

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hubert Schelzig

Charakterisierung der mechanischen Endothelintegrität im Kontext der Pathogenese  
von Aortendissektionen

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

vorgelegt von  
Sönke Maximilian Braß

2026

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Markus Wagenhäuser

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hug Aubin

Für meine Familie

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Braß SM, Mazrekaj A, Mulorz J, Ibing W, Krott K-J, Takeuchi K, Cappallo M, Liu H-H, Elvers M, Schelzig H, Wagenhäuser MU. Nicotine Potentially Alters Endothelial Inflammation and Cell Adhesion via *LGALS9*. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2024; 11(1):6. <https://doi.org/10.3390/jcdd11010006> [1]

## Zusammenfassung

Die Aortendissektion (AD) ist eine lebensbedrohliche Notfallkrankung, die durch die Trennung von Gefäßwandschichten und die Bildung eines echten und eines falschen Gefäßlumens charakterisiert ist. Zu den etablierten Risikofaktoren zählen die arterielle Hypertonie (aHT) und das Rauchen. Pathophysiologisch kommt es zu einem initialen Einriss der Tunica Intima, wobei insbesondere die Endothelintegrität eine maßgebliche Rolle spielen könnte. Diese wird durch Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionsproteine aufrechterhalten, wobei Ve-Cadherin und Integrine zentrale Funktionen einnehmen.

Ziel der Arbeit war es, die Integrität humaner aortaler Endothelzellen (HAoEC) nach Exposition mit Nikotin (Nik) und Angiotensin II (Ang II) als Modellsubstanzen für die Risikofaktoren aHT und Rauchen zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Gen- und Proteinexpression relevanter Adhäsionsproteine mit Hilfe von standardisierten Verfahren quantifiziert. Ergänzend erfolgte eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung, um Aufschluss über weitere potenziell bedeutende Gene für die Endothelintegrität zu erhalten.

Die Ergebnisse der Arbeit deuten auf eine signifikant erhöhte Nik induzierte Genexpression von Ve-Cadherin und Integrin  $\beta 1$  hin, wobei diese vermutlich über eine Laminin vermittelte Regulation erfolgt. Auf Proteinebene wurde stattdessen keine signifikante Regulation der Adhäsionsproteine beobachtet. Die Transkriptomanalyse zeigt eine erhöhte Expression der Galektin kodierenden Gene Galektin-9 (*LGALS9*), Galektin-3 *binding protein* (*LGALS3BP*) und Galektin-3 (*LGALS3*) unter Nikotineinfluss. Galektine haben bekannte Funktionen in der Zell-Zell und Zell-Matrix Verknüpfung und interagieren mit gefäßbiologisch relevanten Genen wie Fibronectin 1 (*FN1*),  $\beta$ -Catenin (*CTNNB1*), Integrin- $\beta 1$  (*ITGB1*), *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (*VCAM1*) und Matrix-Metalloproteinase 2 (*MMP2*), wie eine Interaktionsanalyse zeigt.

Schlussfolgernd hat vor allem die Nik Exposition zu einer signifikant veränderten Genexpression geführt. Die Galektinfamilie wurde als potentieller noveller Regulator im Kontext der Endothelintegrität identifiziert. Weiterführende Experimente sind notwendig um entsprechende Interaktionsmechanismen genauer zu verstehen und funktionelle Auswirkungen zu charakterisieren.

## Abstract

Aortic dissection (AD) is a life-threatening emergency condition characterized by the separation of vascular wall layers and the formation of a true and a false lumen. Established risk factors include arterial hypertension (aHT) and smoking. Pathophysiologically, an initial tear in the tunica intima often occurs, in which endothelial integrity may play a significant role. This integrity is maintained by cell-cell and cell-matrix adhesion proteins, with ve-cadherin and integrins playing central roles.

The aim of this work was to characterize the integrity of human aortic endothelial cells (HAoEC) after exposure to nicotine (Nik) and angiotensin II (Ang II) as model substances for the risk factors aHT and smoking.

In the course of this work, the gene and protein expression of relevant adhesion proteins was first quantified using standardized methods. Additionally, a transcriptome analysis was conducted using RNA sequencing to gain insight into other potentially significant genes for endothelial integrity.

The results of the study indicate a significantly increased nicotine-induced gene expression of ve-cadherin and integrin  $\beta$ 1, which presumably occurs through a laminin-mediated regulation. At the protein level, however, no significant regulation of adhesion proteins was observed. The transcriptome analysis shows increased expression of the galectin-coding genes galectin-9 (*LGALS9*), galectin-3 binding protein (*LGALS3BP*) and galectin-3 (*LGALS3*) under nicotine influence. Galectins have known functions in cell-cell and cell-matrix linking and interact with vascular biologically relevant genes such as fibronectin 1 (*FN1*),  $\beta$ -catenin (*CTNNB1*), integrin- $\beta$ 1 (*ITGB1*), vascular cell adhesion molecule 1 (*VCAM1*) and matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*), as an interaction analysis shows.

In conclusion, nicotine exposure in particular led to significantly altered gene expression. The galectin family was identified as a potential novel regulator in the context of endothelial integrity. Further experiments are necessary to understand the corresponding interaction mechanisms in more detail and to clarify the functional effects.

## Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
[N]/m <sup>2</sup>	Newton
-RT	ohne Reverse Transkriptase
<	kleiner als
>	größer als
≤	kleiner gleich
°C	Grad Celsius
μ	Viskosität
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
AAS	Akutes Aortensyndrom
Abb.	Abbildung
AD	Aortendissektion
aHT	arterielle Hypertonie
AJ	Adherens Junction
Ang II	Angiotensin II
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CTNNB1	β-Catenin
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEG	Differentiell exprimierte Gene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxyNukleosidTriPhosphat
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
dyn/cm <sup>2</sup>	dyn pro Quadratzentimeter
EACTS	European Association for Cardio-Thoracic Surgery
EC	Endothelzelle
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EGFL8	Epidermal Growth Factor-Like Protein 8
EtOH	Ethanol
FASTQ	Fast Alignment Sequence Quality
FBS	Fötales Bovines Kälberserum
FDR	False Discovery Rate
Fiji	Fiji is just ImageJ
Flk-1	Fetal liver kinase
FN1	Fibronektin 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GJ	Gap Junction
h	Stunde

<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HAoEC</b>	Humane Aortale Endothelzellen
<b>hCMEC/D3</b>	Humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen
<b>hEFG</b>	Epidermal Growth Factor
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
<b>HUVEC</b>	Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene
<b>IMH</b>	Intramurales Hämatom
<b>inkl.</b>	inklusive
<b>ITGA1</b>	Integrin $\alpha$ 1
<b>ITGA2</b>	Integrin $\alpha$ 2
<b>ITGA6</b>	Integrin $\alpha$ 6
<b>ITGB1</b>	Integrin $\beta$ 1
<b>K</b>	Kontrolle
<b>KCNQ1OT1</b>	long-coding RNA-Gen
<b>Komb</b>	Kombination
<b>LGALS3</b>	Galektin 3
<b>LGALS3BP</b>	Galektin 3 Bindendes Protein
<b>LGALS9</b>	Galektin 9
<b>LOC100190986</b>	RNA-Gen
<b>mg</b>	Milligramm
<b>Min</b>	Minuten
<b>min</b>	Minimum
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>ms</b>	Millisekunden
<b>MSigDB</b>	Molecular Signature Database
<b>n=</b>	Probenanzahl
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuklear Faktor $\kappa$ B
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NGS</b>	Next-Generation-Sequencing
<b>Nik</b>	Nikotin
<b>nm</b>	Nanometer
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>p</b>	p-Wert
<b>Pa</b>	Pascal
<b>padj</b>	p-adjusted
<b>PAU</b>	Penetrierendes Aortenulkus
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PECAM-1</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PTMA</b>	Thymosin $\alpha$ 1
<b>Q</b>	Flussrate
<b>qRT-PCR</b>	Real-Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
<b>r</b>	Radius
<b>r=</b>	Korrelationskoeffizient
<b>RGD</b>	Arginyl-Glycyl-Aspart Säure

<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>s</b>	Sekunden
<b>sog.</b>	sogenante/r
<b>STS</b>	Society of Thoracic Surgeons
<b>TAP1</b>	Transporter associated with antigen processing 1
<b>TJ</b>	Tight Junction
<b>Trypsin-0,25%/EDTA</b>	Trypsin-0,25%/Ethylendiamintetraessigsäure
<b>UCSC</b>	University of California Santa Cruz
<b>VCAM 1</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
<b>VE-Cadherin</b>	Vascular Endothelial Cadherin
<b>Ve-H<sub>2</sub>O</b>	Demineralisiertes Wasser
<b>x</b>	Multiplikationssymbol
<b>xg</b>	Relative Zentrifugalkraft
<b>α</b>	Alpha
<b>β</b>	Beta
<b>τ</b>	Scherstress

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Aorta</b> .....	1
1.1.1 Anatomie der Aorta .....	1
1.1.2 Histologie der Aorta.....	2
1.1.3 Pathologien der Aorta .....	3
<b>1.2 Die Aortendissektion</b> .....	3
1.2.1 Epidemiologie der Aortendissektion .....	4
1.2.2 Klassifikation der Aortendissektion .....	4
1.2.3 Risikofaktoren der Aortendissektion .....	5
1.2.3.1 Arterielle Hypertonie als Risikofaktor .....	5
1.2.3.1.1 Arterielle Hypertonie und Scherstress .....	6
1.2.3.2 Rauchen als Risikofaktor .....	7
<b>1.3 Das Endothel</b> .....	7
1.3.1 Das Zytoskelett von Endothelzellen .....	8
1.3.2 Zell-Zell Verbindungen.....	9
1.3.2.1 Gap-Junctions.....	9
1.3.2.2 Tight-Junctions.....	10
1.3.2.3 Adherens-Junctions .....	10
1.3.3 Zell-Matrix Verbindungen .....	12
1.3.3.1 Die Basalmembran .....	12
1.3.3.2 Integrine.....	12
<b>1.4 Ziele der Arbeit</b> .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Material</b> .....	15
2.1.1 Zellen.....	15
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.5 Lösungen .....	19
2.1.6 Einbettmedium .....	19
2.1.7 Zellkulturmedium .....	19
2.1.8 Computerprogramme.....	19
<b>2.2 Methoden</b> .....	20
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	20
2.2.1.1 Auftauen der Zellkulturen .....	20

2.2.1.2 Zellkultivierung.....	20
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl .....	21
2.2.1.4 Kollagen und Laminin Beschichtung der Kulturgefäße .....	21
2.2.1.5 Behandlung der Zellen .....	22
2.2.1.6 Kultivierung der HAOEC unter Fluss .....	22
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.2.2.1 Ve-Cadherin und Integrin $\beta$ 1 Färbungen der HAOEC.....	24
2.2.2.2 Aktin Färbung Färbungen der HAOEC .....	26
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.3.1 RNA-Extraktion.....	27
2.2.3.2 RNA-Isolation.....	27
2.2.3.3 NanoDrop .....	27
2.2.3.4 cDNA Synthese .....	27
2.2.3.5 qRT-PCR .....	28
2.2.4 Bioinformatische Methoden .....	30
2.2.4.1 Messung der RNA-Qualität und Quantität.....	30
2.2.4.2 Anfertigung der Library .....	31
2.2.4.3 RNA-Sequenzierung.....	31
2.2.4.4 Analyse der RNA-Sequenzen .....	31
2.2.4.5 In-Silico Analyse .....	31
2.2.5 Statistik.....	32
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1 Ergebnisse qRT-PCR.....	33
3.1.1 Genexpressionslevel von Zell-Zell Adhäsionsproteinen .....	33
3.1.2 Genexpressionslevel von Zell-Matrix Adhäsionsproteinen .....	34
3.2 Ergebnisse- $\mu$ -Slides.....	35
3.2.1 Zellkultivierung unter Fluss .....	35
3.2.2 Proteinexpressionslevel von Integrin $\beta$ 1 und Ve-Cadherin.....	36
3.3 Ergebnisse RNA-Sequenzierung.....	39
3.3.1 Probenqualität.....	39
3.3.2 Probenvarianz.....	40
3.3.3 Differentielle Genexpressionsanalyse.....	41
3.3.4 qRT-PCR-Validierung.....	43
3.3.5 <i>In-silico</i> Interaktionsanalyse.....	44
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>46</b>

4.0.1 Limitationen .....	52
4.1 Schlussfolgerungen.....	53
<b>5. Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Anhang.....</b>	<b>64</b>
6.1 Abbildungsverzeichnis .....	64
6.2 Tabellenverzeichnis .....	64

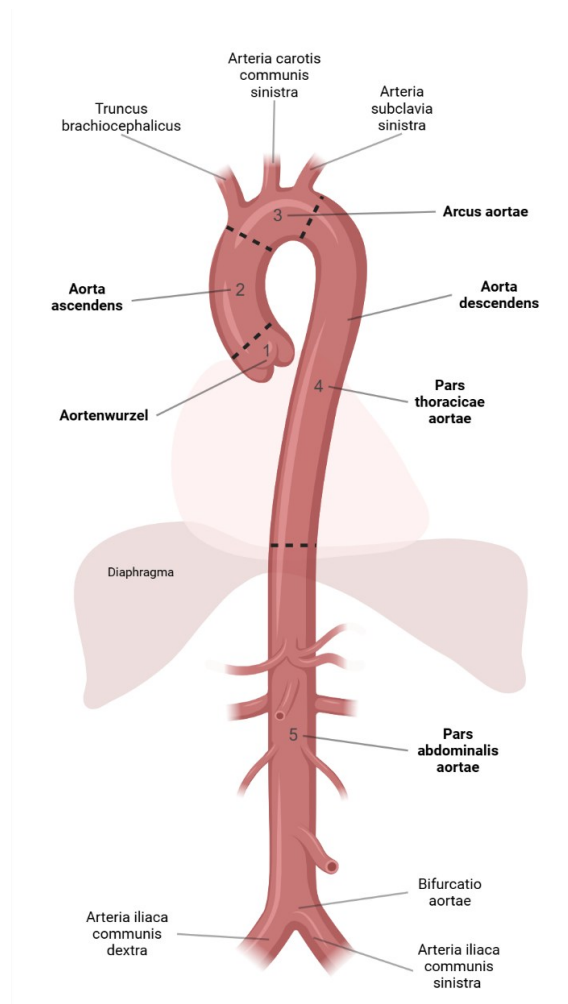
# 1. Einleitung

## 1.1 Die Aorta

Die Aorta, im Volksmund als Hauptschlagader bekannt, ist die größte Arterie des menschlichen Herzkreislaufsystems und wurde 2024 von der *European Association for Cardio-Thoracic Surgery* (EACTS) und der *Society of Thoracic Surgeons* (STS) als selbständiges Organ eingeführt [2]. Bei Erwachsenen erreicht sie einen Durchmesser von ca. 2,5 bis 3,5 cm, wobei dieser von proximal nach distal abnimmt [3]. Sie leitet oxygeniertes Blut aus dem Herzen in die Peripherie.

### 1.1.1 Anatomie der Aorta

Anatomisch lässt sich die Aorta in fünf Segmente einteilen (**Abb. 1**) [4].

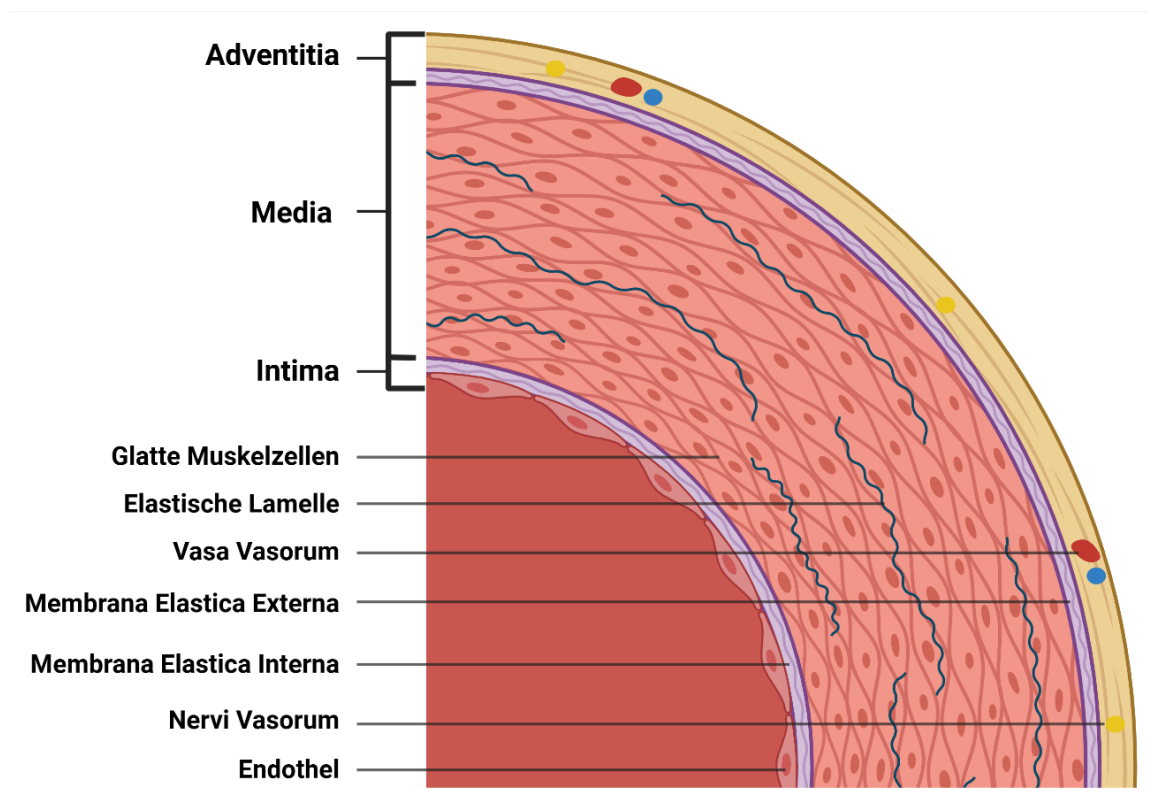


**Abb. 1: Anatomische Einteilung der Aorta.** Die Aorta leitet oxygeniertes Blut aus dem Herzen in die Peripherie und kann in fünf Segmente eingeteilt werden. Auf die Aortenwurzel folgt die Aorta ascendens. Es schließen sich der Arcus aortae, sowie die Aorta descendens an. Diese kann in die Pars thoracicae aortae und Pars abdominalis aortae unterteilt werden. Kreiert mit BioRender nach *Isselbacher et al.* [4].

Die Aortenwurzel entspringt an der Aortenklappe, welche die Aortenwurzel mit dem linken Ventrikel des Herzens verbindet und bildet die Brücke vom Myokard zur Aorta [5]. Das zweite Segment, die Aorta ascendens, nimmt einen kranialen Verlauf ehe der Arcus aortae folgt [6]. Dieser nimmt einen bogenförmigen, dorsalen Verlauf und gibt wichtige arterielle Abgänge für die Blutversorgung der Kopf-Hals Region und oberen Extremitäten ab [7, 8]. Der Truncus brachiocephalicus ist der erste Abgang [6]. Anschließend folgen die Abgänge der Arteria carotis communis sinistra und der Arteria subclavia sinistra [6]. Distal der Arteria subclavia sinistra endet der Aortenbogen und es schließt sich die Aorta descendens an, welche in die Abschnitte Pars thoracicae aortae und Pars abdominalis aortae unterteilt wird [9]. Die Aorta descendens verläuft kaudal, passiert das Diaphragma und gewährleistet die Versorgung der abdominalen Organe [9]. Anschließend teilt sie sich an der Bifurcatio aortae in die beiden Arteriae iliacae communes, welche das Blut in die unteren Extremitäten leiten (**Abb. 1**) [9].

### 1.1.2 Histologie der Aorta

Histologisch weist die aortale Gefäßwand den klassisch dreischichtigen Aufbau elastischer Arterien auf, wobei jede Schicht distinktive Merkmale aufweist (**Abb. 2**) [10].



**Abb. 2: Histologischer Aufbau der Aorta.** Die Aorta weist den klassischen dreischichtigen Wandaufbau auf. Innen die Tunica Intima, in der Mitte die Tunica Media und außen die Tunica Adventitia. Alle Schichten besitzen distinktive Merkmale. Kreiert mit BioRender nach *Isselbacher et al.* [4].

Die Tunica Intima (Innere Gefäßwandschicht) besteht aus Endothelzellen, welche auf einer Basalmembran liegen [4]. Das Endothel stellt eine mechanische Barriere zwischen Gefäßwand und Blutstrom dar [11]. Unter der Basalmembran liegt eine dünne Bindegewebsschicht sowie die Membrana Elastica Interna, welche die Tunica Intima nach außen von den Tunica Media (Mittlere Gefäßwandschicht) abgrenzt [4, 10]. Diese besteht vor allem aus glatten Muskelzellen und einer in der Aorta besonders ausgeprägten Anzahl an elastischen Lamellen [10]. Elastische Lamellen ermöglichen der Aorta die Pulswelle der Myokardsystole in einen kontinuierlichen Blutstrom zu leiten (sog. Windkesselfunktion) [12]. Die Tunica Media wiederum wird durch die Membrana Elastica Externa nach außen zur Tunica Adventitia (Äußere Gefäßwandschicht) abgegrenzt [2, 4]. Die aortale Adventitia besteht aus kollagenösem Bindegewebe, Fibroblasten den Nervi Vasorum und Blutgefäßen, welche die Vasa Vasorum bilden und der Versorgung der Gefäßwand dienen [13].

### 1.1.3 Pathologien der Aorta

Die Aorta kann von einer Vielzahl an Pathologien betroffen sein. Die häufigsten Pathologien der Aorta stellen das Aortenaneurysma, aortale Bindegewebserkrankungen, die Aortitis und das akute Aortensyndrom (AAS) dar [14]. Letzteres fasst drei Notfallerkrankungen der Aorta zusammen, die sich durch eine geschwächte Gefäßwand charakterisieren. Dazu zählen das intramurale Hämatom (IMH), das penetrierende Aortenulkus (PAU), sowie die akute Aortendissektion (AD) [15]. Die AD ist die häufigste Erkrankung des AAS und soll im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen [15].

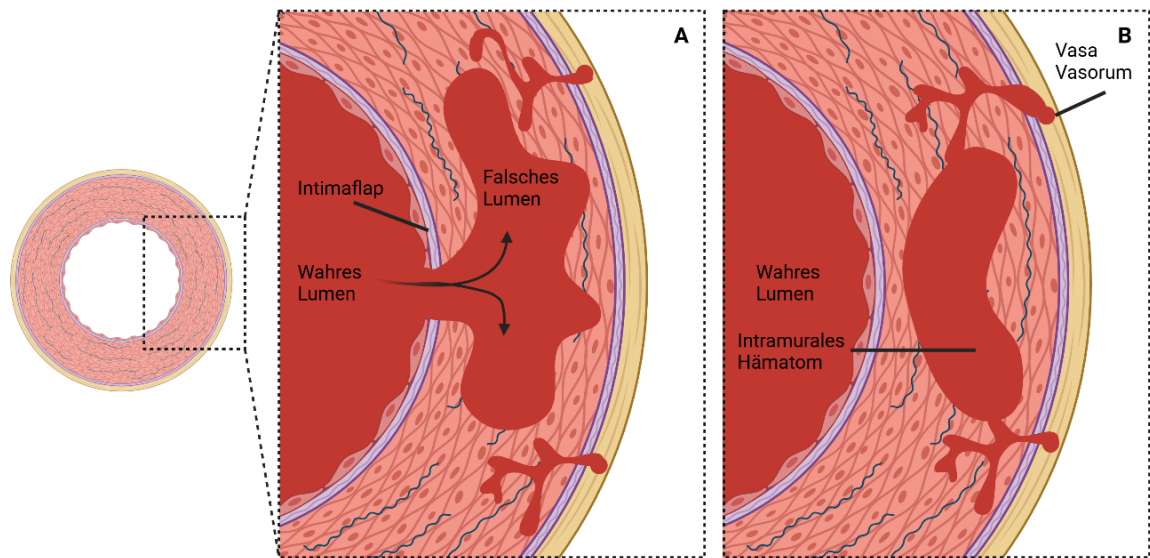
## 1.2 Die Aortendissektion

Die AD stellt eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung dar, die durch die Trennung der Gefäßwandschichten beschrieben wird [16].

In der Regel kommt es zu einem initialen Einriss der Tunica Intima (sog. *Entry*), der das Einströmen von Blut aus dem systemischen Kreislauf in die Gefäßwand zwischen Tunica Intima und Adventitia ermöglicht [17, 18]. Das Blut dehnt sich entweder anterograd oder retrograd entlang der Tunica Media aus, sodass ein *Intimaflap* entsteht, der das wahre Lumen vom neugebildeten Pseudolumen (sog. Falsches Lumen) separiert [3]. In einigen Fällen entsteht ein zweiter, distaler Einriss der Tunica Intima (sog. *Reentry*), über den das Blut aus dem Pseudolumen in das wahre Lumen zurückgelangt (**Abb. 3A**) [16].

In ca. 10% aller Fälle entstehen AD als Folge von IMH [19]. Hier kommt es initial zur Ruptur der Vasa Vasorum, sodass ein IMH die Aufspaltung der Gefäßwand verursacht [16, 20, 21]. In diesen Fällen bleibt die Tunica Intima intakt (**Abb. 3B**) [16, 20].

Als gefährlichste Komplikationen gelten die Malperfusion von Organen und die Aortenruptur, welche tödlich enden können [22].



**Abb. 3: Aortendissektion (AD) verursacht durch eine Separation der Gefäßwand. A:** In den meisten Fällen entsteht eine AD durch den Einriss der Tunica Intima. **B:** In wenigen Fällen führt die Ruptur der Vasa Vasorum zu einem Intramuralen Hämatom (IMH) und einer folgenden AD mit intakter Tunica Intima. Kreiert mit BioRender nach *Nienaber et al.* [16].

### 1.2.1 Epidemiologie der Aortendissektion

AD treten typischerweise ab der fünften Lebensdekade auf [20]. Die hohe Letalität der AD erschwert genaue Aussagen zur Inzidenz. Studien zufolge reicht sie von 5-16 Patienten mit AD pro 100.000 Einwohner, wobei oftmals die prä-hospitalisierten Todesfälle nicht erfasst werden und höhere Inzidenzen durchaus vorstellbar erscheinen [23, 24]. Mit steigendem Alter nimmt die Inzidenz stark zu. Eine prospektive Bevölkerungsstudie aus dem Jahr 2013 von *Howard et al.* berichtet für die Altersgruppe der über 65-Jährigen eine Inzidenz von etwa 35 pro 100.000 Einwohnern [25]. Studienübergreifend sind Männer häufiger betroffen als Frauen [23-25].

