

Aus dem Institut für Pharmakologie und dem  
Center for Cardiovascular Research (CCR)  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Angiotensin AT2 receptor agonist, compound 21,  
prevents extracellular matrix degradation, maintains  
vascular integrity and prevents abdominal aortic  
aneurysm progression in the rat**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Lange

aus Potsdam

Datum der Promotion: 13. 12. 2019

## Inhaltsverzeichnis

<i>Kurzzusammenfassung</i>	3
<i>Abstract</i>	4
<i>Manteltext</i>	5
<i>Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation</i>	26
<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	27
<i>Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)</i>	28
<i>Publikation</i>	29
<i>Lebenslauf</i>	39
<i>Komplette Publikationsliste</i>	41
<i>Danksagung</i>	42

## Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Ang II	Angiotensin II
AT1R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT2R	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MLKL	Mixed Lineage Kinase domain-like
MMP	Matrixmetalloprotease
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO/cGMP	Stickstoffmonoxid/cyclisches Guanosinmonophosphat
p53	Tumorsuppressorprotein p53
RIP-1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
SLUG	Zinkfingerprotein SNAI2
Snai1	Zinkfingerprotein SNAI1
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
vSMC	glatte Gefäßmuskelzellen

## Kurzzusammenfassung

Wir untersuchten die Auswirkungen der Angiotensin II Typ 2 Rezeptor (AT2R) Stimulation auf die Entstehung des abdominellen Aortenaneurysmas (AAA) an männlichen, normotensiven Wistar-Ratten. AAA wurden durch intraaortale Elastase-Instillation (AI) in ein isoliertes infrarenales Segment induziert (Anidjar/Dobrin-Modell). Die Behandlung mit dem direkten AT2R-Agonisten Compound 21 (C21) wurde postoperativ gestartet (0,03mg/kg/Tag i.p.), für 14 Tage fortgeführt und parallel eine Sham- und eine Vehicle-Gruppe beobachtet. Sonographisch wurden präoperativ, an Tag 7 und Tag 14 der aortale Durchmesser, die Pulse Propagation Velocity, die Dehnbarkeit und Flussgeschwindigkeiten an vier definierten Landmarken gemessen. Ebenso wurde der Blutdruck mittels Tailcuff erhoben und an Tag 14 durch eine intrakardiale Samba-Katheter-Messung komplettiert. Die Auswirkungen von C21 auf die Proteinexpression von MMP-9, IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, Snai1/SLUG und MLKL wurden im aortalen Gewebe immunhistochemisch und mittels Western-Blot-Analyse analysiert und die Konzentrationen von IL-6, MCP-1 and TGF- $\beta$  im Serum gemessen.

An Tag 14 war der infrarenale aortale Durchmesser der Vehicle-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe 1,6-fach erhöht ( $2,65 \pm 0,05\text{mm}$  vs.  $1,70 \pm 0,06\text{mm}$ ;  $p < 0,0001$ ). C21 zeigte eine signifikante Reduktion des Durchmessers um 20% am 7. Tag und um 28% an Tag 14 post AI im Vergleich zur Vehicle-Gruppe ( $1,9 \pm 0,06\text{mm}$  vs.  $2,65 \pm 0,05\text{mm}$ ;  $p < 0,0001$ ). Die infrarenale Flussgeschwindigkeit ( $p < 0,0001$ ) und die aortale Dehnbarkeit ( $p < 0,0001$ ) waren nach AI vermindert, die Gefäßsteifigkeit ( $p < 0,05$ ) erhöht. Dies wurde signifikant durch die C21-Behandlung abgemildert. Blutdruck und kardiale Kontraktilität wurden weder in der Vehicle-Gruppe noch durch C21 verändert. Morphologisch zeigte sich durch die Behandlung mit C21 eine Reduktion der Fragmentation elastischer Lamellae und die Anzahl inflammatorischer Infiltrate in der Adventitia. Im Vergleich zur Vehicle-Gruppe war die Expression von IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, MMP-9, TGF- $\beta$ 1 und MLKL durch C21 im aortalen Gewebe signifikant herabreguliert und die von SLUG erhöht. AT2R waren in der Adventitia in der Nähe von CD4+ Zellen lokalisiert. Die Erhöhung der TGF- $\beta$ 1-Serum-Konzentration in der Vehicle-Gruppe wurde durch C21 signifikant limitiert ( $p < 0,01$ ).

Die AT2R-Stimulation mit C21 verhinderte die Degradation extrazellulärer Matrix durch Antiinflammation, bewahrte hämodynamische Parameter und die aortale Integrität durch Schutz der Wandarchitektur und wendete die Ausdehnung des AAA ab.

## Abstract

The effects of angiotensin II Type 2 receptor (AT2R) stimulation on abdominal aortic aneurysm (AAA) formation were investigated in male normotensive Wistar rats. AAA was induced by perfusion of isolated aortic segments with elastase (Anidjar/Dobrin model). Treatment with direct AT2 R agonist Compound 21 (C21) (0,03mg/kg i.p. daily) was started after operation and continued for 14 days. Sham operated and vehicle-treated animals after aneurysm induction (AI) served as controls. Aortic diameters, pulse propagation velocity, aortic wall distensibility and blood velocities were measured at four abdominal aortic landmarks before AI and on days 7 and 14 after AI via ultrasound biomicroscopy. Blood pressure was measured in conscious animals via tail-cuff method. Hemodynamic parameters were assessed by intracardiac Samba catheter on day 14. Additionally, the effect of C21 on aortic expression of MMP-9, IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, Snai1/SLUG and MLKL was studied via immunohistochemistry and western blot analysis. Serum analysis of cytokines IL-6, MCP-1 and TGF- $\beta$  was performed.

On day 14 post AI infrarenal aortic diameter of vehicle-treated animals was increased 1,6-fold compared to sham operated rats ( $2,65 \pm 0,05\text{mm}$  vs.  $1,70 \pm 0,06\text{mm}$ ;  $p < 0,0001$ ). C21 significantly decreased aortic diameter by 20% on day 7 ( $1,9 \pm 0,09$  versus  $2,48 \pm 0,06$  mm;  $P < 0,0001$ ) and by 28% on day 14 post AI as compared to vehicle-treated animals ( $1,9 \pm 0,06\text{mm}$  vs.  $2,65 \pm 0,05\text{mm}$ ;  $p < 0,0001$ ). Infrarenal blood velocity and aortic distensibility were reduced, whereas aortic wall stiffness was increased after AI. These alterations were significantly ameliorated by treatment with C21. Blood pressure and cardiac contractility were not altered. Serum concentration of TGF- $\beta$ 1 was decreased by C21 in comparison to vehicle-group ( $p < 0,01$ ). Morphologically, C21 treatment decreased fragmentation of elastic lamellae and the number of inflammatory infiltrates in the adventitia. Protein expression of IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, MMP-9, TGF- $\beta$ 1 and MLKL in the aorta was significantly down-regulated in the C21 group compared with vehicle, while the expression of SLUG was raised. Immunohistochemically, AT2R were co-localized with CD4+ cells in the adventitia. In serum the higher TGF- $\beta$ 1 concentration of vehicle-group was significantly reduced by C21 ( $p < 0,01$ ).

AT2R stimulation with C21 prevented extracellular matrix degradation via antiinflammation, maintained hemodynamics and aortic integrity by protection of mural architecture and prevented AAA progression.

# 1. Einleitung

## 1.1. Das abdominelle Aortenaneurysma

Das abdominelle Aortenaneurysma (AAA) ist eine lokale, expandierende Erweiterung aller Wandschichten der Bauchaorta um mindestens 50%.<sup>1</sup> Pathologische Prozesse destabilisieren die murale Architektur und dünnen diese aus, sodass durch intraaortale Druckbelastungen Dissektionen oder Rupturen resultieren. Die hohe Zahl der Todesfälle (Todesursachenstatistik: weltweit Platz 13) kann zum einen mit der Symptomarmut und zum anderen mit der bis zu 80%igen Mortalität im Falle einer Ruptur erklärt werden.<sup>2</sup> Das jährliche Rupturrisiko eines AAA mit einem Durchmesser  $\leq 3,9$  cm beträgt 0,3%, steigt aber bereits auf 6,5% für AAA 5–5,9 cm.<sup>3</sup> Mit höherem Alter steigt auch die Prävalenz des AAA, insgesamt beträgt sie 4,8%.<sup>4,5</sup>

### 1.1.2. Pathogenese

Neben Risikofaktoren wie Alter und männlichem Geschlecht erhöhen Tabakkonsum, arterielle Hypertonie und genetische Disposition das Risiko ein AAA zu entwickeln.<sup>2,5,6</sup> Sowohl im Einfluss der einzelnen Risikofaktoren als auch in der Pathogenese unterscheiden sich thorakale von abdominellen Aneurysmata. Pathognomonisch für AAA ist eine Degradation von extrazellulärer Matrix (EZM) durch Matrixmetalloproteasen (MMP) gefolgt von insuffizienten Reparaturmechanismen. Diese Proteolyse führt durch Elastin-Abbau und Kollagen-Akkumulation zu einer zystischen *Tunica media*-Degeneration.<sup>6</sup> Die Schlüsselrolle von Proteolyse und EZM zeigt sich in der Assoziation von genetischen Bindegewebserkrankungen wie dem Marfan- und dem Ehlers-Danlos-Syndrom mit Aneurysmaentstehung.<sup>1,7</sup> Basierend auf einem gestörten Equilibrium der Gegenspieler TIMP-1 und MMP, vorrangig MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-2 (Gelatinase A), vermindern diese Umbauvorgänge die Zugfestigkeit der aortalen Wand und erhöhen zugleich die Steifigkeit und die Wahrscheinlichkeit einer Ruptur.<sup>8-11</sup>

EZM-Abbauprodukte wie Elastinfasern triggern weitere Eckpfeiler der AAA-Entstehung: Inflammation und begleitende oxidative Effekte.<sup>12</sup> Mit wachsendem aortalen Durchmesser steigt auch die Anzahl inflammatorischer Zellen und die Sauerstoffradikal-Konzentration in der *Tunica adventitia*.<sup>1</sup> Durch die produzierten Zytokine, Chemokine und Immunglobuline etablieren die Zellen des angeborenen (Makrophagen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten) sowie des erworbenen (B- und T-Lymphozyten) Immunsystems ein Milieu, das die AAA-Entwicklung fördert.<sup>13</sup>

Während eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  anti-aneurysmatisch wirkt, zeigen Untersuchungen zu TGF- $\beta$  ambivalente Outcomes.<sup>14</sup> TGF- $\beta$  ist ein potenter Regulator der Endothelial-mesenchymalen Transition (EMT), einem Prozess, der durch Polarisationsverlust von zuvor ausdifferenzierten Endothelzellen zu einem migratorisch-sekretorischen Phänotyp der Zelle führen kann.<sup>15</sup> Im AAA zeigt sich eine Neovaskularisierung der *Tunica media* sowie ein dichteres Netz an *Vasa vasorum* in der Adventitia.<sup>16</sup> Während in TAA positive Effekte einer TGF- $\beta$ -Reduktion gezeigt wurden,<sup>7</sup> führt eine Neutralisation der TGF- $\beta$ -Aktivität im AAA zu sehr heterogenen Ergebnissen.<sup>7,17</sup>

Insgesamt bleibt die Pathogenese des AAA allerdings unvollständig verstanden und viele Aspekte bedürfen noch weiterer Untersuchung.

