 Monate) und adulte (6 Monate) Mäuse ohne CD73-Defizienz untersucht, jeweils ohne und mit Angiotensin-II-Stimulation. Die Ergebnisse zeigen deutliche Abnahmen der CD73-Expression nach Angiotensin-II-Stimulation, wobei bei den Lymphozyten ein signifikanter Abfall nachgewiesen wurde. $n = 4-12$ pro Gruppe. MFI, mittleren Fluoreszenzintensität.

Die Gesamtimmunzellzahl wies nach Angiotensin-II-Stimulation niedrigere MFI-Werte auf, wobei die CD73-Expression bei adulten Mäusen insgesamt geringer war. Ohne Angiotensin-II-Stimulation wurden bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) MFI-Werte von 35534 ± 43901 und bei adulten Mäusen ($n = 15$) von 11321 ± 12863 gemessen. Mit Angiotensin-II-Stimulation zeigten juvenile Mäuse ($n = 12$) Werte von 10578 ± 11285 , während adulte Mäuse ($n = 11$) Werte von 4736 ± 2012 aufwiesen (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 7,483$, $p = 0,0580$).

Auf Lymphozyten zeigte sich ein signifikanter Abfall der MFI-Werte bei adulten Mäusen zwischen der Gruppe ohne und der Gruppe mit Angiotensin-II-Stimulation. Ohne Angiotensin-II-Stimulation wurden bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) Werte von 9505 ± 8459 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) von 16614 ± 6192 gemessen. Nach Angiotensin-II-Stimulation wurden bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) Werte von 6293 ± 6405 und bei adulten Mäusen ($n = 10$) von 5545 ± 4074 ermittelt (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 8,780$, $p = 0,0324$; *post-hoc*-Analyse, siehe Anhang Tabelle 6). Bei myeloischen Zellen konnte kein signifikanter Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) festgestellt werden. Ohne Angiotensin-II-Stimulation wurden bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) MFI-Werte von 38376 ± 50075 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) von 12183 ± 16039 gemessen. Mit Angiotensin-II-Stimulation wiesen juvenile Mäuse ($n = 12$) Werte von 8127 ± 7084 und adulte Mäuse ($n = 11$) Werte von 8311 ± 7730 auf (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 3,112$, $p = 0,3747$).

3.6.2 Charakterisierung der CD39- und CD38-Expression auf Immunzellen der Mäuse ohne CD73-Defizienz

Anschließend wurde die CD39- und CD38-Expression auf Immunzellen von Mäusen ohne CD73-Defizienz charakterisiert. Hierfür wurden Aorten juveniler und adulter Mäuse ohne CD73-Defizienz, sowohl mit als auch ohne Angiotensin-II-Stimulation, entnommen und von intraluminalen Blutbestandteilen befreit. Das Aortenwandgewebe wurde anschließend mithilfe des *GentleMacs*-Systems und des *Tumor Dissociation Kits* zerkleinert und aufgeschlossen (siehe Kapitel 2.3.3). Die dabei freigesetzten Immunzellen aus der Aortenwand wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)

der an CD39 und CD38 gebundenen Antikörper wurde daraufhin bestimmt (siehe Abb. 22).

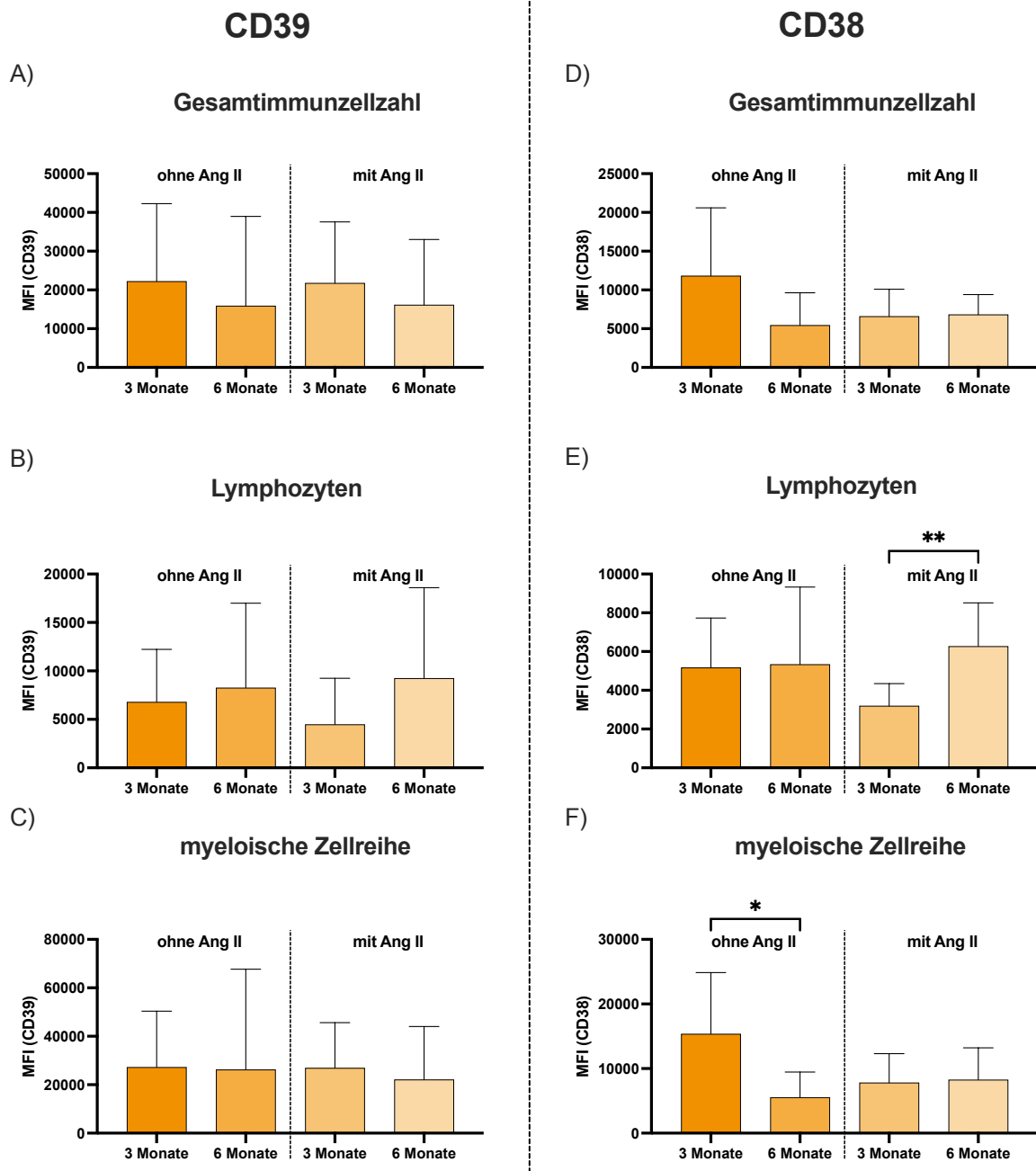


Abb. 22: MFI-Werte eines an CD39 bzw. CD38 gebundenen CD39- und eines CD38-Antikörpers auf verschiedenen Immunzellsubgruppen der Mäuse ohne CD73-Defizienz

In Abbildung 22 sind die mittleren MFI-Werte von Antikörpern dargestellt, die an die Oberflächenmoleküle CD39 bzw. CD38 gebunden sind. Die Messungen wurden auf Immunzellen (CD45-positiv), Lymphozyten (CD45-positiv, CD11b-negativ) und myeloischen Zellen (CD45-positiv, CD11b-positiv) durchgeführt, die aus der Aortenwand gewonnen wurden. Die Ergebnisse sind weiter unterteilt in Lymphozyten (CD45-positiv, CD11b-negativ) und myeloische Zellen (CD45-positiv, CD11b-positiv). Aufgetragen sind die Werte für juvenile (3 Monate) und adulte (6 Monate) Mäuse ohne CD73-

Defizienz, jeweils ohne und mit Angiotensin-II-Stimulation. Es zeigen sich altersabhängige Unterschiede in den Expressionsmustern der beiden Oberflächenmoleküle, wobei für CD38 ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. $n = 4-12$ pro Gruppe. MFI, mittleren Fluoreszenzintensität.

Die Analyse zeigte in Bezug auf die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des CD39-Antikörpers Unterschiede in den gemessenen Parametern, jedoch überwiegend ohne statistische Signifikanz. Bei den Gesamtimmunzellen zeigten juvenile Mäuse ohne Angiotensin-II-Stimulation ($n = 12$) Werte von 22238 ± 20033 , während adulte Mäuse ($n = 4$) Werte von 15890 ± 23094 aufwiesen. Nach Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 21783 ± 15774 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 16127 ± 16881 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 2,868$, $p = 0,4125$).

Die Analyse der Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede. Ohne Angiotensin-II-Stimulation erreichten juvenile Mäuse ($n = 12$) Werte von 6795 ± 5422 und adulte Mäuse ($n = 4$) Werte von 8258 ± 8729 . Mit Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 4469 ± 4775 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 9249 ± 9338 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 0,2881$, $p = 0,9623$).

Die myeloischen Zellen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Ohne Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 27184 ± 23086 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) bei 26215 ± 41470 . Mit Angiotensin-II-Stimulation wurden bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) Werte von 26893 ± 18755 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) Werte von 22113 ± 21893 gemessen (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 2,740$, $p = 0,4335$).

In Bezug auf die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des CD38-Antikörpers wurden signifikante Unterschiede bei Lymphozyten und myeloischen Zellen festgestellt (siehe Abb. 23 E)-F)). Für die Gesamtimmunzellzahl zeigten juvenile Mäuse ohne Angiotensin-II-Stimulation ($n = 12$) Werte von 11835 ± 8760 , während adulte Mäuse ($n = 4$) Werte von 5444 ± 4193 aufwiesen. Nach Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 6594 ± 3499 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 6813 ± 2593 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 3,987$, $p = 0,2629$).