### 1.2.2 Klassifikation der Aortendissektion

Es gibt verschiedenste Möglichkeiten die AD zu klassifizieren. Gängig ist die anatomische Einteilung von AD nach der DeBakey- oder Stanford-Klassifikation.

Besonders die Stanford Klassifikation ist für den klinischen Alltag von Bedeutung [22]. Sie teilt die AD in Stanford Typ A und B ein. Sind Teile der Aorta proximal der Arteria subclavia sinistra betroffen, gilt die AD als Stanford Typ A [16, 22, 26]. Wenn ausschließlich die Aorta descendens, d.h. Abschnitte distal der Arteria subclavia sinistra von einer AD betroffen sind, wird diese als Stanford Typ B klassifiziert [16, 20, 22].

Die DeBakey Klassifikation unterscheidet drei Typen der AD. Typ I ist durch den Einriss der Tunica Intima im Bereich der Aorta ascendens mit distaler Ausbreitung inkl. Aorta descendens charakterisiert [20, 26]. Typ II zeichnet sich ebenfalls durch einen Einriss der Tunica Intima im Bereich der Aorta ascendens aus, jedoch ist die distale Ausbreitung auf den Aortenbogen limitiert [20, 26]. Die Aorta descendens ist in keinem Fall beim DeBakey Typ II betroffen [26]. Der Typ III wiederum betrifft ausschließlich die Aorta descendens, sodass der Intima Einriss distal der Arteria subclavia sinistra liegt [20, 26]. Ist die Ausbreitung der Typ III AD auf die Pars thoracicae aortae begrenzt, gilt die AD als Typ IIIa [20, 26]. Wenn jedoch auch die Pars abdominalis aortae betroffen ist, wird die AD als Typ IIIb eingeteilt [20, 26].

Neben der anatomischen Einteilung können AD auch nach ihrem zeitlichen Verlauf in akut, subakut und chronisch klassifiziert werden. Sind Symptome seit maximal 14 Tagen präsent, wird von einer akuten AD ausgegangen [27]. Präsentieren Patienten Symptome über einen Zeitraum von 14 – 90 Tagen, wird eine subakute AD angenommen [27]. Von einer chronischen AD wird bei Symptomen mit mindestens 90 Tagen Persistenz ausgegangen [27].

### 1.2.3 Risikofaktoren der Aortendissektion

Neben den bereits beschriebenen Risikofaktoren des männlichen Geschlechtes und fortgeschrittenen Alters (>65 Jahre), gibt es eine Vielzahl an weiteren Risikofaktoren für die Entstehung von AD. Angeborene Bindegewebserkrankungen, wie das Marfan Syndrom, Loeys-Dietz Syndrom, Ehlers-Danlos Syndrom oder eine bikuspidale Aortenklappe bilden eine erste Gruppe an Risikofaktoren für die AD [17, 28]. Außerdem steigern inflammatorische Erkrankungen wie die Aortitis, Riesenzelleriitis oder Takayasu Arteriitis das Risiko für AD [29]. Weiter gelten eine Schwangerschaft, der Kokainismus und die Dyslipidämie als Risiko [29]. Auch sind die arterielle Hypertonie (aHT) und das Rauchen als modifizierbare Risikofaktoren für AD gut etabliert und sollen im Rahmen dieser Forschungsarbeit genauer untersucht werden [16, 24, 28, 29].

#### 1.2.3.1 Arterielle Hypertonie als Risikofaktor

Die aHT gilt als größter Risikofaktor für AD [18, 24]. Patienten mit AD weisen eine Prävalenz der aHT von bis zu 75 % auf [25, 30]. Ein bekannter Pathomechanismus für die Entstehung von AD als Folge der aHT, ist die Degeneration der Tunica Media. Die aHT führt zu einer Minderperfusion der Vasa Vasorum, welche für die Blutversorgung der Tunica Adventitia und der äußeren Tunica Media verantwortlich ist [21, 31]. Diese Minderperfusion führt zur Ischämie in der äußeren Gefäßwand, sodass unter anderem die Elastizität der Tunica Media abnimmt [31-33]. Histopathologisch zeigen Patienten mit

AD und aHT eine reduzierte Anzahl an elastischen Lamellen und elastischen Verbindungsfasern [32, 33]. Dies hat eine erhöhte Gefäßsteifigkeit zur Folge und kann potentiell zu einer schlechteren Balance zwischen Intima und Adventitia führen, wenn es um die Kompensation von Scherstress geht [33, 34].

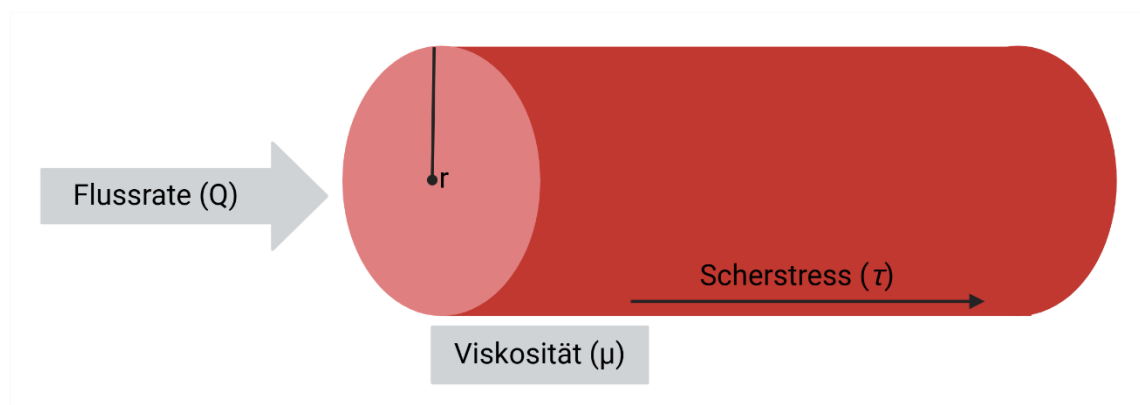
#### 1.2.3.1.1 Arterielle Hypertonie und Scherstress

Die AD ist mit erhöhtem Blutfluss und abnormalem Scherstress assoziiert [35]. Neben morphologischen Veränderungen der Aorta kann auch die aHT zu abnormalem Scherstress führen, sodass der mechanische Stress zu der Entstehung eines *Entry* beiträgt [21, 36]

Scherstress wird als die Kraft, welche parallel zur Oberfläche eines Materials einwirkt definiert [37]. Im menschlichen Körper erzeugt der Blutstrom endothelialen Scherstress, der als Kraft/Flächeneinheit abgegeben wird (in  $\text{dyn}/\text{cm}^2$ , Pascal [Pa] oder Newton  $[\text{N}]/\text{m}^2$ ;  $10 \text{ dyn}/\text{cm}^2 = 1 \text{ Pa} = 1 \text{ N}/\text{m}^2$ ). Die Viskosität ( $\mu$ ) und Flussrate (Q) des Blutes, sowie der Radius (r) der Blutgefäße bestimmen den Scherstress ( $\tau$ ) (**Abb. 4**).

$$\tau = \frac{\mu \times Q \times 4}{\pi \times r^3}$$

Der Normalwert für große Arterien liegt im Durchschnitt bei  $10 - 15 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ , wobei es auf Grund der Hämodynamik deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Regionen eines Gefäßes geben kann [38]. Vom höchsten Scherstress sind in der Regel Bifurkationsareale betroffen [39].



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Scherstress in Blutgefäßen.** Der endotheliale Scherstress ( $\tau$ ) wird von der Viskosität ( $\mu$ ) und der Flussrate (Q), sowie dem Radius (r) des Blutgefäßes bestimmt. Eigene Darstellung kreiert mit BioRender.

Der Scherstress ist ein wichtiger Faktor in der Regulation von physiologischen Prozessen in der Gefäßwand [40]. Er steuert Prozesse in der Tunica Media und vor allem der Tunica Intima, dessen Endothel die mechanische Transduktion des Scherstress umsetzt [41].

### 1.2.3.2 Rauchen als Risikofaktor

Neben der aHT ist das Rauchen ein zweiter modifizierbarer und etablierter Risikofaktor für AD [28]. Studien zeigen ein signifikant höheres Risiko für die Entstehung einer AD, wenn Patienten aktiv rauchen [24, 42]. Auch zeigen Daten, dass sich eine Nikotinkarenz positiv auswirkt und zu einer reduzierten Mortalität führt [42].

Welche genauen pathophysiologischen Prozesse durch das aktive Rauchen zur Entstehung einer AD beitragen, ist nicht in Gänze geklärt. Bekannt ist, dass sie Inhaltsstoffe konventioneller Zigaretten zu Veränderungen in der Tunica Media und Tunica Intima führen, die eine AD bedingen können. Ein Inhaltsstoff, welcher wesentlich zu etwaigen Veränderungen beiträgt ist Nikotin (Nik). Nik trägt zur Versteifung von Gefäßen, der endothelialen Dysfunktion und der Entstehung von atherosklerotischen Plaques bei [43].

Im Kontext der Gefäßversteifung ruft Nik eine erhöhte Expression von Matrixmetalloproteinasen-2 und -9 (MMP2 / MMP9) hervor [43, 44]. Dies führt zur Fragmentierung von elastischen Lamellen in der Tunica Media, sodass die Aorta an Elastizität verliert und versteift [43, 45].

Die Rolle von Nik in der Induktion von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose steht seit Dekaden im Fokus kardiovaskulärer Forschung. Nik Exposition führt zu einer pro-inflammatorischen Umgebung, was letztlich zur endothelialen Dysfunktion führt, die durch eine geringe Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) gekennzeichnet ist [46]. Die endotheliale Dysfunktion ist ein früher Zwischenschritt in der Pathogenese der Atherosklerose, die als Risikofaktor für eine AD gilt [47].

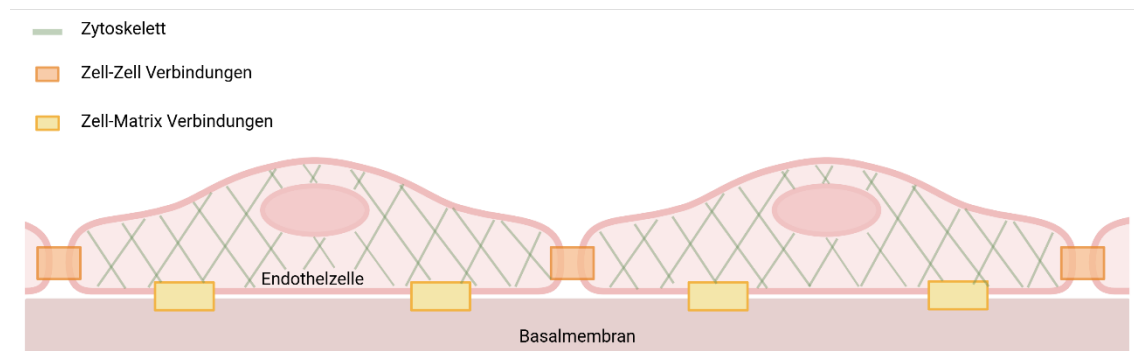
Da das Rauchen und auch die aHT direkte pathologische Einflüsse auf das Endothel haben, könnte es lohnenswert sein die Pathomechanismen dieser beiden Risikofaktoren für eine AD genauer zu untersuchen. Im Hinblick auf die Pathogenese einer AD, welche durch einen initialen Intimaeinriss charakterisiert ist, scheint ein genauer Blick auf die mechanische Stabilität und Integrität des Endothels sinnvoll. Das Endothel ist als innerste Zellschicht direkten mechanischen (Blutdruck) und chemischen Einflüssen (Nik) ausgesetzt.

## 1.3 Das Endothel

In der Aorta bildet das Endothel eine kontinuierliche, nicht-fenestrierte und semipermeable *Monolayer*, die den Transport von Flüssigkeiten, Hormonen, Makromolekülen und Blutzellen zwischen intravasalem und interstitiellem Raum reguliert [48, 49]. Das Endothel formt jedoch nicht nur die mechanische Barriere zwischen

Blutstrom und Gefäßwand, sondern erfüllt darüber hinaus bedeutsame endokrine Funktionen für die physiologische Gefäßfunktion [49]. Es reguliert beispielsweise den Gefäßtonus, steuert den Blutfluss, spielt eine Rolle in der Angiogenese und erfüllt wichtige Funktionen in der Blutgerinnung [50].

Im Hinblick auf die mechanischen Kräfte des Blutstroms, denen das Endothel ausgesetzt ist, sind verschiedene Komponenten für die mechanische Stabilität des Endothels von Bedeutung. Das intrazelluläre Gerüst von Endothelzellen bildet das Zytoskelett [51]. Dieses ist mit Zell-Zell- und Zell-Matrix Verbindungen verknüpft [52]. Zell-Zell Verbindungen verknüpfen zwei benachbarte Endothelzellen und Zell-Matrix Verbindungen bilden die basale Adhäsion von Endothelzellen mit der Basalmembran (**Abb. 5**) [52].



**Abb. 5: Komponenten der endothelialen Stabilität.** Das Gerüst des Endothels wird durch das Zytoskelett geformt. Lateral sind die Endothelzellen durch Zell-Zell Verbindungen verknüpft und basal verknüpfen Zell-Matrix Verbindungen die Endothelzellen mit der Basalmembran. Eigene Darstellung kreiert mit BioRender.

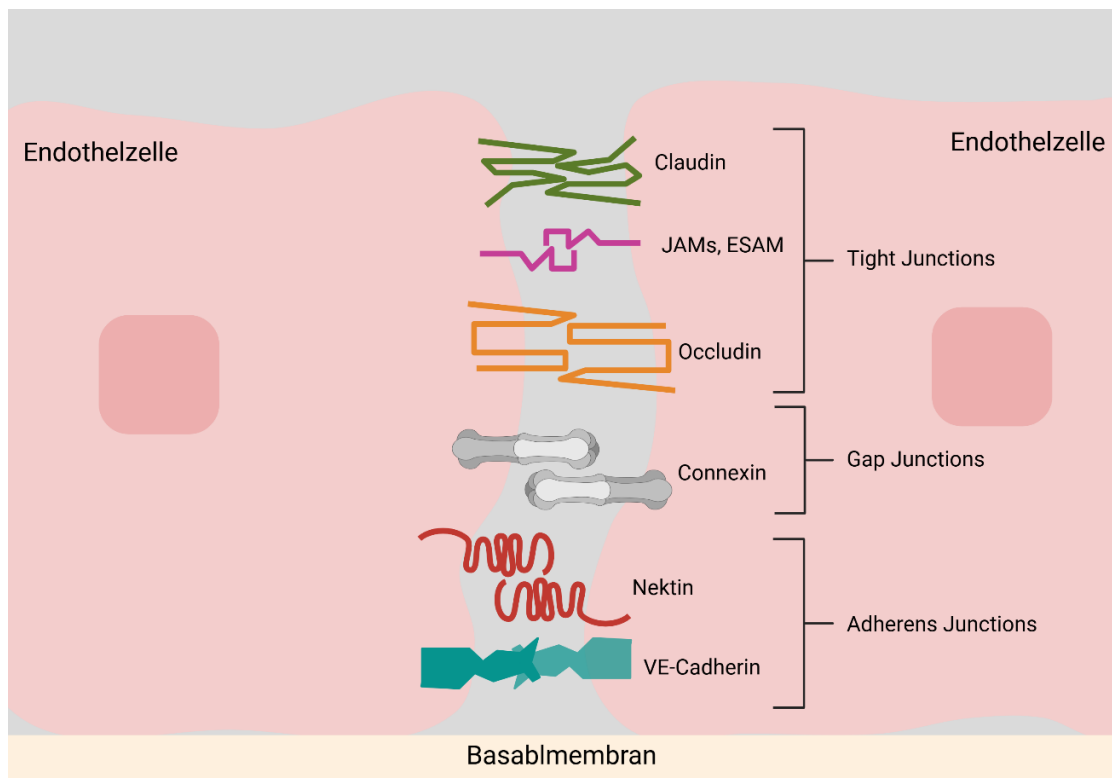
### 1.3.1 Das Zytoskelett von Endothelzellen

Endothelzellen weisen den typischen Aufbau des eukaryotischen Zytoskeletts auf. Dieses befindet sich im Zytoplasma, verleiht der Zelle mechanische Stabilität und verhindert eine übermäßige Verformbarkeit der Zelle [53]. Es besteht im Wesentlichen aus den Hauptstrukturen: Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Aktinfilamente [54]. Mikrotubuli bestehen aus den Heterodimeren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, verlaufen meist von zentral nach außen und sind die steifsten Komponenten des Zytoskeletts [53]. Intermediärfilamente sind länglich und verleihen der Zelle ihre Elastizität. Bislang sind sieben verschiedene Formen von Intermediärfilamenten, welche gewebespezifisch vorkommen, bekannt [55]. Endothelzellen exprimieren den Typ III der Intermediärfilamente Vimentin [55]. Studien zeigten, dass der endotheliale Vimentingehalt im kardiovaskulären System deutliche Variation aufweist und von lokalen, hämodynamischen Gegebenheiten abhängig ist [56]. Die doppelsträngigen Aktinfilamente spielen eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion von Scherstress, der endothelialen Adhärenz und Steuerung der

Permeabilität der Monolayer [57]. Gemeinsam mit Intermediärfilamente sind sie lateral und basal der Endothelzellen mit Zell-Zell- und Zell-Matrix Verbindungen verknüpft [52].

### 1.3.2 Zell-Zell Verbindungen

Zell-Zell Verbindungen sind Proteinkomplexe, die benachbarte Zellen miteinander verknüpfen und essentiell für die Barrierefunktionen, Zellproliferation und Zellmigration von Gewebe sind [58]. Die Ankerproteine der Proteinkomplexe sind im Zytosol mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden. Es folgt ein Transmembranprotein und der extrazelluläre Ligand, welcher mit dem extrazellulären Liganden der Nachbarzelle verankert ist [59]. Die endothelialen Zell-Zell Verbindungen zeichnet sich durch drei große Familien aus: Die *Gap Junctions* (GJ), *Tight Junctions* (TJ) und *Adherens Junctions* (AJ) (**Abb. 6**). Jede dieser Gruppen weist distinktive Merkmale und Funktionen auf [60].



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Zell-Zell Verbindungen.** Zell-Zell Verbindungen verknüpfen Endothelzellen. Es gibt verschiedene Gruppen von Zell-Zell Verbindungen, die distinktive Merkmale haben. Kreiert mit BioRender nach *Wallez und Huber* [60].

#### 1.3.2.1 Gap-Junctions

GJ sind interzelluläre Kanäle die bedeutsam für die Kommunikation benachbarter Zellen sind [61]. Sie ermöglichen die interzelluläre Diffusion kleiner Moleküle und Ionen [61]. Ein Connexin stellt die kleinste Untereinheit von GJ dar [62]. Sechs Connexine bilden ein Connexon und zwei Connexone bilden eine GJ. Unterschiedliche Connexin-Formen

werden gewebespezifisch exprimiert [62]. Das Endothel exprimiert einige Connexine uniform und andere variabel [63]. Die Expression von Connexin43 ist beispielsweise variabel und hängt vom Scherstress ab, sodass Connexin43 in Bifurkationsarealen vermehrt vorkommt [63]. Im kardiovaskulären Kontext sind GJ essentiell für die Vasodilatation von Blutgefäßen und den Blutdruck [64-66]. Beispielhaft zeigt ein Knockout von Connexin40 in Mausmodellen im Phänotyp eine eingeschränkte Gefäßerweiterung [64].

### 1.3.2.2 *Tight-Junctions*

TJ, auch Zonula Occludens genannt, sind für die Barrierefunktion des Endothels essentiell. Sie kontrollieren die endotheliale Permeabilität und sorgen für einen regulierten parazellulären Transport von Wasser, Ionen, Proteinen und Zellen, sodass die vaskuläre Homöostase aufrechterhalten bleibt [67]. Verschiedene Transmembranproteine bilden TJ in dem sie ein apikal liegendes Netzwerk formen. Die Anzahl der TJ ist reziprok proportional zur Permeabilität des Endothels [68]. Zu den wichtigsten TJ Proteinen zählen Occludin, Claudin und *Junctional Adhesion Molecules* [60]. Die endotheliale Permeabilität kann durch unterschiedlichste physiologische und pathologische Reize verändert werden, indem es zu einer geänderten TJ Konfiguration kommt [69]. Ein Integritätsverlust der TJ erhöht die endotheliale Permeabilität, sodass Flüssigkeit, Makromoleküle und Zellen aus den Blutgefäßen in den interstitiellen Raum treten können und die vaskuläre Homöostase aus dem Gleichgewicht kommt [67].

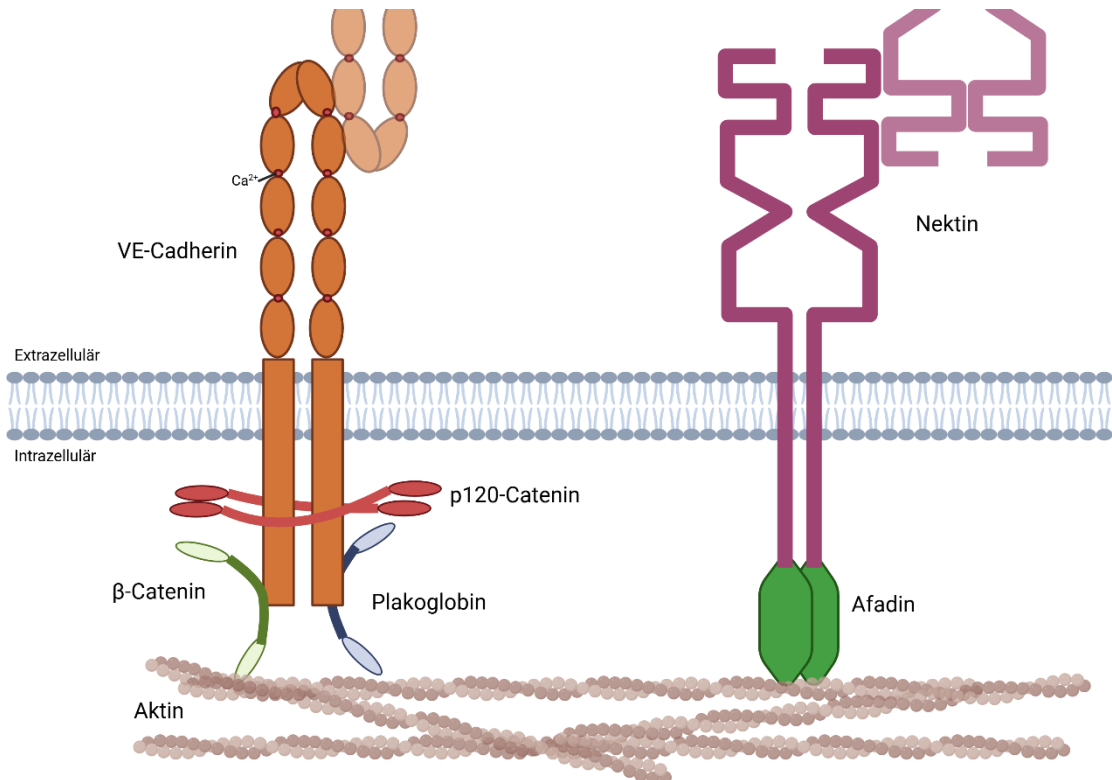
### 1.3.2.3 *Adherens-Junctions*

Nachdem die Schlüsselfunktion von GJ die interzelluläre Kommunikation und von TJ die Regulation des parazellulären Transports ist, sorgen AJ maßgeblich für die mechanische Stabilität des Endothels, welche wie bereits erwähnt im Fokus dieser Arbeit stehen soll [59]. AJ werden von zwei Proteineinheiten gebildet: Die bekannteste ist der Ve-Cadherin-Catenin Komplex, während der Nektin-Afadin Komplex im vaskulären Kontext weniger erforscht ist [70, 71].

#### 1.3.2.3.1 Ve-Cadherin

*Vascular Endothelial Cadherin* (Ve-Cadherin) ist ein transmembran Protein aus der Familie der Cadherine [72]. Cadherine sind Adhäsionsproteine, welche insbesondere in Geweben, die mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, eine Rolle spielen [73]. Die extrazelluläre Domäne von Ve-Cadherin ist für die homophile Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) abhängige Interaktion mit benachbarten Endothelzellen verantwortlich [74]. Durch das Binden von  $\text{Ca}^{2+}$  an die extrazellulären Domänen, werden die Interaktionen gestärkt [75]. Die Transmembranregion verankert das Protein in der Zellmembran und die intrazelluläre

Domäne von Ve-Cadherin ist durch Adapterproteine wie  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin oder p120-Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (**Abb. 7**) [72, 75].



**Abb. 7: Vereinfachte schematische Darstellung endothelialer Adhärenz Junctions.** Ve-Cadherin ist über verschiedene Adapterproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden, während Nektin durch Afadin mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft wird. Eigene Darstellung kreiert mit BioRender.

Ve-Cadherin hat verschiedene Funktionen, welche für das Endothel von essentieller Bedeutung sind. Es ist das bedeutsamste Adhäsionsprotein für die mechanische Stabilität und Integrität des Endothels und Teil eines Scherstress sensitiven Netzwerks, welches ständige Veränderungen der endothelialen Integrität als Antwort auf den lokalen Scherstress ermöglicht [59, 76]. Wie TJ spielt auch Ve-Cadherin eine Rolle in der Regulation der endothelialen Permeabilität [77]. Vor allem die transendotheliale Migration von Leukozyten ist nur durch lokale Ve-Cadherin *Downregulation* möglich und wird durch inflammatorische Zytokine ausgelöst [77, 78]. In pathologischen *Settings* kann dies zur Entstehung von Atherosklerose führen [79].

#### 1.3.2.3.2 Nektin

Im Gegensatz zu Ve-Cadherin bilden Nektine eine Familie von  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängigen Adhäsionsproteinen, die aus vier Mitgliedern (Nektin-1 bis Nektin-4) besteht [80]. Die intrazelluläre Domäne von Nektin ist durch das Adapterprotein Afadin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (**Abb. 7**) [81]. Im Vergleich mit Ve-Cadherin sorgen Nektine für

eine schwächere Zell-Zell Adhäsion, die sowohl homo –, als auch heterophil sein kann [80, 82]. Im Endothel sind Nektine mitverantwortlich für dessen Barrierefunktion [60]. Hier gibt es eine direkte Interaktion mit Ve-Cadherin [60, 81, 82]. Nektin-2 oder Nektin-3 *Knockout* in Endothelzellen hat eine *Downregulation* von Ve-Cadherin und einen Barriereverlust zur Folge [82].