### 1.1.3. Therapie

Die Standardversorgung eines AAA erfolgt ab einem aortalen Durchmesser  $<5,5$  cm endovaskulär oder offen chirurgisch.<sup>3,4</sup> Die Möglichkeiten einer pharmakologischen Therapie sind limitiert. Gesichert scheint der Vorteil einer Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren inklusive anti-hypertensiver Therapie.<sup>18</sup> Unterschiedliches Potential zur Limitierung der AAA-Progression zeigten bisher Betablocker, Antibiotika und Statine.<sup>19, 20</sup> Während Betablocker tierexperimentell besonders im Hinblick auf die Inhibierung der MMP Effekte zeigten, macht die geringe Adhärenz (22-42%) aufgrund des Nebenwirkungsprofils diese zur suboptimalen Therapie.<sup>21</sup> Eine Langzeittherapie mit Makroliden oder Tetrazyklinen ist durch die Gefahr zunehmender bakterieller Resistenzen obsolet. Zurzeit stellen anti-atherosklerotische Therapien wie Tabakentwöhnung, eine Behandlung mit Statinen und eine Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems die vielversprechendsten Ansätze dar.<sup>18</sup> Durch ACE-Blockade und AT1R-Antagonisten konnte tierexperimentell eine Wachstumsbegrenzung unabhängig vom blutdrucksenkenden Effekt gezeigt werden.<sup>18, 22</sup> In umfangreichen humanen Analysen zeigte sich retrospektiv eine Reduktion der Ruptur-Rate durch ACE-Hemmer.<sup>23</sup> Der Einsatz von AT1R-Antagonisten bei AAA-Patienten ist Gegenstand aktueller klinischer Forschung.<sup>24</sup>

## 1.2. Das Renin-Angiotensin-System

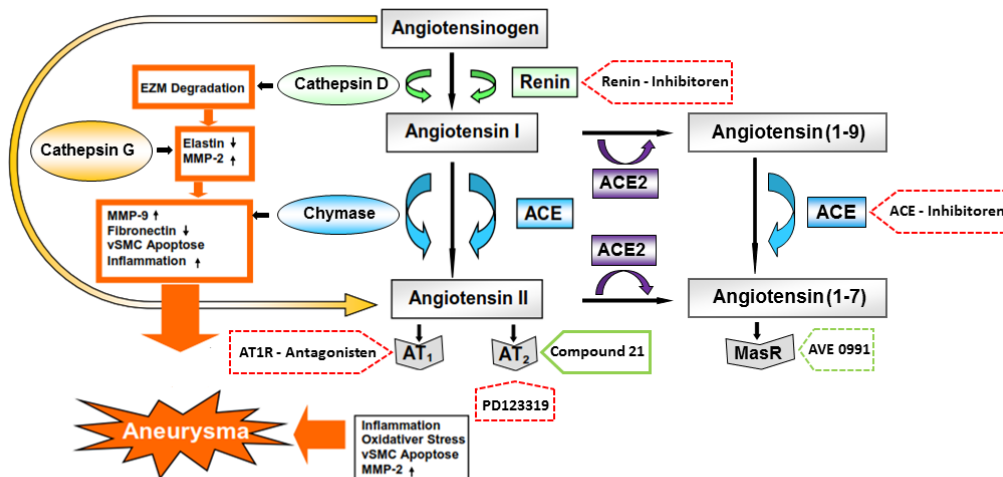
Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein Hormonsystem und zentraler Regulator des Blutdrucks sowie der Wasser- und Elektrolyt-Homöostase. Das zentrale Octapeptid Angiotensin II (Ang II) vermittelt seine Wirkungen über vier Rezeptorsubtypen.

Effekte wie Vasokonstriktion, Zellproliferation, Fibrose oder Inflammation sowie Steigerung der Noradrenalin-Freisetzung werden über den im adulten Organismus überwiegend exprimierten AT1R vermittelt.<sup>25</sup> (Abb. 1) Die medikamentöse Verhinderung der Konversion zu Ang II durch ACE-Hemmer oder eine AT1R-Blockade bewirkt eine Abmilderung dieser pathologischen Effekte.<sup>26</sup> Der AT2R ist durch regulatorische Effekte bei Embryogenese, Zelldifferenzierung, Apoptose und Wundheilung in den Fokus aktueller Forschung gerückt.<sup>25</sup> Besonders unter pathologischen Bedingungen wie beim AAA wird die Expression hochreguliert.<sup>27, 28</sup>

Jüngere Studien fokussieren zunehmend den sogenannten „Protective Arm of the Renin Angiotensin System“.<sup>25</sup> Hier konvertiert ACE2 das Vorgängerpeptid Angiotensin I alternativ zu Ang (1-9), welches durch ACE dann weiter zu Ang (1-7) gespalten wird. Ang (1-7) wirkt als endogener Ligand am Mas-Rezeptor, welcher sowohl funktionell mit dem AT2R verwandt ist, als auch mit diesem Dimere bildet.<sup>29</sup> Dieser Arm des RAS vermittelt ebenso Effekte wie Vasodilatation, Antiproliferation und Antiinflammation.<sup>25</sup> (Abb. 1)

### 1.2.1. Bedeutung für die Aneurysmaentstehung

Das RAS ist für die Pathophysiologie der vaskulären Inflammation, Proteolyse sowie für den Abbau der extrazellulären Matrix und der damit assoziierten Aneurysmagenese von erheblicher Bedeutung. (Abb. 1) Hierbei vermittelt Ang II über den AT1R hämodynamischen sowie oxidativen Stress und fördert Zytokinproduktion, Apoptose und Matrixproteindegradation via MMP Aktivierung.<sup>28</sup> (Abb. 1)



Modifiziert nach:  
Kaschina E, Steckelings UM, Unger T et al, Atherosclerosis, 2009

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Rolle der RAS-Komponenten während der Aneurysmaentstehung; ACE Angiotensin-Converting-Enzym, AT1 Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, AT2R Angiotensin II Typ 2 Rezeptor, MMP Matrixmetalloprotease, vSMC glatte Gefäßmuskelzelle

Die Bedeutung von Ang II für die AAA-Entstehung konnte in experimentellen Studien festgestellt werden - eine kontinuierliche Infusion löst sowohl TAA als auch AAA aus.<sup>28, 30, 31</sup> Im humanen AAA sind im Vergleich zu gesundem und atherosklerotischem Gewebe die Expressionen der wichtigsten Komponenten des RAS hochreguliert.<sup>28</sup> An vSMC vermittelt Ang II seine Wirkung hauptsächlich über den AT1R, während der AT2R vermehrt auf Endothelzellen exprimiert ist und die Expression von Immuzell-Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und VCAM-1 aber auch verschiedener Zytokine wie IL-6 reguliert.<sup>32</sup>

Tierexperimentell zeigte die Blockade des AT1R anti-inflammatorische und anti-oxidative Effekte sowie eine Reduktion von TGF- $\beta$ 1 und apoptotischer Faktoren, wie p53 und Fas-Ligand.<sup>22, 33</sup> An primären vSMC konnte der AT1R-Antagonist Telmisartan die durch Ang II gesteigerte Sekretion von MMP-9 und MMP-2 herabregulieren.<sup>34</sup> Während bei genetisch modifizierten Tieren ambivalente Effekte des AT2R auf das AAA festzustellen sind, liegen für die AT2R-Stimulation genetisch nicht veränderter AAA-Tiere bisher keine Untersuchungen vor.<sup>35, 36</sup>



### 1.2.2. Der Angiotensin II Typ 2 Rezeptor

Ang II löst über den AT2R vasodilatorische,<sup>37</sup> anti-fibrotische,<sup>38</sup> anti-proliferative<sup>39</sup> sowie anti-inflammatorische Effekte aus.<sup>40</sup> Zugleich aktiviert der AT2R zahlreiche protektive Mechanismen. Die wichtigsten AT2R-Effekte und deren molekularen Mechanismen sind in Abbildung 2 dargestellt.

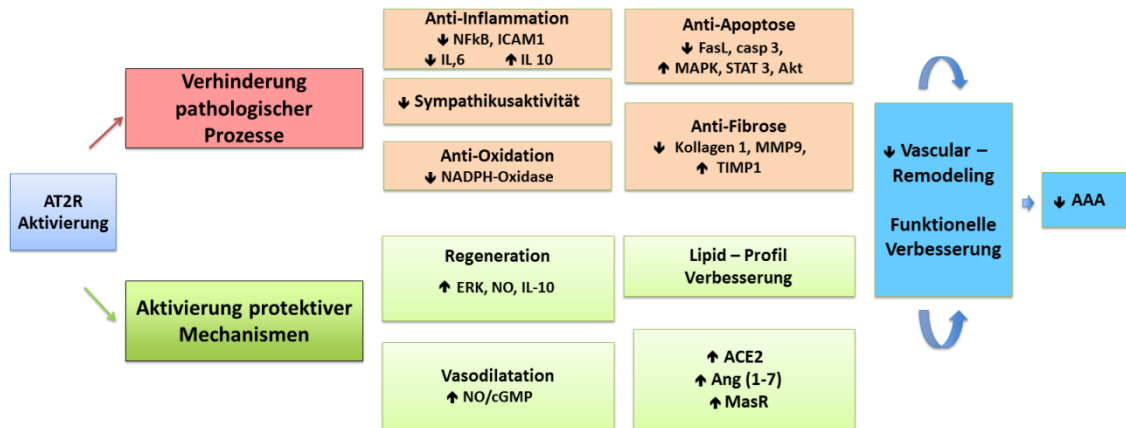


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Effekte einer AT2R-Aktivierung und hypothetische Auswirkungen auf das abdominelle Aortenaneurysma. *ACE* Angiotensin-Converting-Enzym, *AT1* Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, *AT2R* Angiotensin II Typ 2 Rezeptor, *MMP* Matrixmetalloprotease, *vSMC* glatte Gefäßmuskelzelle, *NFκB* Nuklear Factor Kappa B, *ICAM* Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül, *IL* Interleukin, *FasL* Fas-Ligand, *casp* Caspase, *MAPK* Mitogen-Activated Protein Kinase, *Stat* Signal transducer and activator of transcription, *Akt* Proteinkinase B, *TIMP* Tissue inhibitor of metalloproteinases, *NADPH* Nicotinamidadeninucleotidphosphat, *ERK* Extracellular-signal Regulated Kinase, *NO* Stickstoffmonoxid, *cGMP* cyclisches Guanosinmonophosphat, *Ang* Angiotensin, *MasR* MAS-Rezeptor, *AAA* abdominelles Aortenaneurysma

AT2R sind auf Endothel- und inflammatorischen Zellen<sup>41</sup> (Monozyten<sup>42</sup>, Mastzellen<sup>43</sup>, c-kit+ Zellen<sup>44</sup>) nachweisbar. Dieser Rezeptorbesatz und die Reduktion pro-inflammatorischer Mediatoren (IL-6, IL-1β) durch AT2R-Stimulation könnten protektive anti-inflammatorische Effekte erklären.<sup>38, 40, 45</sup>

Zu den Hauptmechanismen der AT2R-Stimulation gehören die Aktivierung der Phospholipase A2 sowie der MAPK und die Regulation der NO/cGMP-Signalkaskade.<sup>46-48</sup> Nachgeschaltete Mechanismen umfassen antioxidative Effekte, wie die Inaktivierung der NADPH-Oxidase, anti-atherosklerotische, plaquestabilisierende Effekte durch Reduktion der MMP-2 und MMP-9-Aktivität und eine Verbesserung der endothelialen Funktion.<sup>49</sup> Die antifibrotische Wirkung des AT2R durch Modulation der TIMP/MMP-Ratio und von TGFβ-Pathways konnte bereits beim kardialen Remodeling nach Herzinfarkt beobachtet werden.<sup>38</sup>

*In vivo* konnte eine gewebeprotective Wirkung des AT2R, beispielsweise bei Schlaganfall,<sup>50</sup> Myokardinfarkt,<sup>45</sup> Atherosklerose<sup>51</sup>, arterieller Hypertonie<sup>52, 53</sup> oder neuronalen Schäden<sup>54</sup> beobachtet werden. Die Rolle des AT2R bei der AAA wurde in genetisch veränderten Tieren untersucht. Eine fehlende AT2R-Expression löst eine Beschleunigung der AAA-Progression im Marfan-Tiermodell aus<sup>35</sup>, während eine genetische AT2R-Defizienz im Ang II-Infusion-Modell keine Effekte hatte.<sup>36</sup> Eine indirekte Co-Stimulation des AT2R wurde bereits zur Erklärung anti-aneurysmaler Effekte von Losartan (AT1R-Antagonist) bei ausbleibender Wirkung von Aliskiren (Renin-Inhibitor) während eines Versuches an einem Marfan-Syndrom-Mäusemodell herangezogen.<sup>55</sup> Die Autoren postulierten, dass

nach einer direkten Renin-Inhibition die protektiven Effekte einer begleitenden AT2R-Stimulation konsekutiv im Vergleich zur alleinigen Blockade des AT1R ausbleiben.