Bei den Lymphozyten wurden signifikante Unterschiede festgestellt. Ohne Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 11$) bei 5168 ± 2563 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) bei 5336 ± 3998 . Mit Angiotensin-II-Stimulation erreichten juvenile Mäuse ($n = 12$) Werte von 3197 ± 1146 und adulte

Mäuse ($n = 11$) 6270 ± 2240 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 11,23$, $p = 0,0105$, *post-hoc*-Analyse, siehe Anhang Tabelle 7). Bei den myeloischen Zellen wurden ebenfalls signifikante Unterschiede beobachtet. Ohne Angiotensin-II-Stimulation zeigten juvenile Mäuse ($n = 12$) Werte von 15371 ± 9502 , während adulte Mäuse ($n = 4$) 5534 ± 3940 erreichten. Mit Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 7815 ± 4505 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 8260 ± 4951 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 10,12$, $p = 0,0176$, *post-hoc*-Analyse, siehe Anhang Tabelle 7).

3.6.3 Charakterisierung der CD39- und CD38-Expression auf Immunzellen der CD73-defizienten Mäusen

Nachdem bei Mäusen ohne CD73-Defizienz Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen festgestellt wurden, wurde untersucht, ob auch CD73-defiziente Mäuse eine veränderte Expression von CD39 und CD38 aufweisen. Aufgrund der fehlenden CD73-Expression wurde diese in dieser Gruppe nicht untersucht. Die Analyse umfasste die Entnahme der von intraluminalen Blutbestandteilen befreiten Aorten juveniler und adulter CD73-defizienter Mäuse, sowohl mit als auch ohne Angiotensin-II-Stimulation. Das Aortenwandgewebe wurde mithilfe des *GentleMacs*-Systems und des *Tumor Dissociation Kits* zerkleinert und aufgeschlossen (siehe Kapitel 2.3.3). Die freigesetzten Immunzellen aus der Aortenwand wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Anschließend wurden die mittleren Fluoreszenzintensitätswerte (MFI) der an CD39 bzw. CD38 gebundenen Antikörper bestimmt (siehe Abb. 23).

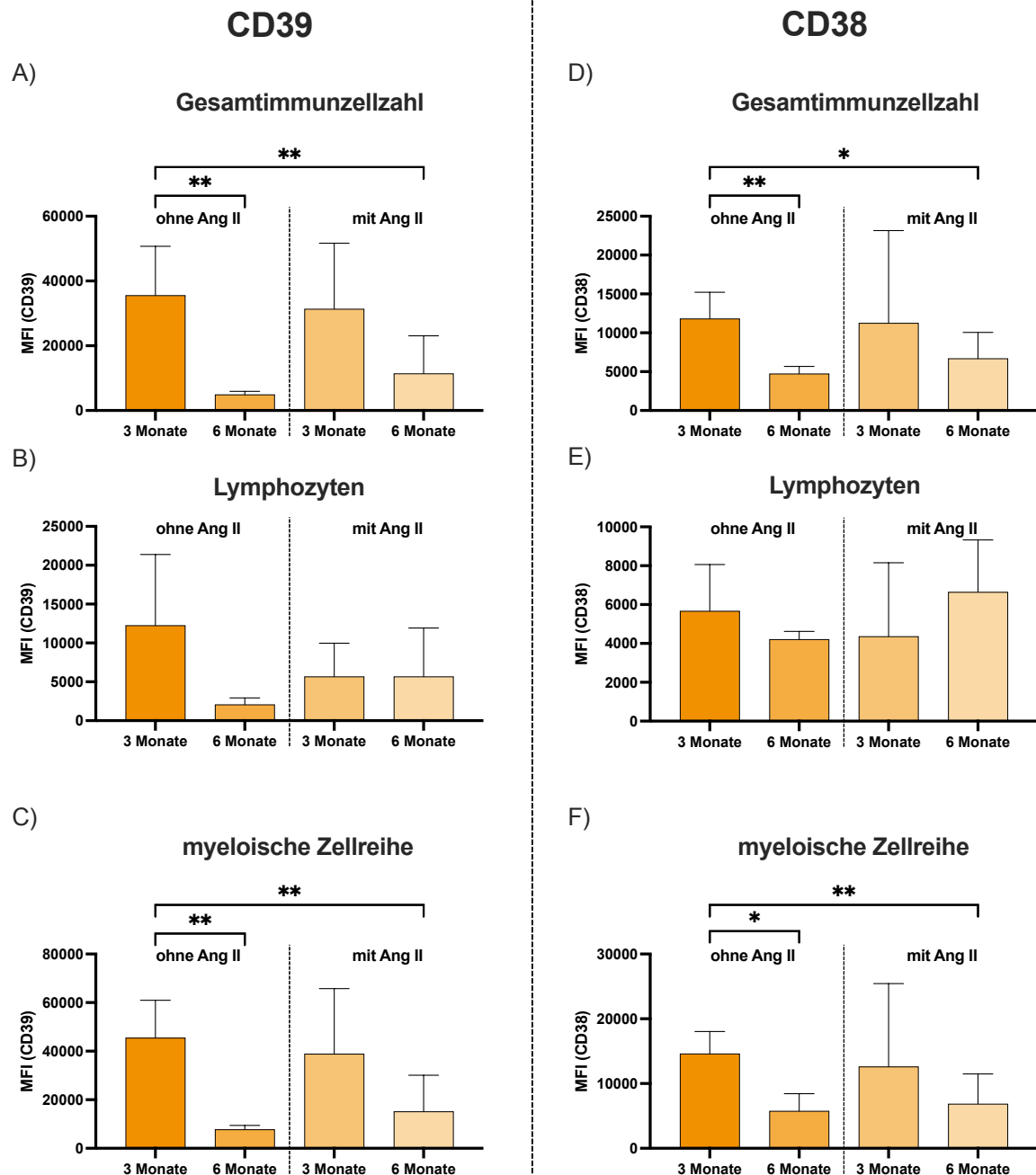


Abb. 23: MFI-Werte eines an CD39 bzw. CD38 gebundenen CD39- und eines CD38-Antikörpers auf verschiedenen Immunzellsubgruppen CD73-defizienter Mäuse

In Abbildung 23 sind die mittleren MFI-Werte von Antikörpern dargestellt, die an die Oberflächenmoleküle CD39 bzw. CD38 gebunden sind. Die Messungen wurden auf Immunzellen (CD45-positiv), Lymphozyten (CD45-positiv, CD11b-negativ) und myeloischen Zellen (CD45-positiv, CD11b-positiv) durchgeführt, die aus der Aortenwand gewonnen wurden. Die Ergebnisse sind für juvenile (3 Monate) und adulte (6 Monate) CD73-defiziente Mäuse ohne und mit Angiotensin-II-Stimulation dargestellt. Signifikante Veränderungen in der Expression der Oberflächenmoleküle wurden sowohl in Bezug auf das Alter als auch auf die Angiotensin-II-Stimulation beobachtet. $n = 4-12$ pro Gruppe; MFI = mittlere Fluoreszenzintensität.

Bei den mittleren Fluoreszenzintensitätswerten (MFI) des CD39-Antikörpers traten signifikante Unterschiede in allen Gruppen auf, wobei in der *post-hoc*-Analyse signifikante Ergebnisse nur für die Gesamtimmunzellzahl und die myeloische Zellreihe festgestellt wurden (siehe Abb. 23 A) und C)). Für die Gesamtimmunzellzahl ergaben sich ohne Angiotensin-II-Stimulation bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) Werte von 35.576 ± 15.158 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) Werte von 4.903 ± 1.025 . Mit Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 9$) bei 31.384 ± 20.274 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 11.423 ± 11.631 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 18,63$, $p = 0,0003$; *post-hoc*-Analyse siehe Anhang Tabelle 8). Für die myeloische Zellreihe ergaben sich ohne Angiotensin-II-Stimulation bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) Werte von 45.467 ± 15.500 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) Werte von 7.785 ± 1.616 . Mit Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 9$) bei 38.808 ± 26.917 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 15.169 ± 14.938 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 18,92$, $p = 0,0003$; *post-hoc*-Analyse siehe Anhang Tabelle 8). Bei den MFI-Werten des CD38-Antikörpers wurden signifikante Unterschiede bei der Gesamtimmunzellzahl und den myeloischen Zellen festgestellt (siehe Abb. 23 D) und F)). Für die Gesamtimmunzellzahl ergaben sich ohne Angiotensin-II-Stimulation bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) Werte von 11.794 ± 3.404 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) Werte von $4.744 \pm 939,3$. Mit Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 9$) bei 11.254 ± 11.911 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 6.697 ± 3.355 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 14,07$, $p = 0,0028$; *post-hoc*-Analyse siehe Anhang Tabelle 8).

