

Aus dem Universitäts-Herzzentrum Freiburg-Bad Krozingen  
Kardiologie und Angiologie I

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie des Fachbereichs  
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Der Einfluss von**  
***bone morphogenetic protein endothelial cell precursor derived***  
***regulator (Bmper)***  
**und**  
***bone morphogenetic protein 4 (Bmp4)***  
**auf die**  
**Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen**  
**im Mausmodell**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Lena Meier**  
Tierärztin  
aus Daun

Berlin 2021  
**Journal-Nr.: 4244**



**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

<b>Dekan:</b>	Univ.- Prof. Dr. Jürgen Zentek
<b>Erster Gutachter:</b>	Univ.- Prof. Dr. Robert Klopffleisch
<b>Zweiter Gutachter:</b>	PD. Dr. Jennifer S. Eßer
<b>Dritter Gutachter:</b>	Univ.- Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): mice, animal models, aorta, aneurysm, arteries, aortic rupture, polymerase chain reaction, echocardiography, SDS-PAGE

**Tag der Promotion:** 15.04.2021



*Für meine Familie*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Nomenklatur .....</b>	<b>X</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturteil .....</b>	<b>2</b>
2.1. BMPs- <i>Bone morphogenetic proteins</i> .....	2
2.1.1. Der BMP-Signalweg .....	2
2.1.2. <i>Bone Morphogenetic Protein endothelial cell precursor derived regulator</i> (BMPER) .....	4
2.2. Arterielle Blutgefäße .....	5
2.2.1. Vaskuläre glatte Muskelzellen .....	5
2.2.1.1. Modulation des vSMC-Phänotyps - Der Phänotypenwechsel.....	5
2.2.1.2. Einflüsse des TGF- $\beta$ Signalwegs auf das arterielle Remodeling.....	6
2.2.1.3. Einflüsse von Mechanorezeptoren und ANGII-vermitteltem Bluthochdruck auf den Phänotypenwechsel.....	7
2.2.2. Aufbau arterieller Blutgefäße .....	8
2.2.3. Die Aorta .....	9
2.3. Definition und Epidemiologie von Aortenaneurysmen in der Humanmedizin 9	9
2.3.1. Notwendigkeit zur Unterscheidung von thorakalen und abdominellen Aortenaneurysmen .....	10
2.3.2. Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen .....	11
2.3.2.1. Veränderungen der Extrazellulärmatrix und ihr Beitrag zur Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen.....	11
2.3.2.2. Matrixmetalloproteinasen und ihr Beitrag zur Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen .....	12
2.3.3. Aortenaneurysmen in der Tiermedizin .....	13
2.3.4. Induktion von Aortenaneurysmen in der Grundlagenforschung .....	13
2.4. Zielsetzung der Arbeit.....	14
<b>3. Tiere und Material.....</b>	<b>15</b>
3.1. Tiere .....	15
3.2. Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	15
3.3. Verbrauchsmaterialien.....	16
3.4. Chemikalien und Reagenzien.....	18
3.5. Puffer und Lösungen .....	19
3.6. Kits.....	20

3.7.	Primer .....	21
3.7.1.	Primer: Qualitative Genotypisierungs-PCR .....	21
3.7.2.	Primer: Quantitative SybrGreen Realtime-PCR .....	21
3.7.3.	Primer: Quantitative Taqman-Realtime-PCR .....	22
3.8.	Marker .....	22
3.9.	Enzyme und Inhibitoren .....	22
3.10.	Antikörper .....	22
3.10.1.	Western Blot .....	22
3.10.2.	Histologie .....	23
3.11.	Medikamente/ Injektionslösungen .....	24
3.12.	Software .....	24
<b>4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>25</b>
4.1.	Tierexperimentelle Versuche .....	25
4.1.1.	Die C57/BL6-N Bmper Mäuse .....	25
4.1.2.	Das Cre/loxP-Rekombinationssystem .....	25
4.1.2.1.	Die Myh11-CreERT2/Bmp4flox Mäuse .....	26
4.1.2.2.	Injektion von Tamoxifen .....	26
4.1.3.	Tiermodell zur Induktion von Aortenaneurysmen .....	26
4.1.3.1.	Anästhesie und Analgesie .....	27
4.1.3.2.	Vorbereitung der Mäuse für die Echokardiographie .....	27
4.1.3.3.	Echokardiographie .....	27
4.1.3.4.	Implantation der Minipumpen .....	29
4.1.3.5.	Entnahme der Aorten und Organe .....	29
4.2.	Molekularbiologie .....	30
4.2.1.	DNA-Gewinnung aus einer Biopsie von der Maus .....	30
4.2.2.	RNA Isolation aus thorakalen Aortenabschnitten .....	31
4.2.2.1.	Aufreinigung der gewonnenen RNA .....	31
4.2.3.	Herstellung von cDNA aus RNA .....	32
4.2.4.	Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion .....	32
4.2.4.1.	Agarosegelelektrophorese .....	33
4.2.4.1.1.	Myh11-CreERT2/Bmp4flox .....	33
4.2.4.1.2.	Bmper-Linie .....	34
4.2.5.	Quantitative Real-Time PCR .....	35
4.2.6.	Proteinanalytische Methode .....	36
4.2.6.1.	Proteingewinnung aus Aortenbögen .....	38
4.2.6.2.	Proteinquantifizierung mittels Bradford Assay .....	38
4.2.6.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
4.2.6.4.	Probenvorbereitung .....	39
4.2.6.5.	Proteintransfer mittels Western Blot-Verfahren .....	39

4.2.6.6.	Absättigung der freien Proteinbindungsstellen auf der Membran..	40
4.2.6.7.	Proteindetektion .....	40
4.2.6.8.	Optimierte Methodik zur Proteinbestimmung.....	40
4.2.7.	Proteom-Array – Kollaboration .....	41
4.3.	Histologische Methoden .....	41
4.3.1.	Anfertigung von histologischen Schnitten .....	41
4.3.2.	Elastica-Färbung nach van Gieson.....	42
4.3.3.	Immunfluoreszenzmarkierung .....	42
4.3.4.	TUNEL-Assay.....	43
4.3.5.	Funktionelle Versuche - Zymogen Versuch .....	44
4.3.6.	Auflichtmikroskopie.....	45
4.3.7.	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
4.4.	Statistik .....	45
4.5.	Abgrenzung des Eigenanteils der vorliegenden Arbeit zu vorherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe .....	46
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
5.1.	Die Auswirkungen der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen .....	47
5.1.1.	Die exemplarische makroskopische Betrachtung der Aorten von Mäusen der Bmper-Studie nach Entnahme.....	47
5.1.2.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Herzleistung 48	
5.1.3.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Aortendiameter.....	50
5.1.4.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf histomorphologische Veränderungen des Aortengewebes .....	52
5.1.5.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die strukturellen Veränderungen der elastischen <i>Laminae</i> mittels Elastica van Gieson Färbung.....	53
5.1.6.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Extrazellulärmatrix-Komponente Kollagen im Aortenbogen .....	56
5.1.7.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen.....	59
5.1.8.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die glatten Muskelzellen.....	64
5.1.8.1.	Die Veränderung der Expression von $\alpha$ -Sma .....	64
5.1.8.2.	Die Veränderung der Expression von Myh11 .....	66
5.1.9.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper Defizienz auf den apoptischen Zelluntergang im Gewebe.....	68
5.1.10.	Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf den BMP- Signalweg.....	70
5.1.11.	Durchführung eines Proteom-Arrays: Eine Übersichtsdarstellung.....	75