Nachdem zunächst nur eine gemeinsame Blockade des AT1R und AT2R mittels PD123319 (AT2R-Antagonist) möglich war, stellt CGP42112A den ersten AT2R-Agonist dar.<sup>56</sup> Der peptidische Aufbau erschwerte eine enterale Aufnahme und zusätzlich zeigte es in hohen Konzentrationen weiterhin einen inhibierenden Effekt am AT1R. Mit Compound 21 (C21) konnte 2004 erstmals ein selektiver, non-peptid und damit oral mit besserer Bioverfügbarkeit (20-30%) applizierbarer, reiner AT2R-Agonist etabliert werden.<sup>58</sup> C21, N-Butyloxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-isobutylthiophene-2-sulfonamide, hat ein Molekulargewicht von 475.63 g/mol. Dieses Small-Molecule-Medikament hingegen hat eine Dissoziationskonstante von  $K_i \sim 0,4$  nM für AT2R und  $K_i > 10$   $\mu$ M für AT1R und eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} \sim 4$  Stunden.<sup>57, 58</sup>

### 1.3. Hypothese

Aufgrund der regulatorischen Effekte der AT2R-Stimulation auf extrazelluläre Matrix, Matrixmetalloproteasen, Inflammation und Apoptose vermuten wir, dass die Stimulation mit dem AT2R-Agonist Compound 21 eine Limitierung der AAA-Dilatation im genetisch nicht veränderten Elastase-Modell des AAA bewirkt. Unseren Fokus legen wir hierbei zusätzlich auf Hämodynamik und mechanische Eigenschaften der aortalen Wand.

## 2. Methodik

### 2.1. Protokoll

25 männliche Wistar Ratten (360 – 430g) wurden randomisiert auf drei Gruppen verteilt. Sham-Gruppe: sechs Ratten mit Scheinoperation ohne Aneurysmainduktion (AI). Vehicle- und Treatment-Gruppe: acht respektive sieben Tiere mit infrarenalem Aortenaneurysma. 4 Tiere verstarben während der AI und wurden nicht in die Ergebnisauswertung eingeschlossen. Tiere der Vehicle-Gruppe wurden täglich mit 0,9%iger Kochsalzlösung i.p. behandelt, Tiere der Treatment-Gruppe erhielten täglich Compound 21 (0,03mg/kg Körpergewicht, i.p.). Alle Tiere erhielten bei einem 12/12h Tag-Nacht-Rhythmus Futter und Wasser *ad libitum*. Vor AI, an Tag 7 und Tag 14 wurden die Ultraschall- und Blutdruckmessungen durchgeführt. An Tag 14 wurden die Tiere nach einer invasiven Hämodynamikmessung in Narkose durch Exsanguination euthanasiert. Bei allen Tieren wurden die Gewebe und Blut asserviert und jeweils in 4% Formalin und in Flüssigstickstoff gelagert. Die Versuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt (G0002/16). Die Richtlinien der Gesellschaften für Versuchstierkunde (FELASA, GV-SOLAS) und die Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden eingehalten.

## 2.2. Experimentelle Aneurysma – Induktion

Die Tiere wurden mit 1,5-2%igem Isofluran anästhesiert und die Inhalationsanästhesie atemfrequenzadaptiert aufrecht erhalten. Der Bauch und die Innenseite des linken Hinterlaufs wurden rasiert und enthaart (Veet, Reckitt-Beckinsler, Mannheim, Deutschland), die Haut proximal des Kniegelenks 3cm in Richtung Schwanzwurzel inzidiert, die Arterie stumpf aus der Leitungsbahn präpariert und mit einem Katheter kanüliert. Nach einem xyphopubalen Hautschnitt und der Durchtrennung der darunterliegenden Bauchmuskeln mit Eröffnung des Peritoneums wurde der Darm mobilisiert und das Retroperitoneum eröffnet. Die Aorta wurde unterhalb der Nierenarterie von der *Vena cava caudalis* auf einer Länge von 1 cm abpräpariert und mit einer Ligatur cranial verschlossen. Die Katheterspitze wurde in dem Bereich positioniert, eine kaudale Ligatur angelegt, Schweine–Elastase (14 U, Typ I, Sigma-Aldrich Chemie, Darmstadt, Deutschland) über 40 Minuten volumenkontrolliert infundiert und der Situs nach Blutstillung und Gefäßnaht verschlossen.

## 2.3. Sonographische Messungen

Vor AI, an Tag 7 und Tag 14 wurden unter Isofluran-Narkose (1,5-2%) Ultraschall-Untersuchungen bei den Ratten durchgeführt (Vevo 3100 incl. MX250–Schallkopf, VisualSonics Inc., Toronto, Canada). Vor Beginn wurde ein standardisiertes Protokoll ausgearbeitet und Geräteeinstellungen (Gain 37 dB, Tiefe 20 mm, Bildbreite 12,04 mm) festgelegt. Der systolische und diastolische Durchmesser wurde 1.) suprarenal und infrarenal 2.) unterhalb der A. renalis, 3.) an der Bifurkation und 4.) am Mittelpunkt dieser Punkte im B-Mode gemessen und durch duplexsonographische Messungen ergänzt. Nach AI wurde an der maximalen infrarenalen Ausdehnung gemessen und der Durchmesser als arithmetisches Mittel aus dem systolischen und diastolischen Wert errechnet. Die Flussgeschwindigkeiten ergaben sich aus der Analyse der duplexsonographischen Messungen (VevoLab 2.2.0, VisualSonics Inc., Toronto, Canada). Mittels Speckle-Tracking wurden Distensibility und Pulse Propagation Velocity kalkuliert.

## 2.4. Hämodynamische Messungen

Der systolische Blutdruck wurde mit der Tailcuff-Methode (MLT125/R Pulse Transducer/Pressure Cuff, ADInstruments, Oxford, United Kingdom) vor AI, am 7. und 14. Tag noninvasiv, an wachen Tieren erhoben. Die Tiere wurden in einem Restraint positioniert und am Schwanz wurde ein Elektrosphygmomanometer platziert. Nach einer Adaptationszeit von mindestens 5 Minuten wurden drei Messungen erhoben und gemittelt.

An Tag 14 wurden zusätzlich hämodynamische Messungen an den anästhesierten (Isofluran 1,5-2%) Ratten durchgeführt. Die *Arteria carotis* wurde frei präpariert und kanüliert. Intraaortale und linksventrikuläre Drücke wurden mit einem optischen Drucksensor (Samba Sensors, Gothenburg, Schweden) erhoben und mittels Chart5–Programm (Blood Pressure Module) aufgezeichnet und ausgewertet. Die hämodynamischen Untersuchungsparameter sind in Tab. 2 aufgelistet.

## 2.5. Molekularbiologie

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Manuela Sommerfeld angefertigt. Zur Proteinextraktion wurden die Aorten-Gewebe mechanisch zerkleinert und mit Lyse-Puffer mit Proteinase-Inhibitoren homogenisiert. Die lysierten Proteine wurden in gleichen Konzentrationen für 5 Minuten bei 95°C mit Probenpuffer inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels der SDS-PAGE unter Verwendung von 10%igen Polyacrylamidgelen. Der Transfer auf PVDF-Membranen wurde in einer Nassblotkammer bei 100V für 1h durchgeführt. Die Membran wurde mit einer Verdünnung des primären Antikörpers (Tab. 1) inkubiert und gewaschen. Eine zweite Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper folgte für 30 Minuten. Nach einem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran mit ECL-Reagenz (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany) benetzt und auftretende Chemolumineszenz durch Auflegen eines Fotofilms detektiert. Die Banden wurden densometrisch mittels Scion Image Software ausgewertet.

primäre Antikörper		Typ	Verdünnung	Hersteller
	MMP-9	Polyclonal rabbit	1:1000	Abcam
	TIMP-1	Polyclonal rabbit	1:500	Santa Cruz
	TGF- $\beta$ 1	Polyclonal rabbit	1:500	Santa Cruz
	IL-1 $\beta$	Polyclonal rabbit	1:500	Santa Cruz
	NF $\kappa$ B	Polyclonal rabbit	1:500	Santa Cruz
	Snail/SLUG	Polyclonal rabbit	1:1000	Abcam
	MLKL	Monoclonal rat	1:1000	Merck Millipore
	Angiotensin	Polyclonal goat	1:500	Santa Cruz
	AT <sub>2</sub> R	Polyclonal goat	1:500	Santa Cruz
	GAPDH	Monoclonal mouse	1:10000	Merck Millipore
	AT <sub>2</sub> R	Polyclonal goat	1:100	Santa Cruz
	CD4	Monoclonal rat	1:100	Santa Cruz
sekundäre Antikörper	Anti-mouse	Polyclonal goat	1:2000	Dako
	Anti-rabbit	Polyclonal goat	1:2000	Dako
	Alexa 488	Polyclonal goat	1:200	life science
	Alexa 568	Polyclonal rat	1:200	life science

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

## 2.6. Histologie

Die Anfertigung der histologischen und immunhistologischen Schnitte wurde in Kooperation mit Manuela Sommerfeld realisiert. Die Aorten wurden in 4%igem Formaldehyd eingelegt, gewaschen und in flüssiges Paraffin eingebettet. Der Gewebeparaffinblock wurde am Mikrotom in 5 $\mu$ m dicke Schnitte geschnitten, die Slices im auf 37°C vorbeheizten Wasserbad gestreckt und auf den Objektträger aufgezogen. Nach mehrstündiger Trocknung bei 60°C und Entparaffinierung mittels Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Weigert-Sirius-Rot und Hämatoxylin-Eosin angefärbt und morphometrisch ausgewertet (Biorevo BZ-9000, Keyence Japan).

### 2.6.1. Immunhistochemie

Nach Entparaffinierung, wurden die Schnitte in die endogene Peroxidase für 30 Minuten mittels 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Phosphatpuffersalzlösung geblockt. Danach wurden die Schnitte mit primären Antikörpern (MMP-9, NFκB, TGF-β1, IL-1β, MLKL, ANG, AT2R, CD4, Snail/SLUG) und sekundären anti-rabbit IgG behandelt. Die Peroxidase-Aktivität wurde mittels 3-Amino-9-ethylcarbazol (Vectastain ABC; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) bestimmt. Um Kreuzreaktionen gegen die primären Antikörper auszuschließen wurden Kontrollgewebe mit Phosphatpuffersalzlösung und 5% Normal-Esel-Serum inkubiert.