Bei den mittleren Fluoreszenzintensitätswerten (MFI) des CD38-Antikörpers wurden signifikante Unterschiede sowohl bei der Gesamtimmunzellzahl als auch bei den myeloischen Zellen festgestellt (siehe Abb. 23 D)) und F)). Ohne Angiotensin-II-Stimulation lagen die MFI-Werte der Gesamtimmunzellzahl bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 11.794 ± 3.404 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) bei $4.744 \pm 939,3$. Mit Angiotensin-II-Stimulation ergaben sich Werte von 11.254 ± 11.911 bei juvenilen Mäusen ($n = 9$) und 6.697 ± 3.355 bei adulten Mäusen ($n = 11$) (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 14,07$, $p = 0,0028$; *post-hoc*-Analyse siehe Anhang Tabelle 8). Bei den Lymphozyten lagen die Werte ohne Angiotensin-II-Stimulation bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 5.671 ± 2.390 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) bei $4.211 \pm 406,1$. Mit Angiotensin-II-Stimulation lagen die Werte bei juvenilen Mäusen ($n = 9$) bei $4.362 \pm$

3.789 und bei adulten Mäusen ($n = 11$) bei 6.647 ± 2.688 (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 5,821$, $p = 0,1206$). Für die myeloischen Zellen lagen die Werte ohne Angiotensin-II-Stimulation bei juvenilen Mäusen ($n = 12$) bei 14.622 ± 3.412 und bei adulten Mäusen ($n = 4$) bei 5.765 ± 2.684 . Mit Angiotensin-II-Stimulation wurden Werte von 12.609 ± 12.831 bei juvenilen Mäusen ($n = 9$) und 6.874 ± 1.392 bei adulten Mäusen ($n = 11$) gemessen (Kruskal-Wallis-Test, $H(3) = 17,10$, $p = 0,0007$; *post-hoc*-Analyse siehe Anhang Tabelle 8).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CD73 auf subklinische Entzündungsprozesse in der Aorta juveniler und adulter Mäuse untersucht. Um die Forschungslücke zu schließen, wurden erstmals die kombinierten Effekte von Alter, Angiotensin-II-Stimulation und CD73-Defizienz auf die Gefäßwand umfassend analysiert. Hierfür wurde ein subklinisches Entzündungsmodell auf Basis eines Angiotensin-II-Modells entwickelt. Darauf aufbauend erfolgten morphologische, funktionale und immunologische Untersuchungen der Aorta bei Mäusen mit und ohne CD73-Defizienz, jeweils mit und ohne Angiotensin-II-Stimulation. Ergänzend wurde die Expression verschiedener Ektoenzyme des extrazellulären Purinmetabolismus mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.1 Angiotensin II-Modell

In dieser Untersuchung wurde eine zehntägige Stimulation mit Angiotensin II eingesetzt, um subklinische Entzündungsprozesse zu induzieren. Angiotensin II, ein vasoaktives Hormon und Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts und ist ein bedeutendes pharmakologisches Ziel in der modernen Bluthochdrucktherapie (11,65). Über die AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren beeinflusst Angiotensin II zahlreiche Prozesse in verschiedenen Geweben. Dabei dient es primär der Erhöhung des Blutdrucks und der Natriumretention (11,66). Darüber hinaus moduliert Angiotensin II die Funktionen von Immunzellen, indem das Modell beispielsweise über den AT_1 -Rezeptor die Proliferation von Milzlymphozyten stimuliert und Milzmakrophagen mobilisiert. Dies fördert unter anderem die Entwicklung von Aortenaneurysmen (11,67,68).

Bei Mäusen hat sich die Angiotensin-II-Behandlung, die erstmals im Jahr 2000 beschrieben wurde (11,69), als das verbreitetste Modell zur Untersuchung von Aortenaneurysmen etabliert. Es wird in verschiedenen Behandlungsregimen angewendet, die bis zu 12 Wochen Angiotensin-II-Exposition umfassen und häufig genetische Modifikationen wie ApoE-Defizienz berücksichtigen (11,70). Der genaue Mechanismus der Immunzellrekrutierung durch Angiotensin II in der Gefäßwand ist noch nicht vollständig verstanden. Hierbei wird jedoch angenommen, dass eine proinflammatorische Reaktion auf die Interaktion mit AT_1 -Rezeptoren von Immunzellen

zurückzuführen ist (71). Diese Reaktion ist u. a. durch eine erhöhte ROS-Produktion, T-Zell-Aktivierung sowie die Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B gekennzeichnet (72,73). Die Behandlung mit Angiotensin II führt zu erheblichen histopathologischen Veränderungen, darunter Leukozyteninfiltration, Mediadegeneration, Arteriosklerose, intramurale Thromben und Wanddissektion (11,62,74). Der früheste beobachtbare Effekt ist dabei die Einwanderung von Makrophagen in die *Tunica media* (75). Eine Besonderheit des Angiotensin-II-Modells besteht darin, dass nicht alle Mäuse nach Implantation der Minipumpe ein Aortenaneurysma entwickeln. Zwar lässt sich die Rate der Aortenaneurysmen durch die Verwendung von ApoE-defizienten Mäusen erhöhen, diese liegt jedoch im Durchschnitt bei 60 %, wobei die meisten Fälle durch Aortendissektionen verursacht werden (76).

Das Ziel der Kurzzeitstimulation mit Angiotensin II bestand darin, die frühe Entwicklung einer Gefäßerkrankung zu untersuchen, bei der klinische Schäden noch nicht sichtbar sind, jedoch bereits entzündliche Prozesse vorliegen. Darüber hinaus sollte durch die Kurzzeitstimulation die ohnehin hohe Variabilität des Tiermodells reduziert werden, um den Einsatz größerer Tierzahlen zu vermeiden.

Zur Validierung dieses Modells im Hinblick auf die Forschungsfrage wurde geprüft, ob nach einer zehntägigen Angiotensin-II-Stimulation ein inflammatorischer Prozess nachweisbar ist. Diese Annahme konnte durch die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellzahlen bestätigt werden. Bei juvenilen Mäusen stieg die Immunzellzahl um 81 %, während diese bei adulten Mäusen um 151 % zunahm. Dieser Unterschied könnte auf die in den *Hallmarks of Aging* beschriebene chronische Entzündung und zelluläre Seneszenz zurückzuführen sein (3). Diese Prozesse äußern sich insbesondere in den als Immunoseneszenz bezeichneten Veränderungen des Immunsystems (77,78), auf die in Kapitel 4.2 näher eingegangen wird.

Zur Beurteilung der subklinischen Entzündungskomponente wurde die Morphologie der Aorta mittels Magnetresonanztomographie (MRT) dargestellt. Diese Methode wurde gewählt, um die Untersuchung am lebenden Tier durchzuführen. Eine histologische Analyse hätte möglicherweise feinere Unterschiede sichtbar gemacht, wäre jedoch nur *post mortem* möglich gewesen und hätte die zusätzliche Analyse der Immunzellen mittels Durchflusszytometrie verhindert. Die durchgeführte Untersuchung zeigte bei adulten Mäusen eine nicht signifikante Zunahme der Aortenfläche. Im Gegensatz dazu wiesen juvenile Mäuse mit Angiotensin-II-Stimulation im Vergleich zu

juvenilen Mäusen ohne Stimulation eine signifikante Flächenzunahme um 12 % auf. Diese Veränderung erfüllte jedoch nicht die Kriterien eines Aortenaneurysmas, bei dem eine Vergrößerung des normalen Aortendurchmessers um 50 % erwartet wird (16), was einer rechnerischen Zunahme der Aortenfläche um 125 % entspricht. Unter diesen Voraussetzungen kann das Modell als subklinisch eingestuft werden, sofern subklinisch als das Fehlen klarer diagnostischer Kriterien für eine Krankheit definiert wird.

Trotzdem könnte die beobachtete Flächenzunahme ein Hinweis auf die beginnende Entwicklung eines Aneurysmas sein, das durch den Verlust elastischer Fasern gekennzeichnet ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde eine sonographische Untersuchung des *Strains* durchgeführt. Ein signifikanter Abfall dieses Parameters hätte auf eine Zerstörung der elastischen Fasern durch Entzündungsprozesse hingewiesen (63,79–82). Ein solcher Befund konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den sonographischen und histologischen Analysen von Mäusen nach zehntägiger Angiotensin-II-Stimulation, die unsere Arbeitsgruppe 2023 veröffentlichte und die keine pathologischen Veränderungen der elastischen Fasern zeigten, sondern vielmehr eine bereits in anderen Publikationen beschriebene Expansion der *Tunica media* (11,83). Diese Expansion wird vermutlich durch die Aktivierung von ADAM17 und die damit verbundene EGFR-Aktivierung vermittelt (84).

Im Gegensatz dazu berichteten Favreau et al. (2012) in einer *circumferential strain analysis* bereits nach drei Tagen Angiotensin-II-Stimulation über eine Abnahme der Gefäßwandelastizität bei Mäusen (85). Diese Untersuchung wurde systematischer und an weiteren Messstellen durchgeführt, allerdings mit einer kleineren Stichprobe von 15 Mäusen pro Gruppe. Zudem ist die Genauigkeit der Ergebnisse aufgrund der zehn Jahre früher durchgeführten Messungen mit älteren Geräten möglicherweise geringer. Da die verwendeten Methodiken zwischen den Studien unterschiedlich sind, gestaltet sich ein direkter Vergleich der Ergebnisse schwierig.

Die Einschätzung, dass das etablierte Angiotensin-II-Modell zu subklinischen Entzündungen ohne strukturelle Schädigung der Gefäßwand führt, sollte mit der Einschränkung betrachtet werden, dass zukünftige Studien die *Strainuntersuchung* mit aktuellen Methoden wiederholen. Basierend auf den histologischen Untersuchungen dieser Arbeit lässt sich jedoch argumentieren, dass andere Mechanismen als die inflammatorisch bedingte Zerstörung der aortalen Gefäßwand ursächlich sein könnten.

Eine mögliche Erklärung wäre die von Gasparo et al. bereits 1999 beschriebene Aktivierung der AT₂-Rezeptoren, die eine erhöhte Produktion des Vasodilatators Stickstoffmonoxid induzieren kann (11,86).

Interessanterweise nimmt die Expression des AT₂-Rezeptors zumindest im Herzen mit zunehmendem Alter zu, während die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems physiologischerweise abnimmt (87,88). Ob eine altersabhängige Modulation der AT₂-Rezeptor-Expression in den Gefäßen über die kindliche und jugendliche Entwicklung hinaus stattfindet, ist bislang nicht bekannt. Unter der Annahme, dass die kardiale und vaskuläre Expression des AT₂-Rezeptors im Alter ähnlich ist, könnte als plausible Erklärung für die unterschiedliche Reaktion der Aortenfläche auf den Angiotensin-II-Stimulus die Gefäßplastizität herangezogen werden. Diese Plastizität ist bei adulten Mäusen eingeschränkt, da mit steigendem Alter der Kollagenanteil in der *Tunica media* zunimmt (89–91).