5.2.	Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Deletion .....	79
5.2.1.	Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die Herzleistung .....	79
5.2.2.	Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die Aortendiameter .....	81
5.2.3.	Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) .....	83
5.2.4.	Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die glatten Muskelzellen.....	84
5.2.5.	Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf den BMP-Signalweg.....	86
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
6.1.	Die Auswirkung der heterozygoten Defizienz von Bmper auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen im Mausmodell .....	89
6.1.1.	Die heterozygote Defizienz von Bmper verändert den strukturellen Wandaufbau der thorakalen Aorta .....	89
6.1.2.	Die heterozygote Defizienz von Bmper verschiebt das Gleichgewicht der vSMCs hin zum synthetisierenden Phänotyp.....	91
6.1.3.	Die heterozygote Defizienz von Bmper fördert den Umbau der Extrazellulärmatrix.....	91
6.1.4.	Die heterozygote Defizienz von Bmper und der Einfluss auf den Bmp4-Signalweg.....	93
6.2.	Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4 Defizienz auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen im Mausmodell .....	94
6.3.	Herausforderung bei der Erklärung der zugrundeliegenden Signalwege..	95
6.4.	Optimierungsmöglichkeiten der Methodik.....	95
6.4.1.	Optimierungsmöglichkeiten im Rahmen der Versuche an der Maus.....	96
6.4.2.	Optimierungsmöglichkeiten der Proteindetektion.....	97
<b>7.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>9.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>101</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>XIV</b>
<b>12.</b>	<b>Finanzierungsquellen/Interessenskonflikte .....</b>	<b>XV</b>
<b>13.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>XVI</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tiere.....	15
Tabelle 2: Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	16
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	18
Tabelle 5: Kits.....	21
Tabelle 6: Primer Genotypisierung.....	21
Tabelle 7: Primer SybrGreen .....	22
Tabelle 8: Primer Taqman .....	22
Tabelle 9: Marker.....	22
Tabelle 10: Enzyme/ Inhibitoren.....	22
Tabelle 11: Primärantikörper Western Blot.....	23
Tabelle 12: Sekundärantikörper Western Blot.....	23
Tabelle 13: Primärantikörper Histologie .....	23
Tabelle 14: Sekundärantikörper Histologie.....	24
Tabelle 15: Medikamente/ Injektionslösungen.....	24
Tabelle 16: Software.....	24
Tabelle 17: Berechnung der Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion (Kawahara et al. 2005).....	28
Tabelle 18: Protokoll für die RNA-Isolierung aus Mauseartenproben .....	31
Tabelle 19: Protokoll für die Aufreinigung der RNA nach Isolation .....	32
Tabelle 20: Herstellung von cDNA .....	32
Tabelle 21: Ansatz der Master-Mixe für die Genotypisierungs-PCR von Myh11-CreERT2 und Bmp4loxP.....	34
Tabelle 22: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von Myh11-CreERT2 und Bmp4loxP	34
Tabelle 23: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von Bmper .....	35
Tabelle 24: Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese.....	39
Tabelle 25: Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese .....	39
Tabelle 26: Protokoll für die Elastica-Färbung der Gefrierschnitte nach van Gieson .....	42
Tabelle 27: Protokoll für die Immunfluoreszenzmarkierung der Gefrierschnitte .....	43
Tabelle 28: Protokoll für die TUNEL-Färbung auf Gefrierschnitten.....	44
Tabelle 29: Protokoll für das <i>in situ</i> -Zymogen- Assay.....	45

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der BMP-Signalweg, modifiziert nach Katagiri und Watabe (Katagiri und Watabe 2016) .....	3
Abbildung 2: Darstellung von BMPER und Crossveinless-2, modifiziert nach Moser et al. (2003) .....	4
Abbildung 3: Phänotypen glatter Muskelzellen, modifiziert nach Rensen et. al. 2007 .....	6
Abbildung 4: Schematischer Wandaufbau arterieller Gefäße, modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2012.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lokalisation von thorakalen und abdominalen Aortenaneurysmen und ihre Bezeichnung.....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Cre/LoxP-System, modifiziert nach Pechisker 2004.....	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung des 2D- und M-Modus.....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung der sonographischen Messpunkte an der Aorta	29
Abbildung 9: Beispielhaftes Ergebnis der Genotypisierung von Myh11-CreERT2/Bmp4flox Mäusen .....	34
Abbildung 10: Beispielhaftes Ergebnis der Genotypisierung von Bmper-Mäusen .....	35
Abbildung 11: Ablauf der Proteinquantifizierung von Gewinnung bis zur Detektion mittels Western Blot Verfahren, modifiziert nach Joppien et al 2010 .....	37
Abbildung 12: Exemplarische Aufnahmen nach Entnahme der Aorten .....	47
Abbildung 13: Vergleich der Innendurchmesser des linken Ventrikels von Tag 0 zu Tag 28.....	49
Abbildung 14: Vergleich der Auswurfraction und Verkürzungsfraction von Tag 0 zu Tag 28.....	50
Abbildung 15: Vergleich der Aortendurchmesser von Tag 0 zu Tag 28.....	51
Abbildung 16: Beurteilung histomorphologischer Veränderungen der Mausearten anhand ihrer Autofluoreszenz .....	53
Abbildung 17: Übersichtsdarstellung von Aorten gefärbt mit der Elastica-Färbung nach van Gieson in 100facher Vergrößerung.....	54
Abbildung 18: Elastica-Färbung nach van Gieson in 400facher Vergrößerung .....	55
Abbildung 19: Quantifizierung der rupturierten elastischen <i>Laminae</i> im Aortenquerschnitt .....	56
Abbildung 20: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Col3A1 – Antikörper im Aortenbogen .....	57
Abbildung 21: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Col1A1 – Antikörper im Aortenbogen .....	58
Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von Mmp2 in der thorakalen Aorta.....	59
Abbildung 23: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Mmp2 – Antikörper im Aortenbogen .....	60
Abbildung 24: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Mmp9 – Antikörper im Aortenbogen .....	61
Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahmen des <i>in-Situ</i> -Zymogen-Assays im Aortenbogen.....	63
Abbildung 26: Relative mRNA- und Proteinexpression von $\alpha$ -Sma im thorakalen Aortengewebe.....	64
Abbildung 27: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit $\alpha$ -Sma Antikörper im Aortenbogen	65
Abbildung 28: Relative Proteinexpression von Myh11 im Aortenbogen.....	66
Abbildung 29: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Myh11 Antikörper im Aortenbogen	67
Abbildung 30: TUNEL-Assay zur Bestimmung der apoptotischen Zellen in der thorakalen Aorta.....	69
Abbildung 31: Quantifizierung der Apoptosevorgänge in der TUNEL-Färbung.....	70
Abbildung 32: Relative Proteinexpression von Bmp4 im Aortenbogen .....	71
Abbildung 33: Relative Proteinexpression von Smad und P-Smad im Aortenbogen .....	72
Abbildung 34: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Id1 Antikörper zur Beurteilung der Expression in der <i>Tunica media</i> und Endothel der thorakalen Aorta .....	73

Abbildung 35: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Id1 Antikörper zur Beurteilung der Expression in der <i>Tunica adventitia</i> der thorakalen Aorta.....	74
Abbildung 36: PLS-DA Auswertung der Proteomanalyse aus Aortenbogenlysaten.....	75
Abbildung 37: <i>Gene Ontology</i> klassifizierte Auswertung des Proteomscreens der Wt NaCl vs. Bmper <sup>+d</sup> Mäuse.....	76
Abbildung 38: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Biglykan-Antikörper im Aortenbogen.....	77
Abbildung 39: Relative Proteinexpression von Biglykan im Aortenbogen.....	78
Abbildung 40: Vergleich der Innendurchmesser des linken Ventrikels von Tag 0 zu Tag 28.....	80
Abbildung 41: Vergleich der Auswurfraction und Verkürzungsfraction von Tag 0 zu Tag 28.....	81
Abbildung 42: Vergleich der Aortendurchmesser von Tag 0 zu Tag 28.....	82
Abbildung 43: Relative mRNA- und Proteinexpression von Mmp2 im thorakalen Aortengewebe.....	83
Abbildung 44: Relative mRNA- und Proteinexpression von Mmp9 im thorakalen Aortengewebe.....	84
Abbildung 45: Relative mRNA- und Proteinexpression von $\alpha$ -Sma im thorakalen Aortengewebe.....	85
Abbildung 46: Relative Proteinexpression von Myh11 im Aortenbogen.....	86
Abbildung 47: Relative mRNA- und Proteinexpression von Bmp4 im thorakalen Aortengewebe.....	87
Abbildung 48: Relative mRNA-Expression von Id1 im thorakalen Aortengewebe.....	87
Abbildung 49: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Id1 Antikörper der thorakalen Aorta.....	88

## Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten und nicht im Duden aufgeführten Abkürzungen alphabetisch aufgelistet.