### 1.3.3 Zell-Matrix Verbindungen

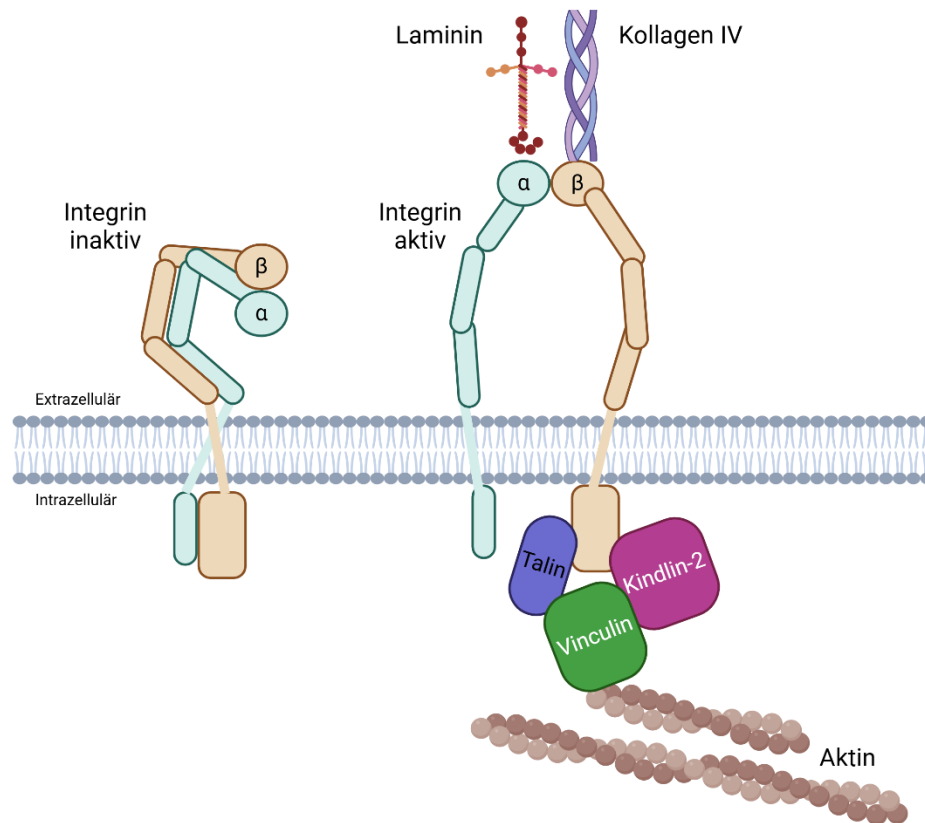
Zell-Matrix Verbindungen sind für die mechanische Stabilität des Endothels ebenso wichtig wie das Zytoskelett und Zell-Zell Verbindungen [83]. Sie verknüpfen das Endothel mit der unterliegenden Basalmembran und tragen so zur Aufrechterhaltung der Endothelintegrität bei [59, 83]. Endotheliale Zell-Matrix Verbindungen werden hauptsächlich durch Integrine gebildet [84].

#### 1.3.3.1 Die Basalmembran

Die Basalmembran besteht im Wesentlichen aus drei Schichten, die von unterschiedlichen Komponenten gebildet werden. Die apikale, endothelnahe Schicht wird als Lamina Lucida bezeichnet und enthält Kollagen IV, Laminine und Fibronectin [83, 85]. Durch eine netzartige Struktur verleiht das Kollagen IV der Basalmembran ihre Stabilität [86]. Die mittlere Schicht, die Lamina Densa, enthält Kollagen IV, Perlecan und Nidogen [85]. Perlecan ist ein Proteoglykan, welches an Zell-Matrix Interaktionen beteiligt ist und Nidogen spielt eine Rolle in der Verbindung von Kollagen IV und Lamininen [87, 88]. Die Lamina Reticularis ist die basale Schicht, welche Proteoglykane und Kollagen enthält [85]. Kollagen IV, Laminin und Fibronectin sind die Komponenten der Basalmembran, welche als Liganden für Integrine dienen [83, 84].

#### 1.3.3.2 Integrine

Integrine sind eine große Familie an heterodimeren Glykoproteinen, die als Adhäsionsproteine dienen [84, 89]. Sie bestehen aus jeweils einer  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit, die wie Zell-Zell Adhäsionsproteine aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembran Domäne und einer kleinen intrazellulären Domäne aufgebaut sind [89]. Integrine übernehmen wichtige Funktionen in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts mit dem sie durch fokale Adhäsionskomplexe verbunden sind [90]. Sie wechseln ständige zwischen inaktivem und aktivem Zustand [91]. Aktiviert werden sie durch die Adapterproteine Talin und Kindlin-2 [90, 91]. Das Aktin-bindende Protein Vinculin verbindet aktivierte Integrine intrazellulär mit dem Zytoskelett (**Abb. 8**) [92]. Die extrazelluläre Domäne der Integrine ist je nach Affinität mit Kollagen IV, Laminin [84]. Integrin  $\alpha1\beta1$  und Integrin  $\alpha2\beta1$  sind zwei Vertreter der Kollagen bindenden Integrine und Integrin  $\alpha6\beta1$  ein Vertreter der Laminin bindenden Integrine [83].



**Abb. 8: Vereinfachte schematische Darstellung der Integrin vermittelten Zell-Matrix Verbindung.** Extrazellulär binden Integrine je nach Affinität an Kollagen IV oder Laminine. Intrazellulär sind sie durch Adapterproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Eigene Darstellung kreiert mit BioRender.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Obwohl der Intimaeinriss in den meisten Fällen der initiale Auslöser für die Entstehung einer AD ist, sind konkrete pathophysiologische Vorgänge, die einen Einriss der Tunica Intima auslösen bzw. begünstigen, nicht in Gänze geklärt. Auf Grund der Tatsache, dass das Endothel als innerste Zellschicht der Tunica Intima eine Barriere zwischen Blutstrom und Gefäßwand darstellt und sowohl den mechanischen, als auch den chemischen Einflüssen des Blutstroms unmittelbar ausgesetzt ist, scheint es sinnvoll das Endothel im Kontext der Pathogenese einer AD genauer zu beleuchten.

Dazu wird in dieser Arbeit der Einfluss von etablierten, modifizierbaren Risikofaktoren für die AD wie eine aHT oder das Rauchen auf die mechanische Endothelintegrität untersucht. Dazu wurden Nik und Ang II als Modellsstanzen für das Rauchen und die aHT zur experimentellen Durchführung ausgewählt. Zunächst wurde sowohl die Gen- als auch Proteinexpression von Ve-Cadherin, Nektin und verschiedenen Integrinen in exponierten Humanen Aortalen Endothelzellen (HAoEC) quantifiziert. Weiterführend

wurde eine Transkriptionsanalyse mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Sequenzierung durchgeführt, um Aufschluss über weitere potenziell bedeutsame Gene für die Endothelintegrität und die damit verbundenen Signaltransduktionswege zu erhalten.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

Wie beeinflussen Nik und Ang II/aHT die Gen- und Proteinexpression von Ve-Cadherin, Nektin und ausgewählten Integrinen in HAoEC?

Welche Gene könnten außerdem in die Regulation der Endothelintegrität von Nik oder Ang II exponierten HAoEC potentiell involviert sein?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zellen**

Für alle Experimente mit Zellkulturen, wurden kommerziell erhältliche HAoEC (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Die Primärzellen wurden aus der humanen Aorta ascendens und Aorta descendens isoliert.

#### **2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Absaugsystem Modell Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Autoklave VX-95	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
Bioreaktor	Fraunhofer, München, Deutschland
Drucker ECOSYS P 2040dn	Kyocera, Kyoto, Japan
Einkanalpipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Köln/Wesseling, Deutschland
Einkanalpipetten P10, P20, P200, P1000	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
Eismaschine Scotsman FRIMONT AF 80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Feuchtigkeitskammern	Eigenbau
Filter- Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 100 µl	STARLab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C HERAFREEZE	Fisher Scientific™ GmbH, Schwerte, Deutschland
HFU T SERIES	
Hämozytometer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
IKA-Schüttler MTS 4	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
Inkubator HERAcell®	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inversmikroskop CKX41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Kamera AxioCam Mrm	Zeiss, Jena, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kulturgefäß: 6-Well Platte	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland

Laborglasflasche Schott-Duran 100 ml	DWK Life Sciences GmbH, Mainz, Deutschland
Mikroskop Axio Observer D1	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco™	Fisher Scientific™ GmbH, Schwerte, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus Pico 21™	Fisher Scientific™ GmbH, Schwerte, Deutschland
Nitril Einmalhandschuhe XL	Ansell, Yarra City, USA
Parafilm 'M' Laboratory Film	Amtcor Limited, Zürich, Schweiz
PCR Reaktionsgefäß Multiply®-Pro Gefäß 0,2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
PCR-Verschließfolien 'B' seal	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Petrischalen 60 x 15 mm	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Petrischalen CELLSTAR 100 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 100 µl	STARLab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Pipettus Eppendorf Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettus Powerpette	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pumpe im Bioreaktor ISMATEC®	IDEX Health & Science GmbH, Wetheim, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml & 2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
RT-PCR System CFX96 Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Schlauchsystem ISMATEC Innerer Durchmesser: 2,79 mm	IDEX Health & Science GmbH, Wetheim, Deutschland
Serologische Pipetten CEIISTAR 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Spektrophotometer NANODROP 2000c	Fisher Scientific™, Waltham, USA
Sterile Luftfilter Filtropur 0,2 µm	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland

Sterile Sicherheitswerkbank Safe 2020	Fisher Scientific™ GmbH, Schwerte, Deutschland
Stickstofftank Cryoplus 3	Fisher Scientific™, Waltham, USA
Thermo Cyclor FlexCyclor2	Analytic Jena, Jena, Deutschland
TUXEDO InfinityBook S 15 - Gen6	TUXEDO Computers GmbH, Augsburg, Deutschland
Universal-Tischzentrifuge 5424	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Köln/Wesseling, Deutschland
Vernichtungsbeutel	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
Vortex GENIE 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wasserbad WNE 14	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellschaber Größe L	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge PerfectSpinMini	VWR PeQlab, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml & 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürmbrecht, Deutschland
µ Slide   Luer 0,4 mm Collagen IV coverslip, 80172	ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland
µ Slide   Luer 0,4 mm uncoated coverslip, 80171	ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Angiotensin II	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
BSA	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Chloroform	VWR International GmbH, Hannover, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Californien, USA
Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EC Basal Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

EC Growth Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol vergällt	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
Fötales Bovines Kälberserum (FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Gentamycin 10 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
Kollagen IV 0,5 mg/ml	R&D Systems, Minneapolis, USA
Laminin 0,5 mg/ml	Roche, Mannheim, Deutschland
Mowiol	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
Nikotin	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Paraformaldehyd 4 %	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher Science, Waltham, USA
Quiazol	Qiagen, Hilden, Deutschland
Tris-HCL	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
Tritron X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypan Blau 0,4 %	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Damstadt, Deutschland
Trypsin 0,25 %/EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Xylol (Roti®Histofix 4 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

#### 2.1.4 Kits

		<u>Hersteller Nr.</u>
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, USA	4368814
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	74004

## 2.1.5 Lösungen

	<u>Rezept</u>	<u>Menge</u>
BSA 1 %	BSA	1 g
	PBS	100 ml
BSA 2 %	BSA	2 g
	PBS	100 ml

## 2.1.6 Einbettmedium

	<u>Rezept</u>	<u>Menge</u>
Mowiol für Fluoreszenz	Mowiol	12 g
	Glycerin (Merck)	30 g
	Ve- H <sub>2</sub> O	30 ml
	0,2M Tris-HCL	60 ml

## 2.1.7 Zellkulturmedium

Zellkulturmedium für Endothelzellen

	<u>Absolute Menge</u>	<u>Finale Konzentration</u>
EC Basal Medium	500 ml	
Fetales Kälberserum	25 ml	0,05 ml/ml
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	2 ml	0,004 ml/ml
Epidermal Growth Factor (hEFG)	500 µl	10 ng/ml
Hydrocortison	500 µl	1 ug/ml

## 2.1.8 Computerprogramme

EndNote 20	Thomson Reuters, New York, USA
Fiji is just ImagJ (Fiji)	NIH open source, Bethesda, USA
GraphPad Prism 9.1.2	Graphpad Software, La Jolla, USA
Linux Ubuntu	Canonical Foundation, Ubuntu community
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
multiqc (Version 1.7)	
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Science, Waltham, USA
R (Version 4.3.1)	
Zen blue Version 3.3.89.0000	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturarbeiten wurden den herkömmlichen Standards entsprechend unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die benötigten Materialien waren vor dem Einsatz entweder steril verpackt oder wurden vorab desinfiziert oder sterilisiert. Die verwendeten Lösungen und Kulturmedien wurden bei 4 °C – 8 °C gelagert und vor Gebrauch in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Zellkulturen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) – Gehalt im Inkubator kultiviert.

#### 2.2.1.1 Auftauen der Zellkulturen

Die HAOEC wurden im Stickstofftank aufbewahrt. Für den Gebrauch wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Sobald sich das Zellpellet vom Kryoröhrchen lösen ließ, wurde es in 10 ml Endothelzellmedium (siehe 2.1.7 Zellkulturmedium) überführt. Anschließend wurde die Suspension auf eine Petrischale transferiert und zur Kultivierung in den Inkubator gegeben.

#### 2.2.1.2 Zellkultivierung

Alle zwei bis drei Tage erfolgte der Wechsel des Endothelzellmediums. Dabei wurde zunächst das alte Medium mittels Absaugsystem dekantiert, bevor die Zellen mit 10 ml *Dulbecco's Balanced Salt Solution* (DPBS) gewaschen wurden. Anschließend wurde 6 ml Endothelzellmedium auf die Petrischale gegeben. Das fortschreitende Zellwachstum wurde engmaschig unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Sobald eine 80 % - 90 % Konfluenz des Zellrasens erreicht war, fand eine Zellpassage statt. Hierbei wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen einmalig mit 10 ml DPBS gewaschen und 1 ml Trypsin-0,25 %/Ethyldiamintetraessigsäure (Trypsin-0,25 %/EDTA) auf die Petrischale pipettiert. Da Trypsin Adhäsionsproteine verdaut, lösten sich die Zellen vom Boden der Petrischale ab und befanden sich in Suspension. Um beschriebenen Vorgang zu stoppen, wurde 6 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + 20 % Fötale Kälberserum (FBS) auf die Zellen gegeben. FBS bindet kompetitiv an die Adhäsionsproteine und stoppt so die Verdauung der Proteine durch Trypsin. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 Minuten (Min) bei 200 x g zentrifugiert, sodass ein Zellpellet entstand. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 10 ml DPBS resuspendiert und wieder für 5 Min bei 200 x g zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren des Überstands, wurden die Zellen in Endothelzellmedium resuspendiert und auf zwei bis drei frische Petrischalen, welche vorab mit 5 ml Endothelzellmedium bedeckt worden waren, ausgesät.

### 2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellen in einer gewünschten Zahl auszusäen, wurden sie, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, gelöst, gewaschen, zentrifugiert und in Suspension aufgenommen. 15 µl der Zellsuspension wurden mit 15 µl Trypanblau gemischt. Danach erfolgte die Bestimmung der Zellzahl gemäß standardisiertem Protokoll in einem Hämocytometer. Unter dem Lichtmikroskop wurden alle leuchtenden, vitalen Zellen in den vier Quadranten gezählt. Anhand der ermittelten Werte wurde dann mittels folgender Formel entsprechende Zellzahl pro ml errechnet.

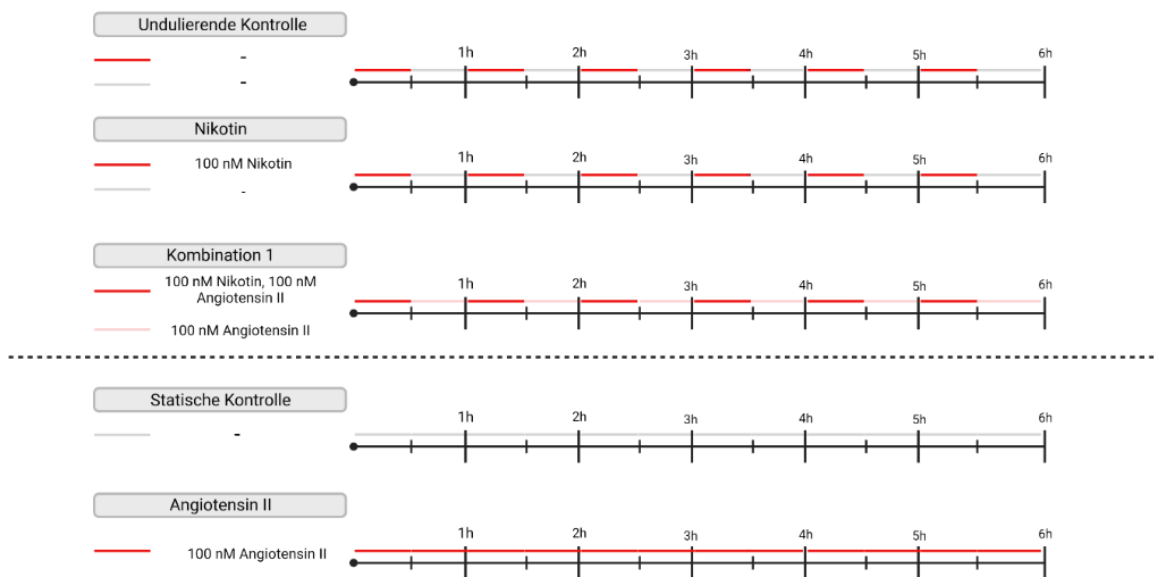
$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl (Summe aller Quadranten)} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times \text{Kammerfaktor (10.000)}}{\text{Anzahl der Quadranten (4)}}$$

### 2.2.1.4 Kollagen und Laminin Beschichtung der Kulturgefäße

Um Zell-Matrix Verbindungen zu untersuchen, wurden die HAoEC nach einer Zellpassage auf Laminin oder Kollagen IV beschichteten Kulturgefäßen ausplattiert. Hierzu wurden unbeschichtete Kulturgefäße vorab mit den Strukturproteinen beschichtet. Zunächst wurden die jeweiligen Stammlösungen auf Eis aufgetaut, bevor Gebrauchslösungen mit gewünschten Konzentrationen hergestellt wurden. Die Stammlösung Kollagen IV (0,5 mg/ml) wurde auf eine finale Konzentration von 0,005 mg/ml und die Stammlösung Laminin (0,5 mg/ml) auf eine finale Konzentration von 0,015 mg/ml in DPBS verdünnt. Anschließend sind die Gebrauchslösungen in ausreichender Menge in die Kulturgefäße pipettiert worden, sodass die gesamte Fläche bedeckt war. Um die gleichmäßige Beschichtung der Kulturgefäße zu gewährleisten, wurden diese zusätzliche für 5Min auf einen Schüttler gestellt. Danach kamen die Kulturgefäße in den Inkubator. Nach 1Stunde (h) wurde die Gebrauchslösung abgenommen und es konnten Zellen ausgesät werden. Um die Methode zu validieren wurden  $6 \times 10^4$  Zellen auf  $\mu$ -Slides | Luer 0,4 mm (ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland) ausgesät und unter Fluss kultiviert. Vorab wurden die  $\mu$ -Slides mit Kollagen IV oder Laminin beschichtet. Als Kontrolle diente eine unbeschichtete  $\mu$ -Slide. Nachdem die Zellen wie in 2.2.1.6 beschrieben unter Fluss kultiviert wurden, wurde anschließend die Adhärenz der Zellen per Mikroskop evaluiert.

### 2.2.1.5 Behandlung der Zellen

Bevor die statisch kultivierten HAoEC behandelt wurden, sind ein Teil der Zellen nach einer Zellpassage auf Laminin oder Kollagen IV beschichteten 6-Well Platten ausgesät worden. Sobald die HAoEC eine Konfluenz von 95 % erreicht hatten, wurden sie über einen Zeitraum von 6h mit 100 nM Nik, 100 nM Ang II oder der Kombination aus 100 nM Nik und 100 nM Ang II behandelt. Um die undulierenden Nikotinspiegel von Rauchern im Blutplasma zu simulieren wurde eine undulierende Exposition gewählt, wohingegen die Exposition mit Ang II kontinuierlich erfolgte. Sowohl für die undulierende, als auch für die kontinuierliche Exposition wurden Kontrollen erstellt. Nachfolgende Abbildung zeigt das beschriebene Behandlungsregimen. (**Abb. 9**)



**Abb. 9: Schematische Darstellung des Behandlungsregimen.** Die HAoECs wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit 100 nM Nikotin, 100 nM Angiotensin II oder der Kombination aus 100 nM Nikotin und 100 nM Angiotensin II behandelt. Die Exposition mit Nikotin erfolgte undulierend, während die Exposition mit Angiotensin II konstant stattfand. Sowohl für die undulierende, als auch für die konstante Exposition wurden Kontrollen angefertigt.

### 2.2.1.6 Kultivierung der HAoEC unter Fluss

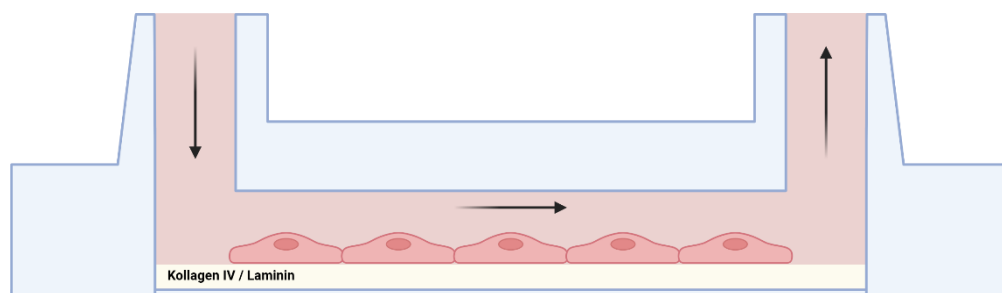
Um die HAoEC unter physiologischem Scherstress zu kultivieren wurden die HAoEC auf unterschiedlich beschichteten  $\mu$ -Slides ausgesät und für 6h unter Fluss kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen proteinbiochemisch aufbereitet, um die Expression von Ve-Cadherin und Integrin  $\beta$ 1 der unterschiedlichen Gruppen zu quantifiziert.

#### 2.2.1.6.1 Aussäen der HAoEC auf $\mu$ -Slides

Für die Kultivierung der HAoEC unter Fluss wurden Kollagen IV und unbeschichtete  $\mu$ -Slides | Luer 0,4 mm (ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland) verwendet. Die

unbeschichteten  $\mu$ -Slides | Luer 0,4 mm wurden nach in Abschnitt 2.2.1.4 erläuterten Protokoll mit Laminin beschichtet. Die mit Kollagen IV oder Laminin beschichteten  $\mu$ -Slides wurden mit  $6 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Endothelzellmedium gefüllt und inkubiert. Nach 6h wurden beide Seiten der  $\mu$ -Slides mit Endothelzellmedium aufgefüllt und über Nacht inkubiert. Dadurch konnten sich die Zellen niederlassen und auf dem Boden der  $\mu$ -Slides einen adhären Zellenrasen bilden (**Abb. 10**). Am Folgetag konnte das Experiment fortgeführt werden.

#### 2.2.1.6.2 Kultivierung der HAoEC im Bioreaktor



**Abb. 10: Schematische Darstellung von flusskultivierten HAoEC in  $\mu$ -Slides.** HAoEC wurden auf Kollagen IV oder Laminin beschichtete  $\mu$ -Slides (ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland) ausgesät und unter Fluss kultiviert. Eigene Darstellung kreiert mit BioRender nach *ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland* [93].

Die am Vortag auf beschichteten  $\mu$ -Slides inkubierten HAoEC wurden an eine Pumpe im Bioreaktor (Fraunhofer, München, Deutschland) angeschlossen und bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % unter Fluss kultiviert. Ein Laborglas, gefüllt mit 30 ml Endothelzellmedium + 75  $\mu$ l Gentamycin wurde über die Pumpe mit den  $\mu$ -Slides verbunden, sodass ein geschlossener Kreislauf hergestellt wurde. An einen dritten Ausgang des Laborglases wurde ein Luftfilter konnektiert. Die ersten 30Min wurde die Flussgeschwindigkeit auf 9 ml/Min eingestellt. Danach erfolgte die Erhöhung der Flussgeschwindigkeit auf 14,5 ml/Min, sodass die HAoEC für 48h bei einem physiologischen Scherstress von 14 dyn/cm<sup>2</sup> kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 6h mit 100 nM Nik, mit einer erhöhten Flussgeschwindigkeit (22,5 ml/Min / 21 dyn/cm<sup>2</sup>), oder der Kombination aus 100 nM Nik und erhöhter Flussgeschwindigkeit behandelt. Wie in 2.2.1.5 wurde auch hier eine ondulierende Exposition mit Nik gewählt. Die Exposition mit erhöhter Flussgeschwindigkeit erfolgte kontinuierlich. Für die ondulierende, als auch für die kontinuierliche Exposition wurden Kontrollen angefertigt. Nachdem die Exposition der

HAoEC abgeschlossen war, wurden die Zellen für 10Min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei 4 °C – 8 °C aufbewahrt.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Ve-Cadherin und Integrin $\beta$ 1 Färbungen der HAoEC

Um die Proteinexpression von Ve-Cadherin und Integrin  $\beta$ 1 zu quantifizieren wurden flusskultivierte Zellen immunzytochemisch gefärbt. Hierzu wurde die indirekte Färbemethode angewandt. Zuerst erfolgte das Abnehmen der Pufferlösung von den Slides, auf denen die Zellen kultiviert und behandelt worden waren. Die Zellen wurden in PBS mit 1 % Triton X-100 für 10Min permeabilisiert. Anschließend fand eine Blockierung mit einer 2 % Bovines Serumalbumin (BSA)-Blockierungslösung (2.1.5 siehe Lösungen) für 1h statt. Die Primärantikörper wurden in 1 % BSA verdünnt. Die Verdünnung wurde auf die Zellen pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen doppelt gewaschen, bevor sie mit den Sekundärantikörpern für 1h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert wurden. Danach wurden sie erneut mindestens zweimal gewaschen und eine zehnminütige 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Gegenfärbung durchgeführt. Nach abgeschlossener Färbung erfolgte das Eindecken der Slides mit Mowiol (siehe 2.1.6 Einbettmedium). Am Tag darauf wurden Aufnahmen der Slides bei 200 x Vergrößerung mit Mikroskop und Kamera gemacht. Während die Belichtungszeit für DAPI im ZEN blue Computerprogramm auf 100 ms gesetzt wurde, betrug die Belichtungszeit für Ve-Cadherin und Integrin  $\beta$ 1 3000 ms. Für die Auswertung wurde das Programm *Fiji is just ImageJ* (Fiji) genutzt. Um die Intensität der Fluoreszenz von Ve-Cadherin und Integrin  $\beta$ 1 pro Bild zu quantifizieren wurde der durchschnittliche Grauwert ermittelt.