4.2 Das Alter

Das Alter stellt einen zentralen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar und beeinflusst gleichzeitig die Immunantwort maßgeblich (92–94). Um altersabhängige Unterschiede zwischen den Mäusen in dieser Studie zu identifizieren, wurden zunächst *Baseline*-Messungen an juvenilen und adulten Mäusen ohne Angiotensin-II-Stimulation durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass adulte Mäuse eine um 30 % größere mittlere Aortenfläche aufwiesen als juvenile Mäuse. Dieser Befund steht im Einklang mit der bekannten altersphysiologischen Zunahme des Gefäßdurchmessers und der Aortenfläche (95–98). Der größere Gefäßdurchmesser könnte auf Umbauprozesse in den Gefäßen hindeuten, wie den Verlust von Elastizität und den Aufbau von Kollagen. Der Organismus kompensiert die reduzierte Elastizität durch eine Erweiterung der Gefäße, was zu einer erhöhten Steifigkeit führt (99,100).

Es bleibt jedoch unklar, ob dieser Mechanismus auch bei Mäusen mit nur fünf Elastinlamellen in der Bauchaorta, im Vergleich zu den 28 Lamellen beim Menschen, eine vergleichbare Rolle spielt (101). Der Unterschied in der mittleren Aortenfläche korreliert mit der Feststellung, dass die Maximalflussgeschwindigkeit und Durchschnittsflussgeschwindigkeit des Blutes in der Aorta bei juvenilen Mäusen um 29 % bzw. 24 % höher war. Dies lässt sich wahrscheinlich durch das Kontinuitätsprinzip erklären: Ein größerer Aortendurchmesser bei adulten Mäusen führt bei gleichem Volumenstrom zu geringeren Flussgeschwindigkeiten. Alternativ

könnte der geringere Fluss auch auf eine niedrigere Herzleistung und einen reduzierten Volumenstrom hinweisen. Studien an älteren Menschen zeigen, dass die Herzleistung, gemessen an der Ejektionsfraktion und der Herzfrequenz, mit zunehmendem Alter abnimmt (102–104). Weitere echokardiografische Untersuchungen könnten in zukünftigen Studien zusätzliche Erkenntnisse liefern.

Obwohl keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, waren die Gesamtimmunzellzahlen sowie die Zellzahlen der Lymphozyten und der myeloischen Zellreihen bei adulten Mäusen tendenziell niedriger als bei juvenilen Mäusen. Besonders auffällig war ein Rückgang von etwa 41 % bei den Lymphozyten und 32 % bei der Gesamtimmunzellzahl. Diese Unterschiede könnten aufgrund der hohen Streuung in den Messwerten nicht signifikant sein, könnten jedoch bei einer größeren Stichprobe sichtbar werden. Die beobachteten Werte stehen im Einklang mit der Immunoseneszenz, die mit einer Abnahme des zellulären Immunsystems und einer Zunahme chronischer Entzündungen im Sinne der *Hallmarks of Aging* einhergeht (3,77). Die genauen Mechanismen der Immunoseneszenz sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (105).

Bezüglich der reduzierten Immunzellzahlen gibt es einige plausible Hypothesen: Mit zunehmendem Alter nimmt die Zelldichte im Knochenmark ab, während der Thymus verfettet und in seiner Funktion eingeschränkt wird (106–108). Da beide Organe zentrale Orte der Immunzellreifung darstellen, könnten diese altersbedingten Veränderungen den Rückgang der Immunzellzahlen erklären.

Nach der Angiotensin-II-Stimulation zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mittleren Aortenfläche zwischen juvenilen und adulten Mäusen. Beide Gruppen wiesen vergleichbare Werte von etwa 1,3 mm² auf. Dieser Befund widerspricht den vorherigen Ergebnissen unter basalen Bedingungen ohne Angiotensin-II-Stimulation, bei denen die mittlere Aortenfläche bei adulten Mäusen signifikant größer war als bei juvenilen Mäusen. Die fehlenden Unterschiede könnten darauf hinweisen, dass Angiotensin II bei beiden Altersgruppen eine maximale Dilatation der Aorta induziert, was in Anbetracht der üblicherweise vasokonstriktiven Wirkung des Angiotensin II jedoch überraschen würde. Alternativ könnten unterschiedliche Anpassungsmechanismen der Gefäßwand eine Rolle spielen. Eine mögliche Erklärung wäre eine reduzierte Expression des Angiotensin-II-Rezeptors auf der adulten Aorta oder eine erhöhte Steifigkeit der Gefäßwand bei adulten Mäusen, die zu einer geringeren Reaktion auf Angiotensin II führt (87–91).

Bemerkenswert ist, dass die Angiotensin-II-Stimulation bei juvenilen Mäusen zu einer signifikanten Dilatation der Aorta führte, während dieser Effekt bei adulten Mäusen weniger ausgeprägt war. Die funktionale Analyse der Blutflussgeschwindigkeit zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den Gruppen. Adulte Mäuse wiesen nach der Stimulation sowohl in der Maximal- als auch in der Durchschnittsgeschwindigkeit etwa 15 % höhere Werte auf als juvenile Mäuse. Vor der Angiotensin-II-Stimulation hatten die juvenilen Mäuse signifikant höhere Flussgeschwindigkeiten. Dies deutet darauf hin, dass die Stimulation altersbedingte Unterschiede in der Flussgeschwindigkeit ausgleicht. Eine Erklärung hierfür könnte in der höheren Gefäßplastizität der juvenilen Mäuse liegen, die aufgrund eines geringeren Kollagen- und eines höheren Elastinanteils in der *Tunica media* eine größere Verformbarkeit aufweisen (89–91).

Während die Gesamtzahl der Immunzellen nach Angiotensin-II-Stimulation keine Unterschiede zwischen den Gruppen zeigte, ergaben sich bei der Analyse der einzelnen Immunzelllinien signifikante Unterschiede. Während die Lymphozyten bei adulten Mäusen signifikant höhere Werte aufwiesen als bei juvenilen Mäusen, zeigte die myeloische Zellreihe bei juvenilen Mäusen signifikant höhere Werte. Diese Unterschiede sind bemerkenswert, da diese auf eine altersabhängige Reaktion des Immunsystems auf proinflammatorische Stimuli hinweisen und auf den ersten Blick teilweise im Widerspruch zur bestehenden Literatur stehen. Allgemein ist bekannt, dass die Anzahl der naiven T-Lymphozyten mit zunehmendem Alter aufgrund der Thymusinvolution abnimmt (109,110). Gleichzeitig zeigt sich im Knochenmark eine myeloide Schieflage („*myeloid skew*“), bei der vermehrt myeloide Vorläuferzellen anstelle von lymphoiden Vorläuferzellen produziert werden (106,111).

Die in dieser Arbeit beobachtete stärkere Zunahme der Lymphozyten im Aortengewebe adulter Mäuse nach Angiotensin-II-Stimulation im Vergleich zu juvenilen Mäusen könnte mehrere Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung wäre die Akkumulation von Gedächtnis-Lymphozyten. Mit dem Alter nimmt die Produktion neuer naiver Lymphozyten ab, während ältere Gedächtnis-Lymphozyten im peripheren Immunsystem zunehmen (112,113). Diese Zellen hatten bereits Antigenkontakt und können daher bei erneuter Stimulation schneller reagieren. Aus Studien zu Herzinfarktmodellen ist bekannt, dass Gedächtnis-Lymphozyten mit AT₂-

Rezeptorexpression vorhanden sind und eine vermehrte Produktion von IL-17 auslösen (114). Eine Angiotensin-II-Stimulation könnte somit eine Aktivierung und Akkumulation dieser Zellen erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht untersucht, ob es sich bei den beobachteten Lymphozyten tatsächlich um Gedächtnis-Lymphozyten handelt.

Eine weitere plausible Erklärung wäre eine Verschiebung von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort. Juvenile Mäuse könnten aufgrund ihres weniger erfahrenen Immunsystems verstärkt auf myeloische Zellen zurückgreifen, um auf den proinflammatorischen Stimulus zu reagieren. Adulte Mäuse könnten hingegen eher adaptive Immunantworten bevorzugen (115–117). Schließlich könnte auch eine altersabhängige Immunantwort auf die Angiotensin-II-Stimulation mit einem noch unklaren Mechanismus vorliegen. Um diese Unterschiede genauer zu charakterisieren, wären zusätzliche Untersuchungen zur altersabhängigen Zusammensetzung und Funktion der Immunzellen in der Aortenwand nach Angiotensin-II-Stimulation erforderlich.

4.3 Die CD73-Defizienz

Die 5'-Ectonukleotidase CD73 stellt ein potenzielles pharmakologisches Ziel in der Therapie entzündungsassoziierter Gefäßerkrankungen dar, da diese die Umwandlung von ATP in Adenosin, einem antiinflammatorischen Mediator, ermöglicht (18). Dabei scheinen die Effekte von CD73 auf das Gefäßsystem altersabhängig zu sein. Studien zeigten, dass juvenile Mäuse mit CD73-Defizienz vermehrte atherosklerotische Veränderungen in der Aorta aufwiesen, während adulte Mäuse mit CD73-Defizienz im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne CD73-Defizienz weniger atherosklerotische Veränderungen aufzeigten (61). Das Ziel dieser Arbeit war es, die kombinierten Effekte von Alter und CD73-Defizienz genauer zu untersuchen.

Die morphologische Analyse ohne Angiotensin-II-Stimulation ergab, dass die Abwesenheit von CD73 weder bei juvenilen noch bei adulten Mäusen signifikante Veränderungen der Aortenmorphologie unter basalen Bedingungen verursachte. Die minimalen Unterschiede in der mittleren Aortenfläche (3 % bei juvenilen und 2 % bei adulten Mäusen) waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,7815$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Alter in diesem Zusammenhang keine wesentliche Rolle spielt und CD73 unter physiologischen Bedingungen ohne zusätzlichen Stimulus wie Angiotensin II keine entscheidende Funktion bei der Beeinflussung der

Aortenmorphologie ausübt. Es ist jedoch denkbar, dass andere Mechanismen oder Enzyme die fehlende CD73-Aktivität kompensieren. Beispielsweise kann die alkalische Phosphatase ATP ebenfalls in Adenosin umwandeln, wenn auch mit deutlich geringerer Effizienz als CD73 (118,119).