<b>Abkürzung</b>	<b>Definition</b>
<b>Bmper<sup>+/-d</sup></b>	heterozygote Bmper-Defizienz
<b>ΔBmp4</b>	Bmp4 Defizienz
<b>AAA</b>	abdominelles Aortenaneurysma
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Akt</b>	Proteinkinase B
<b>Alk</b>	<i>ALK receptor tyrosine kinase</i> (Tyrosinkinase-Rezeptor)
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein-E
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>Aqua dest.</b>	<i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
<b>AngII</b>	Angiotensin II
<b>α-SMA</b>	<i>alpha smooth muscle actin</i>
<b>BGN</b>	Biglykan
<b>BMP</b>	<i>bone morphogenetic protein</i> (Knochenmorphogenetisches Protein)
<b>BMPER</b>	<i>BMP endothelial cell precursor derived regulator</i>
<b>BMPR1 und 2</b>	BMP-Rezeptor 1 und 2
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin (Rinderalbumin)
<b>CAD</b>	<i>coronary artery disease</i> (Koronare Herzkrankheit)
<b>cDNA</b>	<i>complementary cDNA</i> (komplementärere DNA)
<b>cKO</b>	<i>conditioned knockout</i> (konditioneller Knockout)
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>COL1A1</b>	Kollagen Typ 1 alpha 1
<b>COL3A1</b>	Kollagen Typ 3 alpha 1
<b>COPD</b>	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
<b>Cre</b>	<i>cyclization recombination</i>
<b>CV-2</b>	<i>crossveinless-2</i>
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DNA</b>	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribunukleinsäure)
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>DQ Gelatine</b>	<i>dye quenched gelatin</i> (an Gelatine gekoppelter, blockierter Fluoreszenzfarbstoff)
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<b>ECM</b>	<i>extracellular matrix</i> (Extrazellulärematrix)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EF</b>	<i>ejection fraction</i> (Ejektionsfraktion)
<b>ER</b>	<i>estrogen receptor</i> (Östrogenrezeptor)
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>EvG</b>	Elastica-van-Gieson
<b>FBN-1</b>	Fibrillin-1
<b>FS</b>	<i>fractional shortening</i> (fraktionelle Verkürzung)
<b>FITC</b>	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GO</b>	<i>gene ontology</i>
<b>HCL</b>	Chlorwasserstoff; Salzsäure
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<b>ID-1</b>	<i>inhibitor of DNA-binding protein</i>
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>JNK</b>	C-Jun-N-terminale Kinase

<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>LDLR</b>	<i>low density lipoprotein receptor</i>
<b>loxP</b>	<i>locus of crossing over in P1</i>
<b>LVIDd</b>	diastolischer Linksventrikulärer Innendurchmesser
<b>LVIDs</b>	systolischer Linksventrikulärer Innendurchmesser
<b>MAPK</b>	<i>mitogen activated protein kinase</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MMP</b>	Matrixmetalloproteinase
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>MSI</b>	Massenspektrometrie
<b>MT1-MMP</b>	<i>membrane type 1-matrix metalloproteinase</i>
<b>Myh11</b>	<i>smooth muscle myosin heavy chain 1 and 2</i> (auch: SM-MHC)
<b>N</b>	Anzahl
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid (hier 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung)
<b>NF-κB</b>	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>p38</b>	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>PAH</b>	pulmonalarterielle Hypertonie
<b>PASMC</b>	<i>primary pulmonary artery smooth muscle cells</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PLS-DA</b>	<i>partial least squares regression – discriminant analysis</i>
<b>RIPA</b>	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>ROI</b>	<i>region of interest</i>
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SEM</b>	Standardfehler
<b>SMAD</b>	<i>small body size mothers against decapentaplegic</i>
<b>SMC</b>	<i>smooth muscle cell</i> (glatte Muskelzelle)
<b>SMURF</b>	<i>SMAD specific E3 Ubiquitin protein ligase 1</i>
<b>TAA</b>	thorakales Aortenaneurysma
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TBST</b>	<i>tris-buffered saline with Tween 20</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TGF-β</b>	<i>transforming growth factor β</i> (Transformierender Wachstumsfaktor)
<b>TGFβR</b>	<i>transforming growth factor β receptor</i>
<b>TIMP</b>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>TUNEL</b>	<i>Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
<b>VCAM-1</b>	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
<b>vSMC</b>	<i>vascular smooth muscle cell</i> (vaskuläre glatte Muskelzelle)
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>x g</b>	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## Nomenklatur

Zur vereinfachten Darstellung der Herkunft der Proteine und Gene werden diese anhand ihrer Spezies in anderer Schreibweise aufgeführt. Aus dem humanen Organismus stammende Ergebnisse, sowie im Literaturteil zusammengefasste Studien unterschiedlicher Spezies werden großgeschrieben (Beispiel: BMPER).

Beziehen sich die Ergebnisse auf die Maus, so wird das Protein/Gen mit großen Anfangsbuchstaben geschrieben (Beispiel Bmper). Stammen die vorliegenden Daten aus dem Zebrafisch, so wird dies klein und kursiv geschrieben (Beispiel: *bmp**er*). Die Vereinfachung ist angelehnt an die „Guidelines for Formatting Gene and Protein Names“ (Katherine A. 2014).

## 1. Einleitung

In den vergangenen Jahren hat die Forschung gezeigt, dass das Gefäßsystem mehr ist als ein Transportsystem für Sauerstoff und Nährstoffe. Es ist ein feinreguliertes Netzwerk aus Endothelzellen und glatten Muskelzellen (engl. vSMC), die eingebettet in die extrazelluläre Matrix, durch autokrine und parakrine Interaktionen gesteuert werden (Sanchorawala und Keaney 1997, Owens et al. 2004). Kleinste Veränderungen können die Homöostase stören und so zu vermehrter Proliferation, Degeneration oder Destruktion der Gefäßwand führen und zur Genese von Erkrankungen beitragen (Melo et al. 2007, Park-Windhol und D'Amore 2016, Sun et al. 2019). Wie auch in den vergangenen Jahren sind Erkrankungen des Kreislaufsystems mit einem Anteil von 36,2 % (345.274 Verstorbene in Deutschland) an der Spitze der Erkrankungen mit der höchsten Mortalität (Erhebungsjahr 2018) (Statistisches Bundesamt 2020). Nach internationalen Studien erkranken zudem weltweit im Schnitt 6 von 100.000 Menschen jährlich an thorakalen Aortenaneurysmen, die durch ihren meist symptomlosen Verlauf erst in akuten Notfallsituationen diagnostiziert werden (Howard et al. 2013). Durch die vielfältige Genese von Aortenaneurysmen und individuellem Phänotyp der Patienten wird im Erkrankungsfall zwischen den Risiken eines chirurgischen Eingriffs und eines engmaschigen Überwachungsschemas mit eventuell späterer chirurgischer Intervention abgewogen (Goldfinger et al. 2014, Mokashi und Svensson 2019). Trotz intensiver Forschung sind nach wie vor viele Mechanismen, die zur Entstehung von Aortenaneurysmen beitragen, ungeklärt. Die Dringlichkeit der Grundlagenforschung im Bereich der Aortenerkrankungen wird durch einen im Jahr 2019 eingerichteten Sonderforschungsbereich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstrichen (Deutsche Forschungsgemeinschaft 2019). Eine hereditäre Erkrankung, die mit der Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen assoziiert ist, stellt das Loeys-Dietz Syndrom dar. Die degenerativen Prozesse im Aortengewebe sind auf eine Mutation des *transforming growth factor receptor* Typ I oder II (TGFB1 oder TGFB2) zurückzuführen (Goldfinger et al. 2014). Die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie regulieren Signalwege, die mit der Entstehung von Aneurysmen in Zusammenhang gebracht werden und somit auch nach gründlicher Erforschung für die Entwicklung neuer Früherkennungsmethoden und nicht invasiver Therapieansätze genutzt werden könnten (Jones et al. 2009).