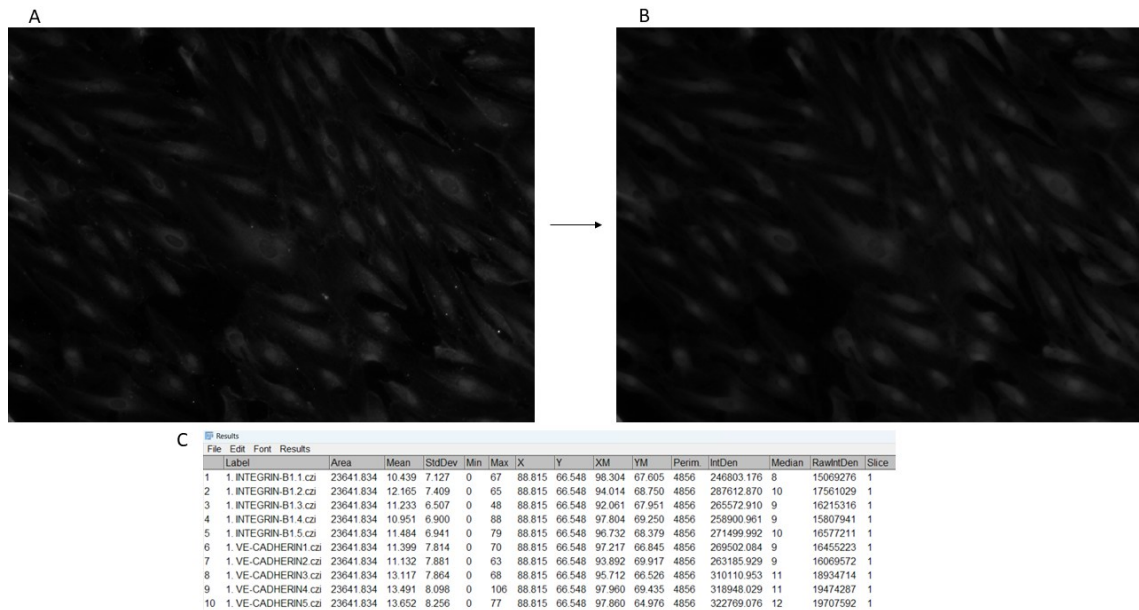
Alle Bilder wurden mittels standardisierten Protokolls ausgewertet (**Abb. 11**):

```
run("Remove Outliers...", "radius=10 threshold=40 which=Bright");
```

```
run("8-bit");
```

```
run("Set Measurements...", "area mean standard min centroid center perimeter  
integrated median stack display redirect=None decimal=3");
```

```
run("Measure");
```



**Abb. 11: Beispielhafte Darstellung der Ermittlung des durchschnittlichen Grauwerts für Ve-Cadherin und Integrin  $\beta 1$ .** Native Bilder (A) wurden zunächst bearbeitet und Artefakte wurden mittels Threshold beseitigt (B). Anschließend wurde der durchschnittliche Grauwert für jedes Bild ermittelt und in einer Tabelle in der Spalte ‚Mean‘ angezeigt (C).

Weiter erfolgte die Bestimmung der Anzahl an Zellkernen pro Bild (Abb. 12):

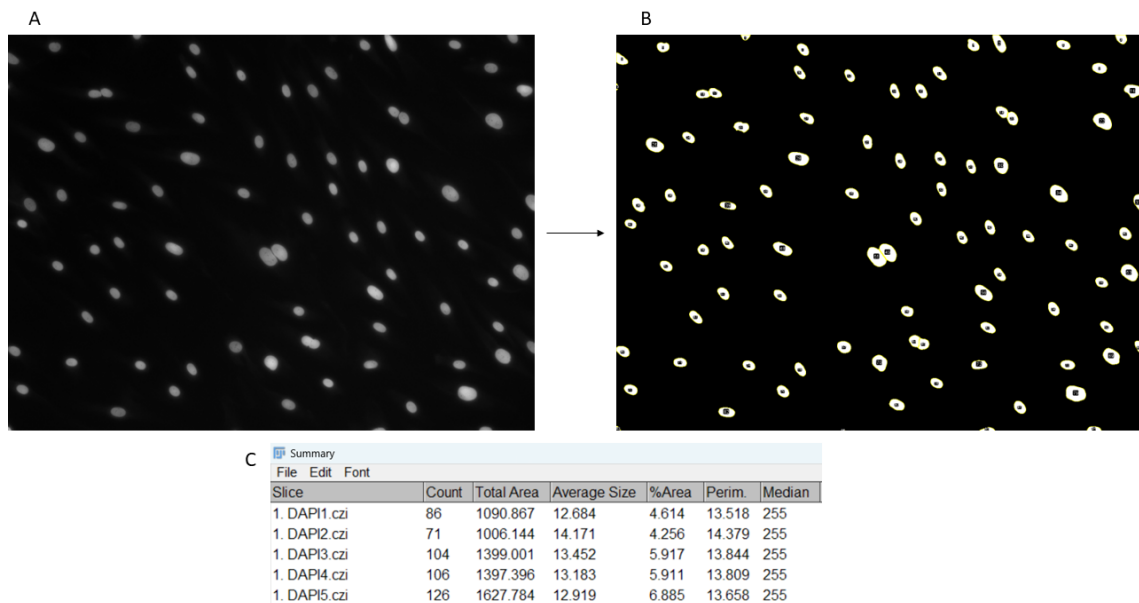
```

setOption("ScaleConversions", true);

run("8-bit");
run("Median...", "radius=3");
run("Options...", "iterations=1 count=1 black");
run("Auto Threshold", "method=Otsu white");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area standard centroid center perimeter median stack display redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "display clear summarize add");

```

Der Quotient aus dem durchschnittlichen Grauwert und der Anzahl der Zellkerne wurde mittels Excel errechnet und diente für den späteren Vergleich der Proteinexpression unter den verschiedenen Versuchsgruppen.



**Abb. 12: Beispielhafte Darstellung der Ermittlung der Anzahl der Zellkerne.** Native DAPI-Bilder (A) wurden zunächst bearbeitet um Zellkerne zu ermitteln und zu zählen (B). Anschließend wurde die Anzahl der Zellkerne für jedes Bild ermittelt und in einer Tabelle in der Spalte ‚Count‘ angezeigt (C).

#### 2.2.2.2 Aktin Färbung Färbungen der HAoEC

Um die Morphologie von statisch kultivierten und flusskultivierten HAoEC zu vergleichen wurde eine Aktin Immunfluoreszenzfärbung mittels direkter Methode durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben wurden die Pufferlösung abgenommen, die Zellen permeabilisiert und eine Blockierung vorgenommen. Danach wurde der Aktin Antikörper in PBS verdünnt (Tabelle 1) und für 15Min inkubiert.

Primärantikörper	Konzentration/Verdünnung	Hersteller
Ve-Cadherin	1:30	Thermo Fischer
Integrin $\beta$ 1	15 $\mu$ g/ml	R&D
DAPI	2 $\mu$ g/ml	Sigma Aldrich
AktinGreen 488	1 Tropfen/ml	Thermo Fischer
Sekundärantikörper	Konzentration/Verdünnung	Hersteller
AlexaFluor 488 goat anti-rabbit	2 Tropfen/ml	Thermo Fischer
AlexaFluor 594 goat anti-rabbit	2 Tropfen/ml	Thermo Fischer

**Tabelle 1: Antikörper für die immunzytochemischen Färbungen**

Nach dem anschließenden Waschen der Zellen wurde die Färbung wie in 2.2.2.1 mit einer DAPI Gegenfärbung und dem Eindecken mittels Mowiol fortgeführt. Am Folgetag

wurden mikroskopische Aufnahmen mit individuell passender Belichtungszeit angefertigt.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 RNA-Extraktion

Vor der RNA-Extraktion wurden die Zellen auf unbeschichteten oder, wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, beschichteten 6-Well Platten behandelt. Anschließend wurden die Kulturgefäße auf Eis gelagert und ein dreimaliger Waschvorgang mit jeweils 6 ml DPBS pro Well durchgeführt. Durch die Zugabe von 350 µl QIAzol Lysispuffer erfolgte die Auflösung der äußeren Zellmembran, sodass die Zellkulturen mithilfe von Zellschabern geerntet werden konnten. Das Lysat wurde bis zur RNA-Isolation in Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.3.2 RNA-Isolation

Nachdem die RNA extrahiert wurde, erfolgte die RNA-Isolation. Hierzu wurde das Lysat auf Eis aufgetaut, mit 45 µl Chloroform vermischt und für 15 Sekunden (Sek) geschüttelt. Anschließend wurde es für 30Min bei 12.000 x g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, sodass eine Phasentrennung stattfinden konnte. Die obere, wässrige RNA-Phase wurde aufgenommen und je nach Menge in einem Verhältnis von 1:1 mit 70 % Ethanol (EtOH) präzipitiert. Die weiteren Schritte der RNA-Isolation wurden mithilfe des *RNeasy Mirco Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde an eine Mini *Spin* Säule gebunden, bevor sie mit den Puffern gewaschen wurde. Als Letztes wurde die isolierte RNA in 30 µl RNase freiem Wasser aus den Mini *Spin* Säulen herausgelöst. Direkt im Anschluss wurde die Konzentration der RNA bestimmt.

### 2.2.3.3 NanoDrop

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Sepkrophotometer. Es wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen und anschließend der Quotient aus A260/280 errechnet. Dieser gilt als Indikator für die Reinheit der isolierten RNA und liegt im optimalen Fall bei 2,0. Für die Messungen wurde 1 µl der Proben auf dem entsprechenden Sensor des Sepkrophotometers appliziert und dreifach bestimmt. Als Blank wurde RNase freies Wasser verwendet. Im Anschluss an die Messungen wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.3.4 cDNA Synthese

Die RNA wurde mittels *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Litauen) in komplementäre

Desoxyribonukleinsäure (cDNA) transkribiert. Hierzu wurden 10 µl RNA (50 ng/µl) und 10 µl Mastermix in Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Tubes pipettiert, anschließend kurz zentrifugiert und für die cDNA-Synthese im *Thermocycler* inkubiert. Das Pipettieren der Reagenzien erfolgte auf Eis. Als Kontrolle wurde eine zusätzliche Probe ohne reverse Transkriptase (-RT) mitgeführt. Der Mastermix war wie folgt zusammengestellt:

Komponente	Volumen/Probe [µl]
Nuklease freies Wasser	3,2 µl
10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix	0,8 µl
10x RT Random Primer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Multiscribe Reverse Transkriptase	1 µl

Tabelle 2: Komponenten des Mastermix für die cDNA-Synthese

Folgendes Programm wurde für die cDNA-Synthese verwendet:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Min]
Bindung der Primer	25 °C	10Min
Transkription	37 °C	120Min
Inaktivierung der reversen Transkriptase	85 °C	5Min

Tabelle 3: Cycler Programm für die cDNA-Synthese

#### 2.2.3.5 qRT-PCR

Um die Genexpression der unterschiedlich exponierten HAoEC vergleichen zu können, wurde die cDNA (-RT Kontrolle) mithilfe von spezifischen Primern in einer Real-Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) amplifiziert und im Anschluss über Fluoreszenzdetektion quantifiziert. Hierfür kam ein interkalierender Farbstoff in Form von *Sybr Green I* zur Anwendung. Zunächst wurde 1 µl cDNA pro Probe in eine 96-Well Mikrotiterplatte eingesetzt und anschließend 19 µl Mastermix hinzugefügt. Für jede Probe ist eine Doppelbestimmung angesetzt worden. Der Mastermix war wie folgt zusammengestellt:

Komponente	Volumen/Probe [ $\mu$ l]
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, USA)	10 $\mu$ l
Primer (verdünnt)	1 $\mu$ l
Destilliertes Wasser	8 $\mu$ l

Tabelle 4: Komponenten des Mastermix für die qRT-PCR

Allen Läufen wurde eine negative Wasserkontrolle mitgeführt. Als *Housekeeping* Gen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) genutzt. Nach dem Pipettieren, wurden die 96-Well Mikrotiterplatten verschlossen und zentrifugiert.

Für die Amplifikation und Fluoreszenzdetektion wurde das CFX96™ *Real-Time System* sowie das *Bio-Rad CFX Manager Programm* verwendet. Da die qRT-PCR mit einem interkalierenden Farbstoff durchgeführt wurde, erfolgte im Anschluss der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse, um die Spezifität der Amplifikate zu bestimmen.

Das *Cycler* Programm wurde wie folgt eingestellt:

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [Sek]	Zyklen
Denaturierung	95,0 $^{\circ}$ C	180Sek	1
Amplifikation	95,0 $^{\circ}$ C	10Sek	44
	60,0 $^{\circ}$ C	60Sek	
<b>Schmelzkurve: Kontinuierlicher Anstieg der Temperatur von 50 <math>^{\circ}</math>C auf 95 <math>^{\circ}</math>C alle 5 Sekunden um 0,5 <math>^{\circ}</math>C</b>			

Tabelle 5: Cycler Programm für die qRT-PCR

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Excel. Sie wurden mittels ddCT-Methode und *Fold Change* Wert  $2^{-ddCt}$  analysiert und zur Kontrolle normalisiert.

Primer	Verdünnung	Hersteller
GAPDH	1:20	Quiagen
Nektin	1:3	OriGene
Ve-Cadherin	1:3	OriGene
Integrin $\beta$ 1	1:3	OriGene
Integrin $\alpha$ 1	1:3	OriGene
Integrin $\alpha$ 2	1:3	Sino Biological
Integrin $\alpha$ 6	1:3	Origene
Galektin 9	1:20	biozol
Galektin 3 binding protein	1:20	biomol
Galektin 3	1:3	biomol

Tabelle 6: Primerliste für die qRT-PCR

## 2.2.4 Bioinformatische Methoden

Um etwaige Einflüsse von Nik oder Ang II auf das Transkriptom der HAoEC zu untersuchen und *differential expressed genes* (DEG) ausmachen zu können wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurden HAoEC über 24h mit 100 nM Nik, 100 nM Ang II und deren Kombination behandelt, sowie eine Kontrolle angefertigt. Die RNA wurde wie oben beschrieben isoliert und in Zusammenarbeit mit dem Labor für *Genomics & Transcriptomics*, Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf weiterverarbeitet. Dieses hat die Qualität und Quantität der RNA-Proben gemessen, fertigte die sog. *Library* an und führte die RNA-Sequenzierung durch. Die RNA-Sequenzen wurden im *Fast Alignment Sequence Quality* (FASTQ) Format übermittelt und eigenständig ausgewertet. Es folgt die Beschreibung der Methoden, die durch das Labor für *Genomics & Transcriptomics* durchgeführt wurden.

### 2.2.4.1 Messung der RNA-Qualität und Quantität

Die RNA-Proben wurden quantifiziert (Qubit RNA HS Assay, Thermo Fisher Scientific) und die Qualität wurde mittels Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines *Fragment Analyzers* und dem *'Total RNA Standard Sensitivity Assay'* (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien) gemessen. Alle Proben wiesen eine hohe RNA-Qualität (RQN über 9,8) auf.

#### 2.2.4.2 Anfertigung der Library

Die Anfertigung der *Library* erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll unter Verwendung des '*Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Library Prep Kit*' (Illumina Inc., San Diego, Kalifornien). Für die *ribosomal depletion*, Fragmentierung, cDNA-Synthese, Adapterligierung und *library amplification* wurden 500 ng RNA verwendet.

#### 2.2.4.3 RNA-Sequenzierung

Die *Library* wurden aufgereinigt, normalisiert und anschließend mit einer Sequenzlänge von 1 x 151 Basepaaren mittels HiSeq 3000/4000 System (Illumina Inc., San Diego, Kalifornien) sequenziert. Bevor die Daten zur weiteren Analyse an unsere Arbeitsgruppe übermittelt wurden, wurde das *bcl2fastq2* Programm genutzt um die Daten vom Base-Call (BCI) Format in das FastQ Format zu konvertieren, sowie ein *Adapter Trimming* und *Demultiplexing* durchzuführen.

#### 2.2.4.4 Analyse der RNA-Sequenzen

Nachdem die RNA-Sequenzen im FASTQ Format erhalten wurden, wurde zunächst Qualitätsanalyse der Proben mit FastQC (v11.9) ermittelt und in Form eines MultiQC (v1.7) Berichts gebündelt dargestellt [94, 95]. Durch das *Mapping*, wurde anschließend die Lage der Rohsequenzen auf dem Referenzgenom ermittelt. Hierzu wurden das Programm STAR (v2.7.10a) genutzt [96]. Dieses hat die Rohsequenzen dem Referenzgenom (*Genome Reference Consortium Human Reference 38/hg38*) von der *University of California Santa Cruz (UCSC) Genome* Datenbank zugeordnet [97]. Mithilfe von *featureCounts* (v2.0.1) wurden die Anzahl an Sequenzen für jedes Gen ausgezählt und in einer Tabelle festgehalten [98]. Anhand dieser Tabellen ließ sich eine *Principal Component Analysis (PCA)* und *Differential Expression Analysis* durchführen. Die PCA ermöglicht es die Varianz der Proben zu visualisieren und wurde mit R 4.3.1 durchgeführt. Das DESeq2 Paket (v1.26.0) von R wurde für die Normalisierung und die Analyse der DEG zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe genutzt [99]. Um die Anzahl an falsch-positiven Resultaten zu reduzieren, wurden ausschließlich Gene mit einer *False Discovery Rate (FDR)* von maximal 5 % (*p-adjusted (padj) ≤ 0,05*) als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse der DESeq2 Analysen wurden in Volcano Plots dargestellt.

#### 2.2.4.5 In-Silico Analyse

Mithilfe von GenMANIA (v3.6.0) wurden die Top 100 Interaktionsgene von *LGALS9*, *LGALS3* und *LGALS3BP* ermittelt [100]. Um Interaktionsgene, die eine Relevanz in der

Zelladhäsion haben, zu finden, wurden anschließend Überlappungen der Interaktionsgene und einem Zelladhäsion Genset (GO:0007155) der *Molecular Signatures Database* (MSigDB) ermittelt [101, 102].

### 2.2.5 Statistik

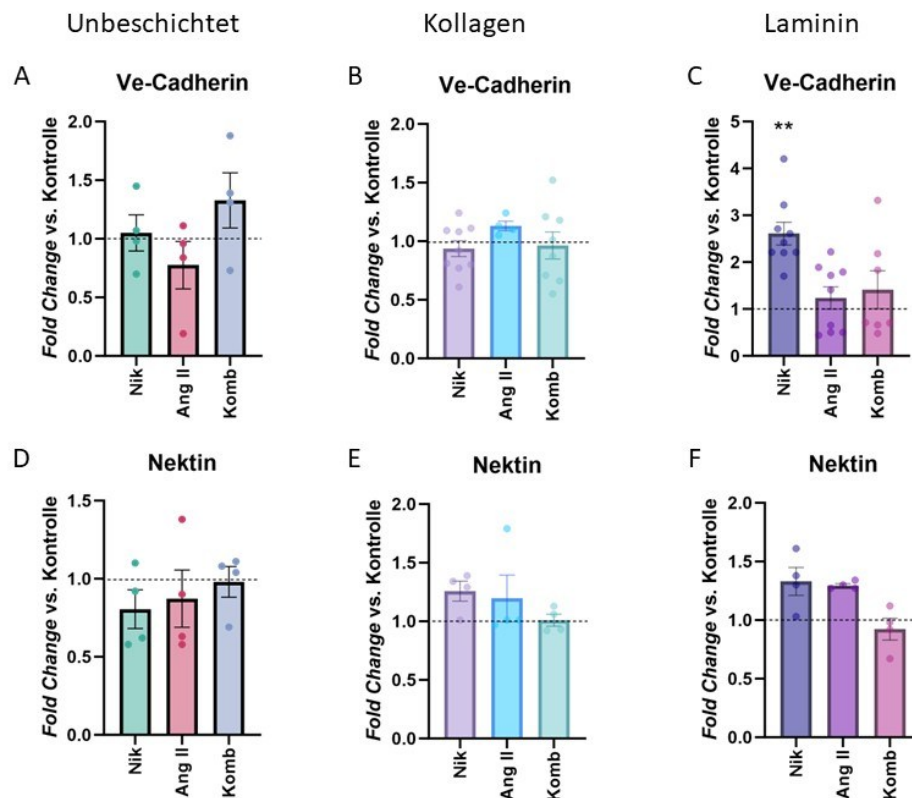
Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 9.1.2 (Graphpad Software, La Jolla, USA) genutzt. Es wurden verschiedene statische Tests zur Analyse der Daten verwendet. Die jeweils angewendeten Tests sind in der entsprechenden Abbildungsunterschrift vermerkt. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf einen *p-Wert* von  $\leq 0,05$  festgelegt. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) mit einzelnen Datenpunkten dargestellt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse qRT-PCR

#### 3.1.1 Genexpressionslevel von Zell-Zell Adhäsionsproteinen

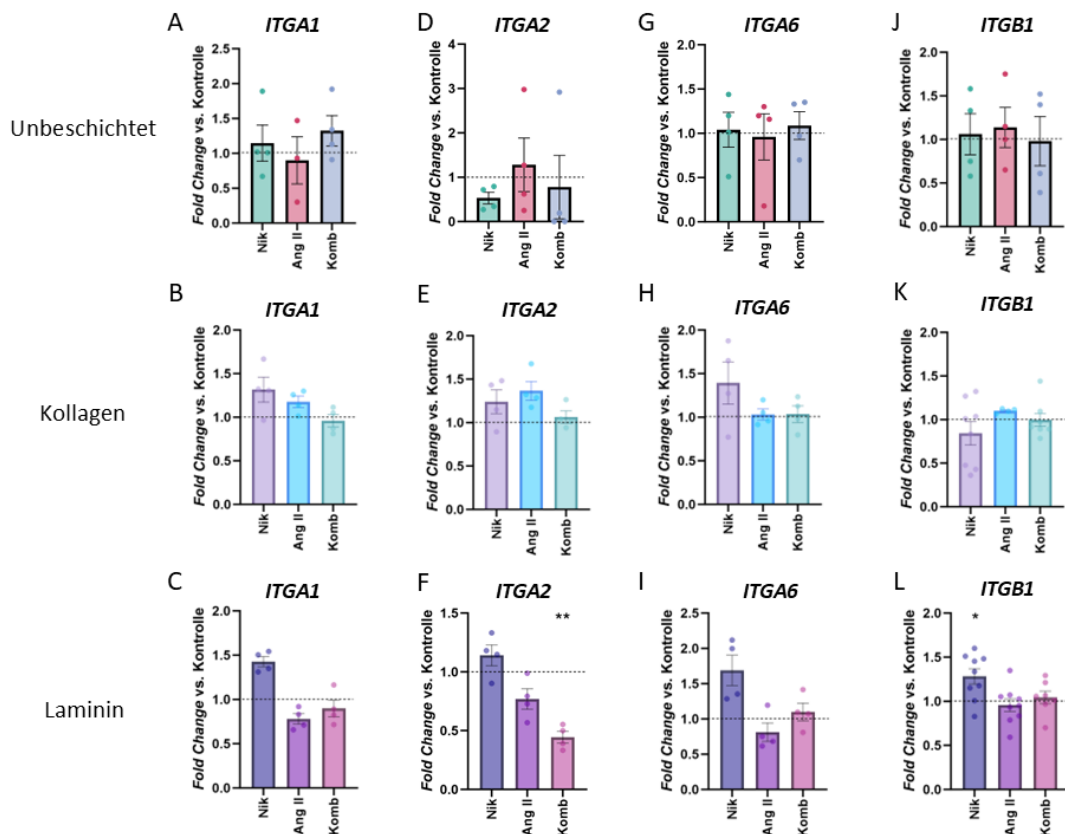
Zunächst wurde der Einfluss von Nik und Ang II auf die Genexpression von AJ-Adhäsionsproteinen in Form von Ve-Cadherin und Nektin mittels qRT-PCR quantifiziert. Hierfür wurden die HAoEC auf unterschiedlich beschichteten 6-Well Platten über einen Zeitraum von 6h mit Nik, Ang II exponiert. Während keine statistisch signifikante Regulation von Ve-Cadherin in HAoEC auf unbeschichteten oder Kollagen beschichteten 6-Well Platten zu erkennen ist, sorgt die Nik Exposition der HAoEC auf Laminin beschichteten 6-Well Platten für eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant höhere Expression von Ve-Cadherin ( $p = 0,0046$ ) (**Abb. 13 A-C**). Für die Expression von Nektin konnten keine statistisch signifikanten Regulationen ermittelt werden (**Abb. 13 D-F**).



**Abb. 13: Genexpressionslevel von Zell-Zell Proteinen in HAoEC auf unterschiedlich Beschichtungen.** A-F: Transkriptionslevel von Ve-Cadherin (A-C) und Nektin (D-F) in HAoECs, die auf unterschiedlich beschichteten 6-Well Platten kultiviert wurden und mit 100 nM Nikotin (Nik), 100 nM Angiotensin II (Ang II) und deren Kombination (Komb) exponiert wurden. Für die Analyse wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode genutzt. GAPDH wurde als Referenz (*Housekeeper*) genutzt. Die Daten sind als *Fold Change vs. Kontrolle* dargestellt. \*\* $p$ -Wert ( $p < 0,005$ ; one-way Anova mit Dunnett Correction oder t-test ( $n=4-9$ )).

### 3.1.2 Genexpressionslevel von Zell-Matrix Adhäsionsproteinen

Weiter wurde der Einfluss von Nik und Ang II auf die Genexpression von Zell-Matrix Adhäsionsproteinen wie Integrin  $\alpha 1$  (*ITGA1*), Integrin  $\alpha 2$  (*ITGA2*), Integrin  $\alpha 6$  (*ITGA6*) und Integrin  $\beta 1$  (*ITGB1*) quantifiziert. Sowohl für die Expression von *ITGA1*, als auch *ITGA6* lassen sich, unabhängig der Beschichtung, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der jeweiligen Kontrolle feststellen (**Abb. 14 A-C/G-I**). Auch für die Expression von *ITGA2* und *ITGB1* in HAoEC, die auf unbeschichteten oder Kollagen beschichteten 6-Well Platten kultiviert wurden, können keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (**Abb. 14 D/E, J/K**). Lediglich auf Laminin kultivierte HAoEC zeigen signifikante Unterschiede in der Expression von *ITGA2* ( $p = 0,0034$ ) und *ITGB1* ( $p = 0,0363$ ). Eine kombinierte Exposition mit Nik und Ang II führt zu einer signifikant niedrigeren Expression von *ITGA2*, während die alleinige Nik Exposition für einen signifikanten Anstieg der *ITGB1* Expression sorgt (**Abb. 14 I/L**).