### 2.6.2. Immunfluoreszenz

Zur Immunfluoreszenz der Aorta wurde der AT2R und CD4+ Antikörper mit dem Fluorochrom (Alexa Fluor 488 und 568) gekoppelt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (1:10 000) markiert und die Präparate mittels Konfokalmikroskopie (Bioevo BZ-9000, Keyence Japan) ausgewertet.

## 2.7. Statistische Analyse

Alle Ergebnisse werden als Mittel ± Standardabweichung dargestellt. Für Mehrfachvergleiche wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Tukey's post-hoc Mehrfachvergleichstest genutzt, für Vergleiche zwischen zwei Gruppen der Einstichproben-t-test. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) berechnet und ab einem  $p < 0,05$  als signifikant erachtet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Aortaler Durchmesser

An Tag 7 post-AI war der infrarenale aortale Durchmesser der Vehicle-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe 1,5-fach vergrößert ( $2,48 \pm 0,06\text{mm}$   $n=8$  vs.  $1,74 \pm 0,05\text{mm}$   $n=6$ ;  $p < 0,0001$ ). An Tag 14 bereits 1,6-fach ( $2,65 \pm 0,06\text{mm}$   $n=8$  vs.  $1,7 \pm 0,07\text{mm}$   $n=6$ ;  $p < 0,0001$ ). Im Vergleich zur Vehicle-Gruppe milderte C21 die Dilatation um 20% an Tag 7 ( $2,48 \pm 0,06\text{mm}$   $n=8$  vs.  $1,9 \pm 0,09\text{mm}$   $n=7$ ,  $p < 0,001$ ) und um 28% an Tag 14 ( $2,65 \pm 0,06\text{mm}$   $n=8$  vs.  $1,9 \pm 0,06\text{mm}$   $n=7$ ;  $p < 0,0001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und im zeitlichen Verlauf sind in Abbildung 3 (A, B) dargestellt. Die Durchmesser der weiteren aortalen Messpunkte zeigten keine signifikanten Veränderungen.

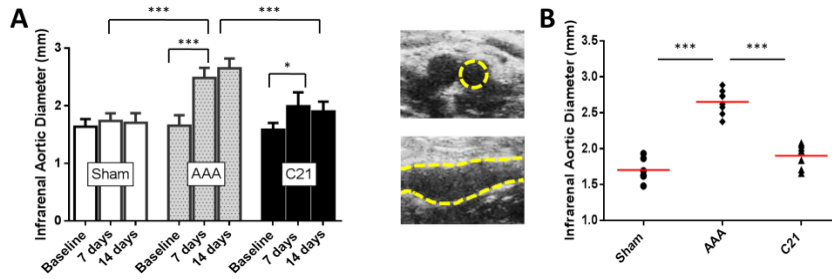


Abbildung 3: Compound 21 verhindert die Ausbildung eines AAA. **A** der sonographisch erhobene, infrarenale Aortendurchmesser zu den verschiedenen Zeitpunkten. Weiße Säulen: Tiere der Sham-Gruppe; graue Säulen: Tiere der Vehicle-Gruppe und schwarze Säulen: Tiere der C21-Gruppe; Mittelwerte; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ . **Mitte oben**: Ultraschallbild eines transversalen Schnittes einer aneurysmal erweiterten abdominalen Aorta neben der *Vena caudalis*. **Mitte unten**: Ultraschallbild eines longitudinalen AAA-Schnittes. **B** infrarenaler Aortendurchmesser am Ende des Experiments • Einzelwerte der Sham-Gruppe, ▲ Einzelwerte der C21-Gruppe, ◆ Einzelwerte der Vehicle-Gruppe; die rote Linie markiert jeweils den Mittelpunkt der Werte; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.2. Duplexsonographische Messungen

Sowohl die Spitzengeschwindigkeit als auch die mittlere Geschwindigkeit und das Velocity Time Integral spiegeln eine auf das aneurysmale Segment der Aorta begrenzte Verringerung des Flusses wider. (Abb. 4B, C, D) Im Vergleich zur Vehicle-Gruppe ergab die Behandlung mit C21 signifikant höhere Spitzenflussgeschwindigkeiten ( $2240 \pm 157 \text{ mm/s}$   $n=7$  vs.  $1602 \pm 131 \text{ mm/s}$   $n=8$ ,  $p < 0,01$ ), mittlere Flussgeschwindigkeiten ( $902,1 \pm 98 \text{ mm/s}$   $n=7$  vs.  $626,7 \pm 56 \text{ mm/s}$   $n=8$ ,  $p < 0,05$ ) und ein höheres Velocity Time Integral ( $113 \pm 12 \text{ mm}$   $n=7$  vs.  $75,4 \pm 7 \text{ mm}$   $n=8$ ,  $p < 0,05$ ). Die enddiastolische Flussgeschwindigkeit und die damit verbundenen Indices (Resistive Index, Pulsatile Index) waren nicht signifikant verändert. (Abb. 3E, F, G) Der Blutfluss abseits der Dilatation war nicht alteriert.

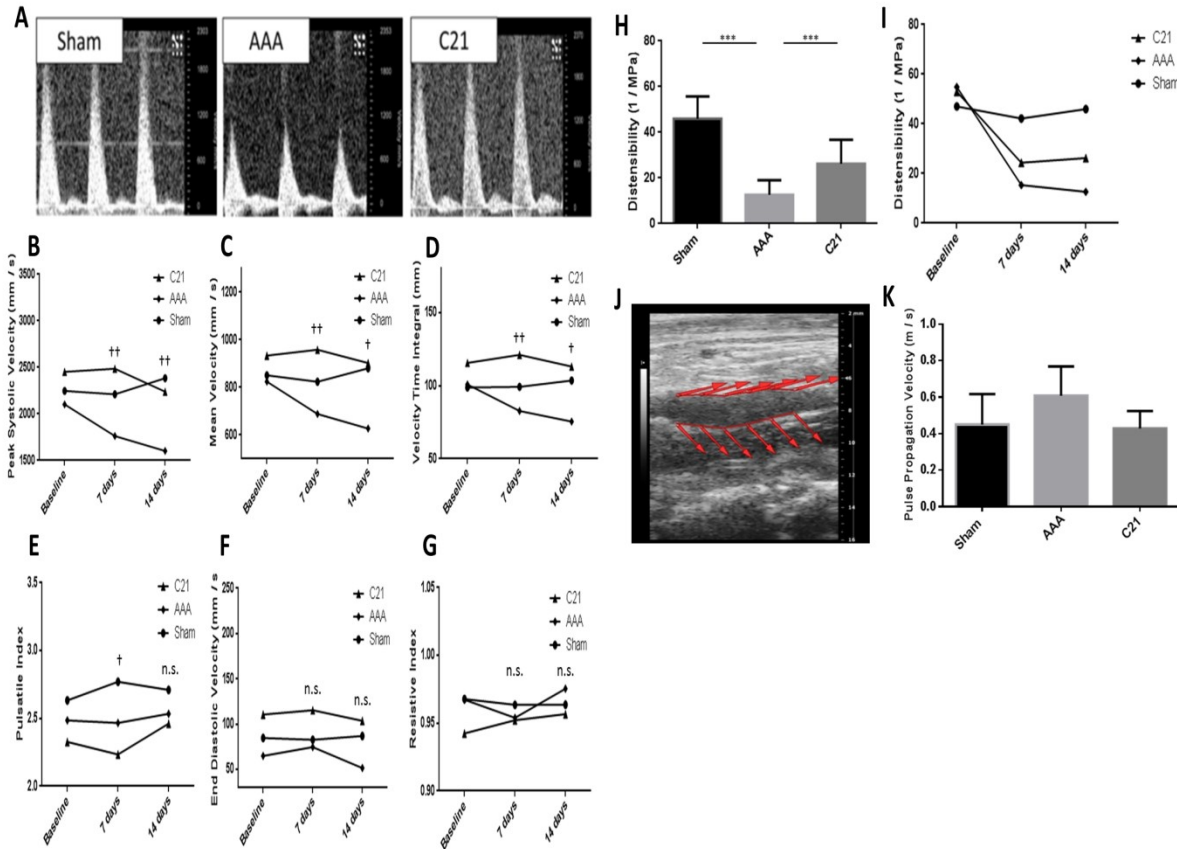


Abbildung 4: Blutflussgeschwindigkeitsanalysen der infrarenalen Aorta. **A** Repräsentative ultrasonographische Doppler-Bildgebungen. Links: Sham-Gruppe; Mitte: Vehicle-Gruppe; Rechts: Treatment-Gruppe. Zeitliche Verläufe der infrarenalen **B** Spitzenflussgeschwindigkeit **C** mittleren Geschwindigkeit **D** Velocity Time Integral **E** Pulsatile Index **F** enddiastolische Geschwindigkeit **G** Resistive Index. ● Sham-Gruppe ▲ Treatment-Gruppe ◆ Vehicle-Gruppe, Mittelwerte; †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ . Dehnbeanspruchungsanalysen der Aorta. **H** infrarenale aortale Wanddehnbarkeit am Ende des Experiments. Schwarze Säulen: Sham-Gruppe; hellgraue Säulen: Vehicle-Gruppe und dunkelgraue Säulen: Treatment-Gruppe; Mittelwerte; \*\*\*  $p < 0,0001$ . **I** Zeitlicher Verlauf der infrarenalen Dehnbarkeit. ● Sham-Gruppe ▲ Treatment-Gruppe ◆ Vehicle-Gruppe; Mittelwerte; #  $p < 0,05$ . **J** Speckle-Tracking-basierte Analyse der aneurysmalen Wanddehnbarkeit der Aorta, die Pfeile zeigen den Kraftvektor an. **K** Pulse Propagation Velocity am Ende des Experiments.

### 3.3. Mechanische Eigenschaften der aortalen Wand

Die Dehnbarkeit der Aorta sank in der Vehicle-Gruppe bis Tag 14 um 72%. Die Sham-Gruppe wies keine signifikanten Veränderungen auf. (Abb. 4H) Die Behandlung mit C21 minderte im Vergleich zur Vehicle-Gruppe den Abfall signifikant an Tag 7 ( $24,3 \pm 9,41/\text{MPa}$   $n=7$  vs.  $15,4 \pm 4,04/\text{MPa}$   $n=8$ ,  $p < 0,05$ ) und noch ausgeprägter an Tag 14 ( $26,2 \pm 10,5/\text{MPa}$   $n=7$  vs.  $12,7 \pm 6,35/\text{MPa}$   $n=8$ ,  $p < 0,01$ ). (Abb. 4I) Die Pulse Propagation Velocity der Vehicle-Gruppe zeigte einen 1,72-fachen Anstieg. (Abb. 4K) Im Vergleich verblieb sie in der Treatment-Gruppe signifikant niedriger ( $0,61 \pm 0,06\text{m/s}$   $n=8$  vs.  $0,43 \pm 0,04\text{m/s}$   $n=7$ ,  $p < 0,05$ ) und in der Sham-Gruppe fast unverändert. Außerhalb des Aneurysmas zeigte sich keine Veränderung der aortalen Dehnbarkeit oder Gefäßsteifigkeit.