## 2. Literaturteil

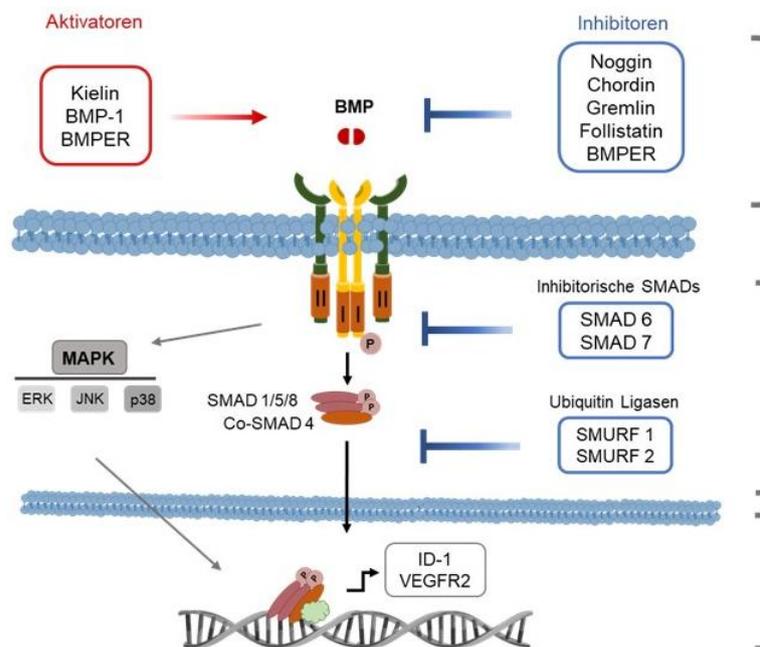
### 2.1. BMPs- *Bone morphogenetic proteins*

*Bone morphogenetic proteins* (BMPs) sind extrazelluläre Glykoproteine. Sie gehören der *transforming growth factor  $\beta$*  Superfamilie (TGF- $\beta$ ) an und wurden ursprünglich 1965 von M.R. Urist entdeckt und wegen ihrer Funktion der Induktion der ektopen Knochen- und Knorpelbildung *bone morphogenetic proteins* benannt (Urist 1965). Im Laufe der Zeit entdeckten Forscher weitere pleiotrope Effekte, die Auswirkungen auf die neuronale Axenbildung und Organogenese während der frühen Embryogenese haben (Sieber et al. 2009), die Gewebshomöostase im adulten Organismus aufrechterhalten und auch für die vaskuläre Funktion unentbehrlich sind (Hiepen et al. 2016). Aufgrund der vielfältigen Funktionen kam es zur Anregung ihren Namen in *body morphogenetic proteins* zu ändern, was jedoch bislang nicht umgesetzt wurde (Wang et al. 2014). Basierend auf ihrer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz und Rezeptoraffinität können die bislang rund 20 bekannten BMPs in Subgruppen unterteilt werden. BMP2 und BMP4 gehören mit einer 83 %igen Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen einer Subgruppe an und binden an den BMP-Rezeptor-Typ 1 und dem zugehörigen Typ 2-Rezeptor (Kawabata 1998, Miyazono et al. 2010, Garcia de Vinuesa et al. 2016). In der Literatur wird BMP4 als mechanosensitives und proinflammatorisches Molekül diskutiert. Ein gestörter Blutfluss erhöht die Expression von BMP4 in Endothelzellen und induziert die gesteigerte Expression von ICAM1 (engl. *intercellular adhesion molecule*) und VCAM1 (engl. *vascular cell adhesion molecule*). Ebenso wird über NADPH-Oxidasen die Menge an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) gesteigert und führt somit zu einem proinflammatorischen Effekt (Sorescu et al. 2003, Sorescu et al. 2004). Während die Stimulation von Endothelzellen mit BMP4 zu einer erhöhten Proliferation und Migration führt, bewirkt es in vSMCs gegenteilige Antwort und fördert somit den kontraktile Phänotyp (Lagna et al. 2007, Garcia de Vinuesa et al. 2016). Dieser zelltypspezifische Effekt kann sowohl bei pulmonalen glatten Muskelzellen als auch bei aortalen glatten Muskelzellen gezeigt werden (Nakaoka et al. 1997, Wong et al. 2003). Die Gruppe um Winnier zeigte bereits 1995, dass homozygot-Bmp4-defiziente Mäuse zwischen Tag 6,5 und 9,5 der Embryonalentwicklung im Mutterleib aufgrund kardiovaskulärer Malformationen und fehlerhafter mesodermaler Differenzierung versterben (Winnier et al. 1995).

#### 2.1.1. Der BMP-Signalweg

BMP-Liganden können als Homo- oder Heterodimere über transmembranäre Typ-1 und -2 Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren. Durch die Bindung des BMP-Glykoproteins an den Typ-2 Rezeptor (BMPR2) kommt es zu einer Phosphorylierung des Typ-1 Rezeptors (BMPR1), welches zu einer Konformationsänderung und somit zur Aktivierung von SMAD oder nicht-SMAD-Signalkaskaden führt (Miyazono et al. 2010). Die Abkürzung SMAD ist eine Kombination aus dem homologen Protein der Taufliege *Drosophila melanogaster* *MAD* (*mothers against decapentaplegic*) und dem SMA-Protein (*small body size*) codierenden Gen des Fadenwurms (*C. elegans*) (Sedlacek 2014). Es gibt 8 bekannte SMAD-Proteine, die in 3 Gruppen unterteilt werden können: *Regulatory-SMADs* (R-SMAD) zu denen SMAD1, 5 und 8 zählen, das *common-partner* SMAD (co-SMAD; SMAD4) und die *inhibitory-SMADs* (I-SMADs), zu denen SMAD6 und 7 gehören. Durch die Konformationsänderung von BMPR1 kommt es zur Phosphorylierung von zwei R-SMADs, welches die Komplexbildung mit SMAD4 ermöglicht. Dieser Komplex ist dann in der Lage in den Nukleus zu translozieren und als Transkriptionsfaktor zu fungieren. I-SMADs können diese Komplexbildung

verhindern und so die Signalkaskade inhibieren. Als Zielgene des BMP-aktivierten SMAD-Signalwegs werden in der Literatur unter anderem ID1 (*inhibitor of DNA binding 1*) und VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor-2*) genannt (Miyazono et al. 2010). Neben I-SMAD können auch E3-Ubiquitin-Ligasen wie SMURF1 und SMURF2 den BMP-Signalweg intrazellulär regulieren (Katagiri und Watabe 2016). Alternativ zum klassischen SMAD-Signalweg kann die Signaltransduktion über MAPKs (*engl. mitogen-activated protein kinases*) aktiviert werden, zu denen ERK (*extracellular-signal regulated kinases*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) und P38 gehören. Diese Kinasen können direkt in den Zellkern translozieren und Signale induzieren, die für die Proliferation und Differenzierung von Zellen wichtig sind (Miyazono et al. 2010). Das BMP-Signal wird extrazellulär durch die direkte Bindung von Antagonisten an BMPs verhindert, zu denen unter anderem Chordin, Noggin, Gremlin und Follistatin zählen. Bei Noggin und Gremlin wird ein negativer Feedbackmechanismus vermutet. Das eng mit Chordin verwandte BMPER (*BMP endothelial cell precursor derived regulator*) hingegen kann sowohl stimulierende als auch inhibierende Wirkung auf den BMP-Signalweg haben (Katagiri und Watabe 2016). Der Signalweg ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