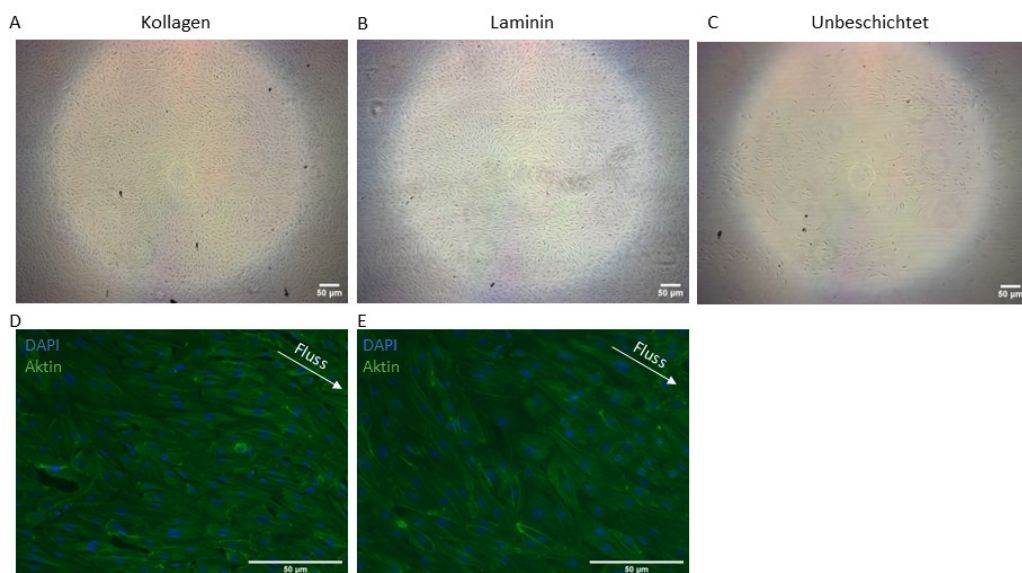


**Abb. 14: Genexpressionslevel von Zell-Matrix Proteinen in HAoECs auf unterschiedlich Beschichtungen.** A-L: Transkriptionslevel von Integrin  $\alpha 1$  (*ITGA1*) (A-C), Integrin  $\alpha 2$  (*ITGA2*) (D-F), Integrin  $\alpha 6$  (*ITGA6*) (G-I) und Integrin  $\beta 1$  (*ITGB1*) (J-L) in HAoECs, die auf unterschiedlich beschichteten 6-Well Platten kultiviert wurden und mit Nikotin (Nik), Angiotensin II (Ang II) und deren Kombination (Komb) exponiert wurden. Für die Analyse wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode genutzt. GAPDH wurde als *Housekeeper* genutzt. Die Daten sind als *Fold Change* vs. Kontrolle dargestellt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ ; one-way Anova mit Dunnett Correction oder t-test (n=4-9).

## 3.2 Ergebnisse- $\mu$ -Slides

### 3.2.1 Zellkultivierung unter Fluss

Für die Zellkultivierung unter Fluss wurden zunächst das Verhalten der HAoEC auf unbeschichteten, sowie Kollagen IV und Laminin beschichteten  $\mu$ -Slides charakterisiert. Nachdem die HAoEC unter Fluss kultiviert wurden, wurde die Konfluenz des Zellrasens unter einem Lichtmikroskop evaluiert. In der Betrachtung lässt sich feststellen, dass der Zellrasen auf Kollagen und Laminin beschichteten  $\mu$ -Slides dicht ist und keine größeren Abtragungen des Zellrasens zu erkennen sind (**Abb. 15 A/B**). Im Vergleich dazu fällt auf, dass der Zellrasen auf unbeschichteten  $\mu$ -Slides wesentlich lichter ist und Teile des Zellrasens durch das Wirken von Scherstress abgetragen werden (**Abb. 15 C**). Anschließend wurde durch eine Aktin Färbung die Ausrichtung der HAoEC charakterisiert. Man sieht, dass sich die HAoEC sowohl auf Kollagen, als auch auf Laminin beschichteten  $\mu$ -Slides entlang der Flussrichtung ausrichten (**Abb. 15 D/E**).



**Abb. 15: Darstellung des Zellrasens unter Flussbedingungen.** Während die Beschichtung der Channel Slides mit Laminin und Kollagen für den Erhalt eines dichten und konfluenten Zellrasens sorgt (**A/B**), ist erkennbar, dass die HAoECs auf unbeschichteten Channel Slides nicht adhären sind und durch den Scherstress abgetragen werden (**C**). Die Aktin Färbung sorgt für eine Färbung der Aktinfilamente des Zytoskeletts. Sie zeigt, dass sich die HAoECs unter Fluss auf Kollagen und auf Laminin beschichteten Channel Slides ausrichten (**D/E**). Fluoreszenzbilder erstellt mit *Fiji is just ImagJ* (Fiji).

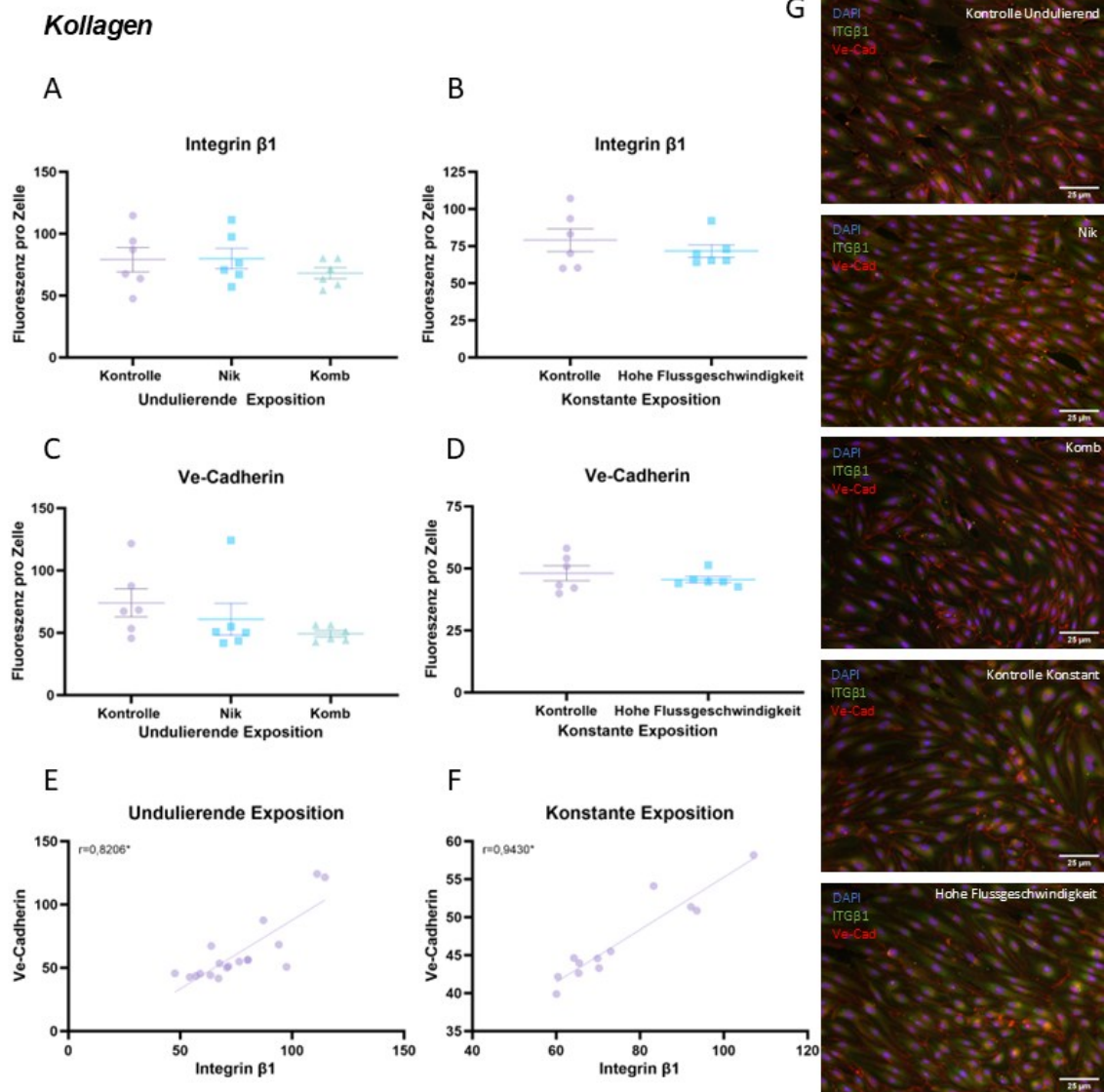
Auf Grund der dargestellt Ergebnisse wurde die Zellkultivierung unter Fluss auf unbeschichtete  $\mu$ -Slides für folgende Versuche als ungeeignet beurteilt und im weiteren Verlauf nichtmehr angewandt.

### 3.2.2 Proteinexpressionslevel von Integrin $\beta$ 1 und Ve-Cadherin

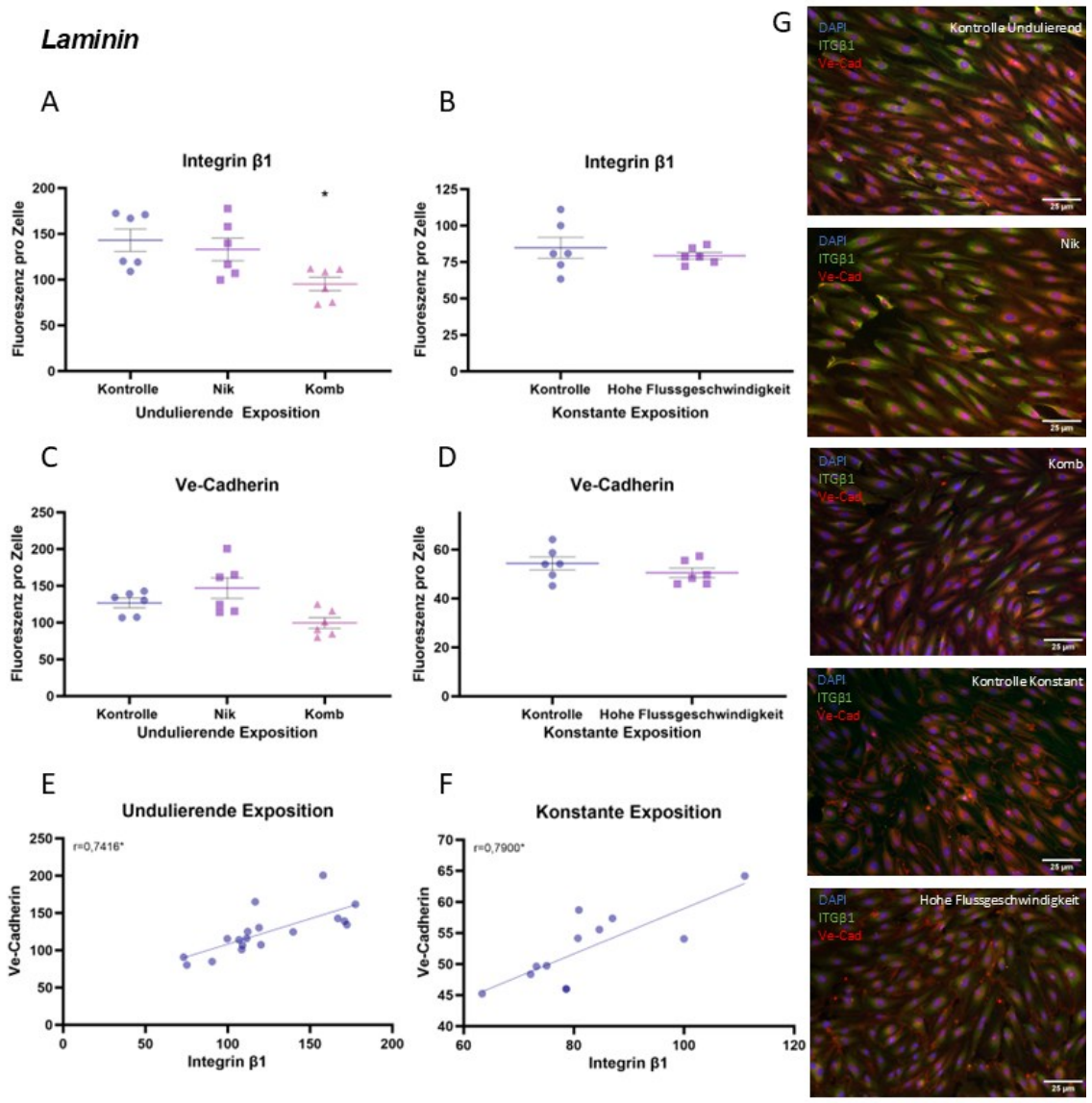
Um den Einfluss von Nik und Bluthochdruck – simuliert durch eine erhöhte Flussgeschwindigkeit - auf die Proteinexpressionslevel von Integrin  $\beta$ 1 und Ve-Cadherin von HAoEC zu untersuchen, wurden HAoEC in einem Bioreaktor unter Fluss kultiviert und behandelt. Durch anschließende immunzytochemische Aufbereitungen konnten die Proteinexpressionslevel quantifiziert werden.

Für die HAoEC, welche auf Kollagen beschichteten  $\mu$ -Slides kultiviert wurden, lassen sich keine signifikanten Unterschiede zu den Vergleichskontrollen für die Expression von Integrin  $\beta$ 1 feststellen (**Abb. 16 A/B**). Für die Expression von Ve-Cadherin stellen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede dar, wobei sich in Nik und Komb exponierten HAoEC eine in der Tendenz niedrigere Expression zeigt (**Abb. 16 C/D**). Weiter wurde mittels Pearsons Korrelationstest untersucht, inwiefern die Expression von Integrin  $\beta$ 1 und Ve-Cadherin miteinander korreliert. Sowohl für die undulierende Exposition ( $r = 0,8206, p < 0,0001$ ), als auch für die konstante Exposition ( $r = 0,9430, p < 0,0001$ ) der HAoEC zeigt sich, dass es eine statistisch signifikante positive Korrelation der Expression von Integrin  $\beta$ 1 und Ve-Cadherin gibt (**Abb. 16 E/F**). **Abb. 16G** zeigt Fluoreszenzbilder aller Kontroll- und Versuchsgruppen für die Zellkultivierung unter Fluss auf Kollagen beschichteten  $\mu$ -Slides. Obwohl sich in der Betrachtung kaum Unterschiede zwischen den Gruppen ausmachen lassen, lässt sich dennoch die in der Tendenz niedrige Expression von Ve-Cadherin in Nik und Komb behandelten HAoEC im Vergleich zu Kontrolle auch visuell bestätigen (**Abb. 16 G**).

HAoEC, die auf Laminin beschichteten  $\mu$ -Slides kultiviert wurden, zeigen eine signifikant niedrige Expression von Integrin  $\beta$ 1 nach der Exposition mit Komb im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0139$ ) (**Abb. 17 A**). Für die Exposition mit Nik oder erhöhter Flussgeschwindigkeit sind keine signifikanten Unterschiede für die Integrin  $\beta$ 1 Expression erkennbar (**Abb. 17 A/B**). Für die Expression von Ve-Cadherin stellen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede dar, wobei Nik exponierte HAoEC eine in der Tendenz höhere Expression verglichen zur Kontrolle zeigen (**Abb. 17 C/D**). Auch für die HAoEC, welche auf Laminin kultiviert wurden, wurde die Korrelation der Expression von Integrin  $\beta$ 1 und Ve-Cadherin untersucht. Wie für HAoEC, die auf Kollagen kultiviert wurden, stellt sich für die undulierende Exposition ( $r = 0,7416, p = 0,0004$ ) und für die konstante Exposition ( $r = 0,7900, p = 0,0022$ ) der HAoEC eine statistisch signifikante positive Korrelation der Expression von Integrin  $\beta$ 1 und Ve-Cadherin dar (**Abb. 17 E/F**). Bei Betrachtung der Fluoreszenzbilder (**Abb. 17 G**) bestätigt sich die niedrigere Expression von Integrin  $\beta$ 1 für die Komb Versuchsgruppe auch visuell.



**Abb. 16: Proteinexpressionslevel von Ve-Cadherin und Integrin β1 von flusskultivierten HAoECs auf Kollagen.** **A-D:** Proteinexpressionslevel von Integrin β1 und Ve-Cadherin in HAoECs, die auf Kollagen beschichteten Channel Slides flusskultiviert (14,5 ml/Min) wurden und mit Nikotin (Nik), Erhöhtem Fluss (22,5 ml/Min) und deren Kombination (Komb) exponiert wurden. Für die Analyse wurde das Programm Fiji genutzt, wobei der Quotient aus Grauwert und Anzahl der Zellkerne gebildet wurde. Dieser Diente für die statistische Analyse.  $*p < 0,05$ ; one-way Anova mit Dunnett Correction (n=6). **E/F:** Pearsons Korrelationstest für die Proteinexpressionslevel von Integrin β1 und Ve-Cadherin.  $*p < 0,05$ ; (n=12-18). **G:** Fluoreszenzbilder aller Kontroll- und Versuchsgruppen.



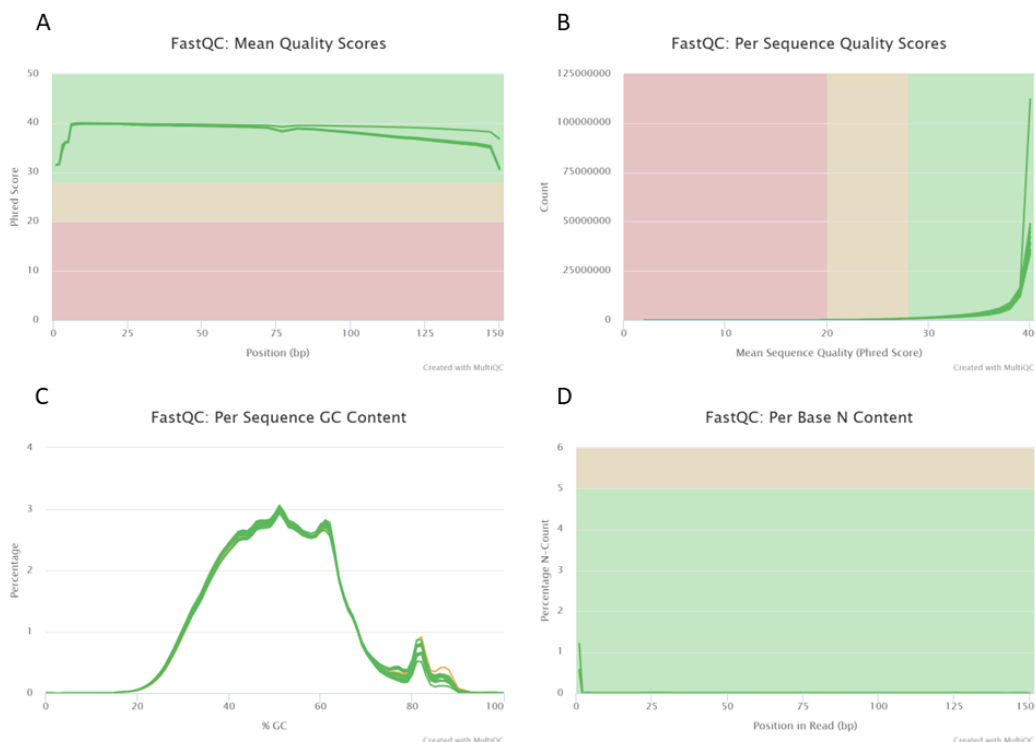
**Abb. 17: Proteinexpressionslevel von Ve-Cadherin und Integrin  $\beta 1$  von flusskultivierten HAoECs auf Laminin.** A-D: Proteinexpressionslevel von Integrin  $\beta 1$  und Ve-Cadherin in HAoECs, die auf Laminin beschichteten Channel Slides flusskultiviert (14,5 ml/min) wurden und mit Nikotin (Nik), Erhöhtem Fluss (22,5 ml/min) und deren Kombination (Komb) exponiert wurden. Für die Analyse wurde das Programm Fiji genutzt, wobei der Quotient aus Grauwert und Anzahl der Zellkerne gebildet wurde. Dieser Diente für die statistische Analyse.  $*p < 0,05$ ; one-way Anova mit Dunnett Correction (n=6). E/F: Pearsons Korrelation Test für die Proteinexpressionslevel von Integrin  $\beta 1$  und Ve-Cadherin.  $*p < 0,05$ ; (n=12-18). G: Fluoreszenzbilder aller Kontroll- und Versuchsgruppen.

### 3.3 Ergebnisse RNA-Sequenzierung

Um Aufschluss über weitere potenziell bedeutende Gene für die Endothelintegrität und damit verbundene potentielle Signaltransduktionswege zu erhalten, wurde eine Transkriptionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurden HAoEC mit Nik, Ang II und deren Kombination für 24h exponiert. Zusammen mit der Kontrollgruppe (K) gab es insgesamt vier Gruppen: K, Nik, Ang II und Komb.

#### 3.3.1 Probenqualität

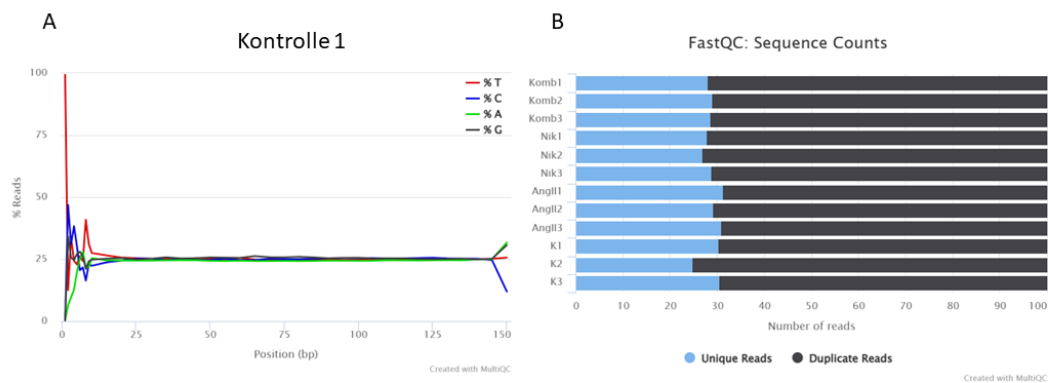
Zunächst wurde die Qualität der RNA-Sequenzen aller Proben ermittelt und in einem MultiQC Bericht zusammengefasst. Die Analyse geht als erstes auf die Wahrscheinlichkeit das eine Base vom *Basecaller* korrekt erkannt wurde ein und gibt diese im sog. *Phred Score* wieder. **Abb. 18A** stellt den durchschnittlichen *Phred Score* (y-Achse) aller Sequenzen für jede Basenposition (x-Achse) dar. Dabei repräsentiert eine Kurve jeweils eine Probe. Alle Proben weisen für alle Basen einen *Phred Score* von über 30 auf. In **Abb. 18B** wird die Anzahl an Sequenzen (y-Achse) pro *Phred-Score* (x-Achse) dargestellt. In allen Proben liegt der *Phred Score* für nahezu alle Sequenzen bei über 30.



**Abb. 18: MultiQC Bericht zur Probenqualität 1/2.** In allen Diagrammen (A-D) repräsentiert eine Kurve jeweils eine Probe (n=12). Teilweise überlappen die Kurven. **A:** Darstellung des durchschnittlichen *Phred Scores* für jede Basenposition in den Sequenzen. **B:** Darstellung der Anzahl an Sequenzen pro *Phred Score* **C:** Darstellung des durchschnittlichen Anteils von Guanin und Cytosin (GC) innerhalb der Sequenzen **D:** Darstellung des Prozentsatzes an 'N' Calls des *Basecallers* für jede Basenposition. (Erstellt mit MultiQC). Programm: MultiQC (v1.7).

In **Abb. 18C** ist der durchschnittliche Anteil von Guanin und Cytosin (GC-Anteil) innerhalb aller Sequenzen einer Probe dargestellt. Wie erwartet sind alle Kurven annähernd normalverteilt, wobei die Proben eine kleine Spitze bei 80 % aufweisen. Der Anteil der Basen, die der *Basecaller* nicht mit ausreichender Sicherheit erkennen konnte wird in **Abb. 18D** gezeigt. Dieser Anteil wird als N-Anteil bezeichnet und liegt für alle Proben ab Base 3  $\leq 0,01$  %.

Die Analyse gibt außerdem Aufschluss über den Inhalt pro Basensequenz (*Per base sequence content*), den Anteil an Adaptersequenzen, den Anteil an überrepräsentierten Sequenzen und der Anzahl an Sequenzduplikaten.