In den funktionellen Analysen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Maximalflussgeschwindigkeit zwischen juvenilen Mäusen ohne CD73-Defizienz und adulten CD73-defizienten Mäusen. Dieser Befund deutet auf einen möglichen synergistischen Effekt von Alter und CD73-Defizienz hin. Insgesamt zeigte sich bei juvenilen Mäusen eine Tendenz, dass die CD73-Defizienz mit einer etwa 10 % geringeren Maximalflussgeschwindigkeit einherging. Dies könnte auf einen Einfluss von CD73 auf den Gefäßtonus hinweisen, wie dieser beispielsweise im Gehirn beschrieben wurde (120). Es ist jedoch zu beachten, dass in den anderen untersuchten Gruppen, insbesondere in Bezug auf die Durchschnittsgeschwindigkeit, keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Daher scheinen die berichteten Effekte von begrenzter Relevanz zu sein.

In der immunologischen Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da die CD73-Defizienz allgemein mit proinflammatorischen Effekten assoziiert wird (121,122). Vor dem Hintergrund dieser Befunde stellt sich die Frage, inwieweit diese proinflammatorischen Effekte außerhalb spezifischer Krankheitsmodelle tatsächlich von Relevanz sind. Patienten mit CD73-Defizienz – einer seltenen Erkrankung – zeigen in der Regel Kalzifikationen der Gefäße und Gelenkkapseln, jedoch keine ausgeprägten entzündlichen Erkrankungen (123). Es ist jedoch denkbar, dass die fehlende Signifikanz der Ergebnisse auf die hohe Standardabweichung zurückzuführen ist. In diesem Fall könnte ein statistischer Alphafehler vorliegen, der durch eine größere Stichprobe möglicherweise vermieden worden wäre. Weitere Studien mit erweiterten Populationen sind erforderlich, um eine fundierte Bewertung vorzunehmen.

Die Ergebnisse nach Stimulation mit Angiotensin II waren ebenfalls unerwartet. Nach bisheriger Literatur hätte ein deutlicher Unterschied zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und solchen mit CD73-Defizienz zu beobachten sein müssen. Beispielsweise konnten Eckle et al. 2008 eine erhöhte Anfälligkeit genetisch veränderter Mäuse mit CD73- oder CD39-Defizienz für akute Lungenschäden nachweisen (11,124). Zerneck et al. 2006 zeigten, dass CD73 einen schützenden Effekt vor vaskulären Entzündungen und Neointimabildung besitzt (11,59). Darüber

hinaus beschrieb Hart et al. 2008 eine verstärkte Infiltration von Neutrophilen in durch ischämische Reperfusion geschädigte Darmanteile nach pharmakologischer Hemmung oder genetischer Deletion von CD73 (11,125). Weder in der morphologischen noch in der funktionalen Analyse zeigten sich Unterschiede zwischen juvenilen und adulten Mäusen nach Angiotensin-II-Stimulation, unabhängig davon, ob eine CD73-Defizienz vorlag oder nicht. Auch die immunologische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl der Immunzellen. Lediglich in den Gruppen der B-Zellen und F4/80-positiven Makrophagen konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden, deren Aussagekraft jedoch aufgrund hoher Standardabweichungen eingeschränkt ist. Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur zu stehen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch ergab sich aus der Untersuchung der Expressionsmuster von CD73, CD39 und CD38. Nach Angiotensin-II-Stimulation zeigte sich ein signifikanter Abfall der CD73-Expression auf Lymphozyten bei adulten Mäusen. Dieser Befund könnte die fehlenden Unterschiede erklären, sofern die verminderte Expression eine metabolisch relevante Rolle spielt und Mäuse ohne CD73-Defizienz einen funktionell CD73-defizienten Phänotyp aufweisen.

In detaillierteren Untersuchungen aus unserer Veröffentlichung von 2023 konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt altersunabhängig insbesondere Neutrophile betrifft. Diese Zellen sind für die Entstehung von Aortenaneurysmen von zentraler Bedeutung (11). Die Hypothese eines funktionellen CD73-defizienten Phänotyps findet ihre Entsprechung in einer humanen, randomisierten, kontrollierten Doppelblindstudie von Hakovirta et al. aus dem Jahr 2022. Diese zeigte, dass eine hohe CD73-Expression mit einem signifikant erhöhten Überleben nach Aortenruptur assoziiert war (126). Dies untermauert die klinische Relevanz des Befundes der CD73-Reduktion.

Um auszuschließen, dass Angiotensin II die beobachteten Expressionsveränderungen direkt verursacht, wurden in unserer Veröffentlichung von 2023 Immunzellen *in vitro* mit Angiotensin II inkubiert. Ein Vergleich der Ektoenzymexpression zeigte dabei keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Angiotensin-II-Stimulation (11). Dies spricht für eine indirekte Wirkung von Angiotensin II, die wahrscheinlich über eine verstärkte Entzündungsreaktion im Gewebe vermittelt wird.

4.4 Limitationen

Jede wissenschaftliche Arbeit weist Limitationen auf, die im Sinne guter wissenschaftlicher Praxis offengelegt und eingeordnet werden sollten. In dieser Arbeit ist zu berücksichtigen, dass das verwendete Angiotensin-II-Modell lediglich ein vereinfachtes Modell der Entzündung darstellt. Es bildet weder die gesamte Komplexität der bislang unzureichend verstandenen Gefäßwandentzündung bei Aortenaneurysmen vollständig ab, noch kann ausgeschlossen werden, dass ein anderes Modell zu abweichenden Ergebnissen geführt hätte. Um diese Frage zu klären, wären Wiederholungsstudien mit alternativen Modellen erforderlich, die jedoch aus Zeit- und Tierschutzgründen nicht durchgeführt wurden.

Zudem wurde in dieser Untersuchung eine frühe Entzündungsphase mit subklinischem Verlauf analysiert, die primär durch eine myeloische Zellreaktion gekennzeichnet ist, während die adaptive Lymphozytenantwort typischerweise erst in späteren Phasen auftritt. Obwohl Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Aortenaneurysmen spielen, erlaubt dieses Modell keine umfassende Darstellung der Pathogenese.

Die erhobenen Daten weisen teilweise eine hohe Standardabweichung auf, die bei diesem Modell unvermeidbar war. Die begrenzte Anzahl an Versuchstieren schränkte zudem die Möglichkeit ein, statistisch alle potenziellen Unterschiede sichtbar zu machen. Darüber hinaus könnte die CD73-Defizienz der Mäuse langfristig alternative Signalwege aktivieren, die zu einer Umstellung auf andere Stoffwechselwege führen. Zukünftige Studien könnten Daten an Mäusen ohne CD73-Defizienz mit der Verabreichung von CD73-Antagonisten ergänzen, um die Hypothesen weiter zu überprüfen. Zudem erlaubten es tierschutzrechtliche Einschränkungen aufgrund der vorliegenden genetischen Mutation, CD73-defiziente Mäuse nur bis zu einem bestimmten Alter zu untersuchen. Effekte, die mit zunehmendem Alter (z. B. einem Jahr oder eineinhalb Jahren) auftreten könnten, bleiben in diesem Modell daher unberücksichtigt.

Die verwendeten Methoden der Magnetresonanztomographie und Sonographie ermöglichten zwar eine Analyse der Aorta im lebenden Tier, zeigten jedoch vermutlich eine geringere Sensitivität im Vergleich zur histologischen Analyse, insbesondere in Bezug auf sehr frühe Gewebepathologien. Auch wenn einige dieser Untersuchungen nachträglich durchgeführt und publiziert wurden (11), bleibt die Möglichkeit bestehen, dass feinere Unterschiede unentdeckt blieben.

Die Untersuchung der Rezeptorexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Für eine abschließende Charakterisierung der Rezeptorexpression wären jedoch ergänzende mikroskopische Analysen der antikörpergefarbten Oberflächenmoleküle oder eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Untersuchung der CD73-RNA empfehlenswert. Diese Methoden würden eine höhere Sensitivität und Spezifität ermöglichen. Aufgrund zeitlicher und finanzieller Restriktionen wurde auf diese weiterführenden Analysen verzichtet.

Die erhobenen Daten stammen aus Untersuchungen an Mäusen, was eine Übertragung auf den Menschen nur eingeschränkt ermöglicht. Die Expression von CD73 auf Immunzellen unterscheidet sich zwischen Mensch und Maus, ebenso wie die Belastungen des Kreislaufsystems. Zusätzliche Studien an humanen Proben wären notwendig, um die Relevanz der gewonnenen Erkenntnisse für die Humanforschung zu validieren.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat neue Erkenntnisse zur subklinischen Entzündung im Mausmodell beigetragen. Die zehntägige Angiotensin-II-Stimulation erwies sich als geeignet, um subklinische Entzündungsprozesse zu untersuchen, ohne die Expression der analysierten Ektoenzyme direkt zu beeinflussen. Unterschiede in der Morphologie der Aorta und den Flussgeschwindigkeiten zwischen juvenilen und adulten Mäusen konnten identifiziert werden, die möglicherweise Alterungs- und Degenerationsprozesse widerspiegeln. Diese Unterschiede nivellierten sich jedoch unter Angiotensin-II-Stimulation. Die CD73-Defizienz führte zu altersabhängigen Reaktionen, zeigte jedoch unter Angiotensin-II-Stimulation keine relevanten oder altersabhängigen Unterschiede zwischen Mäusen ohne CD73-Defizienz und CD73-defizienten Mäusen. Die geringe Rolle von CD73 in diesem Kontext könnte durch die signifikante Herunterregulation von CD73 und anderen Enzymen erklärt werden, wie diese in der hier vorliegenden Studie nachgewiesen wurde.

Es wird vorgeschlagen, in zukünftigen Studien zu prüfen, ob die Herunterregulation von CD73 Mäuse ohne CD73-Defizienz funktionell zu defizienten Mäusen macht. Zudem könnte eine Hochregulation von CD73 möglicherweise die Entzündungsreaktion reduzieren. Hierfür wären folgende Ansätze denkbar: Erstens könnte die intrazelluläre RNA von CD73 mittels Polymerase-Kettenreaktion

quantifiziert werden. Zweitens wäre die Entwicklung eines Modells zur Infusion löslicher CD73-Rezeptoren sinnvoll. Darüber hinaus sollten die Experimente mit einem alternativen Modell für Aortenentzündungen wiederholt werden, um die Ergebnisse unter Angiotensin-II-Stimulation zu validieren.