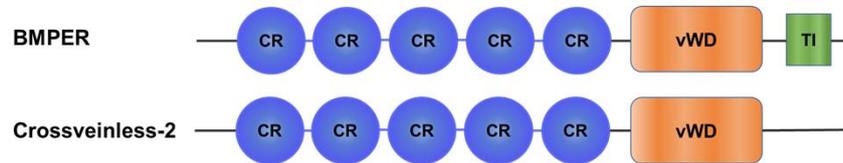


**Abbildung 1: Der BMP-Signalweg, modifiziert nach Katagiri und Watabe (Katagiri und Watabe 2016)**

Durch die Bindung eines BMP-Dimers an die in der Zellmembran verankerten Rezeptoren werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Durch die Phosphorylierung der BMP-Rezeptoren können R-SMADs phosphoryliert werden und einen Komplex mit SMAD4 bilden, welcher dann in den Nukleus translozieren kann und dort die Expression verschiedener Gene induziert. Inhibitorische SMADs und Ubiquitin-Ligasen inhibieren die SMAD-Signalkaskade. Neben der klassischen Signalkaskade können über MAP-Kinasen weitere Genexpressionen gesteuert werden. Die Wirkung von BMPs kann bereits extrazellulär durch Inhibitoren und Aktivatoren moduliert werden. BMPs= *Bone morphogenetic proteins*; I und II= BMP-Rezeptor-Typ-1 und -2; P= phosphoryliert; MAPK: *mitogen-activated protein kinases*; ERK: *extracellular-signal regulated kinases*; JNK: *c-Jun N-terminal kinases*; p38: *p38-mitogen-activated protein kinases*; BMPER: *BMP endothelial cell precursor derived regulator*

### 2.1.2. *Bone Morphogenetic Protein endothelial cell precursor derived regulator* (BMPER)

BMPER ist ein extrazellulär sezerniertes Glykoprotein und stellt das in Vertebraten exprimierte Homolog zu *Crossveinless-2* (CV2) der Drosophila dar. Das Protein besteht aus 5 cysteinreichen Einheiten, einer von-Willebrandt-Faktor D-Domäne und einer Trypsin-Inhibitor-Domäne, durch welche sie sich von CV2 im Aufbau unterscheidet (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Darstellung von BMPER und Crossveinless-2, modifiziert nach Moser et al. (2003)**

Vergleichende schematische Darstellung von „*Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator*“ (BMPER) und dem Homolog aus Drosophila *Crossveinless-2*.

Im Jahr 2003 wurde Bmper durch Moser et al. im Rahmen eines Screenings auf unterschiedlich exprimierte Proteine in embryonalen Endothelvorläuferzellen entdeckt. Durch seine Eigenschaft, BMP2, 4 und 6 durch direkte Bindung zu modulieren und die intrazelluläre Signalkaskade zu inhibieren, wurde es als inhibitorischer Modulator des BMP-Signalwegs der TGF- $\beta$ -Superfamilie zugeordnet (Moser et al. 2003). Spätere Studien zeigen, dass die BMP4 abhängige Phosphorylierung von SMAD1/5 in humanen Endothelzellen nur in Anwesenheit von BMPER stattfinden konnte, jedoch für die Aktivität von BMPER, BMP4 ebenso unerlässlich ist (Heinke et al. 2008). Weitere Versuche unterschiedlicher Gruppen zeigten eine konzentrationsabhängige Wirkung von BMPER auf BMPs (BMP2,-4,-6,-7,-9), welche durch direkte Bindung an die BMPs und den BMPR1 erfolgen kann (Moser et al. 2003, Heinke et al. 2008, Serpe et al. 2008, Kelley et al. 2009, Yao et al. 2012). In hohen Konzentrationen wirkt BMPER inhibitorisch, während niedrige Dosen zu einer Potenzierung des BMP-Signals führen (Heinke et al. 2008). Die Expression von BMPER ist in Endothelzellen von Lunge, Herz und Haut sowie in Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisbar (Heinke et al. 2008, Heinke et al. 2012). Für Endothelzellen konnte eine proangiogene und antiinflammatorische Wirkung von BMPER nachgewiesen werden (Heinke et al. 2008, Dyer et al. 2014). Pi et al setzten Endothelzellen pathologischen Scherkräften aus, es wurde mehr Bmper vom Endothel exprimiert und die inflammatorischen Mediatoren reduziert (Pi et al. 2012). Eine Reduktion von *bmper* im Zebrafischembryo durch Morpholinoinjektion verminderte die Aussprossung intersomitischer Gefäße im kaudalen Gefäßplexus, was zeigt, dass *bmper* für die embryonale Angiogenese unerlässlich ist (Moser et al. 2007). Eine homozygote Bmper-Defizienz führt bei Mäusen zu Fehlbildungen in Knochen, Nieren und Augen und führt durch eine mangelhafte Lungenreife und das Fehlen von trachealen Knorpelspangen zum perinatalen Tod der Jungtiere (Ikeya et al. 2006). In vielen kardiovaskulären Erkrankungen spielt die Veränderung der vSMCs eine tragende Rolle, weshalb in der Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit angefertigt wurde, die Funktion von Bmper auf diese Zellpopulation untersucht wurde. BMPER zeigt in PASMC (*pulmonal artery smooth muscle cells*, pulmonalarterielle glatte Muskelzellen) eine BMP4-ähnliche Wirkung, indem es den kontraktile Phänotyp fördert und die Migration der Zellen vermindert. Bmper steigert über die Phosphorylierung der eNOS (Helbing et al. 2011) die Produktion von NO und führt zur Relaxation der vSMCs (Heiss et al. 2015). Noch nicht publizierte Daten zeigen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Förderung des kontraktile Phänotyps. Neben der Wirkung auf die vSMCs konnte Bmper eine protektive Funktion in der Atherosklerose zugesprochen werden (Pi et al. 2012). Jones et al zeigten, dass es zu einer erhöhten Expression von Bmper nach Induktion eines thorakalen Aortenaneurysmas gekommen ist (Jones et al. 2008). Weitere, noch nicht publizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe lassen auf die protektive Wirkung im

Aortenaneurysma schließen, da es hier durch die Teildefizienz von Bmp<sub>er</sub> zu einer erhöhten inflammatorischen Komponente und einem vermehrt synthetisierenden vSMC-Typ mit Verlust der glatten-Muskelzellmarker im Aortenaneurysma-Modell gekommen ist (Baur 2015). Dieser Effekt konnte auch in Bezug auf die Neointimabildung nach Carotis-Ligatur gezeigt werden. Somit kann man zur Annahme kommen, dass BMPER nicht nur in der Entwicklung des Blutgefäßsystems eine Rolle spielt, sondern bei seiner Abwesenheit auch die Progression von kardiovaskulären Erkrankungen fördert (Gösele 2019).

## 2.2. Arterielle Blutgefäße

Das kardiovaskuläre Kreislaufsystem transportiert oxygeniertes, nährstoffreiches Blut vom Herzen über die großen Arterien entlang der Arteriolen und Kapillaren in die Peripherie unseres Körpers. Hier findet die Abgabe von Sauerstoff und Nährstoffen in das Interstitium der Zielorgane statt. Sauerstoffarmes Blut gelangt über die nicht kontraktile Venolen und großen Venen wieder in das Herz zurück, wo dieses anschließend im Lungenkreislauf wieder oxygeniert wird. Arterien und Venen unterscheiden sich in Funktion und Aufbau voneinander, weshalb es für die Pathogenese von Aortenaneurysmen wichtig ist, den Aufbau des arteriellen Gefäßtypus näher zu beleuchten (Lüllmann-Rauch 2012).