### 3.4. Hämodynamische Parameter

Der systolische Blutdruck - gemessen im wachen Zustand - wurde zu allen drei Zeitpunkten nicht durch AI oder C21 beeinflusst. (Tab. 2) Der zentrale Blutdruck - im anästhesierten Tier gemessen - zeigt keine Änderungen bei systolischem ( $106 \pm 6\text{mmHg}$   $n=8$  vs.  $104 \pm 3,5\text{mmHg}$   $n=6$ ; n.s.) und diastolischem ( $70,1 \pm 4,8\text{mmHg}$   $n=8$  vs.  $74,3 \pm 5,2\text{mmHg}$   $n=6$ ; n.s.) Blutdruck. (Tab. 2) Die intraaortalen Messwerte zeigen im direkten Vergleich der Pulsamplitude ( $26,8 \pm 1,4\text{mmHg}$   $n=7$  vs.  $33,5 \pm 2,5\text{mmHg}$   $n=8$ ;  $p<0,05$ ) zwischen Treatment- und Vehicle-Gruppe eine signifikante Reduktion durch C21. (Tab. 2) Die Gruppen zeigten gleiche kardiale Kontraktilität, Relaxation und Zykluspartialzeiten. (Tab. 2)

		Sham	AAA	C21	p value
<b>Pressure</b>					
left ventricular max. Pressure	<i>mmHg</i>	107,4 ± 5,91	103,1 ± 4,81	92,06 ± 4,47	n. s.
left ventricular min. pressure	<i>mmHg</i>	1,299 ± 0,57	2,145 ± 1,24	-0,7452 ± 2,05	n. s.
left vent. end diast. pressure	<i>mmHg</i>	11,14 ± 0,71	12,21 ± 1,28	9,031 ± 2,25	n. s.
mean pressure	<i>mmHg</i>	48,55 ± 4,04	46,84 ± 3,45	41,87 ± 3,02	n. s.
max-min left ventricular press.	<i>mmHg</i>	106,1 ± 6,11	101,0 ± 4,31	92,80 ± 2,81	n. s.
dicrotic notch pressure	<i>mmHg</i>	86,70 ± 4,22	84,84 ± 5,66	85,14 ± 4,34	n. s.
syst. aortic pressure	<i>mmHg</i>	106,2 ± 6,141	103,5 ± 3,474	95,69 ± 4,521	n. s.
diast. aortic pressure	<i>mmHg</i>	74,33 ± 5,215	70,07 ± 4,760	68,89 ± 3,635	n. s.
mean arterial pressure	<i>mmHg</i>	90,28 ± 5,84	85,49 ± 4,58	82,84 ± 4,09	n. s.
pulse pressure	<i>mmHg</i>	31,86 ± 2,42	33,46 ± 2,52	26,80 ± 1,41	n. s.
pulse pressure	<i>mmHg</i>		33,46 ± 2,52	26,80 ± 1,41	0,0453
<b>Time Periods</b>					
systolic duration	<i>sec</i>	0,08941 ± 0,003	0,08789 ± 0,002	0,09502 ± 0,003	n. s.
diastolic duration	<i>sec</i>	0,1010 ± 0,009	0,1003 ± 0,007	0,1043 ± 0,007	n. s.
cycle duration	<i>sec</i>	0,1904 ± 0,01	0,1882 ± 0,01	0,1993 ± 0,01	n. s.
heart frequency	<i>bpm</i>	320,9 ± 18	324,6 ± 16	304,8 ± 14	n. s.
ejection duration	<i>sec</i>	0,07918 ± 0,002	0,07478 ± 0,006	0,08097 ± 0,002	n. s.
non-ejection duration	<i>sec</i>	0,1162 ± 0,009	0,1162 ± 0,006	0,1150 ± 0,006	n. s.
time to peak	<i>sec</i>	0,03404 ± 0,006	0,02878 ± 0,003	0,03604 ± 0,005	n. s.
<b>Contractility</b>					
max. dP/dt	<i>mmHg/sec</i>	8683 ± 907,4	7584 ± 661,1	6470 ± 292,8	n. s.
contractility Index	<i>1/sec</i>	139,2 ± 9,76	127,4 ± 5,42	128,3 ± 8,48	n. s.
min. dP/dt	<i>mmHg/sec</i>	-7995 ± 880,2	-7146 ± 686,2	-6258 ± 358,5	n. s.
<b>Relaxation</b>					
IRP Average	<i>mmHg/sec</i>	-3535 ± 349,7	-3324 ± 302,6	-2879 ± 187,4	n. s.
pressure time index	<i>mmHg/sec</i>	8,044 ± 0,302	7,599 ± 0,274	7,426 ± 0,424	n. s.
<b>Tailcuff</b>					
Baseline	<i>mmHg</i>	-3535 ± 349,7	-3324 ± 302,6	-2879 ± 187,4	n. s.
7 days	<i>mmHg</i>	-3535 ± 349,7	-3324 ± 302,6	-2879 ± 187,4	n. s.
14 days	<i>mmHg</i>	-3535 ± 349,7	-3324 ± 302,6	-2879 ± 187,4	n. s.
		n = 6	n = 8	n = 7	



Tabelle 2: Ergebnisse der intraventrikulären und intraaortalen Drücke, gemessen via Samba-Katheter und Tailcuff.

### 3.5. Morphologische Analysen

Morphologische Untersuchungen der infrarenalen Aorta der Vehicle-Gruppe zeigen eine deutliche Lumen-Dilatation und vaskuläres Remodeling. (Abb. 5A, B) Aneurysmata waren durch eine ausgedünnte Wand, Fragmentierung und Rupturen der elastischen Lamellae gekennzeichnet. (Abb. 5A, B) Die Anzahl elastischer Lamellae war signifikant reduziert ( $p < 0,0001$ ). (Abb. 5D) Die Querschnittsfläche der paraaortalen Lymphknoten zeigte eine signifikante Vergrößerung ( $p < 0,0001$ ). (Abb. 5E) Die C21-Behandlung bewirkte eine signifikante Reduktion des aortalen Durchmessers, der Fragmentation elastischer Lamellae, des muralen Remodelings sowie der Anzahl inflammatorischer Zellen, der Größe von Lymphknoten und der muralen Ausdünnung. (Abb. 5A, B, E) Immunhistochemisch zeigte sich die erhöhte Expression von AngII in der Vehicle-Gruppe durch die Behandlung mit C21 reduziert. (Abb. 6E) Die AT2R-Expression war nach AI vor allem in der Nähe inflammatorischer Zellen, perivaskulären Fetts und *Vasa vasorum* nachweisbar. (Abb. 6E) Die Vehicle-Gruppe zeigte eine Co-Lokalisation mit Endothelzellen und in der Adventitia, besonders in der Nähe von CD4+ Lymphozyten. (Abb. 5C) In Immunfluoreszenzanalysen wiesen die Signale auf AT2R exprimierende CD4+ Zellen hin. (Abb. 5C merged)

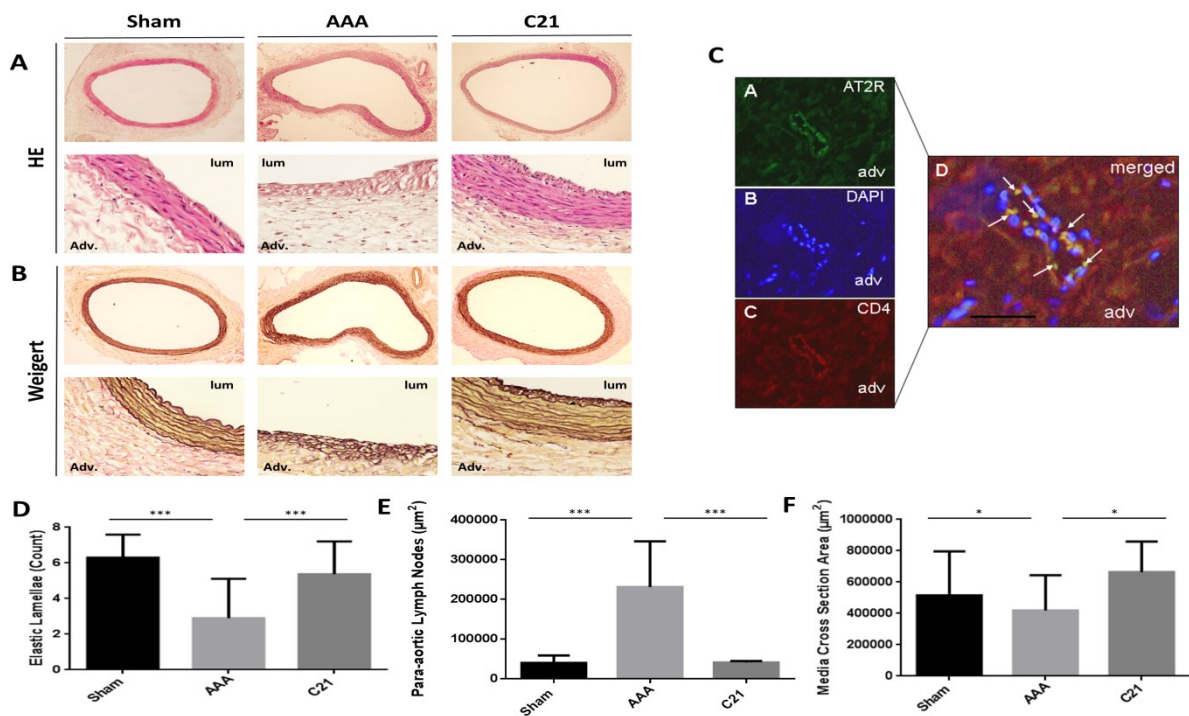


Abbildung 5: Histomorphologie der infrarenalen Aorta. **A** Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE). *Oben*: repräsentative Querschnittsfläche abdomineller Aorten, x4. *Unten*: aortaler Wandabschnitt, x40. **B** Weigert-Färbung. *Oben*: repräsentative Querschnittsfläche abdomineller Aorten, x4. *Unten*: aortaler Wandabschnitt, x40. **C** repräsentative Immunfluoreszenzfärbung eines aortalen Abschnitts aus der Vehicle-Gruppe **A**: der AT2R (grün) **B**: Hoechst-Färbung der Zellkerne (blau) **C**: CD4+ Zellen (rot) **D**: CD4+ Zellen exprimieren den AT2R (yellow) die Pfeilspitzen deuten auf die co-lokalisierten Signale (merged). Scala: 50  $\mu\text{m}$ . **D** Anzahl der elastischen Lamellae in der Tunica media der abdominellen Aorta **E** Querschnittsfläche der para-aortalen Lymphknoten **F** Dicke der Tunica media. Schwarze Säulen: Tiere der Sham-Gruppe; hellgraue Säulen: Tiere der Vehicle-Gruppe und dunkelgraue Säulen: Tiere der Treatment-Gruppe; Mittelwerte; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.6. Molekularbiologische Erkenntnisse