Sollte es gelingen, eine Überexpression von CD73 zu erreichen, die auch in Humanstudien klinischen Nutzen zeigt, könnte CD73 als neues pharmakologisches Ziel für die Therapie des Aortenaneurysmas etabliert werden. Eine altersunabhängige lokale Hochregulation von CD73, beispielsweise durch CD73-beschichtete Aortenstents, könnte die Aortenentzündung reduzieren und damit möglicherweise die Progression des Aortenaneurysmas wirksam verlangsamen oder sogar verhindern.

5 Literaturverzeichnis

1. Gems D, Partridge L. Genetics of Longevity in Model Organisms: Debates and Paradigm Shifts. *Annual Review of Physiology*. 2013;75:621-644. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183712
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
3. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-278. doi:10.1016/j.cell.2022.11.001
4. Hirata T, Arai Y, Yuasa S, et al. Associations of cardiovascular biomarkers and plasma albumin with exceptional survival to the highest ages. *Nature Communications*. 2020;11(1):3820. doi:10.1038/s41467-020-17636-0
5. Mogilenko DA, Shpynov O, Andhey PS, et al. Comprehensive Profiling of an Aging Immune System Reveals Clonal GZMK⁺ CD8⁺ T Cells as Conserved Hallmark of Inflammaging. *Immunity*. 2021;54(1):99-115.e12. doi:10.1016/j.immuni.2020.11.005
6. Carrasco E, Gómez de Las Heras MM, Gabandé-Rodríguez E, Desdín-Micó G, Aranda JF, Mittelbrunn M. The role of T cells in age-related diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2022;22(2):97-111. doi:10.1038/s41577-021-00557-4
7. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524-533. doi:10.1038/s41586-021-03392-8
8. Gusev E, Sarapultsev A. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(9):7910. doi:10.3390/ijms24097910
9. Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204-1222. doi:10.1016/S0140-6736(20)30925-9
10. Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nature Reviews Cardiology*. 2022;19(2):133-143. doi:10.1038/s41569-021-00607-3

11. Massold T, Ibrahim F, Niemann V, et al. CD73 deficiency does not aggravate angiotensin II-induced aortic inflammation in mice. *Scientific Reports*. 2023;13(1):17125. doi:10.1038/s41598-023-44361-7
12. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-435. doi:10.1038/nature07201
13. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(9):678-689. doi:10.1038/nri2156
14. Vestweber D. Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1257(1):184-192. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06558.x
15. Bäck M, Yurdagul A, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(7):389-406. doi:10.1038/s41569-019-0169-2
16. Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, et al. Abdominal aortic aneurysms. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4(1):34. doi:10.1038/s41572-018-0030-7
17. Di Virgilio F, Vuerich M. Purinergic signaling in the immune system. *Autonomic Neuroscience*. 2015;191:117-123. doi:10.1016/j.autneu.2015.04.011
18. Massold T, Simon F, Flögel U, Temme S, Bouvain P. Der extrazelluläre Adenosinstoffwechsel um CD73: ein neuer Therapieansatz bei entzündungsassoziierten Gefäßerkrankungen? *Gefässchirurgie*. 2024;29(6):364-369. doi:10.1007/s00772-024-01135-3
19. Linden J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(7):1835-1837. doi:10.1172/JCI29125
20. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology. *Journal of Immunology*. 2010;185(4):1993-1998. doi:10.4049/jimmunol.1000108
21. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. 2013;19(6):355-367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005
22. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal*. 1992;285(Pt 2):345-365. doi:10.1042/bj2850345
23. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Varani K. Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its

- Protective Effects? Trends in Pharmacological Sciences. 2016;37(6):419-434. doi:10.1016/j.tips.2016.02.006
24. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. Physiological Reviews. 2018;98(3):1591-1625. doi:10.1152/physrev.00049.2017
 25. Zhong L, Peng Q, Zeng X. The role of adenosine A1 receptor on immune cells. Inflammation Research. 2022;71(10-11):1203-1212. doi:10.1007/s00011-022-01607-w
 26. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. Pharmacological Reviews. 2001;53(4):527-552. Letzter Aufruf am 02.01.2025. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9389454/>
 27. Eudy BJ, da Silva RP. Systematic deletion of adenosine receptors reveals novel roles in inflammation and pyroptosis in THP-1 macrophages. Molecular Immunology. 2021;132:1-7. doi:10.1016/j.molimm.2021.01.018
 28. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. Journal of Immunology. 1992;148(7):2201-2206. doi:10.4049/jimmunol.148.7.2201
 29. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. Journal of Clinical Investigation. 1990;85(4):1150-1157. doi:10.1172/JCI114547
 30. Liang D, Zuo A, Shao H, Chen M, Kaplan HJ, Sun D. Anti-Inflammatory or Proinflammatory Effect of an Adenosine Receptor Agonist on the Th17 Autoimmune Response Is Inflammatory Environment-Dependent. Journal of Immunology. 2014;193(11):5498-5505. doi:10.4049/jimmunol.1401959
 31. Montesinos MC, Desai A, Chen JF, et al. Adenosine Promotes Wound Healing and Mediates Angiogenesis in Response to Tissue Injury Via Occupancy of A2A Receptors. American Journal of Pathology. 2002;160(6):2009-2018. doi:10.1016/S0002-9440(10)61151-0
 32. Feoktistov I, Biaggioni I, Cronstein BN. Adenosine Receptors in Wound Healing, Fibrosis and Angiogenesis. Handbook of Experimental Pharmacology. 2009;(193):383-397. doi:10.1007/978-3-540-89615-9_13

33. Johnston-Cox HA, Koupenova M, Ravid K. A2 Adenosine Receptors and Vascular Pathologies. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2012;32(4):870-878. doi:10.1161/ATVBAHA.112.246181
34. Dubey RK, Gillespie DG, Shue H, Jackson EK. A2B Receptors Mediate Antimitogenesis in Vascular Smooth Muscle Cells. Hypertension. 2000;35(1):267-272. doi:10.1161/01.HYP.35.1.267
35. Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Jackson EK. Adenosine Inhibits Growth of Human Aortic Smooth Muscle Cells Via A2B Receptors. Hypertension. 1998;31(1):516-521. doi:10.1161/01.HYP.31.1.516
36. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA. Adenosine Inhibits Tumor Necrosis Factor- α Release from Mouse Peritoneal Macrophages via A2A and A2B but Not the A3 Adenosine Receptor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006;317(1):172-180. doi:10.1124/jpet.105.096016
37. Sipka S, Kovács I, Szántó S, et al. Adenosine inhibits the release of interleukin-1 β in activated human peripheral mononuclear cells. Cytokine. 2005;31(4):258-263. doi:10.1016/j.cyto.2005.05.002
38. Xaus J, Valledor AF, Cardó M, et al. Adenosine Inhibits Macrophage Colony-Stimulating Factor-Dependent Proliferation of Macrophages Through the Induction of p27kip-1 Expression. Journal of Immunology. 1999;163(8):4140-4149. doi:10.4049/jimmunol.163.8.4140
39. Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, et al. The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. Journal of Clinical Investigation. 2006;116(7):1913-1923. doi:10.1172/JCI27933
40. Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S, Thompson LF, Eltzschig HK. A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. Blood. 2008;111(4):2024-2035. doi:10.1182/blood-2007-10-117044
41. Butler M, Sanmugalingam D, Burton VJ, et al. Impairment of adenosine A3 receptor activity disrupts neutrophil migratory capacity and impacts innate immune function in vivo. European Journal of Immunology. 2012;42(12):3358-3368. doi:10.1002/eji.201242655
42. Haskó G, Németh ZH, Vizi ES, Salzman AL, Szabó C. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. European Journal of Pharmacology. 1998;358(3):261-268. doi:10.1016/s0014-2999(98)00619-0

43. Fishman P, Bar-Yehuda S, Liang BT, Jacobson KA. Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. *Drug Discovery Today*. 2012;17(7-8):359-366. doi:10.1016/j.drudis.2011.10.007
44. Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Müller CE, Sträter N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure*. 2012;20(12):2161-2173. doi:10.1016/j.str.2012.10.001
45. De Flora A, Zocchi E, Guida L, Franco L, Bruzzone S. Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1028:176-191. doi:10.1196/annals.1322.021
46. Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:619458. doi:10.3389/fphar.2020.619458
47. Minor M, Alcedo KP, Battaglia RA, Snider NT. Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2019;317(6):C1079-C1092. doi:10.1152/ajpcell.00285.2019
48. Schneider E, Rissiek A, Winzer R, et al. Generation and Function of Non-cell-bound CD73 in Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1729. doi:10.3389/fimmu.2019.01729
49. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*. 2017;120(1):207-228. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
50. Yegutkin GG, Auvinen K, Rantakari P, et al. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 enhances endothelial barrier function and sprouting in blood but not lymphatic vasculature. *European Journal of Immunology*. 2015;45(2):562-573. doi:10.1002/eji.201444856
51. Bono MR, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters*. 2015;589(22):3454-3460. doi:10.1016/j.febslet.2015.07.027
52. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*. 2004;25(1):33-39. doi:10.1016/j.it.2003.11.003
53. Vijayan D, Young A, Teng MWL, Smyth MJ. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(12):709-724. doi:10.1038/nrc.2017.86