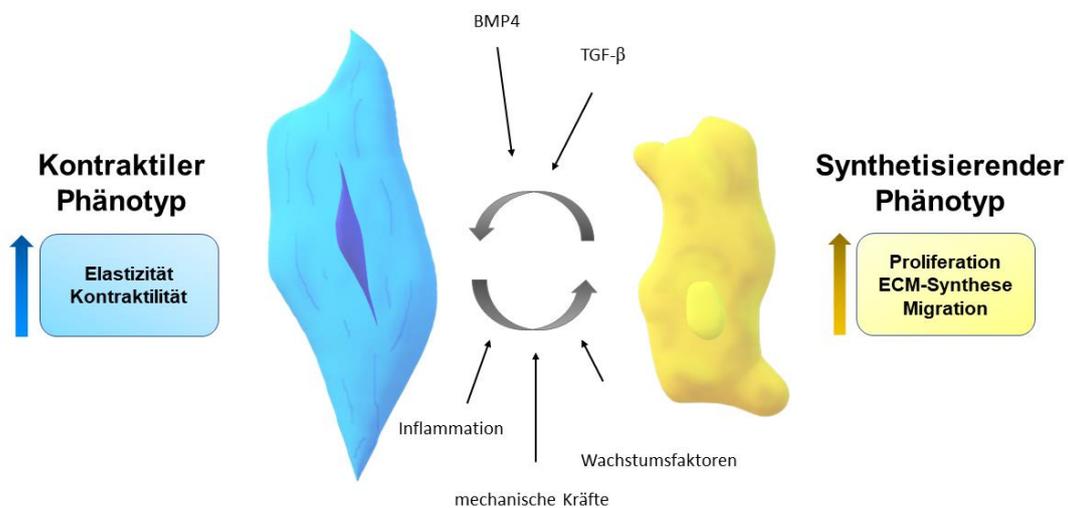
### 2.2.1. Vaskuläre glatte Muskelzellen

Menschen und Tiere besitzen drei Arten von Muskulatur, welche sich in ihrer Funktion und ihrer mikroskopischen Struktur unterscheiden. Glatte Muskelzellen befinden sich in allen Hohlorganen, außer dem Herzen. Sie besitzen im Gegensatz zu der Skelettmuskulatur und der Herzmuskulatur keine Querstreifung und kontrahieren sich durch Reize des vegetativen Nervensystems sowie durch Hormone, Neurotransmitter und andere Botenstoffe. Im Falle der Blutgefäße sitzen die vaskulären glatten Muskelzellen in der *Tunica media* und sorgen für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und Vasotonus, weshalb ihre Schicht in arteriellen Gefäßen kräftiger ist, als in venösen (Lüllmann-Rauch 2012). Die Zellen haben im relaxierten Zustand meist einen spindelförmigen Aufbau, sind 50–400 µm lang, 2–10 µm breit und weisen einen zentralen Nukleus auf. Die kontraktile Eigenschaft der vSMCs wird durch Aktin- und Myosinfilamente im Zytoplasma erreicht. Die Aktinfilamente liegen variabel in der Zelle verteilt und weisen Verdichtungszone, sogenannte *dense bodies*, sowie Verankerungsplaques am Zellrand auf. Mechanisch verknüpft werden die einzelnen Zellen durch Desmosomen und bilden mit Hilfe von elastischen und kollagenen Fasern der extrazellulären Matrix ein festes Netzwerk (Linke und Pfitzer 2011). Sind die vSMCs ausdifferenziert, proliferieren sie nur noch sehr langsam und produzieren wenig extrazelluläre Matrix-Komponenten. Mikrotraumata im Gefäß, Arterogenese oder Umbau der Gefäße erfordern Veränderungen auf zellulärer Ebene, währenddessen der Vasotonus aufrechterhalten werden muss. Über unterschiedliche Signalkaskaden wechseln einige der glatten Muskelzellen zu einem dedifferenzierten, „synthetisierenden“ Zelltyp zurück, der in der Lage ist für die Versorgung des Schadens zu sorgen. In diesem Zustand weisen die Zellen eine rhomboide bis epitheloide Form mit vielen Zellorganellen auf, welche für die Proteinsynthese der benötigten Reparaturstoffe zuständig sind. Dieser Phänotypenwechsel unterscheidet sie stark von terminal differenzierten Skelett- und Herzmuskelzellen und kann im Falle von Verletzungen überlebenswichtig sein (Owens 1995, Rensen et al. 2007, Zhang M. J. et al. 2016).

#### 2.2.1.1. Modulation des vSMC-Phänotyps - Der Phänotypenwechsel

Um die Homöostase im Gefäßgewebe aufrecht zu erhalten und an die stetig wechselnden Bedingungen anzupassen, findet der Phänotypenwechsel statt (Abbildung 3: Phänotypen

glatter Muskelzellen, modifiziert nach Rensen et. al. 2007). Durch die hohe Plastizität können glatte Muskelzellen zusätzliche Funktionen als Reaktion auf bestimmte Reize übernehmen. In einem Spektrum aus proliferierenden, synthetisierenden Phänotypen auf der einen Seite und kontraktile, differenzierten vSMCs auf der anderen Seite existieren noch weitere Zwischenformen, die als Reaktion auf externe Stimuli ihre Funktionalität anpassen können. Die Expression von spezifischen Genen kann durch Reize wie erhöhte mechanische Kräfte, Verletzungen, Inflammation und Wachstumsfaktoren aus der Umgebung angeregt werden und so zur Dedifferenzierung der Zellen führen (Lacolley et al. 2012, Zhang M. J. et al. 2016). Treten diese negativen Reize über einen längeren Zeitraum auf oder werden nicht mehr ausreichend Signale für den kontraktile Phänotyp aufgenommen, so kommt es zu einem Ungleichgewicht (Melo et al. 2007). Dieses Ungleichgewicht resultiert in einer geringeren Kontraktilität und Belastbarkeit des Gefäßes, einer übermäßigen Produktion von Extrazellulärmatrix und einer gesteigerten Produktion von elastolytischen Enzymen, wie den MMPs (Matrixmetalloproteinasen) (Petsophonsakul et al. 2019). Als exemplarische Marker des kontraktile Phänotyps sind  $\alpha$ -SMA (*alpha smooth muscle actin*), MYH11 (*smooth muscle myosin heavy chain*), Smoothelin, SM22- $\alpha$  (Transgelin) und Vinculin zu nennen (Owens 1995). Kommt es zum Verlust dieser Proteine geht dies häufig mit Erhöhungen von Kollagen I und MMPs einher und ist charakteristisch für ein vermehrtes Vorhandensein des synthetisierenden Phänotyps (Petsophonsakul et al. 2019).