Die aktive Form des proteolytischen MMP-9 (~ 70 kDa) zeigte in der Vehicle-Gruppe eine 1,5-fache Hochregulation der Expression ( $p < 0,05$ ). (Abb. 6A) Co-lokalisiert war MMP-9 mit inflammatorischen Zellen. (Abb. 6B) Auch IL-1 $\beta$  und NF $\kappa$ B waren im aortalen Gewebe der Vehicle-Tiere signifikant mehr exprimiert ( $p < 0,05$ ) und in der Nähe inflammatorischer Zellen gehäuft vorhanden. (Abb. 6B) C21 erbrachte eine 4,9-fache Reduktion von IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) und eine 2,4-fache Verminderung der NF $\kappa$ B-Expression ( $p < 0,05$ ). (Abb. 6A) TGF- $\beta$ 1 zeigte in den Western-Blot-Analysen zwei durch die AI hochregulierte Banden: ein Protein ~ 60 kDa und ein Dimer ~ 40 kDa. (Abb. 6A) Bei höchsten Expressionen in der Adventitia zeigten sich auch Expression in der Media, (Abb. 6C) die durch C21 deutlich abgemildert wurden (Reduktion 1,8-fach 60 kDa Protein und 2,5-fach 40 kDa Dimer im Vergleich zur Vehicle-Gruppe;  $p < 0,05$ ). (Abb. 6A) Zusätzlich untersuchten wir Transkriptionsfaktoren der Epithelial-mesenchymalen Transition. C21 limitierte signifikant die SLUG-Herabregulation der Vehicle-Gruppe ( $p < 0,05$ ), während Snai1 keine Regulation zeigte. (Abb. 6A) Die mit einer Form des programmierten Zelltods - der Nekroptose - assoziierte mixed lineage kinase domain-like (MLKL) war in der *Tunica media* der Vehicle-Gruppe in der Nähe von vSMC und inflammatorischen Zellen exprimiert. (Abb. 6A, B) C21 halbierte die MLKL-Expression ( $p < 0,05$ ). Im Serum der Tiere zeigten MCP-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. In der Vehicle-Gruppe fand sich im Vergleich zur Sham-Gruppe eine deutlich erhöhte Serum-Konzentration von TGF- $\beta$ 1 ( $p < 0,01$ ), welche durch die Behandlung mit C21 signifikant verringert werden konnte ( $p < 0,05$ ). (Abb. 6D)

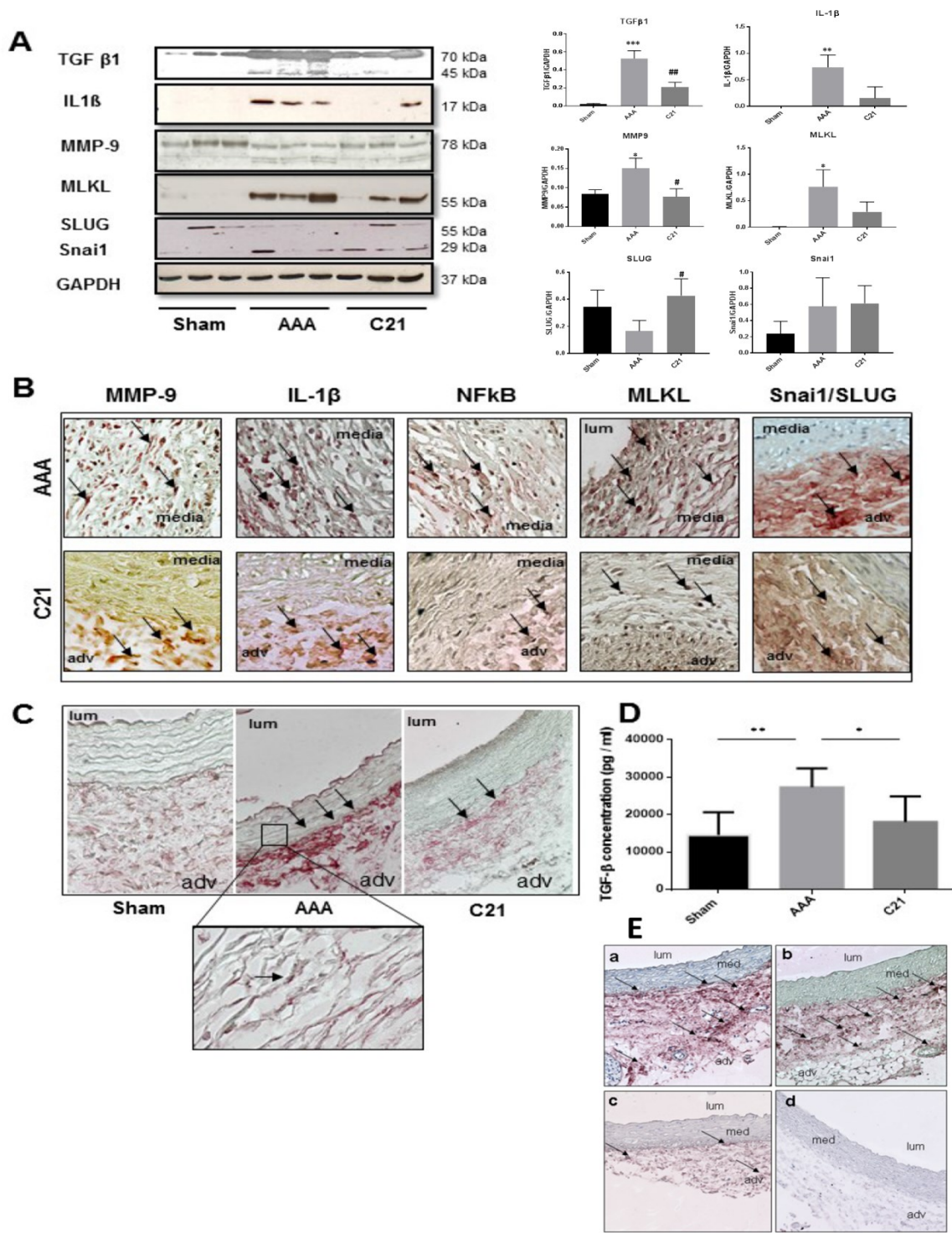


Abbildung 6: Molekularbiologische und immunohistochemische Analyse der abdominalen Aorta. **A** Western-Blot-Analyse der aortalen Expression an Zytokinen (TGF-β1; IL-1β), Matrixmetalloprotease 9 (MMP-9), Nekroptosemarker (MLKL) und EMT-Marker (Snai1, SLUG); \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001 Vehicle-Gruppe vs. Sham-Gruppe; # p<0,05; ## p<0,001; Treatment-Gruppe vs. Vehicle-Gruppe. **B** Immunohistochemische Färbung aortaler Querschnitte, x70. *Oben*: Vehicle-Gruppe; *Unten*: Treatment-Gruppe. **C** Immunohistochemische TGFβ1-Färbung, x40. **D** TGFβ1-Konzentration im Serum. Schwarze Säulen: Sham; hellgraue Säulen: Vehicle und dunkelgraue Säulen: Treatment; Mittelwerte; \* p<0,05; \*\*\* p<0,0001. **E** Immunohistologische Schnitte der abdominalen Aorta, rot gefärbt sind ANG/AngI/AngII, x20. a: Vehicle-Gruppe. b: Treatment-Gruppe. d: Sham-Gruppe. c: Negativkontrolle.

## 4. Diskussion

Mit dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Stimulation des AT2R das Fortschreiten eines experimentellen AAA im Tiermodell der Ratte limitieren kann. Die systemische Therapie mit dem AT2R-Agonisten C21 hat zu reduzierter aortaler Dilatation, erhaltener Funktion und bewahrter struktureller Integrität geführt. Eine fehlende AT2R-Expression zeigte bereits eine Beschleunigung des Wachstums und der Ruptur vorhandener Aneurysmata in einem Mausmodell des Marfan-Syndroms und die genetische AT2R-Defizienz in einem AngII-Infusion-Modell blieb ohne Effekt auf TAA, AAA oder Atherosklerose per se.<sup>35, 36</sup> In genetisch nicht modifizierten Tieren des Elastase-Modells sahen wir nach AI eine deutliche Dilatation des Aortenlumens und strukturelle *Tunica media*-Veränderungen, wie Fragmentation und Abbau elastischer Lamellae. Die erhöhte inflammatorische und proteolytische Aktivität in den Geweben konnte bereits in früheren Untersuchungen beobachtet werden.<sup>13</sup> Wir konnten darlegen, wie die AT2R-Stimulation sowohl die aortale Aussackung als auch murale Abbauprozesse verhinderte. Der limitierende Einfluss von C21 auf das vaskuläre Remodeling spiegelte sich morphologisch in einer deutlichen Reduktion von Fragmentierungen und Rupturen elastischer Lamellae, *Tunica media*-Degeneration und inflammatorischer Infiltrate wider. Der Einfluss hämodynamischer Faktoren wie Blutdruck auf Verlauf und Ruptur-Wahrscheinlichkeit von AAA ist bekannt.<sup>37, 59</sup> Wir stellten einen blutdruckunabhängigen positiven Effekt durch C21 fest. Im direkten Vergleich der Pulsamplitude und der Gefäßsteifigkeit war aber eine signifikante Reduktion durch C21 - in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen - messbar.<sup>38, 39, 52</sup> Eine Assoziation zwischen erhöhter Gefäßsteifigkeit und Aneurysma-Entstehung<sup>60, 61</sup> respektive einer akuten Dissektion der Aorta<sup>62</sup> konnte in klinischen Studien nachgewiesen werden. Grundlage der Gefäßsteifigkeits-Verbesserung durch C21 scheint die erhaltene strukturelle Integrität aufgrund verminderter Proteolyse und Inflammation sowie der Erhalt der vSMC zu sein. C21 hatte einen vorteilhaften Einfluss auf die Dehnbarkeit der aortalen Wand. Wie bei der Gefäßsteifigkeit sahen wir auch hier eine signifikante, lokal begrenzte Wirkung. Veränderungen der Blutflussgeschwindigkeit und erhöhte mural wirksame Scherkräfte sind beim AAA vorbeschrieben.<sup>59</sup> Eine Verlangsamung sowohl der Spitzengeschwindigkeit als auch der mittleren Geschwindigkeit im aneurysmalen Segment, wie von uns gemessen, gelten als unabhängige Risikofaktoren für eine Ruptur. Durch die geschützte Geometrie des AAA und bewahrte murale Rückstellkräfte als Folge der C21-Behandlung konnten diese erhalten werden.<sup>63, 64</sup> Die enddiastolische Geschwindigkeit und damit verbundene Indices - die etablierte Stenose-Parameter sind - zeigten keine signifikanten Alterationen durch die Dilatation oder die Behandlung mit C21. Der AT2R ist in der Adventitia, in der Nähe von *Vasa vasorum* und inflammatorischen Zellen exprimiert. Wir konnten Erkenntnisse aus der tierexperimentellen TAA-Forschung bestätigen, die eine Co-Lokalisation von AT2R und CD4+ Lymphozyten mit protektiven Effekten durch Wachstumsinhibition und Apoptose postulierten.<sup>65</sup> Die Behandlung mit C21 bewirkte eine Größenlimitierung paraaortaler Lymphknoten sowie eine Reduktion inflammatorischer Infiltrate in der Adventitia. Diese Ergebnisse unterstreichen die bekannte anti-inflammatorische Rolle des AT2R nun im Kontext der Limitierung der AAA-Progression.<sup>27</sup> C21 begrenzte erhöhte Expressionen inflammatorischer Schlüsselzytokine der AAA-Genese wie IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B und TGF- $\beta$ 1 im aortalen Gewebe.<sup>13</sup> Aus Studien ist eine reduzierende