54. Rubenich DS, de Souza PO, Omizzollo N, Lenz GS, Seigny J, Braganhol E. Neutrophils: fast and furious—the nucleotide pathway. *Purinergic Signalling*. 2021;17(3):371-383. doi:10.1007/s11302-021-09786-7
55. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(6):1257-1265. doi:10.1084/jem.20062512
56. Eckle T, Krahn T, Grenz A, et al. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation*. 2007;115(12):1581-1590. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.669697
57. Borg N, Alter C, Gördt N, et al. CD73 on T Cells Orchestrates Cardiac Wound Healing After Myocardial Infarction by Purinergic Metabolic Reprogramming. *Circulation*. 2017;136(3):297-313. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023365
58. Quast C, Alter C, Ding Z, Borg N, Schrader J. Adenosine Formed by CD73 on T Cells Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis and Preserves Contractile Function in Transverse Aortic Constriction–Induced Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*. 2017;10(4). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003346
59. Zerneck A, Bidzhekov K, Özüyaman B, et al. CD73/Ecto-5'-Nucleotidase Protects Against Vascular Inflammation and Neointima Formation. *Circulation*. 2006;113(17):2120-2127. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595249
60. Buchheiser A, Ebner A, Burghoff S, et al. Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovascular Research*. 2011;92(2):338-347. doi:10.1093/cvr/cvr218
61. Sutton NR, Bouïs D, Mann KM, et al. CD73 Promotes Age-Dependent Accretion of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2020;40(1):61-71. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313002
62. Sénémaud J, Caligiuri G, Etienne H, Delbosc S, Michel JB, Coscas R. Translational Relevance and Recent Advances of Animal Models of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;37(3):401-410. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308534
63. Goergen CJ, Barr KN, Huynh DT, et al. In Vivo Quantification of Murine Aortic Cyclic Strain, Motion, and Curvature: Implications for Abdominal Aortic Aneurysm Growth. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2010;32(4):847. doi:10.1002/jmri.22331

64. Phillips EH, Yrineo AA, Schroeder HD, Wilson KE, Cheng JX, Goergen CJ. Morphological and Biomechanical Differences in the Elastase and AngII apoE $-/-$ Rodent Models of Abdominal Aortic Aneurysms. *BioMed Research International*. 2015;2015:413189. doi:10.1155/2015/413189
65. Te Riet L, van Esch JHM, Roks AJM, van den Meiracker AH, Danser AHJ. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation Research*. 2015;116(6):960-975. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303587
66. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirososou M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. *Comprehensive Physiology*. 2014;4(3):1201-1228. doi:10.1002/cphy.c130040
67. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(12):1693-1701. doi:10.1172/JCI7451
68. Mellak S, Ait-Oufella H, Esposito B, et al. Angiotensin II mobilizes spleen monocytes to promote the development of abdominal aortic aneurysm in Apoe $-/-$ mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015;35(2):378-388. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304389
69. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(11):1605-1612. Accessed August 2, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC300846/>
70. Liu J, Daugherty A, Lu H. Angiotensin II and Abdominal Aortic Aneurysms: An update. *Current Pharmaceutical Design*. 2015;21(28):4035-4048. doi:10.2174/1381612821666150826093318
71. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2018;98(3):1627-1738. doi:10.1152/physrev.00038.2017
72. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(10):2449-2460. doi:10.1084/jem.20070657
73. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008;29(7):367-374. doi:10.1016/j.tips.2008.05.003

74. Lysgaard Poulsen J, Stubbe J, Lindholt JS. Animal Models Used to Explore Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2016;52(4):487-499. doi:10.1016/j.ejvs.2016.07.004
75. Saraff K, Babamusta F, Cassis LA, Daugherty A. Aortic Dissection Precedes Formation of Aneurysms and Atherosclerosis in Angiotensin II-Infused, Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003;23(9):1621-1626. doi:10.1161/01.ATV.0000085631.76095.64
76. Trachet B, Fraga-Silva RA, Jacquet PA, Stergiopoulos N, Segers P. Incidence, severity, mortality, and confounding factors for dissecting AAA detection in angiotensin II-infused mice: a meta-analysis. *Cardiovascular Research*. 2015;108(1):159-170. doi:10.1093/cvr/cvv215
77. Pawelec G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? *Experimental Gerontology*. 2018;105:4-9. doi:10.1016/j.exger.2017.10.024
78. Stahl EC, Brown BN. Cell Therapy Strategies to Combat Immunosenescence. *Organogenesis*. 2015;11(4):159-172. doi:10.1080/15476278.2015.1120046
79. Satriano A, Rivolo S, Martufi G, Finol EA, Di Martino ES. In vivo strain assessment of the abdominal aortic aneurysm. *Journal of Biomechanics*. 2015;48(2):354-360. doi:10.1016/j.jbiomech.2014.11.016
80. He X, Lu J. On strain-based rupture criterion for ascending aortic aneurysm: The role of fiber waviness. *Acta Biomaterialia*. 2022;149:51-59. doi:10.1016/j.actbio.2022.06.034
81. Ning H, Liu X, Ma C, Yang J, Li T. The Evaluation of Longitudinal Strain of Large and Small Abdominal Aortic Aneurysm by Two-Dimensional Speckle-Tracking Ultrasound. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2022;41(5):1085-1093. doi:10.1002/jum.15792
82. Bihari P, Shelke A, Nwe TH, et al. Strain measurement of abdominal aortic aneurysm with real-time 3D ultrasound speckle tracking. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2013;45(4):315-323. doi:10.1016/j.ejvs.2013.01.004
83. Bhatta A, Yao L, Toque HA, et al. Angiotensin II-induced arterial thickening, fibrosis and stiffening involves elevated arginase function. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0121727. doi:10.1371/journal.pone.0121727
84. Forrester SJ, Kawai T, O'Brien S, Thomas W, Harris RC, Eguchi S. Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Mechanisms, Pathophysiology, and Potential

- Therapies in the Cardiovascular System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2016;56:627-653. doi:10.1146/annurev-pharmtox-070115-095427
85. Favreau JT, Nguyen BT, Gao I, et al. Murine ultrasound imaging for circumferential strain analyses in the angiotensin II abdominal aortic aneurysm model. *Journal of Vascular Surgery*. 2012;56(2):462-469. doi:10.1016/j.jvs.2012.01.056
 86. de Gasparo M, Siragy HM. The AT₂ receptor: fact, fancy and fantasy. *Regulatory Peptides*. 1999;81(1-3):11-24. doi:10.1016/s0167-0115(99)00023-3
 87. Heymes C, Swynghedauw B, Chevalier B. Activation of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme gene expression in the left ventricle of senescent rats. *Circulation*. 1994;90(3):1328-1333. doi:10.1161/01.cir.90.3.1328
 88. Heymes C, Silvestre JS, Llorens-Cortes C, et al. Cardiac Senescence Is Associated with Enhanced Expression of Angiotensin II Receptor Subtypes*. *Endocrinology*. 1998;139(5):2579-2587. doi:10.1210/endo.139.5.6023
 89. Astrand H, Stalhand J, Karlsson J, Karlsson M, Sonesson B, Länne T. In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: effect of age and sex. *Journal of Applied Physiology* (1985). 2011;110(1):176-187. doi:10.1152/jappphysiol.00579.2010
 90. Watson SR, Cooper KM, Liu P, et al. Diet alters age-related remodeling of aortic collagen in mice susceptible to atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2021;320(1):H52-H65. doi:10.1152/ajpheart.00420.2020
 91. Hosoda Y, Kawano K, Yamasawa F, Ishii T, Shibata T, Inayama S. Age-dependent changes of collagen and elastin content in human aorta and pulmonary artery. *Angiology*. 1984;35(10):615-621. doi:10.1177/000331978403501001
 92. Dhingra R, Vasan RS. Age as a Cardiovascular Risk Factor. *Medical Clinics of North America*. 2011;96(1):87. doi:10.1016/j.mcna.2011.11.003
 93. Tian F, Chen L, Qian Z (Min), et al. Ranking age-specific modifiable risk factors for cardiovascular disease and mortality: evidence from a population-based longitudinal study. *eClinicalMedicine*. 2023;64. doi:10.1016/j.eclinm.2023.102230
 94. Cisneros B, García-Aguirre I, Unzueta J, et al. Immune system modulation in aging: Molecular mechanisms and therapeutic targets. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1059173. doi:10.3389/fimmu.2022.1059173
 95. Gameraddin M. Normal abdominal aorta diameter on abdominal sonography in healthy asymptomatic adults: impact of age and gender. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2019;12(1):186-191. doi:10.1080/16878507.2019.1617553

96. Wanhainen A, Themudo R, Ahlström H, Lind L, Johansson L. Thoracic and abdominal aortic dimension in 70-year-old men and women – A population-based whole-body magnetic resonance imaging (MRI) study. *Journal of Vascular Surgery*. 2008;47(3):504-512. doi:10.1016/j.jvs.2007.10.043
97. Grimshaw GM, Thompson JM. Changes in diameter of the abdominal aorta with age: An epidemiological study. *Journal of Clinical Ultrasound*. 1997;25(1):7-13. doi:10.1002/(SICI)1097-0096(199701)25:1<7::AID-JCU2>3.0.CO;2-M
98. Allison MA, Kwan K, DiTomasso D, Wright CM, Criqui MH. The epidemiology of abdominal aortic diameter. *Journal of Vascular Surgery*. 2008;48(1):121-127. doi:10.1016/j.jvs.2008.02.031
99. Hickson SS, Butlin M, Graves M, et al. The relationship of age with regional aortic stiffness and diameter. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2010;3(12):1247-1255. doi:10.1016/j.jcmg.2010.09.016
100. Vatner SF, Zhang J, Vyzas C, Mishra K, Graham RM, Vatner DE. Vascular Stiffness in Aging and Disease. *Frontiers in Physiology*. 2021;12. doi:10.3389/fphys.2021.762437
101. Wolinsky H. Comparison of Abdominal and Thoracic Aortic Medial Structure in Mammals. *Circulation Research*. 1969;25(6):677-686. <https://doi.org/10.1161/01.RES.25.6.677>
102. Yeragani VK, Sobolewski E, Kay J, Jampala VC, Igel G. Effect of age on long-term heart rate variability. *Cardiovascular Research*. 1997;35(1):35-42. doi:10.1016/S0008-6363(97)00107-7
103. Jensen-Urstad K, Storck N, Bouvier F, Ericson M, Lindbland LE, Jensen-Urstad M. Heart rate variability in healthy subjects is related to age and gender. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1997;160(3):235-241. doi:10.1046/j.1365-201X.1997.00142.x
104. Fiechter M, Fuchs TA, Gebhard C, et al. Age-related normal structural and functional ventricular values in cardiac function assessed by magnetic resonance. *BMC Medical Imaging*. 2013;13:6. doi:10.1186/1471-2342-13-6
105. Wang Y, Dong C, Han Y, Gu Z, Sun C. Immunosenescence, aging and successful aging. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:942796. doi:10.3389/fimmu.2022.942796