**Abbildung 3: Phänotypen glatter Muskelzellen, modifiziert nach Rensen et. al. 2007**

Dargestellt sind links der kontraktile Phänotyp der glatten Muskelzellen und rechts der rhomboide, synthetisierende Typ. Mittig sind die interagierenden Signalreize dargestellt, welche Einfluss auf die Ausprägung des Phänotypen-Switches nehmen. *BMP4* = Bone morphogenetic protein 4; *TGF-β* = Transforming growth factor  $\beta$ ; *ECM* = Extrazellulärmatrix

### 2.2.1.2. Einflüsse des TGF- $\beta$ Signalwegs auf das arterielle Remodeling

Die Einflüsse des TGF- $\beta$  Signalwegs auf den Phänotypenwechsel und somit auch auf den Umbau der Gefäßwand (engl. *arterial remodeling*) sind in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Wirkungsweise des Signalwegs ist sehr komplex und abhängig von seiner Zielzellpopulation, vorliegenden Mediatoren und seiner Konzentration. Durch SMAD und nicht-SMAD-Signalwege wie PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), AKT (Protein-Kinase-B) und

ERK wird eine erhöhte Proliferation und Migration von vSMCs induziert (Shui-Bo Zhu 2015). Für den TGF- $\beta$ -Signalweg ist eine konzentrationsabhängige Wirkung auf das Gewebe beschrieben. Für Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass niedrige Konzentrationen von TGF- $\beta$  einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation und Migration der Zellen haben (Goumans et al. 2002), wohingegen hohe Konzentrationen diesen Effekt inhibieren (Ota et al. 2002, Bobik 2006). Dies konnte nicht nur für Endothelzellen, sondern auch für vSMCs gezeigt werden (Khanna 2004). Als der zugrunde liegende Signalweg bei vSMCs wird die Transduktion über ALK5/ TGFBR-2 diskutiert, welcher über SMAD2/3 sowie die Kinasen P38, MAPK und JNK vermittelt wird. Nimmt man diese Quellen zusammen, so stimuliert TGF- $\beta$  zwar die Produktion von  $\alpha$ -SMA und SM22- $\alpha$ , sorgt aber auch gleichzeitig für eine erhöhte Proliferations- und Migrationsrate sowie eine erhöhte inflammatorische Antwort. Dies würde eher ein Indiz für die Aktivierung des synthetisierenden Phänotyps sein. Die pleiotropen Effekte von TGF- $\beta$  sind abhängig von der Bindung an den TGFBR1 oder 2-Rezeptor auf der Zelloberfläche (Bobik 2006, Goldfinger et al. 2014). Pedroza *et al.* zeigten ganz aktuell, dass in den Aortenproben von Marfan-Patienten ein gemischter vSMC-Typ vorlag, der sowohl erhöhtes Kollagen I zeigte als auch erhöhte kontraktile Marker (Pedroza et al. 2020). Hier wird ein Zusammenhang zwischen dem embryonalen Ursprung der glatten Muskelzellen, einer zeitlichen Komponente des Entwicklungsstadiums und der somit resultierenden Auswirkung des TGF- $\beta$ -Signalwegs auf den Phänotypenswitch vermutet (Sawada et al. 2018, Pedroza et al. 2020). Bei Erkrankungen wie der hereditär hämorrhagischen Teleangiektasie (Cunha et al. 2017), der pulmonal arteriellen Hypertonie (Cai et al. 2012) und dem Loeys-Dietz-Syndrom (Yang et al. 2016) liegt in der Pathogenese ein Mangel einer Komponente des TGF- $\beta$ -Signalwegs zugrunde. Dies würde für eine protektive Eigenschaft auf die vSMCs und auf das Gefäßgewebe sprechen.

Wie in 2.1 (BMPs – *bone morphogenetic proteins*) beschrieben, zählt auch BMP4 zur TGF- $\beta$  Superfamilie. Die zugrunde liegenden Signalwege sind nicht ausreichend geklärt, zumal die Auswirkungen unterschiedlicher BMPs auch gegensätzlich sein können. BMP4 hemmt die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und erhöht gleichzeitig die Expression von vSMC-spezifischen Markern und würde somit einen protektiven Einfluss auf den arteriellen Wandumbau nehmen. Diese Wirkung ist jedoch wie bei TGF- $\beta$  sehr komplex und abhängig vom Gewebetyp und Ursprung, dem Entwicklungsstatus des Gewebes und experimentellen Variablen (Lagna et al. 2007). Neben diesen und anderen Signalwegen ist aber auch eine Induktion des Phänotypenwechsels über Mechanorezeptoren und durch Blutdruckveränderungen ein wichtiger Parameter, der besonders im Hinblick auf die Entstehung von Aortenaneurysmen mit einbezogen werden sollte.

### **2.2.1.3. Einflüsse von Mechanorezeptoren und ANGII-vermitteltem Bluthochdruck auf den Phänotypenwechsel**

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit einer Erhöhung des Blutdruckes einher, welcher unter anderem auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) zurückzuführen ist. Die wichtigste Funktion des RAA-Systems ist die Regulierung der Druck-Volumen-Homöostase in der Niere, welche zur Aufrechterhaltung des Blutdruckes notwendig ist. Durch die Reninproduktion und Freisetzung aus der Niere kann das im Blut befindliche Renin nun Angiotensinogen zu ANGI (Angiotensin-I) umwandeln. ANGI wird dann durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (engl. *angiotensin-converting-enzyme*; ACE) zu ANGII (Angiotensin-II) konvertiert und führt so zu einer Steigerung des Blutdruckes. ACE ist als Oberflächenrezeptor unter anderem auf Endothelzellen zu finden. ANGII aktiviert sowohl den AT<sub>1</sub>- als auch den AT<sub>2</sub>-Rezeptor und führt so zu peripherer Vasokonstriktion, einem Anstieg des Blutdruckes und Herzzeitvolumens. Ebenso führt ANGII über die Synthese von Aldosteron zur Wasserrückresorption in der Niere und somit zusätzlich zur Erhöhung des Blutdruckes. Neben der RAAS-Kaskade kann ANGII auch

lokal synthetisiert werden, so ist unter anderem die Synthese im Herz, der Niere, dem Hirn und auch den peripheren Blutgefäßen bekannt. Bindet ANGII an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor, so wird das Zellwachstum und die Proliferation angeregt, was zu einer erhöhten inflammatorischen Antwort und zu oxidativem Stress für die Zelle führt. ANGII ist als kurzzeitige Exponierung für die schnelle Regulation des Blutdruckes und Blutvolumens, aber auch für den Erhalt physiologischer Prozesse wie der Regeneration nach einer Verletzung wichtig (Atlas 2007). Kommt es zu einer langfristigen und gesteigerten Exponierung des Gefäßgewebes, so führt dies zu einer vermehrten Dedifferenzierung und Proliferation der vSMCs sowie deren Apoptose. Ebenso kann eine gesteigerte Produktion von ECM-Komponenten festgestellt werden. Neben dem direkten Einfluss von ANGII auf die Endothelzellen können auch Druck- und Strömungsänderungen des Blutflusses wiederum die an Mechanorezeptoren gekoppelten Signalwege aktivieren und somit Einfluss auf das Verhalten der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand nehmen (Touyz 2005, Oparil et al. 2018). Unterschiedliche Mediatoren wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO), ROS (*reactive oxygen species*), NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und inflammatorische Zytokine führen über diese Kaskade dann zu einer erhöhten Produktion von ECM und MMPs (Wagenseil und Mecham 2009, Jufri et al. 2015, Leloup et al. 2019).