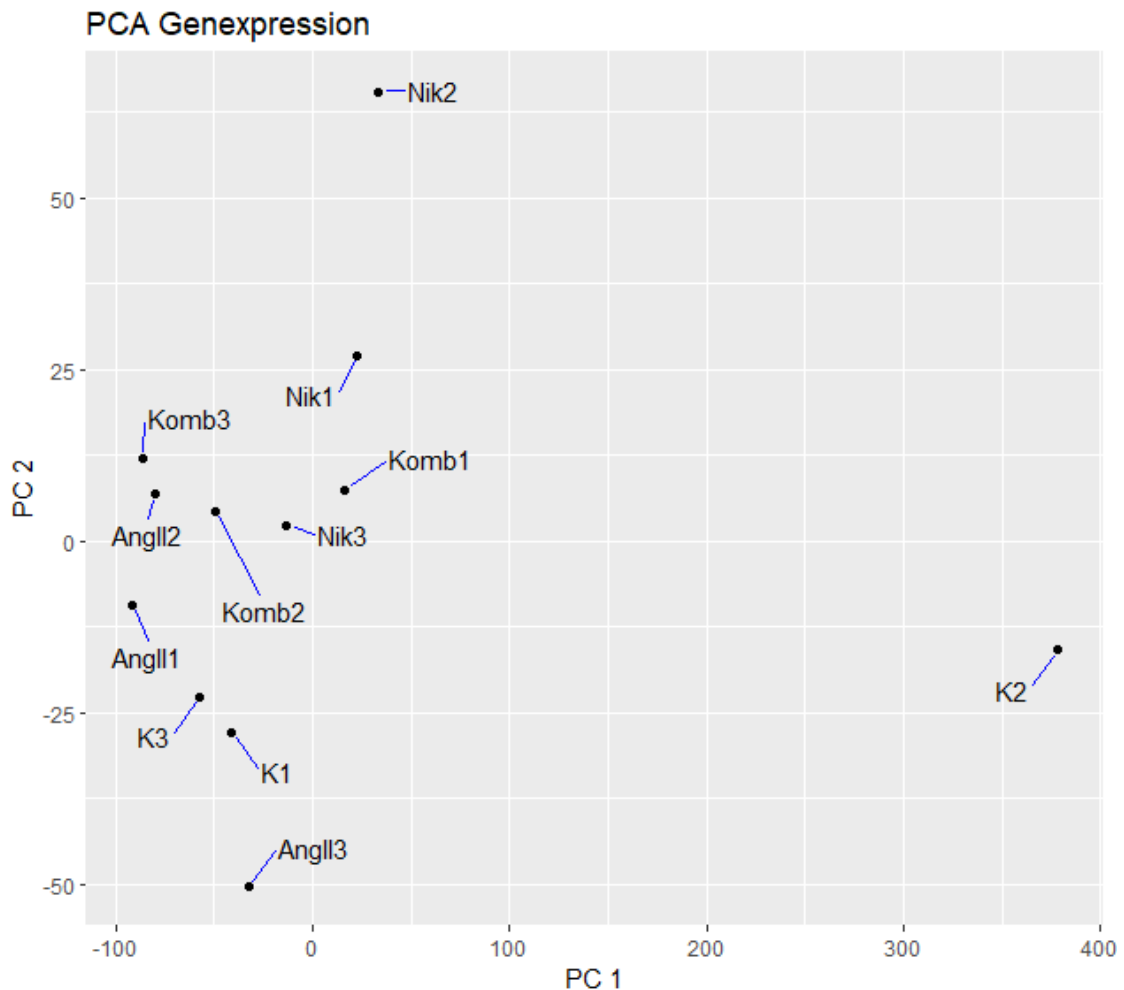
**Abb. 19: MultiQC Bericht zur Probenqualität 2/2. A:** Darstellung des Inhalts pro Basensequenz für die Probe Kontrolle1. **B:** Darstellung des Anteils an Sequenzduplikationen. (Erstellt mit MultiQC). Programm: MultiQC (v1.7)

Der Inhalt pro Basensequenz gibt das Verhältnis der vier Basen für jede Position innerhalb der Sequenzen einer Probe an und ist für die ersten 10 - 15 Basen in allen Proben nicht uniform verteilt. Ab Base 15 zeigt sich der Anteil der vier Basen über die Länge der Sequenzen annähernd uniform. **Abb. 19A** zeigt das Verhältnis der vier Basen für die Probe Kontrolle1 exemplarisch. Der Anteil an Adaptersequenzen liegt bei allen Proben  $< 0,1$  %. Der Anteil an überrepräsentierten Sequenzen ist bei allen Proben  $< 1$  %. Die Anzahl an Sequenzduplikaten liegt im Durchschnitt bei ca. 70 % (**Abb. 19B**).

### 3.3.2 Probenvarianz

Um die Varianz der Genexpression innerhalb aller Proben zu ermitteln wurde eine PCA durchgeführt. Es zeigt sich, dass sich die Proben der einzelnen Gruppen (K, Nik, Ang II und Komb) nicht in *Clustern* bündeln und stattdessen nur unzulänglich voneinander abgrenzen lassen (**Abb. 20**). Die Proben K1, K3, AngII1, AngII2, Komb1, Komb2, Komb3, Nik1 und Nik3 bilden ein großes *Cluster*. Deutlich außerhalb dieses *Clusters*

liegen die Proben Nik2 und K2. Sie zeigen eine starke Varianz in der Genexpression im Vergleich mit allen anderen Proben.



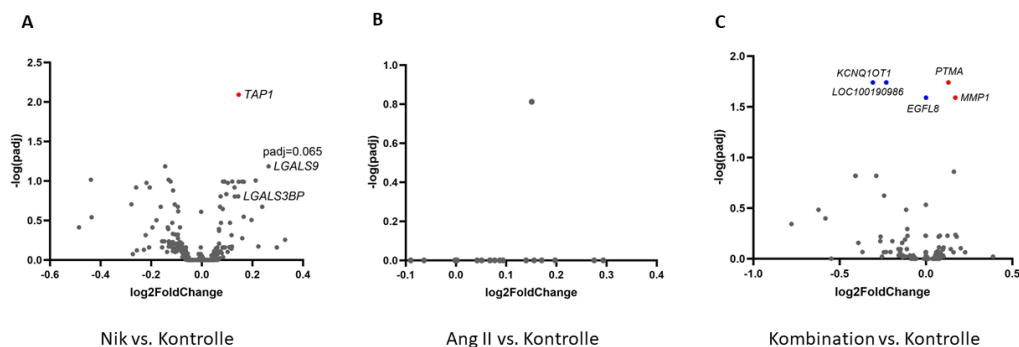
**Abb. 20: Probenvarianz in der Genexpression.** PCA-Plot, der die Varianz aller Proben (Kontrolle, Nikotin, Ang II, Komb) in Bezug auf deren Genexpression darstellt. n=3. Programm: R (v4.3.1)

### 3.3.3 Differentielle Genexpressionsanalyse

In weiteren Verlauf wurde die Genexpression der Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe verglichen. Dieser Vergleich wurde mithilfe des R Pakets DESeq2 durchgeführt. Die Analyse zeigt eine signifikant höhere Expression von *TAP1* (*Transporter associated with antigen processing 1*) in Nik exponierten HAoECs (**Tabelle 7**). Eine Ang II Exposition führt zu keiner signifikanten Regulation der Gene (**Tabelle 7**). Wurden die HAoEC mit Komb behandelt, lassen sich fünf signifikant regulierte Gene feststellen. Signifikant erhöht exprimiert werden Matrix-Metalloproteinase 1 (*MMP1*) und Thymosin  $\alpha$ 1 (*PTMA*), während es für das nicht kodierende Gen *KCNQ1OT1*, *Epidermal Growth Factor-Like Protein 8* (*EGFL8*) und das RNA-Gen *LOC100190986* zu einer niedrigeren Expression kommt (**Tabelle 7**).

Gen	Log2FoldChange	p-Werte (p)	p-adjustiert (padj)
<b>Nikotin vs. Kontrolle</b>			
<i>TAP1</i>	0,1459	3,63E-07	<b>0,0080</b>
<i>LGALS9</i>	0,2640	6,93E-06	0,0654
<i>RPS12</i>	-0,1447	8,81E-06	0,0654
<i>HMGA2-AS1</i>	-0,4382	1,80E-05	0,0963
<i>RPS20</i>	-0,1310	2,16E-05	0,0963
<b>Angiotensin II vs. Kontrolle</b>			
<i>MMP1</i>	0,1510	8,81E-06	0,1541
<i>POTEM</i>	0,2935	0,0005	0,9999
<i>LINC01106</i>	0,2754	0,0016	0,9999
<i>SNORD84</i>	0,1975	0,0047	0,9999
<i>ZBTB12</i>	0,1707	0,0018	0,9999
<b>Kombination vs. Kontrolle</b>			
<i>PTMA</i>	0,1301	1,71E-06	0,0182
<i>KCNQ1OT1</i>	-0,3078	2,02E-06	0,0182
<i>LOC100190986</i>	-0,2305	2,46E-06	0,0182
<i>EGFL8</i>	-0,0003	5,81E-06	0,0257
<i>MMP1</i>	0,1698	5,73E-06	0,0257

**Tabelle 7: Top 5 Gene der differentiellen Genexpressionsanalyse**

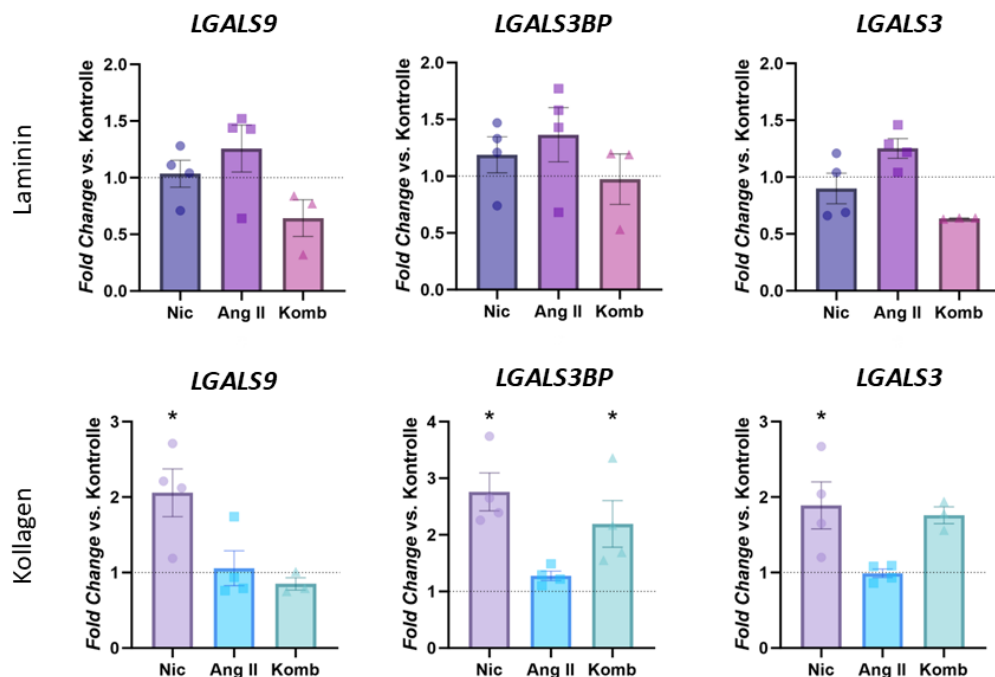


**Abb. 21: Differentielle Genexpressionsanalyse: Versuchsgruppen vs. Kontrolle. A-C:** Volcano Plots, die differentiell exprimierte Gene (DEGs) der RNA-Sequenzierung Analyse von HAoECs exponiert mit Nikotin (Nik) (A), Angiotensin II (Ang II) (B) und Kombination (Komb) (C) vs. Kontrolle zeigen. Die signifikant hochregulierten Gene (Rot) und signifikant runterregulierten Gene (Blau) mit  $padj < 0,05$  sind in entsprechender Farbe markiert. Relevante Gene sind mit ihrem Gen Namen hervorgehoben. n=3. Programm: DESeq2 R-Paket (v1.26.0)

Im Hinblick auf Gene, die in der Zell-Zell und/oder Zell-Matrix Adhäsion beteiligt sind, fällt vor allem die erhöhte Expression von *LGALS9* (Galektin-9) ( $p_{adj} = 0,0654$ ) und auch *LGALS3BP* (Galektin-3 bindendes Protein) ( $p_{adj} = 0,1567$ ) in Nik behandelten HAoEC auf (**Abb. 21 A**). In Ang II und Komb exponierten HAoEC zeigen sich in der differentiellen Genexpressionsanalyse keine nennenswerten Tendenzen in der Expression dieser Gene (**Abb. 21 B/C**).

### 3.3.4 qRT-PCR-Validierung

Um die Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse für relevante Gene zu validieren, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. HAoEC wurden auf Laminin oder Kollagen beschichteten 6-Well Platten mit Nik, Angio II und Komb behandelt. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression von *LGALS9*, *LGALS3BP* und *LGALS3* in HAoEC, die auf Laminin beschichteten 6-Well Platten kultiviert und exponiert wurden (**Abb. 22 A-C**).

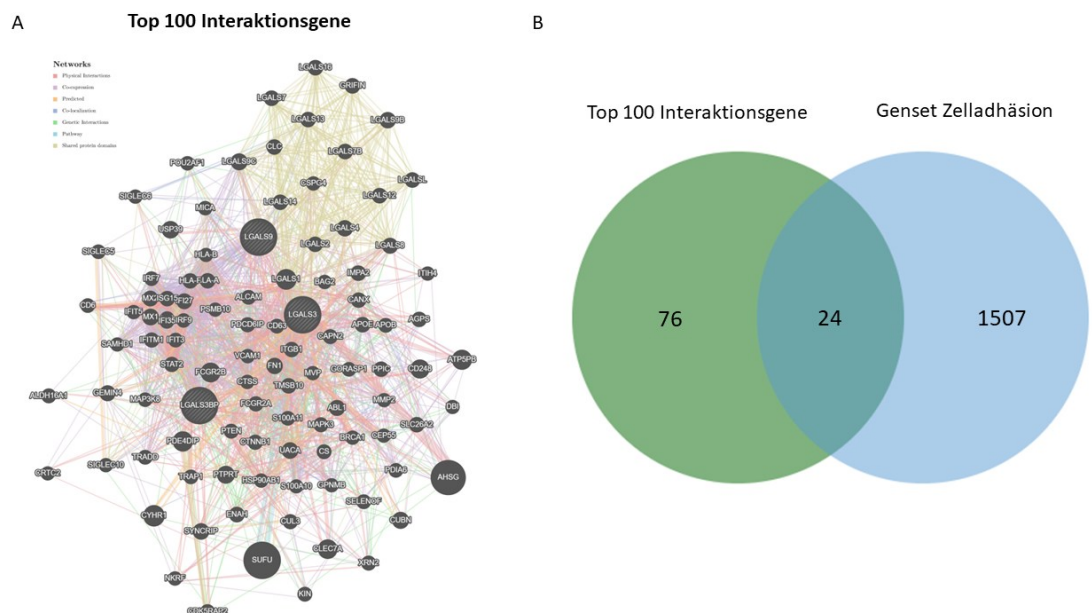


**Abb. 22: Genexpressionslevel von Galektinen in HAoECs auf Laminin und Kollagen. A-F:** Transkriptionslevel von Galektin-9 (*LGALS9*), Galektin-3 bindendes Protein (*LGALS3BP*) und Galektin-3 (*LGALS3*) in HAoECs, die auf Laminin und Kollagen kultiviert wurden und mit 100 nM Nikotin (Nik), 100 nM Angiotensin II (Ang II), sowie deren Kombination (Komb) exponiert wurden. Für die Analyse wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode genutzt. GAPDH wurde als *Housekeeper* genutzt. Die Daten sind als Fold Change vs. Kontrolle dargestellt. \*\* $p$ -Wert ( $p < 0,005$ ); Grubbs' test und one-way Anova mit Dunnett Correction oder t-test ( $n=4$ ).

Für HAoEC, die auf Kollagen kultiviert und mit Nik behandelt wurden, erhöht sich jedoch die Expression von *LGALS9*, *LGALS3BP* und *LGALS3* statistisch signifikant (**Abb. 22 D-F**). Die Komb Exposition sorgt für eine signifikant erhöhte Expression von *LGALS3BP* in auf Kollagen kultivierten HAoEC (**Abb. 22 E**).

### 3.3.5 *In-silico* Interaktionsanalyse

Um etwaige Geninteraktionen von *LGALS9*, *LGALS3* und *LGALS3BP* auszumachen wurde eine *in-silico* Interaktionsanalyse durchgeführt. Diese ermöglicht eine Identifikation der Top 100 Interaktionsgene (**Abb. 23 A**). Ein anschließender Vergleich der Interaktionsgene mit einem Zelladhäsion Genset zeigt, dass 24 Interaktionsgene eine Funktion in der Adhäsion von Zellen haben (**Abb. 23 B**). Diese Gene sind in **Tabelle 8** nach Interaktionsrank-Reihenfolge aufgelistet.



**Abb. 23: Interaktionsgene von *LGALS9*, *LGALS3BP* und *LGALS3* mit Fokus auf Zelladhäsion. A:** Interaktionsnetzwerkanalyse von *LGALS9*, *LGALS3BP* und *LGALS3*. **B:** Venn Diagramm, dass die Schnittmenge der Interaktionsgene und dem Genset Zelladhäsion zeigt.

Interaktionsgene von <i>LGALS9</i> , <i>LGALS3BP</i> und <i>LGALS3</i> in der Zelladhäsion					
4	<i>LGALS1</i>	<i>Galectin 1</i>	49	<i>CTNNB1</i>	<i>Catenin Beta 1</i>
7	<i>FCGR2B</i>	<i>Fc Gamma Receptor IIb</i>	60	<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
10	<i>PTPRT</i>	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type T</i>	66	<i>CD63</i>	<i>CD63 Molecule</i>
13	<i>LGALS9C</i>	<i>Galectin 9C</i>	68	<i>ALCAM</i>	<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>
17	<i>LGALS9B</i>	<i>Galectin 9B</i>	70	<i>CD6</i>	<i>CD6 Molecule</i>
18	<i>FN1</i>	<i>Fibronectin 1</i>	73	<i>SIGLEC5</i>	<i>Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 5</i>
19	<i>LGALS4</i>	<i>Galectin 4</i>	74	<i>S100A11</i>	<i>S100 Calcium Binding Protein A11</i>
20	<i>ABL1</i>	<i>ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase</i>	82	<i>VCAM1</i>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
27	<i>LGALS7B</i>	<i>Galectin 7B</i>	87	<i>SIGLEC10</i>	<i>Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 10</i>
40	<i>LGALS2</i>	<i>Galectin 2</i>	90	<i>SIGLEC6</i>	<i>Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 6</i>
42	<i>HLA-A</i>	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, A</i>	92	<i>GPNUMB</i>	<i>Glycoprotein Numb</i>
44	<i>ITGB1</i>	<i>Integrin Beta 1</i>	98	<i>MMP2</i>	<i>Matrix Metalloproteinase 2</i>

**Tabelle 8: Interaktionsgene von *LGALS9*, *LGALS3BP* und *LGALS3* im Zelladhäsion Genset**

## **4. Diskussion**

Die AD stellt eine lebensbedrohliche Notfallkrankung dar. Laut einer britischen Studie aus dem Jahr 2020 versterben schätzungsweise 20 % der Patienten mit AD, bevor Sie ein Krankenhaus erreichen [103]. Selbst wenn die Patienten ein Krankenhaus erreichen und entsprechend versorgt werden können, liegt die Mortalität in den ersten 30 Tagen bei 16,9 % [104]. Auf Grund der hohen Letalität von AD, ist es daher im allgemeinen Interesse die pathophysiologischen Entstehungsprozesse dieser Erkrankung besser zu ergründen. Bekannt ist, dass die AD eine multifaktorielle Erkrankung ist, die im Wesentlichen durch eine geschwächte Gefäßwand und durch erhöhten Scherstress ausgelöst wird, sodass ein Intimaeinriss folgt [17]. Während die pathophysiologischen Mechanismen in der Tunica Media in den letzten Jahren im Mittelpunkt der Forschung zur AD standen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von etablierten Risikofaktoren wie Rauchen und aHT auf die mechanische Endothelintegrität untersucht. Dazu wurden zunächst die Gen- und Proteinexpression von essentiellen Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen in Nik und Ang II exponierten HAoEC analysiert. Sie verleihen dem Endothel seine mechanische Stabilität indem sie die Endothelzellen untereinander und mit der Basalmembran verbinden. Anschließend sollte eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung Aufschluss über weiterer Gene mit potentieller Rolle in der Modulation der Endothelintegrität geben. Insgesamt deuten die Daten auf signifikant erhöhte Nik induzierte Genexpressionslevel von sowohl Zell-Zell, als auch Zell-Matrix Adhäsionsproteinen und ermittelten die Galektinfamilie als potentiellen novellen Regulator in der Modulation von der Endothelintegrität.

Das bedeutendste Adhäsionsprotein für die Zell-Zell Verbindung ist Ve-Cadherin. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikant erhöhte Genexpression von Ve-Cadherin in statisch kultivierten HAoEC, die mit Nik exponiert wurden. Während *Naik et al.* auch auf Proteinexpressionsebene eine signifikant erhöhte Expression von Ve-Cadherin nach Nik Exposition in humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (hCMEC/D3) feststellen konnten, zeigen die Daten dieser Forschungsarbeit keine signifikant erhöhte Expression von Ve-Cadherin in HAoEC [105]. Im Vergleich fällt auf, dass *Naik et al.* eine deutlich längere Nik Exposition, sowie eine stärkere Nik Konzentration für ihre *in-vitro* Experimente gewählt haben [105]. Studien zeigen, dass die Wahl der Nik Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Forschungsergebnisse hat - hier gilt grundsätzlich je höher die Konzentration, desto eindeutiger die Ergebnisse [106, 107]. Folglich bleibt hypothetisch festzuhalten, dass die Nik Effekte auf transkriptionellen Niveau durchaus konzentrationsabhängig sein könnten. Für eine erhöhte Expression des Adhäsionsproteins Ve-Cadherin könnte Nik

induzierter oxidativer Stress sorgen. *Lei et al.* zeigen, dass oxidativer Stress zur einer erhöhten Ve-Cadherin Expression führt und gehen davon aus, dass dies Teil eines zellschützenden Reaktionsmechanismus ist [108]. Auch ist bekannt, dass der bei Hypoxie gebildete Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$  (*HIF1 $\alpha$* ) die Expression von Ve-Cadherin verstärkt [109]. Da Nik ein etablierter Faktor für die Induktion von oxidativem Stress ist und auch zu erhöhter *HIF1 $\alpha$* -Expression führen kann, sind dies potentielle Mechanismen, die eine Erklärung für eine erhöhte durch Nik ausgelöste Ve-Cadherin Expression liefern könnten [110, 111]. Nichtsdestotrotz deuten Ergebnisse anderer Studien, entgegen der Ergebnisse dieser Arbeit oder derer von *Naik et al.*, auf eine deutlich niedrigere endotheliale Ve-Cadherin Expression nach Nik Exposition hin [106]. Ähnlich wie für das Zell-Zell Adhäsionsprotein Ve-Cadherin, kann für das Zell-Matrix Adhäsionsprotein Integrin  $\beta$ 1 eine signifikant erhöhte Genexpression durch Nik Exposition detektiert werden, während die Quantifizierung der Proteinexpression von Integrin  $\beta$ 1 keine signifikanten Ergebnisse lieferte. Integrin  $\beta$ 1 ist eine bedeutende Integrin Untereinheit und hat entscheidenden Einfluss auf die Adhäsion von Endothelzellen und der Basalmembran [83]. Vergleichbare Studien, die den Einfluss von Nik auf die Expression von Integrin  $\beta$ 1 in Endothelzellen untersuchen, sind dem Autor nicht bekannt. Hier bedarf es somit weiterführende Experimente um den Einfluss von Nik auf Integrine und deren Modulation der Zell-Matrix Verbindungen besser zu verstehen.

Um jene Modulation der Integrine und der Zell-Matrix Verbindungen in von Endothelzellen und der Basalmembran zu untersuchen, wurden die HAoEC in dieser Arbeit auf beschichteten Kulturgefäßen kultiviert und behandelt. Die Kulturgefäße wurden mit Kollagen und Laminin beschichtet. Beides sind Komponenten der Basalmembran und dienen als Ankerproteine von Integrinen. Bei der Betrachtung der Genexpressionslevel von Ve-Cadherin und Integrin  $\beta$ 1 fällt auf, dass die signifikante Transkriptionsreaktionen unter einer Exposition mit Nik von Laminin abhängig zu sein scheint. Dies würde folgernd bedeuten, dass die einzelnen Komponenten der Basalmembran individuelle Auswirkungen auf die Endothelintegrität hätten. Zu ähnlicher Annahme kommen *Song et al.*, deren Daten darauf hinweisen, dass die endotheliale Adhäsion an Laminin eine  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3-Integrine modulierte Ve-Cadherin Stabilisierung an den Zell-Zell-Verbindungen vermittelt und so die Transmigration von Leukozyten gesteuert wird [112]. Auch *Di Russo et al.* deuten in *in-vitro* Studien auf eine Laminin/Integrin/Ve-Cadherin Achse, die maßgeblich zur endothelialen Stabilität und erhöhten Adhäsionskraft beiträgt [113]. Dass es einen komplexen *Crosstalk* zwischen Integrinen und Cadherinen gibt, ist bekannt [83, 114]. Auch die Ergebnisse der

Korrelationsanalyse dieser Arbeit, die eine signifikante Korrelation der Proteinexpression von Integrin  $\beta 1$  und Ve-Cadherin zeigen, deuten auf eine Interaktion der beiden Adhäsionsproteine, welche über das endotheliale Zytoskelett miteinander verbunden sind, hin. Integrine spielen eine zentrale Rolle in der dynamischen Regulation der Endothelintegrität und beeinflussen über komplexe Signalwege unter anderem die Organisation von Ve-Cadherin. Dabei kann Integrin  $\beta 1$  sowohl stabilisierende, als auch disruptive Effekte auf Ve-Cadherin und die Endothelintegrität haben. *Yamamoto et al.* zeigten, dass Integrin  $\beta 1$  die Expression von Ve-Cadherin maßgeblich reguliert und so für eine stabiles Endothel sorgt [115]. Bereits die fehlende Aktivierung von Integrin  $\beta 1$  durch das Adapterprotein Talin hat Auswirkung auf die zelluläre Organisation von Ve-Cadherin und sorgt für einen endothelialen Stabilitätsverlust [116]. In inflammatorischen Settings sorgt jedoch vor allem das Fibronektin bindende Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  für Disruptionen von Ve-Cadherin und den Verlust interendothelialer Verbindungen [117]. Insgesamt zeigt nicht nur diese, sondern auch zahlreiche andere Studien, dass Rauchen, in dieser Arbeit durch die Modellschubstanz Nik abgeleitet, zu Veränderungen der Expression von wichtigen Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionsproteinen führt. Inwiefern Rauchen die Interaktion dieser Proteine untereinander beeinflusst und diese Interaktionen moduliert werden, könnte Gegenstand weiterer Experimente sein.

Nicht nur der Einfluss von Rauchen, sondern auch der Einfluss einer aHT sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Um die Expression von Adhäsionsproteinen in diesem Kontext zu untersuchen wurden die HAoEC mit Ang II oder erhöhter Flussgeschwindigkeit kultiviert. Für die Exposition der HAoEC mit Ang II lassen sich keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression der untersuchten Adhäsionsproteine beobachten. Auch die erhöhte Flussgeschwindigkeit während der Zellkultivierung in  $\mu$ -Slides zeigt keine Veränderungen in der Proteinexpression von Ve-Cadherin und Integrin  $\beta 1$ . Dennoch wurde in anderen Studien gezeigt, dass die Exposition von Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC) und murinen vaskulären Endothelzellen zu einer signifikant geringeren Expression von Ve-Cadherin führt [118, 119]. Die Expositionszeit in diesen Experimenten betrug min 24h. Außerdem zeigten *Li et al.*, dass Ang II maßgeblich zur erhöhten endothelialen Expression von Integrin  $\beta 3$  über eine Nuklear Faktor  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) Aktivierung beiträgt [120], während *Stawowy et al.* eine erhöhte Aktivität von Integrin  $\beta 1$  in murinen kardialen Fibroblasten durch Ang II zeigten [121]. Entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit kommen auch *Miao et al.* zu der Annahme, dass variabler Scherstress keinen signifikanten Einfluss auf die quantitative Proteinexpression von Ve-Cadherin haben [122]. Stattdessen zeigten Sie, dass verschiedene Strömungsmuster unterschiedliche Auswirkungen auf die Verteilung der

Proteine haben [122]. Areale der Aorta mit laminaren Strömungsmustern zeigen eine höhere Expression von Ve-Cadherin an den Zellgrenzen, als Areale mit turbulenten Strömungsmustern [122]. Dass Scherstress Integrine aktiviert und zu einer erhöhten Expression von Integrin  $\beta 1$  führt, zeigten *Urbich et al.* in einem Experiment, welches flusskultivierte HUVEC mit statisch kultivierten HUVEC verglich [123]. Auf Grund der bisher unzureichenden Datenlage bezüglich der Auswirkungen von unterschiedlichem Scherstress auf die Expression von Integrin  $\beta 1$ , könnten weitere Experimente, die dieser Frage nachgehen, für Erkenntnisse sorgen. Dass die aHT, der Blutfluss und dessen Scherstress Auswirkungen auf das Endothel und dessen Adhäsionsproteine haben, ist bekannt. Ve-Cadherin und Integrine sind gemeinsam mit anderen Proteinen wichtige Bestandteile in der Mechanotransduktion. Studien zeigen, dass Scherstress Ve-Cadherin aktiviert [124]. Es formt zusammen mit *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) und *Fetal liver kinase* (Flk-1) einen mechanosensitiven Komplex, der das Endothel dem Scherstress entsprechend orientiert [125]. Integrine geben die Signale des Zytoskelettes über Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Mikrofilamente weiter um die Endothelintegrität zu wahren [126]. Insgesamt zeigt sich eine Ve-Cadherin und Integrin vermittelte Zelladhäsion als komplexes Konstrukt, welches durch unterschiedliche Signalwege untereinander verknüpft ist und die Endothelintegrität steuert. Daher wurde neben der Quantifizierung der Gen- und Proteinexpression von Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionsproteine in Nik und aHT (Ang II) exponierten HAoEC eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Ziel war es Hinweise auf weitere potentielle Gene auszumachen, die im Rahmen der Endothelintegrität steuernde Funktionen einnehmen.

Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung und der qRT-PCR deuten auf eine signifikante Transkriptionsreaktion von *LGALS9*, *LGALS3BP* und *LGALS3* in Nik exponierten HAoEC hin, während die Exposition mit Ang II keine Regulationen dieser Galektine hervorruft. Eine Verknüpfung zwischen Rauchen und erhöhter Galektin-3 Expression wurde bereits von anderen Gruppen beobachtet. *Guha et al.* zeigten, dass Nik zu erhöhten Galektin-3 Expression in Brustkrebszellen führt, während *Sharma et al.* zeigten, dass Zigarettenrauch zu erhöhten Galektin-3 Level im Rahmen von respiratorischen Erkrankungen führt [127, 128]. Die Nik induzierte Transkriptionsreaktion in HAoEC scheint von Kollagen abhängig zu sein. Galektine sind eine Proteinfamilie, die durch eine *carbohydrate recognition domain* (CRD) an  $\beta$ -Galactosidase Kohlenhydrate binden [129]. Insgesamt 15 Galektine gehören dieser Proteinfamilie an, wobei Galektin-1, -3, -8 und -9 die vorherrschenden Galektine in Endothelzellen sind [130, 131]. In jüngsten Beobachtungsstudien wurden erhöhte Galektin-3 und Galektin-9

Plasmakonzentrationen mit verschiedenen vaskulären Pathologien in Verbindung gebracht [132-134]. Ob die erhöhten Plasmaspiegel von Endothelzellen stammen, ist dabei nicht in Gänze geklärt. Außerdem zeigten sich eine erhöhte *LGALS3* Expression in tierexperimentellen Studien zur Atheroskleroseentstehung, welche wie bereits erwähnt ein bekannter Risikofaktor für AD darstellt [135]. Im Kontext dieser Arbeit ist interessant, dass Galektine bekannte Modulatoren von Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen sind [136]. Sie regulieren Zelladhäsion auf konzentrationsabhängige Weise [137]. Ist Galektin-3 bei Normalkonzentration adhäsionsfördernd, so kommt es bei erhöhten Galektin-3 Konzentrationen zu inhibitorischen Effekten [136, 137]. In Epithelzellen vermitteln Galektin-3 und -9 die Adhäsion zu Laminin und Kollagen [138]. Dabei kommt es auch zu Interaktionen mit den in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsproteinen. Bereits 2012 beschrieben *Margadant et al.* etwaige Wechselbeziehungen von Galektin-3 und Integrin  $\beta 1$  [139]. Sie zeigten, dass die Expression von Galektin-3 durch Integrin  $\beta 1$  hervorgerufen wird und Galektin-3 wiederum die Adhäsion von Integrin  $\beta 1$  zu Laminin und Kollagen unterstützt [139]. In der Tumorforschung wurde außerdem in melanozytären Tumorzellen gezeigt, dass Galektin-3 unter anderem die Expression von Ve-Cadherin zur Induktion der Tumor Angiogenese fördert [140]. Auch Galektin-9 interagiert mit Integrinen und reguliert deren Funktionen in der Zell-Matrix Adhäsion [138]. Wie diese Regulation stattfinden könnte und welche weiteren Gene in der Interaktion eine Rolle spielen könnten, sollte eine *in-silico* Interaktionsanalyse von *LGALS3*, *LGALS3BP* und *LGALS9* zeigen.

Die Analyse ergab, dass insgesamt 24 der Top 100 Interaktionsgene Funktionen in der Zelladhäsion haben. Dabei ist auch das Gen *ITGB1* unter jenen 24 Genen. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, sind Wechselbeziehungen von Galektin-3 und Integrin  $\beta 1$  im Kontext der Zell-Matrix Adhäsion bekannt. Daher könnten weitere Untersuchungen, die die Interaktion im Kontext der Endothelintegrität ergründen, interessante und vielversprechende Ergebnisse liefern. Ein weiteres Gen aus der Liste der 24 Interaktionsgene, die Implikationen in der Zelladhäsion haben, ist das Gen Fibronectin 1 (*FN1*). *FN1* kodiert für das Protein Fibronectin 1, welches wie Laminin und Kollagen einen Bestandteil der Basalmembran darstellt, und eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, Zellmigration und Zelldifferenzierung spielt [83, 141]. In Bezug auf Galektine zeigten *Ahrens et al.*, dass Fibronectin die Genexpression von *LGALS3* in endothelialen Vorläuferzellen signifikant erhöht [142]. Als Bestandteil der Basalmembran ist auch Fibronectin ein wichtiger Ligand für Integrine. Über die Arginyl-Glycyl-Aspart Säure (RGD) sorgen die meisten Integrine für Zell-Matrix Verbindungen zu Fibronectin [143]. Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  ist der stärkste Rezeptor für Fibronectin [143]. Im Kontext der

Endothelintegrität ist Fibronectin ein bedeutender Stabilisator. Enthält die Basalmembran nicht genug Fibronectin kommt es zu einer erhöhten Permeabilität und gestörten Barrierefunktion des Endothels [144]. Ein anderes interessantes Interaktionsgen im Zusammenhang mit Zelladhäsion ist  $\beta$ -Catenin (*CTNNB1*). Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, ist  $\beta$ -Catenin ein Adapterprotein, welches Ve-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet (**Abb. 7**) [72, 75]. *Oas et al.* zeigten, dass  $\beta$ -Catenin die Stärke der Ve-Cadherin induzierten Zell-Zell Adhäsion reguliert, indem es Aktin bindende Proteine mobilisiert, die den Ve-Cadherin/  $\beta$ -Catenin Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett stabilisieren [145]. In der Interaktion mit Galektinen, ist vor allem Galektin-3 ein bekannter Interaktionspartner. Im Kontext vaskulärer Pathologien zeigten experimentelle Studien, dass Galektin-3 den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg in glatten Muskelzellen in der Atheroskleroseformation aktiviert und eine Galektin-3 knockout zur geringeren Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin führt [146]. Das *Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM 1)* Gen ist ebenfalls ein Interaktionsgen der analysierten Galektine. VCAM 1 unterstützt vor allem die Adhäsion von Immunzellen an das Endothelium und ist ein bekanntes Protein in der Entstehung von vaskulären Pathologien wie bspw. Atherosklerose [147, 148]. Auch in der Entstehung von AD scheint VCAM 1 von Bedeutung zu sein. In einem AD Mausmodell wurde eine erhöhte Expression des Proteins im Rahmen von AD gezeigt [149]. Dass eine Inflammation der Gefäßwand eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von AD spielt, ist bekannt [150]. Im Kontext dieser Arbeit ist Interessant, dass bereits von *Chen et al.* gezeigt werden konnte, dass Galektin-3 über einen Integrin  $\beta$ 1 abhängigen Signalweg zur Inflammation durch erhöhte Expression von VCAM 1 führt [151]. Wie VCAM 1 wurden auch erhöhte Expressionslevel des Proteins Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) im Kontext mit AD gezeigt [149, 152]. MMP2 ist ein führendes Protein, wenn es um den Abbau der Extrazellulären Matrix der Gefäßwand geht und trägt so zur Entstehung von AD bei [153]. In der Tunica Intima sorgt MMP2 zu einem Verlust der Endothelintegrität indem es zum Abbau von Ve-Cadherin und  $\beta$ -Catenin beiträgt [154]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das *MMP2* Gen unter den 24 Zelladhäsionsgenen ist, die mit Galektinen interagieren. Neben MMP2 wurden mit FN1, *CTNNB1* und VCAM 1 interessante Interaktionsgene von Galektinen in der *in-silico* Interaktionsanalyse gefunden. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten Basis für weitere experimentelle Ansätze dienen, die den Einfluss von Rauchen auf pathophysiologische Prozesse und Signalketten in der Endothelintegrität untersuchen, die unter anderem durch Galektine, deren Interaktionsgenen und den Adhäsionsproteinen Ve-Cadherin und Integrin  $\beta$ 1 moduliert werden könnten.

#### 4.0.1 Limitationen

Diese Forschungsarbeit basiert ausschließlich auf *in-vitro* Experimenten. Grundsätzlich können diese Experimente die physiologischen Gegebenheiten des menschlichen Körpers nur bedingt abbilden.

Um den Einfluss von Rauchen und aHT auf die Adhärenz des Endothels zu untersuchen, wurden HAoEC mit den Modellsubstanzen Nik und Ang II entsprechend exponiert und Gen- sowie Proteinexpressionslevel von Adhäsionsproteinen quantifiziert. Neben Nik enthalten Zigaretten viele andere Substanzen, die Auswirkungen auf den Körper haben können. Diese Auswirkungen konnten durch die durchgeführten Experimente nicht abgebildet werden, sodass nur bedingt Schlussfolgerungen in Bezug zu Rauchen getroffen werden können. In dieser Arbeit wurde versucht die wechselnden Serumkonzentrationen von Nik möglichst gut nachzuahmen, sodass die Nik Exposition undulierend stattfand. Zur besseren Durchführbarkeit wurde die Exposition für 6h ausgeführt. In Studien die vergleichbare *in-vitro* Experimente durchführten, wurde in aller Regel eine kontinuierliche Nik Exposition im zeitlichen Rahmen von 90Min – 24h gewählt [107, 155]. Ob eine undulierende *in-vitro* Nik Exposition gegenüber der kontinuierlichen *in-vitro* Nik Exposition für Forschungszwecke überlegen ist, um eine möglichst realitätsnahe Nik Exposition abzubilden, ist bisher nicht durch wissenschaftliche Studien beantwortet. Die gewählte Konzentration von 100 nM Nik liegt im üblichen Bereich für *in-vitro* Zellkultur Studien, wenngleich andere Studien bis zu zehnmal höheren Konzentrationen wählten [106, 156]. Es wurde versucht Für die Experimente mit statisch kultivierten HAoEC wurde Ang II zur *in-vitro* Nachahmung von aHT gewählt. Dabei wurde eine Konzentration von 100 nM Ang II gewählt, welche im üblichen Bereich für *in-vitro* Experimente liegt [157]. Ang II ist ein Vasokonstriktor, der eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der aHT spielt und direkt auf das Endothel einwirkt [158]. Außerdem, ist die aHT mit erhöhten Ang II Serumspiegeln assoziiert [159, 160]. Nichtsdestotrotz könnte die Verwendung von Ang II zur Nachahmung von aHT den realen Kontext stark simplifizieren. Vor dem Hintergrund, dass hier ein komplexer biologischer Prozess untersucht wird, sollte eine potentielle Simplifizierung bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Für einige Experimente wurden HAoEC statisch kultiviert und exponiert. Jedoch sind HAoEC, unter natürlichen Bedingungen, ständigem Blutfluss und Scherstress ausgesetzt. Studien zeigen, dass dies wesentliche Auswirkungen auf die Physiologie, Genexpression und Morphologie von Endothelzellen hat [161, 162]. Nichtsdestotrotz ist eine statische Kultivierung von HAoEC für Zellkulturexperimente gängig und verbreitet

[163, 164]. Eine potentielle Simplifizierung sollte auch bei der Interpretation der Ergebnisse von statisch kultivierten HAoEC Experimenten berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zur statischen Kultivierung, wurden HAoEC für die Quantifizierung der Proteinexpressionslevel von Adhäsionsproteinen in einem Bioreaktor bei physiologischem Scherstress kultiviert [38]. Dazu waren die  $\mu$ -Slides mit Laminin und Kollagen IV beschichtet, da der Zellrasen auf unbeschichteten  $\mu$ -Slides wesentlich leichter war und durch den Scherstress abgetragen wurde. Für die Flusskultivierung von HAoEC ist es also essentiell, die  $\mu$ -Slides mit einer Komponente der Basalmembran, die als Ligand für Zell-Matrix Adhäsionsproteine dient, zu beschichten. Offensichtlich ist es den HAoEC nur durch die Zell-Matrix Adhäsion möglich, den mechanischen Kräften des Scherstress zu widerstehen. Außerdem konnte eine morphologische Ausrichtung der HAoEC entlang der Flussrichtung erkannt werden. Nichtsdestotrotz waren die HAoEC einem monotonen Fluss ausgesetzt. Das heterogene Flussgeschehen, sowie die heterogenen Scherstresswerte, welche auf das aortale Endothel einwirken, konnten in diesem Experiment nicht durch den Fluss abgebildet werden [38, 39] .

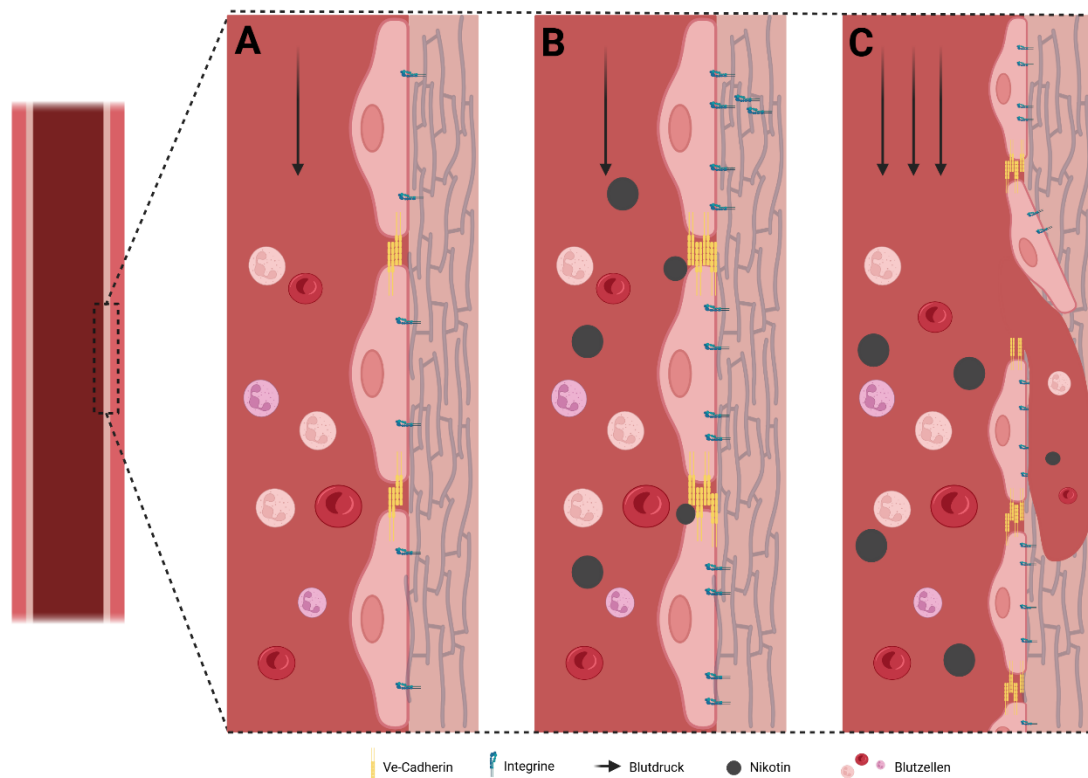
Um potentielle Signalwege, die die Zelladhäsion beeinflussen, zu untersuchen wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Aussagekraft einer RNA-Sequenzierung hängt unter anderem von der Varianz und der Anzahl der Proben ab. *Ching et al.* zeigen, dass sich eine geringe Varianz und hohe Probenanzahl positiv auf die Aussagekraft eines RNA-Sequenzierung Experiments auswirken [165]. Vor diesem Hintergrund sind die Probenvarianz und die gewählte Probenzahl (n=3) als nicht optimal, aber dennoch ausreichend, zu bewerten. Trotz der stetig sinkenden Kosten einer RNA-Sequenzierung ist die Methode im Vergleich immer noch sehr kostenintensiv [165, 166]. Daher wurde für diese Arbeit die minimale Anzahl von drei Proben gewählt. Die Qualität der Proben zeigte sich mit einem *Phred Score* von  $> 30$  als äußerst hochwertig. Auch andere Forschungsgruppen definieren einen *Phred Score* von 30 als qualitativen *cutoff* Wert [167].

## 4.1 Schlussfolgerungen

Vor dem Hintergrund, dass AD eine derartig akut lebensbedrohliche Erkrankung darstellen, bleibt es von Interesse die genauen pathophysiologischen Mechanismen in der Gefäßwand zu verstehen. Ziel dieser Arbeit war es einen ersten Beitrag zur Charakterisierung der mechanischen Endothelintegrität im Kontext der Pathogenese von AD zu leisten.

Vor allem Nikotin, ein etablierter Risikofaktor für AD, hat in diesem Zusammenhang für eine signifikant erhöhte Genexpression von Adhäsionsmolekülen geführt. Auslöser dafür

könnte unter anderem oxidativer Stress sein. Zeigen andere Studien auch auf Proteinebene signifikant erhöhte Nik induzierte Expressionslevel in Endothelzellen, so konnten die Ergebnisse auf Transkriptionsebene in dieser Arbeit nicht gleichermaßen auf Proteinebene abgebildet werden [105]. Hier scheint es auf das Expositionsmaß, welches in dieser Arbeit im Vergleich mit anderen gering ausgefallen ist, anzukommen. Daher deutet eine Nik Exposition von Endothelzellen insgesamt auf einen erhöhten interzellulären Zusammenhalt des Endothels hin. Dies könnte zur Folge haben, dass das Endothel rigider wird und die Tunica Intima an Elastizität verliert. Da das Endothel jedoch formbar und elastisch auf verstärkte Scherkräfte oder erhöhte Blutdrücke reagieren muss, könnte hier eine erhöhte Rigidität der Tunica Intima von Nachteil sein und zu einem Einriss der Tunica Intima beitragen (**Abb. 24**).



**Abb. 24: Vereinfachte Darstellung eines potentiellen Pathomechanismus der Entstehung von Intimaeinrissen. A:** Die Mechanische Endothelintegrität bei physiologischen Bedingungen vermittelt durch Ve-Cadherin und Integrine. **B:** Erhöhte Nikotinlevel im Blutkreislauf führen zur vermehrten Expression von Ve-Cadherin und Integrinen. Dies könnte das Endothel rigider werden lassen. **C:** Die erhöhte Endothelrigidität könnte einen Verlust an Elastizität der Intima bedeuten. Dies hätte zur Folge, dass das Endothel versteifen würde und es bei erhöhtem Blutdruck und stärkeren Scherkräften zu einem Intimaeinriss kommen könnte. Kreiert mit BioRender nach *Mulorz et al. [155]*.

Für die Tunica Media wurde bereits gezeigt, dass Nik für eine erhöhte Rigidität der Gefäßwand sorgt. Nik induziert Abbauprozesse von elastischen Fasern in der Tunica Media, sodass diese zunehmend an Elastizität verliert und es zu einer Versteifung des Gefäßes kommt [43]. Es könnte also lohnenswert sein, weiterführende Experimente, die

sich mit Nik induzierter Intima- und Gefäßversteifung auseinandersetzen, durchzuführen. Feststeht, dass neben den quantitativen Ergebnissen, die diese Arbeit liefert, auch qualitative Studien mit funktionellen Experimenten zu diesem Thema folgen sollten. Um pathophysiologische Prozesse besser zu verstehen, wären daher auch weitere Experimente, die potentielle Signalwege und Interaktionsgene im Kontext der Endothelintegrität von AD erforschen, von Interesse. Hier hat die durchgeführte Transkriptomanalyse Galektine als potentiellen neuen Forschungsansatz hervorgebracht. Nikotin führt zu einer erhöhten Genexpression von *LGALS3*, *LGALS9* und *LGALS3BP*. Es ist bekannt, dass Galektine Modulatoren von Zelladhäsion sind und in den letzten Jahren in den Fokus vaskulärer Forschung rücken [132-134, 136]. Die Interaktionsanalyse hat gezeigt, dass unter den Top Interaktionsgenen von *LGALS3*, *LGALS9* und *LGALS3BP* bekannte Gene der Gefäßbiologie wie *FN1*, *CTNNB1*, *ITGB1*, *VCAM 1* und *MMP2* sind. Etwaige Anschlussexperimente könnten erfolgsversprechend sein.

Die Pathogenese des Intimaeinriss bei AD bleibt weiterhin nicht vollständig geklärt. Diese Arbeit stellt einen Beitrag zur Charakterisierung der mechanischen Endothelintegrität dar. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine erhöhte Verankerung von Endothelzellen durch Nik hin. Es ist vorstellbar, dass dies zu einer verstärkten Rigidität der Tunica Intima und einem Verlust an Elastizität bzw. Formbarkeit führen könnte. Das Nik zur Gefäßversteifung führt ist bereits bekannt [43]. Zukünftige Untersuchungen und Anschlussexperimente, insbesondere mit Fokus auf funktionelle Proteinveränderungen und Änderungen der spezifischen zellulären Funktionalität, sind notwendig, um die pathophysiologischen Entstehungsprozesse von AD, insbesondere im Bereich der Tunica Intima, weiter zu verstehen und potenzielle therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

## 5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Braß, S.M., et al., *Nicotine Potentially Alters Endothelial Inflammation and Cell Adhesion via LGALS9*. J Cardiovasc Dev Dis, 2023. **11**(1).
2. Authors/Task Force, M., et al., *EACTS/STS Guidelines for Diagnosing and Treating Acute and Chronic Syndromes of the Aortic Organ*. Ann Thorac Surg, 2024. **118**(1): p. 5-115.
3. Czerny, M. and C. Nienaber, *Erkrankungen der Aorta*, in *Herz-Kreislauf*. 2024. p. 265-275.
4. Isselbacher, E.M., et al., *2022 ACC/AHA Guideline for the Diagnosis and Management of Aortic Disease: A Report of the American Heart Association/American College of Cardiology Joint Committee on Clinical Practice Guidelines*. Circulation, 2022. **146**(24): p. e334-e482.
5. Loukas, M., et al., *The anatomy of the aortic root*. Clinical Anatomy, 2014. **27**(5): p. 748-756.
6. Schünke, M., et al., *3. Organe des Kreislaufsystems und ihre Leitungsbahnen*, in *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*, M. Schünke, et al., Editors. 2022, Georg Thieme Verlag KG.
7. Schünke, M., et al., *A Kopf und Hals*, in *Prometheus LernAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie*, M. Schünke, et al., Editors. 2018, Georg Thieme Verlag KG.
8. Wurzinger, L.J., *Obere Extremität*, in *Duale Reihe Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2017, Georg Thieme Verlag KG.
9. Tillmann, B.N., *Anatomie der Gefäße: Rumpf*, in *Operative und interventionelle Gefäßmedizin*. 2019. p. 1-13.
10. Gao, Y., *Architecture of the Blood Vessels*, in *Biology of Vascular Smooth Muscle*. 2022. p. 3-17.
11. Kruger-Genge, A., et al., *Vascular Endothelial Cell Biology: An Update*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(18).
12. Belz, G.G., *Elastic properties and Windkessel function of the human aorta*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 1995. **9**(1): p. 73-83.
13. Stenmark, K.R., et al., *The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 23-47.
14. Harky, A., et al., *The Aortic Pathologies: How Far We Understand It and Its Implications on Thoracic Aortic Surgery*. Braz J Cardiovasc Surg, 2021. **36**(4): p. 535-549.
15. Clough, R.E. and C.A. Nienaber, *Management of acute aortic syndrome*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(2): p. 103-14.
16. Nienaber, C.A., et al., *Aortic dissection*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16053.
17. Yuan, X., A. Mitsis, and C.A. Nienaber, *Current Understanding of Aortic Dissection*. Life (Basel), 2022. **12**(10).
18. Sayed, A., M. Munir, and E.I. Bahbah, *Aortic Dissection: A Review of the Pathophysiology, Management and Prospective Advances*. Curr Cardiol Rev, 2021. **17**(4): p. e230421186875.
19. Nakashima, Y., *Pathogenesis of aortic dissection: elastic fiber abnormalities and aortic medial weakness*. Ann Vasc Dis, 2010. **3**(1): p. 28-36.
20. Mussa, F.F., et al., *Acute Aortic Dissection and Intramural Hematoma: A Systematic Review*. JAMA, 2016. **316**(7): p. 754-763.
21. Akutsu, K., *Etiology of aortic dissection*. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2019. **67**(3): p. 271-276.
22. Baumann, F., V. Makaloski, and N. Diehm, *Aortenaneurysma und -dissektion*. Der Internist, 2013. **54**(5): p. 535-542.