106. Thin KA, Cross A, Angsuwatcharakon P, Mutirangura A, Puttipanyalears C, Edwards SW. Changes in immune cell subtypes during ageing. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2024;122:105376. doi:10.1016/j.archger.2024.105376
107. Prabhakar M, Ershler WB, Longo DL. Bone Marrow, Thymus and Blood: Changes Across the Lifespan. *Aging Health*. 2009;5(3):385-393. doi:10.2217/ahe.09.31
108. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transplant International*. 2009;22(11):1041-1050. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x
109. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature Immunology*. 2004;5(2):133-139. doi:10.1038/ni1033
110. Alves AS, Bueno V. Immunosenescence: participation of T lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells in aging-related immune response changes. *Einstein*. 2019;17(2):eRB4733. doi:10.31744/einstein_journal/2019RB4733
111. Sun L, Brown R, Chen S, Zhuge Q, Su DM. Aging induced decline in T-lymphopoiesis is primarily dependent on status of progenitor niches in the bone marrow and thymus. *Aging*. 2012;4(9):606-619. doi:10.18632/aging.100487
112. Qin L, Jing X, Qiu Z, et al. Aging of immune system: immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *Aging*. 2016;8(5):848-859. doi:10.18632/aging.100894
113. Weng n ping. Aging of the Immune System: How Much Can the Adaptive Immune System Adapt? *Immunity*. 2006;24(5):495. doi:10.1016/j.immuni.2006.05.001
114. Caillon A, Grenier C, Grimaud L, et al. The angiotensin II type 2 receptor activates flow-mediated outward remodelling through T cells-dependent interleukin-17 production. *Cardiovascular Research*. 2016;112(1):515-525. doi:10.1093/cvr/cvw172
115. Hu S, Xiang D, Zhang X, et al. The mechanisms and cross-protection of trained innate immunity. *Virology Journal*. 2022;19(1):210. doi:10.1186/s12985-022-01937-5
116. Abacar K, Macleod T, Direskeneli H, McGonagle D. How underappreciated autoinflammatory (innate immunity) mechanisms dominate disparate autoimmune disorders. *Frontiers in Immunology*. 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1439371
117. Semmes EC, Chen JL, Goswami R, Burt TD, Permar SR, Fouda GG. Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. *Frontiers in Immunology*. 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.595297

118. Davidson JA, Urban T, Tong S, et al. Alkaline Phosphatase, Soluble Extracellular Adenine Nucleotides, and Adenosine Production after Infant Cardiopulmonary Bypass. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0158981. doi:10.1371/journal.pone.0158981
119. Sekaran S, Vimalraj S, Thangavelu L. The Physiological and Pathological Role of Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase beyond Mineralization. *Biomolecules*. 2021;11(11):1564. doi:10.3390/biom11111564
120. Yang H, Yao F, Davis PF, Tan ST, Hall SRR. CD73, Tumor Plasticity and Immune Evasion in Solid Cancers. *Cancers*. 2021;13(2):177. doi:10.3390/cancers13020177
121. Grünewald JK, Ridley AJ. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *Journal of Inflammation*. 2010;7(1):10. doi:10.1186/1476-9255-7-10
122. Hesse J, Siekierka-Harreis M, Steckel B, et al. Profound inhibition of CD73-dependent formation of anti-inflammatory adenosine in B cells of SLE patients. *eBioMedicine*. 2021;73. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103616
123. Joolharzadeh P, Hilaire CS. CD73 and the differences between mice and humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2019;39(3):339. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311579
124. Eckle T, Füllbier L, Wehrmann M, et al. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *Journal of Immunology*. 2007;178(12):8127-8137. doi:10.4049/jimmunol.178.12.8127
125. Hart ML, Henn M, Köhler D, et al. Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury. *FASEB Journal*. 2008;22(8):2784-2797. doi:10.1096/fj.07-103911
126. Hakovirta H, Jalkanen J, Saimanen E, et al. Induction of CD73 prevents death after emergency open aortic surgery for a ruptured abdominal aortic aneurysm: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Scientific Reports*. 2022;12:1839. doi:10.1038/s41598-022-05771-1

6 Anhang

Auswertungsgruppe	Anzahl der Werte/ Anzahl je Vergleichsgruppe	H-Wert	P-Wert/ adjustierter P-Wert
CD73: CD45+, CD11b-	38	8,780	0,0324
3- vs. 6-	12 vs. 4		0,4640
3- vs. 3+	12 vs. 12		> 0,9999
3- vs. 6+	12 vs. 10		> 0,9999
6- vs. 3+	4 vs. 12		0,0585
6- vs. 6+	4 vs. 10		0,0407
3+ vs. 6+	12 vs. 10		> 0,9999

Tabelle 6: post-hoc-Analyse für MFI-Werte des CD73-Antikörpers bei Mäusen ohne CD73-Defizienz

Die Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der post-hoc-Analyse mittels Dunn's multiple comparisons test für Immunzellgruppen von Mäusen ohne CD73-Defizienz, deren MFI-Werte des CD73-Antikörpers im Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede zeigten. Verglichen wurden juvenile Mäuse (3 Monate) und adulte Mäuse (6 Monate) mit (+) und ohne (-) Angiotensin-II-Stimulation.

Auswertungsgruppe	Anzahl der Werte/ Anzahl je Vergleichsgruppe	Kruskal-Wallis- Test: H-Wert	P-Wert/ adjustierter P-Wert (Dunn-Test)
CD38: CD45+, CD11b-	38	11,23	0,0105
3- vs. 6-	11 vs. 4		> 0,9999
3- vs. 3+	11 vs. 12		0,1790
3- vs. 6+	11 vs. 11		> 0,9999
6- vs. 3+	4 vs. 12		> 0,9999
6- vs. 6+	4 vs. 11		> 0,9999
3+ vs. 6+	12 vs. 11		0,0062
CD38: CD45+, CD11b+	39	10,12	0,0176
3- vs. 6-	12 vs. 4		0,0285
3- vs. 3+	12 vs. 12		0,2270
3- vs. 6+	12 vs. 11		0,1669

6- vs. 3+	4 vs. 12		> 0,9999
6- vs. 6+	4 vs. 11		> 0,9999
3+ vs. 6+	12 vs. 11		> 0,9999

Tabelle 7: post-hoc-Analyse für MFI-Werte des CD38-Antikörpers bei Mäusen ohne CD73-Defizienz

Die Tabelle 7 zeigt die post-hoc-Analyse mittels Dunn's multiple comparisons test für Immunzellgruppen von Mäusen ohne CD73-Defizienz, deren MFI-Werte des CD38-Antikörpers im Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede aufwiesen. Auch hier wurden juvenile Mäuse (3 Monate) und adulte Mäuse (6 Monate) mit (+) und ohne (-) Angiotensin-II-Stimulation miteinander verglichen.

Auswertungsgruppe	Anzahl der Werte/ Anzahl je Vergleichsgruppe	H-Wert	P-Wert/ adjustierter P-Wert
CD39: CD45+	36	18,63	0,0003
3- vs. 6-	12 vs. 4		0,0067
3- vs. 3+	12 vs. 9		> 0,9999
3- vs. 6+	12 vs. 11		0,0039
6- vs. 3+	4 vs. 9		0,0515
6- vs. 6+	4 vs. 11		> 0,9999
3+ vs. 6+	9 vs. 11		0,0763
CD39: CD45+, CD11b-	36	8,587	0,0353
3- vs. 6-	12 vs. 4		0,0600
3- vs. 3+	12 vs. 9		0,8192
3- vs. 6+	12 vs. 11		0,1699
6- vs. 3+	4 vs. 9		> 0,9999
6- vs. 6+	4 vs. 11		> 0,9999
3+ vs. 6+	9 vs. 11		> 0,9999
CD39: CD45+, CD11b+	36	18,92	0,0003
3- vs. 6-	12 vs. 4		0,0047
3- vs. 3+	12 vs. 9		> 0,9999
3- vs. 6+	12 vs. 11		0,0026
6- vs. 3+	4 vs. 9		0,0771
6- vs. 6+	4 vs. 11		> 0,9999
3+ vs. 6+	9 vs. 11		0,1340

CD38: CD45+	36	14,07	0,0028
3- vs. 6-	12 vs. 4		0,0070
3- vs. 3+	12 vs. 9		0,3579
3- vs. 6+	12 vs. 11		0,0240
6- vs. 3+	4 vs. 9		0,4939
6- vs. 6+	4 vs. 11		> 0,9999
3+ vs. 6+	9 vs. 11		> 0,9999
CD38: CD45+, CD11b+	36	17,10	0,0007
3- vs. 6-	12 vs. 4		0,0129
3- vs. 3+	12 vs. 9		0,2215
3- vs. 6+	12 vs. 11		0,0015
6- vs. 3+	4 vs. 9		0,9386
6- vs. 6+	4 vs. 11		> 0,9999
3+ vs. 6+	9 vs. 11		> 0,9999

Tabelle 8: *post-hoc*-Analyse für MFI-Werte des CD39- und CD38-Antikörpers bei CD73-defizienten Mäusen

Die Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der post-hoc-Analyse mittels Dunn's multiple comparisons test für Immunzellgruppen von CD73-defizienten Mäusen, deren MFI-Werte der CD39- und CD38-Antikörper im Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede aufwiesen. Verglichen wurden juvenile Mäuse (3 Monate) und adulte Mäuse (6 Monate) mit (+) und ohne (-) Angiotensin-II-Stimulation.