Wirkung von Ang (1-7) auf IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in zerebralen Aneurysmata bekannt, die AT2R-abhängig auch vor Rupturen schützen konnte.<sup>66</sup> Eine mögliche Beteiligung der aktivierten ACE2/Ang (1-7)/Mas-Achse als Gegenspieler der ACE/Ang II/AT1-Achse erscheint bei erhöhten Angiotensinvorläuferstufen in unserer Untersuchung neben der Aktivierung des AT2R zusätzlich denkbar. In kardialen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Auswirkungen auf die MMP-9-Aktivität durch C21 AT2R-spezifisch, also durch den AT2R-Antagonisten PD123319 reversibel sind.<sup>38</sup> Die MMP-9/TIMP-Ratio war durch die C21-Behandlung verbessert und die Aktivierung der MMP-9 in der Vehicle-Gruppe durch die Behandlung mit C21 aufgehalten. Wir konnten einen Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Konzentration sowohl im aortalen Gewebe als auch im Serum beobachten. Der Serumkonzentrationsanstieg bei den erkrankten Tieren in Kombination mit dem konsekutiven Abfall durch C21 macht TGF- $\beta$  zu einem möglichen Biomarker für AAA. Zukünftige Experimente sind nötig um diese Hypothese zu untersuchen. Bereits Gao et al. wiesen nach, dass TGF- $\beta$  in vSMC an der Pathogenese des AAA beteiligt ist und eine Unterbrechung der dazugehörigen Signalwege die Aneurysmaformation verhindern kann.<sup>67</sup> Da aus Ang II-basierten Tiermodellen ähnliche Effekte bekannt sind, sollten weitergehende Untersuchungen eine mögliche Translation dieses Ergebnisses in die Klinik beinhalten.<sup>68</sup> Eine C21-Behandlung hat anti-fibrotische Effekte beim kardialen Remodeling<sup>38</sup>, bei L-NAME-Hypertonie-Ratten<sup>53</sup> und beim pulmonalen Hypertonus<sup>69</sup> in Zusammenarbeit mit einer TGF- $\beta$ 1-Reduktion bewirkt. Sowohl TGF- $\beta$  als auch AngII sind eng mit einer AAA-Progression assoziiert und teilen sich Abschnitte regulatorischer Signalkaskaden, wie das SMAD-Protein und die MAP-Kinase (p38, ERK and JNK/p38).<sup>68</sup> Beim TAA steht die AT2R-Signalkaskade der AT1R-abhängigen TGF- $\beta$ -Regulation durch Blockierung der ERK entgegen.<sup>35</sup> Wir untersuchten einen Teilaspekt der TGF- $\beta$ 1-Signalkaskade, die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) inklusive klassischer Transkriptionsfaktoren: Snai1 und SLUG.<sup>70</sup> SLUG zeigte eine Regulation durch C21 und damit zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen dem aus Tumorfiliierung und Wundheilung bekannten Prozess der EMT und der Aneurysmaentwicklung. Weitere Studien sind nötig um diesen Mechanismus in seiner Auswirkung, seinen Zwischenschritten und seiner möglichen therapeutischen Beeinflussbarkeit zu analysieren. Zusätzlich sind protektive Auswirkungen auf den Zelltod im AAA denkbar. Wir untersuchten die Auswirkung der C21-Behandlung auf die Überexpression der Pseudokinase MLKL, einem Trigger und Marker für die Nekroptose – eine Form des mit Inflammation assoziierten, programmierten Zelltods.<sup>71</sup> Wir konnten damit jüngste Erkenntnisse bestätigen, dass Nekroptose neben der bereits bekannten Apoptose einen Teil der AAA-Entstehung darstellt. Tierexperimentell hat eine Inhibition des Nekroptosemediators RIP-1 limitierende Effekte auf das AAA-Wachstum.<sup>72</sup> Diese Arbeit konnte dies um einen weiteren Nekroptosemarker erweitern und zeigen, dass anti-proteolytische Eigenschaften des AT2R mit einer Nekroptoselimitierung einhergehen. Weiterführende Experimente sollten darauf abzielen diesen Mechanismus inklusive seiner Zwischenschritte weiter zu beleuchten.

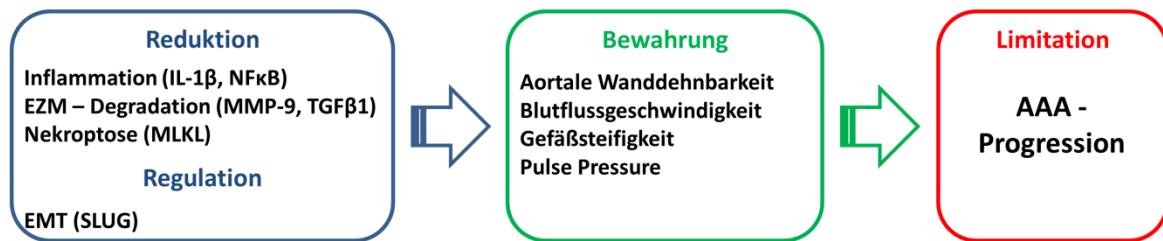


Abbildung 7: Schematische Zusammenfassung der Wirkungen einer AT2R-Stimulation im Kontext des abdominalen Aortenaneurysmas

Zusammengenommen verhinderte die AT2R-Stimulation mit Compound 21 die Progredienz der AAA-Dilatation blutdruckunabhängig durch Limitierung von EZM-Degradation, Inflammation und Nekroptose, bewahrte hämodynamische Parameter und die aortale Integrität durch Schutz der Wandarchitektur. Infolgedessen scheint eine Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems via AT2R-Stimulation als neue, klinisch relevante Behandlung kleiner AAA denkbar.

## 5. Referenzen

1. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365:1577-1589. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66459-8
2. Kuivaniemi H, Platsoucas CD, Tilson MD. Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation*. 2008;117:242-252. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.690982
3. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg*. 1999;230:289-296; discussion 296-287.
4. Nicholls SC, Gardner JB, Meissner MH et al. Rupture in small abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1998;28:884-888.
5. Li X, Zhao G, Zhang J et al. Prevalence and trends of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population--a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8:e81260. DOI: 10.1371/journal.pone.0081260
6. Golledge J, Muller J, Daugherty A et al. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2605-2613. DOI: 10.1161/01.ATV.0000245819.32762.cb
7. Gallo EM, Loch DC, Habashi JP et al. Angiotensin II-dependent TGF- $\beta$  signaling contributes to Loews-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J Clin Invest*. 2014;124:448-460. DOI: 10.1172/JCI69666
8. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M et al. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation*. 1997;96:2228-2232.
9. Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery*. 1997;122:264-271; discussion 271-262.
10. Franck G, Dai J, Fife A et al. Reestablishment of the endothelial lining by endothelial cell therapy stabilizes experimental abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 2013;127:1877-1887. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001677
11. de Beaufort HW, Nauta FJ, Conti M et al. Extensibility and Distensibility of the Thoracic Aorta in Patients with Aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2017;53:199-205. DOI: 10.1016/j.ejvs.2016.11.018
12. Halpern VJ, Nackman GB, Gandhi RH et al. The elastase infusion model of experimental aortic aneurysms: synchrony of induction of endogenous proteinases with matrix destruction and inflammatory cell response. *J Vasc Surg*. 1994;20:51-60.
13. Curci JA, Thompson RW. Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? *J Clin Invest*. 2004;114:168-171. DOI: 10.1172/JCI22309
14. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R et al. Reduced collagen biosynthesis is the hallmark of cerebral aneurysm: contribution of interleukin-1 $\beta$  and nuclear factor- $\kappa$ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1080-1086. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.180760
15. Evrard SM, Lecce L, Michelis KC et al. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun*. 2016;7:11853. DOI: 10.1038/ncomms11853
16. Baikoussis NG, Apostolakis EE, Papakonstantinou NA et al. The implication of vasa vasorum in surgical diseases of the aorta. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;40:412-417. DOI: 10.1016/j.ejcts.2010.11.045
17. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest*. 2010;120:422-432. DOI: 10.1172/JCI38136
18. Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL. Medical management of small abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 2008;117:1883-1889. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.735274
19. Vammen S, Lindholt JS, Ostergaard L et al. Randomized double-blind controlled trial of roxithromycin for prevention of abdominal aortic aneurysm expansion. *Br J Surg*. 2001;88:1066-1072. DOI: 10.1046/j.0007-1323.2001.01845.x



20. Mosorin M, Juvonen J, Biancari F et al. Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Vasc Surg.* 2001;34:606-610. DOI: 10.1067/mva.2001.117891
21. Investigators PAT. Propranolol for small abdominal aortic aneurysms: results of a randomized trial. *J Vasc Surg.* 2002;35:72-79.
22. Kaschina E, Schrader F, Sommerfeld M et al. Telmisartan prevents aneurysm progression in the rat by inhibiting proteolysis, apoptosis and inflammation. *J Hypertens.* 2008;26:2361-2373. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328313e547
23. Hackam DG, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aortic rupture: a population-based case-control study. *Lancet.* 2006;368:659-665. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69250-7
24. Morris DR, Cunningham MA, Ahimastos AA et al. Telmisartan in the management of abdominal aortic aneurysm (TEDY): The study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015;16:274. DOI: 10.1186/s13063-015-0793-z
25. Unger T, Steckelings UM, dos Santos RAS. The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS) : Functional Aspects and Therapeutic Implications. Academic Press, Elsevier. 2015.
26. Zimlichman R, Julius S, Mancia G. Prehypertension and Cardiometabolic Syndrome. Springer International Publishing. 2018.
27. Kaschina E, Namsolleck P, Unger T. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Res.* 2017;125:39-47. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.07.008
28. Kaschina E, Scholz H, Steckelings UM et al. Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components. *Atherosclerosis.* 2009;205:396-403. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.003
29. Leonhardt J, Vilella DC, Teichmann A et al. Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension.* 2017;69:1128-1135. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08814
30. Daugherty A, Cassis LA. Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *Curr Atheroscler Rep.* 2002;4:222-227.
31. Lu H, Rateri DL, Bruemmer D et al. Involvement of the renin-angiotensin system in abdominal and thoracic aortic aneurysms. *Clin Sci (Lond).* 2012;123:531-543. DOI: 10.1042/CS20120097
32. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V et al. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5:73-79.
33. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 2003;12:70-88.
34. Krueger F, Kappert K, Foryst-Ludwig A et al. AT1-receptor blockade attenuates outward aortic remodeling associated with diet-induced obesity in mice. *Clin Sci (Lond).* 2017;131:1989-2005. DOI: 10.1042/CS20170131
35. Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science.* 2011;332:361-365. DOI: 10.1126/science.1192152
36. Daugherty A, Rateri DL, Howatt DA et al. PD123319 augments angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms through an AT2 receptor-independent mechanism. *PLoS One.* 2013;8:e61849. DOI: 10.1371/journal.pone.0061849
37. Sumners C, de Kloet AD, Krause EG et al. Angiotensin type 2 receptors: blood pressure regulation and end organ damage. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;21:115-121. DOI: 10.1016/j.coph.2015.01.004
38. Lauer D, Slavic S, Sommerfeld M et al. Angiotensin type 2 receptor stimulation ameliorates left ventricular fibrosis and dysfunction via regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1/matrix metalloproteinase 9 axis and transforming growth factor  $\beta$ 1 in the rat heart. *Hypertension.* 2014;63:e60-67. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02522