23. Olsson, C., et al., *Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002*. *Circulation*, 2006. **114**(24): p. 2611-8.
24. Landenhed, M., et al., *Risk profiles for aortic dissection and ruptured or surgically treated aneurysms: a prospective cohort study*. *J Am Heart Assoc*, 2015. **4**(1): p. e001513.
25. Howard, D.P., et al., *Population-based study of incidence and outcome of acute aortic dissection and premorbid risk factor control: 10-year results from the Oxford Vascular Study*. *Circulation*, 2013. **127**(20): p. 2031-7.
26. Jassar, A.S., R.Q. Attia, and E.M. Isselbacher, *Classification Systems of Acute Aortic Syndromes*, in *Aortic Dissection and Acute Aortic Syndromes*. 2021. p. 69-84.
27. Erbel, R., et al., *2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(41): p. 2873-926.
28. Gawinecka, J., F. Schönraht, and A. von Eckardstein, *Acute aortic dissection: pathogenesis, risk factors and diagnosis*. *Swiss Medical Weekly*, 2017. **147**(3334): p. w14489.
29. Zhou, Z., et al., *Risk Factors for Thoracic Aortic Dissection*. *Genes (Basel)*, 2022. **13**(10).
30. Pape, L.A., et al., *Presentation, Diagnosis, and Outcomes of Acute Aortic Dissection: 17-Year Trends From the International Registry of Acute Aortic Dissection*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **66**(4): p. 350-8.
31. Heistad, D.D., et al., *Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1981. **240**(5): p. H781-H787.
32. Nakashima, Y., Y. Shiokawa, and K. Sueishi, *Alterations of elastic architecture in human aortic dissecting aneurysm*. *Lab Invest*, 1990. **62**(6): p. 751-60.
33. Kageyama, N., et al., *The histopathologic study of elastic lamina and interconnecting elastic fiber in aortic media: implications for aortic dissection*. *J Jpn Coll Angiol*, 2005. **45**: p. 1003-9.
34. Angouras, D., et al., *Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2000. **17**(4): p. 468-73.
35. Pitcher, A., et al., *Aortic dissection: visualisation of aortic blood flow and quantification of wall shear stress using time-resolved, 3D phase-contrast MRI*. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 2011. **13**(1): p. P392.
36. Vasava, P., et al., *Finite Element Modelling of Pulsatile Blood Flow in Idealized Model of Human Aortic Arch: Study of Hypotension and Hypertension*. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012. **2012**(1): p. 861837.
37. Lacombe, J. and F. Zenhausern, *Effect of mechanical forces on cellular response to radiation*. *Radiotherapy and Oncology*, 2022. **176**: p. 187-198.
38. Reneman, R.S. and A.P. Hoeks, *Wall shear stress as measured in vivo: consequences for the design of the arterial system*. *Med Biol Eng Comput*, 2008. **46**(5): p. 499-507.
39. Lantz, J., J. Renner, and M. Karlsson, *WALL SHEAR STRESS IN A SUBJECT SPECIFIC HUMAN AORTA - INFLUENCE OF FLUID-STRUCTURE INTERACTION*. *International Journal of Applied Mechanics*, 2011. **3**: p. 759-778.
40. Camasao, D.B. and D. Mantovani, *The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review*. *Mater Today Bio*, 2021. **10**: p. 100106.
41. Aitken, C., et al., *Mechanisms of endothelial flow sensing*. *Nature Cardiovascular Research*, 2023. **2**(6): p. 517-529.

42. Yang, Y., et al., *Smoking Cessation and Mortality from Aortic Dissection and Aneurysm: Findings from the Japan Collaborative Cohort (JACC) Study*. *J Atheroscler Thromb*, 2023. **30**(4): p. 348-363.
43. Wagenhäuser, M.U., et al., *Chronic Nicotine Exposure Induces Murine Aortic Remodeling and Stiffness Segmentation-Implications for Abdominal Aortic Aneurysm Susceptibility*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 1459.
44. Peng, S., et al., *Role of aggregated medin in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm and dissection*. *Lab Invest*, 2007. **87**(12): p. 1195-205.
45. Ho, E., et al., *Nicotine Affects Murine Aortic Stiffness and Fatigue Response During Supraphysiological Cycling*. *J Biomech Eng*, 2022. **144**(1).
46. Fu, X., et al., *Nicotine: Regulatory roles and mechanisms in atherosclerosis progression*. *Food and Chemical Toxicology*, 2021. **151**: p. 112154.
47. Krüger, T., et al., *Acute aortic dissection type A*. *Br J Surg*, 2012. **99**(10): p. 1331-44.
48. Evans, C.E., M.L. Iruela-Arispe, and Y.Y. Zhao, *Mechanisms of Endothelial Regeneration and Vascular Repair and Their Application to Regenerative Medicine*. *Am J Pathol*, 2021. **191**(1): p. 52-65.
49. Zeiher, A.M., *Endotheliale Dysfunktion: Mechanismen und prognostische Bedeutung für die Koronare Herzkrankheit*, in *Pentaerithryltetranitrat: Endotheliale Dysfunktion — NO-Substitution als evidenzbasiertes Therapieprinzip*, E. Mutschler, A.M. Zeiher, and D. Stalleicken, Editors. 2004, Steinkopff: Heidelberg. p. 1-28.
50. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. *Circulation*, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
51. Gotlieb, A.I., *The endothelial cytoskeleton: organization in normal and regenerating endothelium*. *Toxicol Pathol*, 1990. **18**(4 Pt 1): p. 603-17.
52. Prasain, N. and T. Stevens, *The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes*. *Microvasc Res*, 2009. **77**(1): p. 53-63.
53. Graeve, L. and M. Müller, *Cytoskelett*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, et al., Editors. 2022, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 229-237.
54. *Zellstrukturen und interzelluläre Matrix; allgemeine Zytologie*, in *Kompendium Vorklinik - GK1*, J. Prieue and D. Tümmers, Editors. 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 794-805.
55. Shakhov, A.S. and I.B. Alieva, *The "Third Violin" in the Cytoskeleton Orchestra-The Role of Intermediate Filaments in the Endothelial Cell's Life*. *Biomedicines*, 2022. **10**(4).
56. Schnittler, H.J., T. Schmandra, and D. Drenckhahn, *Correlation of endothelial vimentin content with hemodynamic parameters*. *Histochem Cell Biol*, 1998. **110**(2): p. 161-7.
57. Butler, P.J., *Mechanotransduction of Shear Stress by the Endothelium*, in *Vascular Engineering: New Prospects of Vascular Medicine and Biology with a Multidiscipline Approach*, K. Tanishita and K. Yamamoto, Editors. 2016, Springer Japan: Tokyo. p. 159-197.
58. Garcia, M.A., W.J. Nelson, and N. Chavez, *Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. **10**(4).
59. Christen, P., R. Jaussi, and R. Benoit, *Zelladhäsion, Zellkontakte und extrazelluläre Matrix*, in *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*, P. Christen, R. Jaussi, and R. Benoit, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 315-322.
60. Wallez, Y. and P. Huber, *Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 794-809.
61. Goodenough, D.A. and D.L. Paul, *Gap junctions*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(1): p. a002576.

62. Goodenough, D.A., J.A. Goliger, and D.L. Paul, *Connexins, connexons, and intercellular communication*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 475-502.
63. Gabriels, J.E. and D.L. Paul, *Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed*. Circ Res, 1998. **83**(6): p. 636-43.
64. Figueroa, X.F., et al., *Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo*. Circ Res, 2003. **92**(7): p. 793-800.
65. Liao, Y., et al., *Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9989-94.
66. Theis, M., et al., *Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene*. Genesis, 2001. **29**(1): p. 1-13.
67. Cong, X. and W. Kong, *Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease*. Cell Signal, 2020. **66**: p. 109485.
68. Schneeberger, E.E., *Structure of intercellular junctions in different segments of the intrapulmonary vasculature*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **384**: p. 54-63.
69. González-Mariscal, L., R. Tapia, and D. Chamorro, *Crosstalk of tight junction components with signaling pathways*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2008. **1778**(3): p. 729-756.
70. Cervero, P., et al., *Nectin stabilization at adherens junctions is counteracted by Rab5a-dependent endocytosis*. European Journal of Cell Biology, 2021. **100**(7): p. 151184.
71. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
72. Gloushankova, N.A., S.N. Rubtsova, and I.Y. Zhitnyak, *Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells*. Tissue Barriers, 2017. **5**(3): p. e1356900.
73. Maitre, J.L. and C.P. Heisenberg, *Three functions of cadherins in cell adhesion*. Curr Biol, 2013. **23**(14): p. R626-33.
74. Gavard, J., *Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship*. Cell Adh Migr, 2014. **8**(2): p. 158-64.
75. Vincent, P.A., et al., *VE-cadherin: adhesion at arm's length*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2004. **286**(5): p. C987-C997.
76. Barry, A.K., N. Wang, and D.E. Leckband, *Local VE-cadherin mechanotransduction triggers long-ranged remodeling of endothelial monolayers*. J Cell Sci, 2015. **128**(7): p. 1341-51.
77. Vestweber, D., *VE-Cadherin*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(2): p. 223-232.
78. Wallez, Y., I. Vilgrain, and P. Huber, *Angiogenesis: the VE-cadherin switch*. Trends Cardiovasc Med, 2006. **16**(2): p. 55-9.
79. Miyazaki, T., et al., *m-Calpain Induction in Vascular Endothelial Cells on Human and Mouse Atheromas and Its Roles in VE-Cadherin Disorganization and Atherosclerosis*. Circulation, 2011. **124**(23): p. 2522-2532.
80. Takai, Y., et al., *Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization*. Cancer Sci, 2003. **94**(8): p. 655-67.
81. Kanzaki, N., et al., *Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 12): p. 2008-17.
82. Hermans, D., et al., *Nectins and Nectin-like molecules drive vascular development and barrier function*. Angiogenesis, 2023. **26**(3): p. 349-362.
83. Aman, J. and C. Margadant, *Integrin-Dependent Cell-Matrix Adhesion in Endothelial Health and Disease*. Circ Res, 2023. **132**(3): p. 355-378.
84. Srichai, M.B. and R. Zent, *Integrin Structure and Function*, in *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, R. Zent and A. Pozzi, Editors. 2010, Springer New York: New York, NY. p. 19-41.

85. Menter, D.G. and R.N. Dubois, *Prostaglandins in cancer cell adhesion, migration, and invasion*. *Int J Cell Biol*, 2012. **2012**: p. 723419.
86. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 422-33.
87. Guilak, F., A.J. Hayes, and J. Melrose, *Perlecan in Pericellular Mechanosensory Cell-Matrix Communication, Extracellular Matrix Stabilisation and Mechanoregulation of Load-Bearing Connective Tissues*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(5).
88. Aumailley, M., et al., *Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV*. *Eur J Biochem*, 1989. **184**(1): p. 241-8.
89. Lu, F., et al., *Mechanism of integrin activation by talin and its cooperation with kindlin*. *Nature Communications*, 2022. **13**(1): p. 2362.
90. Pulous, F.E. and B.G. Petrich, *Integrin-dependent regulation of the endothelial barrier*. *Tissue Barriers*, 2019. **7**(4): p. 1685844.
91. Ginsberg, M.H., *Integrin activation*. *BMB Rep*, 2014. **47**(12): p. 655-9.
92. Atherton, P., et al., *Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin*. *Exp Cell Res*, 2016. **343**(1): p. 21-27.
93. [cited 2023 12.07.2023]; Available from: <https://ibidi.com/channel-slides/50--slide-i-luer.html>.
94. Ewels, P., et al., *MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report*. *Bioinformatics*, 2016. **32**(19): p. 3047-8.
95. Andrews, S. *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. 2010; Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
96. Dobin, A., et al., *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. *Bioinformatics*, 2013. **29**(1): p. 15-21.
97. Nassar, L.R., et al., *The UCSC Genome Browser database: 2023 update*. *Nucleic Acids Res*, 2023. **51**(D1): p. D1188-d1195.
98. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(7): p. 923-30.
99. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. **15**(12): p. 550.
100. Warde-Farley, D., et al., *The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(Web Server issue): p. W214-20.
101. Liberzon, A., et al., *Molecular signatures database (MSigDB) 3.0*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(12): p. 1739-40.
102. Oliveiros, J.C. *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. (2007-2015); Available from: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
103. Mahase, E., *Half of patients with acute aortic dissection in England die before reaching a specialist centre*. *BMJ*, 2020. **368**: p. m304.
104. Conzelmann, L.O., et al., *Mortality in patients with acute aortic dissection type A: analysis of pre- and intraoperative risk factors from the German Registry for Acute Aortic Dissection Type A (GERAADA)*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2016. **49**(2): p. e44-52.
105. Naik, P., et al., *Oxidative and pro-inflammatory impact of regular and denicotinized cigarettes on blood brain barrier endothelial cells: is smoking reduced or nicotine-free products really safe?* *BMC Neuroscience*, 2014. **15**(1): p. 51.
106. Qin, W., et al., *Endothelial to mesenchymal transition contributes to nicotine-induced atherosclerosis*. *Theranostics*, 2020. **10**(12): p. 5276-5289.
107. Majid, S., et al., *Pod-based e-liquids impair human vascular endothelial cell function*. *PLoS One*, 2023. **18**(1): p. e0280674.
108. Lei, Y., et al., *Oxidative stress impact on barrier function of porcine angular aqueous plexus cell monolayers*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013. **54**(7): p. 4827-35.

109. Tang, N.N., et al., *HIF-1 $\alpha$  induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(47): p. 17894-904.
110. Roberto, C., et al., *Effects of Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function*, in *Smoking Prevention and Cessation*, R. Mirjana, Editor. 2018, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 2.
111. Guo, L., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human non-small cell lung cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(6): p. 852-61.
112. Song, J., et al., *Endothelial Basement Membrane Laminin 511 Contributes to Endothelial Junctional Tightness and Thereby Inhibits Leukocyte Transmigration*. Cell Rep, 2017. **18**(5): p. 1256-1269.
113. Di Russo, J., et al., *Endothelial basement membrane laminin 511 is essential for shear stress response*. Embo j, 2017. **36**(2): p. 183-201.
114. Weber, G.F., M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone, *Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(8): p. 1183-1193.
115. Yamamoto, H., et al., *Integrin beta1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6429.
116. Pulous, F.E., et al., *Talin-Dependent Integrin Activation Regulates VE-Cadherin Localization and Endothelial Cell Barrier Function*. Circulation Research, 2019. **124**(6): p. 891-903.
117. Hakanpaa, L., et al., *Endothelial destabilization by angiotensin-2 via integrin  $\beta$ 1 activation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 5962.
118. Zhou, Q., et al., *Angiotensin II Induces Vascular Endothelial Dysfunction by Promoting Lipid Peroxidation-Mediated Ferroptosis via CD36*. Biomolecules, 2024. **14**(11).
119. Liu, L., et al., *Angiotensin II inhibits the protein expression of ZO-1 in vascular endothelial cells by downregulating VE-cadherin*. Mol Med Rep, 2018. **18**(1): p. 429-434.
120. Li, S., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial integrin beta3 expression via nuclear factor-kappaB activation*. Exp Aging Res, 2006. **32**(1): p. 47-60.
121. Stawowy, P., et al., *Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 50-9.
122. Miao, H., et al., *Effects of flow patterns on the localization and expression of VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: in vivo and in vitro investigations*. J Vasc Res, 2005. **42**(1): p. 77-89.
123. Urbich, C., et al., *Laminar Shear Stress Upregulates Integrin Expression*. Circulation Research, 2000. **87**(8): p. 683-689.
124. Conway, D.E., et al., *VE-Cadherin Phosphorylation Regulates Endothelial Fluid Shear Stress Responses through the Polarity Protein LGN*. Curr Biol, 2017. **27**(14): p. 2219-2225.e5.
125. Tzima, E., et al., *A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 426-31.
126. Chatterjee, S., *Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 524.
127. Guha, P., et al., *Nicotine promotes apoptosis resistance of breast cancer cells and enrichment of side population cells with cancer stem cell-like properties via a signaling cascade involving galectin-3,  $\alpha$ 9 nicotinic acetylcholine receptor and STAT3*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **145**(1): p. 5-22.
128. Sharma, J.R., A. Dubey, and U.C.S. Yadav, *Cigarette smoke-induced galectin-3 as a diagnostic biomarker and therapeutic target in lung tissue remodeling*. Life Sci, 2024. **339**: p. 122433.

129. Barondes, S.H., et al., *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(33): p. 20807-20810.
130. Griffioen, A.W. and V.L. Thijssen, *Galectins in tumor angiogenesis*. Annals of translational medicine, 2014. **2**(9).
131. Thijssen, V.L., S. Hulsmans, and A.W. Griffioen, *The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells*. Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 545-53.
132. Zhu, R., et al., *Serum Galectin-9 Levels Are Associated with Coronary Artery Disease in Chinese Individuals*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 457167.
133. He, X.-W., et al., *Serum levels of galectin-1, galectin-3, and galectin-9 are associated with large artery atherosclerotic stroke*. Scientific Reports, 2017. **7**(1).
134. Kremers, B.M.M., et al., *Discovery of four plasmatic biomarkers potentially predicting cardiovascular outcome in peripheral artery disease*. Scientific Reports, 2022. **12**(1).
135. Arar, C., et al., *Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells*. FEBS Lett, 1998. **430**(3): p. 307-11.
136. Colin Hughes, R., *Galectins as modulators of cell adhesion*. Biochimie, 2001. **83**(7): p. 667-676.
137. Le Marer, N. and R.C. Hughes, *Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells*. J Cell Physiol, 1996. **168**(1): p. 51-8.
138. Friedrichs, J., et al., *Contributions of Galectin-3 and -9 to Epithelial Cell Adhesion Analyzed by Single Cell Force Spectroscopy* <sup>\*</sup>. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(40): p. 29375-29383.
139. Margadant, C., et al., *Epigenetic regulation of galectin-3 expression by  $\beta$ 1 integrins promotes cell adhesion and migration*. J Biol Chem, 2012. **287**(53): p. 44684-93.
140. Mourad-Zeidan, A.A., et al., *Expression Profiling of Galectin-3-Depleted Melanoma Cells Reveals its Major Role in Melanoma Cell Plasticity and Vasculogenic Mimicry*. The American Journal of Pathology, 2008. **173**(6): p. 1839-1852.
141. Pankov, R. and K.M. Yamada, *Fibronectin at a glance*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 20): p. 3861-3.
142. Ahrens, I., et al., *Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23210.
143. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
144. Mehta, D. and A.B. Malik, *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 279-367.
145. Oas, R.G., et al., *p120-catenin and beta-catenin differentially regulate cadherin adhesive function*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(6): p. 704-14.
146. Tian, L., et al., *Galectin-3-induced oxidized low-density lipoprotein promotes the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells*. Mol Med Rep, 2015. **12**(4): p. 4995-5002.
147. Singh, V., et al., *ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders*. Clinica Chimica Acta, 2023. **548**: p. 117487.
148. Cybulsky, M.I., et al., *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis*. J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1255-62.
149. Kimura, K., et al., *Novel Aortic Dissection Model Links Endothelial Dysfunction and Immune Infiltration*. Circ Res, 2025. **137**(1): p. 26-42.
150. Luo, F., et al., *Inflammatory response is associated with aortic dissection*. Ageing Res Rev, 2009. **8**(1): p. 31-5.
151. Chen, X., et al., *Galectin-3 exacerbates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing inflammation via integrin  $\beta$ 1-RhoA-JNK signaling activation*. J Cell Physiol, 2019. **234**(7): p. 10990-11000.

152. Kose, T., A. Antal, and T. Gunel, *Expression of MMP2, MMP9, TIMP2 and TIMP3 genes in aortic dissection*. *Exp Ther Med*, 2024. **28**(3): p. 360.
153. Zhou, S., B. Ma, and M. Luo, *Matrix metalloproteinases in aortic dissection*. *Vascul Pharmacol*, 2024. **156**: p. 107420.
154. Wang, B., et al., *Enhanced matrix metalloproteinases-2 activates aortic endothelial hypermeability, apoptosis and vascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014. **57**(4): p. 325-38.
155. Mulorz, J., et al. *Ethanol Enhances Endothelial Rigidity by Targeting VE-Cadherin— Implications for Acute Aortic Dissection*. *Journal of Clinical Medicine*, 2023. **12**, DOI: 10.3390/jcm12154967.
156. Wu, X., et al., *Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(2): p. 171.
157. Miyao, M., et al., *Involvement of Senescence and Mitochondrial Fission in Endothelial Cell Pro-Inflammatory Phenotype Induced by Angiotensin II*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(9): p. 3112.
158. Gallo, G., M. Volpe, and C. Savoia, *Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications*. *Front Med (Lausanne)*, 2021. **8**: p. 798958.
159. Fyhrquist, F., K. Metsärinne, and I. Tikkanen, *Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders*. *J Hum Hypertens*, 1995. **9 Suppl 5**: p. S19-24.
160. Catt, K.J., et al., *Angiotensin II blood-levels in human hypertension*. *Lancet*, 1971. **1**(7697): p. 459-64.
161. Russo, T.A., et al., *Altered shear stress on endothelial cells leads to remodeling of extracellular matrix and induction of angiogenesis*. *PLoS One*, 2020. **15**(11): p. e0241040.
162. Potter, C.M.F., et al., *Role of Shear Stress in Endothelial Cell Morphology and Expression of Cyclooxygenase Isoforms*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011. **31**(2): p. 384-391.
163. Lee, J.H., et al., *Molecular mechanisms of methylglyoxal-induced aortic endothelial dysfunction in human vascular endothelial cells*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(5): p. 403.
164. Dubourg, V., et al., *EGFR activation differentially affects the inflammatory profiles of female human aortic and coronary artery endothelial cells*. *Sci Rep*, 2023. **13**(1): p. 22827.
165. Ching, T., S. Huang, and L.X. Garmire, *Power analysis and sample size estimation for RNA-Seq differential expression*. *Rna*, 2014. **20**(11): p. 1684-96.
166. Christensen, K.D., et al., *Assessing the Costs and Cost-Effectiveness of Genomic Sequencing*. *J Pers Med*, 2015. **5**(4): p. 470-86.
167. Afolabi, H.A., et al., *Molecular characterization of colorectal cancer (CRC) using next generation sequencing (NGS) in bridging the gap between research and clinical practice: from biomarker discovery to clinical implementation*. *Discov Oncol*, 2025. **16**(1): p. 268.

## **6. Anhang**

### **6.1 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Anatomische Einteilung der Aorta.....	1
Abb. 2: Histologischer Aufbau der Aorta.....	2
Abb. 3: Aortendissektion (AD) verursacht durch eine Separation der Gefäßwand.....	4
Abb. 4: Schematische Darstellung des Scherstress in Blutgefäßen.....	6
Abb. 5: Komponenten der endothelialen Stabilität.....	8
Abb. 6: Schematische Darstellung der Zell-Zell Verbindungen.....	9
Abb. 7: Vereinfachte schematische Darstellung endothelialer Adherens Junctions.....	11
Abb. 8: Vereinfachte schematische Darstellung der Integrin vermittelten Zell-Matrix Verbindung.....	13
Abb. 9: Schematische Darstellung des Behandlungsregimen.....	22
Abb. 10: Schematische Darstellung von flusskultivierten HAoEC in $\mu$ -Slides.....	23
Abb. 11: Beispielhafte Darstellung der Ermittlung des durchschnittlichen Grauwerts für Ve-Cadherin und Integrin $\beta$ 1.....	25
Abb. 12: Beispielhafte Darstellung der Ermittlung der Anzahl der Zellkerne.....	26
Abb. 13: Genexpressionslevel von Zell-Zell Proteinen in HAoEC auf unterschiedlich Beschichtungen.....	33
Abb. 14: Genexpressionslevel von Zell-Matrix Proteinen in HAoECs auf unterschiedlich Beschichtungen.....	34
Abb. 15: Darstellung des Zellrasens unter Flussbedingungen.....	35
Abb. 16: Proteinexpressionslevel von Ve-Cadherin und Integrin $\beta$ 1 von flusskultivierten HAoECs auf Kollagen.....	37
Abb. 17: Proteinexpressionslevel von Ve-Cadherin und Integrin $\beta$ 1 von flusskultivierten HAoECs auf Laminin.....	38
Abb. 18: MultiQC Bericht zur Probenqualität 1/2.....	39
Abb. 19: MultiQC Bericht zur Probenqualität 2/2.....	40
Abb. 20: Probenvarianz in der Genexpression.....	41
Abb. 21: Differentielle Genexpressionsanalyse: Versuchsgruppen vs. Kontrolle.....	42
Abb. 22: Genexpressionslevel von Galektinen in HAoECs auf Laminin und Kollagen.....	43
Abb. 23: Interaktionsgene von LGALS9, LGALS3BP und LGALS3 mit Fokus auf Zelladhäsion.....	44
Abb. 24: Vereinfachte Darstellung eines potentiellen Pathomechanismus der Entstehung von Intimaeinrissen.....	54

### **6.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Antikörper für die immunzytochemischen Färbungen.....	26
Tabelle 2: Komponenten des Mastermix für die cDNA-Synthese.....	28
Tabelle 3: Cycler Programm für die cDNA-Synthese.....	28
Tabelle 4: Komponenten des Mastermix für die qRT-PCR.....	29
Tabelle 5: Cycler Programm für die qRT-PCR.....	29
Tabelle 6: Primerliste für die qRT-PCR.....	30
Tabelle 7: Top 5 Gene der differentiellen Genexpressionsanalyse.....	42
Tabelle 8: Interaktionsgene von LGALS9, LGALS3BP und LGALS3 im Zelladhäsion Genset.....	45

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Markus Udo Wagenhäuser meinen herzlichen Dank für die Überlassung des Themas und seine engagierte Betreuung als Doktorvater aussprechen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Joscha Mulorz herzlich für die Übernahme der Co-Betreuung.

Ich bin zutiefst dankbar von diesen beiden inspirierenden Persönlichkeiten an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt worden zu sein. Die Kommunikation mit Ihnen war einmalig. Ihre Erfahrung und Unterstützung waren von unschätzbarem Wert und trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Dank Ihrer großzügigen Förderung durfte ich immer wieder Neues kennenlernen und wurde Stück für Stück vorangebracht. Ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten hat in mir viel Motivation und Begeisterung für die Forschung entfachen können. Sie haben maßgeblich dazu beigetragen, dass alle Erwartungen an die Promotionszeit übertroffen wurden.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig, der mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie durchzuführen. Seine wertvolle Unterstützung ermöglichte mir einen Forschungsbesuch an der *University of Surrey* (England) wahrzunehmen und dort viele großartige Eindrücke und Erfahrungen zu sammeln. Dafür bin ich sehr dankbar.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. med. Jan-Philipp Minol für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing möchte ich besonders für die hervorragende Betreuung im Labor danken. Durch Sie habe ich die Grundlagen der Laborarbeit vermittelt bekommen. Täglich konnte ich auf Ihre Ratschläge und Hilfestellungen zählen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihre freundliche und besonnene Art machte Sie für jegliche Themen zu einer großartigen Gesprächspartnerin.

Mein Dank gilt auch Frau Astrid Hoffmann, die mich zu jeder Zeit im Labor unterstützte und mich stets durch interessante Gespräche von manch zäher Arbeit im Labor ablenkte.

Auch danke ich allen anderen Studierenden, die ich während meiner Promotionszeit kennenlernen durfte. Ich habe den fröhlichen und unterstützenden Umgang miteinander sehr geschätzt.

Meiner Mutter Theda, meinem Vater Hans-Jörg und meinen beiden Schwestern Janne und Jette möchte ich für Ihre grenzenlose Unterstützung danken. Der Rückhalt, den ich von meiner Familie erfahre, ist immer der Grundstein für das Erreichen meiner Ziele.