39. Danyel LA, Schmerler P, Paulis L et al. Impact of AT<sub>2</sub>-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. *Integr Blood Press Control*. 2013;6:153-161. DOI: 10.2147/IBPC.S34425
40. Rompe F, Unger T, Steckelings UM. The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor in inflammation. *Drug News Perspect*. 2010;23:104-111. DOI: 10.1358/dnp.2010.23.2.1475901
41. Bonnet F, Cooper ME, Carey RM et al. Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat: influence of angiotensin II infusion. *J Hypertens*. 2001;19:1075-1081.
42. Nahmod KA, Vermeulen ME, Raiden S et al. Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. *FASEB J*. 2003;17:491-493. DOI: 10.1096/fj.02-0755fje
43. Biscotte SM, Levick SP, Bertling ML et al. Angiotensin II mediated activation of cardiac mast cells. *The FASEB Journal*. 2007;21.
44. Altarche-Xifró W, Curato C, Kaschina E et al. Cardiac c-kit+AT<sub>2</sub>+ cell population is increased in response to ischemic injury and supports cardiomyocyte performance. *Stem Cells*. 2009;27:2488-2497. DOI: 10.1002/stem.171
45. Kaschina E, Grzesiak A, Li J et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*. 2008;118:2523-2532. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784868
46. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T et al. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:19022-19026.
47. Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST et al. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J Biol Chem*. 1994;269:4832-4838.
48. Gohlke P, Pees C, Unger T. AT<sub>2</sub> receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 1998;31:349-355.
49. Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S et al. AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16:416. DOI: 10.1007/s11906-013-0416-6
50. Alhusban A, Fouda AY, Bindu Pillai et al. Compound 21 is pro-angiogenic in the brain and results in sustained recovery after ischemic stroke. *J Hypertens*. 2015;33:170-180. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000364
51. Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Illasaca MA et al. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. *Circulation*. 2005;112:3328-3336. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.541714
52. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N et al. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2012;59:291-299. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180158
53. Paulis L, Becker ST, Lucht K et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation in Nω-nitro-L-arginine-methyl ester-induced hypertension: the effect on pulse wave velocity and aortic remodeling. *Hypertension*. 2012;59:485-492. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185496
54. Ma CY, Yin L. Neuroprotective effect of angiotensin II type 2 receptor during cerebral ischemia/reperfusion. *Neural Regen Res*. 2016;11:1102-1107. DOI: 10.4103/1673-5374.187044
55. Te Riet L, van Deel ED, van Thiel BS et al. AT<sub>1</sub>-receptor blockade, but not renin inhibition, reduces aneurysm growth and cardiac failure in fibulin-4 mice. *J Hypertens*. 2016;34:654-665. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000845
56. Brechler V, Jones PW, Levens NR et al. Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT<sub>2</sub> receptor in PC12W cells. *Regul Pept*. 1993;44:207-213.
57. Karnik SS, Unal H, Kemp JR et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev*. 2015;67:754-819. DOI: 10.1124/pr.114.010454

58. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT<sub>2</sub> receptor agonist. *J Med Chem.* 2004;47:5995-6008. DOI: 10.1021/jm049715t
59. Dua MM, Dalman RL. Hemodynamic influences on abdominal aortic aneurysm disease: Application of biomechanics to aneurysm pathophysiology. *Vascul Pharmacol.* 2010;53:11-21. DOI: 10.1016/j.vph.2010.03.004
60. Raaz U, Zöllner AM, Schellinger IN et al. Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development. *Circulation.* 2015;131:1783-1795. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012377
61. Kadoglou NP, Papadakis I, Moulakakis KG et al. Arterial stiffness and novel biomarkers in patients with abdominal aortic aneurysms. *Regul Pept.* 2012;179:50-54. DOI: 10.1016/j.regpep.2012.08.014
62. Hoff E, Eagle T, Pyeritz RE et al. Pulse pressure and type A acute aortic dissection in-hospital outcomes (from the International Registry of Acute Aortic Dissection). *Am J Cardiol.* 2014;113:1255-1259. DOI: 10.1016/j.amjcard.2013.12.037
63. Sugimoto K, Shimamura Y, Tezuka C et al. Effects of arterial blood flow on walls of the abdominal aorta: distributions of wall shear stress and oscillatory shear index determined by phase-contrast magnetic resonance imaging. *Heart Vessels.* 2016;31:1168-1175. DOI: 10.1007/s00380-015-0758-x
64. Arko FR, Filis KA, Siedel SA et al. Intrasc flow velocities predict sealing of type II endoleaks after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2003;37:8-15. DOI: 10.1067/mva.2003.55
65. Wang C, Wu T, Hu X et al. Identification and characterization of CD4(+)AT<sub>2</sub>(+) T lymphocyte population in human thoracic aortic aneurysm. *Am J Transl Res.* 2015;7:232-241.
66. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT<sub>1</sub> receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res.* 2009;32:533-536. DOI: 10.1038/hr.2009.74
67. Gao F, Chambon P, Offermanns S et al. Disruption of TGF- $\beta$  signaling in smooth muscle cell prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;454:137-143. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.053
68. Chen X, Lu H, Rateri DL et al. Conundrum of angiotensin II and TGF- $\beta$  interactions in aortic aneurysms. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13:180-185. DOI: 10.1016/j.coph.2013.01.002
69. Bruce E, Shenoy V, Rathinasabapathy A et al. Selective activation of angiotensin AT<sub>2</sub> receptors attenuates progression of pulmonary hypertension and inhibits cardiopulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2015;172:2219-2231. DOI: 10.1111/bph.13044
70. Welch-Reardon KM, Wu N, Hughes CC. A role for partial endothelial-mesenchymal transitions in angiogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:303-308. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303220
71. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature.* 2015;517:311-320. DOI: 10.1038/nature14191
72. Gupta K, Phan N, Wang Q et al. Necroptosis in cardiovascular disease - a new therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;118:26-35. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.03.003

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1: Lange C., Sommerfeld M., Namsolleck P., Kintscher U., Unger T., Kaschina E. *AT2R (Angiotensin AT2 Receptor) Agonist, Compound 21, Prevents Abdominal Aortic Aneurysm Progression in the Rat*. Hypertension; 72:e20–e29. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11168.

Beitrag im Einzelnen:

Das Experiment wurde von Frau PD Dr. med. Elena Kaschina geplant und initiiert. Zusammen operierten wir die Tiere zur Aneurysmainduktion oder als Sham - Operation. Ich überwachte die Tiere für 14 Tage und führte die Tailcuff- und die sonographischen Messungen präoperativ, am 7. Tag und am 14. Tag durch. Die intrakardiale Katheterdruckmessung und die Organgewinnung an Tag 14 wurde wieder in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Kaschina durchgeführt. Die histologischen Proben und biomolekularen Versuche (Western - Blot; ELISA) wurden mit Frau Manuela Sommerfeld angefertigt. Ich war an der Evaluation und Auswertung der histologischen Proben beteiligt und übernahm die Erhebung und statistische Auswertung, incl. der graphischen Darstellung (Bilder und Tabellen) der Daten. In Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Kaschina entstand das Manuskript.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christoph Lange, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Angiotensin AT2 receptor agonist, compound 21, prevents extracellular matrix degradation, maintains vascular integrity and prevents abdominal aortic aneurysm progression in the rat“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben ist. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

03.12.2018

---

Unterschrift

## Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)

InCites Journal Citation Reports



Journal Data Filtered By:  
**Selected JCR Year: 2017**  
 Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“PERIPHERAL VASCULAR DISEASE”**  
 Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 65 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CIRCULATION	167,719	18.880	0.223630
2	CIRCULATION RESEARCH	52,753	15.211	0.082820
3	HYPERTENSION	36,908	6.823	0.049510
4	STROKE	65,854	6.239	0.088520
5	ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY	34,074	6.086	0.044820
6	THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS	16,701	4.952	0.025770
7	JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS	17,663	4.899	0.034380
8	Journal of Stroke	694	4.750	0.002880
9	ATHEROSCLEROSIS	23,013	4.467	0.039120
10	ANGIOGENESIS	2,712	4.351	0.004860
11	JOURNAL OF HYPERTENSION	16,916	4.092	0.025250
12	EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY	8,352	3.877	0.012910
13	International Journal of Stroke	3,825	3.859	0.014880
14	CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY	3,849	3.853	0.006100
15	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY	28,039	3.569	0.027570
16	HYPERTENSION RESEARCH	5,064	3.439	0.006250

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11168>

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Komplette Publikationsliste

### Publikationen:

09. 07. 2018 **Lange C.**, Sommerfeld M., Namsolleck P., Kintscher U., Unger T., Kaschina E. *AT2R (Angiotensin AT2 Receptor) Agonist, Compound 21, Prevents Abdominal Aortic Aneurysm Progression in the Rat*. *Hypertension*; 72:e20–e29. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11168. (Impact Factor: 6.823)

### Präsentationen:

#### Poster

15. 10. 2016 **Lange C.**, Sommerfeld M., Namsolleck P., Kintscher U., Unger T., Kaschina E. *Angiotensin AT2 receptor agonist, compound 21, prevents abdominal aortic aneurysm progression in the rat*. 20. Jahrestagung des European Council for Cardiovascular Research Meeting, Garda, Italien
12. 10. 2017 **Lange C.**, Sommerfeld M., Namsolleck P., Kintscher U., Unger T., **Kaschina E.** *Angiotensin AT2 receptor agonist, compound 21, maintains vascular integrity and prevents abdominal aortic aneurysm progression in the rat*. *Artery Research*; 20:63. doi: 10.1016/j.artres.2017.10.059 Konferenz der Association for Research into Arterial Structure and Physiology (ARTERY), Pisa, Italien

#### Vorträge

03. 12. 2016 **Lange C.**, Sommerfeld M., Namsolleck P., Kintscher U., Unger T., Kaschina E. *Angiotensin II Type 2 receptor agonist, compound 21, prevents abdominal aortic aneurysm progression in the rat without affecting blood pressure*. 40. Wissenschaftlicher Kongresses der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL® Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Berlin, Deutschland
19. 06. 2017 **Lange C.**, Sommerfeld M., Namsolleck P., Kintscher U., Unger T., Kaschina E. *Angiotensin AT2 receptor agonist, Compound 21, prevents abdominal aortic aneurysm progression and the decrease of aortic wall distensibility in the rat*. *Journal of Hypertension*; 35:e72. doi: 10.1097/01.hjh.0000523164.52997.5d 27. European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, Milano, Italien
19. 10. 2018 **Görg J.**, Hinterseher I., **Lange C.**, Sommerfeld M., Frese J., Greiner A., Kintscher U., Dollinger P., Kaschina E. *Nekroptoseregulation in der Wand abdomineller Aortenaneurysmen*. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin, Bonn, Deutschland

### Erwähnungen:

- August 2018 Charité Newsletter – *Ausgewählte Publikationen*

### Preise:

- 03.12.2016 3. Vortragspreis der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL im Rahmen des 40. Wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL® Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, Berlin, Germany



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein tiefer Dank meiner Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. Elena Kaschina, die meine Arbeit nicht nur exzellent betreut und unterstützt hat sondern auch darüber hinaus immer ein offenes Ohr für mich hatte. Für die vielen hilfreichen und motivierenden Anregungen und die konstruktive Kritik möchte ich mich herzlich bedanken. Bedanken möchte ich mich auch für die zahlreichen interessanten Debatten und den eingeräumten Freiraum zur Verwirklichung eigener Ideen, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit in dieser Form vorliegt.

Ebenso danke ich Manuela Sommerfeld nicht nur für ihre tatkräftige Unterstützung während diverser Methoden, sondern auch für interessante Gespräche und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Kindern und meiner Partnerin danke ich besonders für den starken emotionalen Rückhalt über die Dauer meines gesamten Studiums.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter und meiner Schwester bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten.

Am meisten danke ich meinem Vater, der mir immer ein gutes Vorbild war und dessen früher Verlust meine Motivation zur Verbesserung der Versorgung von Aneurysmaerkrankten stetig erhalten wird.