### 2.2.2. Aufbau arterieller Blutgefäße

Alle arteriellen Blutgefäße besitzen denselben Grundaufbau, unterscheiden sich aber je nach ihrer Lokalisation und Funktion in der Ausprägung der Wandanteile. Der schematische Aufbau von arteriellen Blutgefäßen ist in Abbildung 4 dargestellt. Die innerste Schicht eines Gefäßes wird *Tunica intima* genannt. Sie besteht aus einer Basallamina und den, dem Lumen zugewandten, Endothelzellen. Ihre Aufgaben sind vielfältig, da sie für den Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen in das umliegende Gewebe, aber auch für die Mediation der extrazellulären Proteine, Immunzellen und anderer Botenstoffe im Blut zuständig sind. Die ihr zugehörige *Membrana elastica interna* besteht aus elastischen Fasern und grenzt die *Tunica intima* von der *Tunica media* ab. Die *Tunica media* oder *muscularis* genannt, bildet die Grundlage für die kontraktile Eigenschaft der arteriellen Gefäße. Sie ist eine kräftige und dehnbare Schicht aus glatten Muskelzellen, Kollagen- und Elastinfasern. Ummantelt wird diese Schicht bei herznahen Gefäßen, wie beispielsweise der Aorta, von weiteren elastischen Fasern, der *Membrana elastica externa*. Diese sorgen dafür, dass die Wand dem hohen systolischen Druck des Blutes durch ihre Dehnbarkeit nachgeben kann und dennoch in der Lage ist, einen konstanten Druck aufrecht zu erhalten und das Blut in die umliegenden Areale des Körpers zu pumpen. In herzfernen Arealen besteht die *Tunica media* hauptsächlich aus vaskulären glatten Muskelzellen, die durch ein Wechselspiel aus Kontraktion und Relaxation einen gleichmäßigen Blutdruck aufrechterhalten. Die äußere Wandschicht wird *Tunica adventitia* genannt und besteht hauptsächlich aus Fibroblasten und Kollagenfasern. Diese Schicht sorgt für die Einbettung des Gefäßes in das umliegende Gewebe (Lüllmann-Rauch 2012).

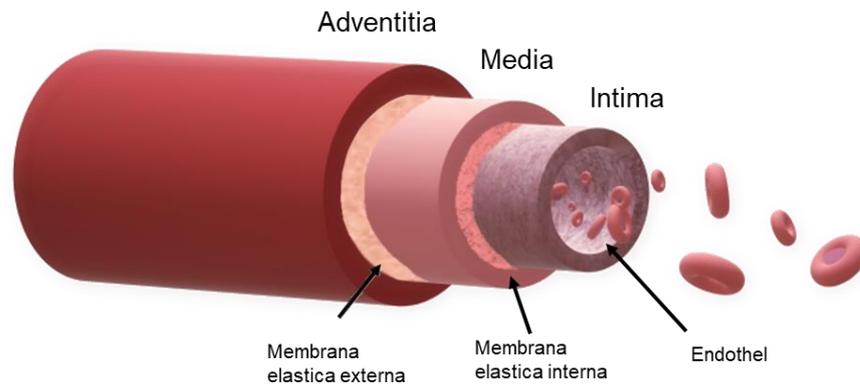


Abbildung 4: Schematischer Wandaufbau arterieller Gefäße, modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2012

### 2.2.3. Die Aorta

Die Hauptschlagader gilt als zentrales Gefäß des Blutkreislaufes, entspringt aus der linken Herzkammer und grenzt sich durch die Aortenklappe von dieser ab. Die Aorta ist das größte arterielle Gefäß des Körpers und hat im humanen Organismus einen Durchmesser von 3,5 cm an ihrer Wurzel und zwischen 2,4 und 3 cm am Aortenbogen bis zum Zwerchfell (Hiratzka et al. 2010). Diese Werte sind alters- und geschlechtsspezifisch anzupassen und variieren je nach Ausprägung der Aortenwand zwischen 0.2 bis 0.4 cm (Goldfinger et al. 2014). Sauerstoffreiches Blut schießt mit hohem Druck aus dem linken Ventrikel in den ascendierenden Teil der Aorta, von welchem das Blut über die kleineren, dem Aortenbogen entspringenden Arterien, im Körper verteilt wird und eine kontinuierliche Versorgung der Organe im proximalen Anteil des Körpers mit Sauerstoff gewährleistet. Vom Aortenbogen aus, fließt das Blut über den thorakalen *Pars descendens* in den distalen Teil des menschlichen Körpers und wird durch das Zwerchfell vom abdominalen Teil abgegrenzt. Aus dem *Pars abdominalis* der Aorta entspringen die arteriellen Blutgefäße, welche für die Versorgung der Bauchorgane und der unteren Extremitäten zuständig sind. Durch die kontraktile Eigenschaften der Aortenwand hält sie den Blutdruck im Körper aufrecht und sorgt somit indirekt für den Abtransport des sauerstoffarmen Blutes, durch die nicht kontraktile Venen, zurück zum Herzen (Lüllmann-Rauch 2012).

### 2.3. Definition und Epidemiologie von Aortenaneurysmen in der Humanmedizin

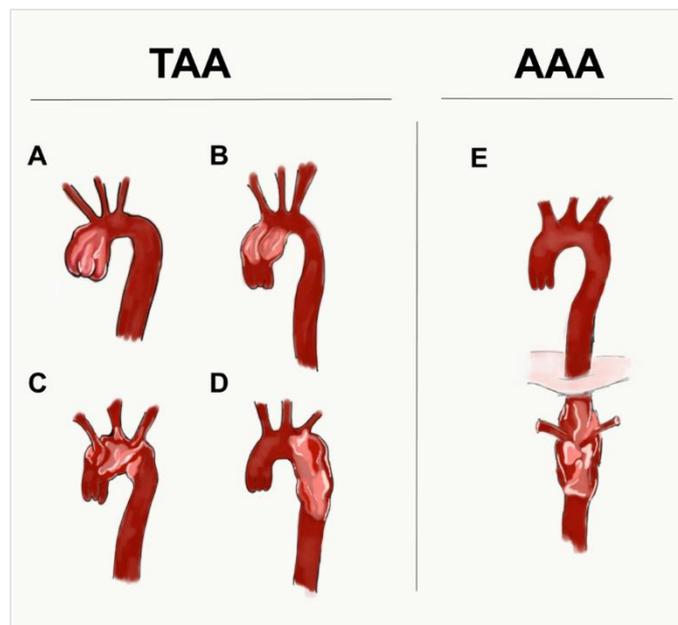
Ein Aortenaneurysma ist *per definitionem* eine permanente, lokal begrenzte Erweiterung des Gefäßdurchmessers der Hauptschlagader um über 50 % (Mokashi und Svensson 2019). Die größte Gefahr für den Patienten entsteht, wenn es zur Ruptur im geschädigten Wandareal kommt – hier spricht man von einer Aortendissektion. Jährlich erkranken etwa 3–6 von 100.000 Menschen an thorakalen Aortenaneurysmen (Olsson et al. 2006, Howard et al. 2013). Der Krankheitsverlauf ist oft symptomlos, was eine frühzeitige Diagnose erschwert. Eine frühzeitig gestellte Diagnose hilft lediglich zur Einschätzung der Progression und zur frühen Reduktion der Risikofaktoren (Pinard et al. 2019), da es zum jetzigen Zeitpunkt keine gezielte Therapie gibt, um eine Retardierung oder sogar Minimierung der Ektasie hervorzurufen (Ruddy et al. 2013). Eine chirurgische Intervention

wird ab einem Durchmesser des betroffenen Aortenabschnitts von 5,5 cm empfohlen, die Entscheidung ist jedoch auf Grundlage der relativen Risiken von chirurgischen Komplikationen, einer Ruptur, Dissektion und dem Tod abzuwägen (Hiratzka et al. 2010, Mokashi und Svensson 2019).

Zu den angeborenen Risikofaktoren zählen Erkrankungen, die meist zu einer Degeneration der medialen Gefäßschicht führen. Hierzu zählt unter anderem das Marfan-Syndrom (Mutation Fibrillin-1, FBN1), das Loeys-Dietz Syndrom (Mutation *transforming growth factor receptor Typ I* oder II (TGFBR1 or TGFBR2)), die vaskuläre Form des Ehlers-Danlos-Syndroms (Mutation Kollagen TypIII (COL3A1)), aber auch Entzündungen der Gefäßwand, Erkrankungen der Bikuspidalklappe und andere familiäre Vorerkrankungen. Durch Hypertension, welche bei 2/3 der Erkrankten diagnostiziert wird, kommt es durch den erhöhten Blutdruck an den Prädilektionsstellen zu einer enormen Belastung der Gefäßwand, die in einer Dilatation, Mikrotraumata, Entzündungsreaktionen und zuletzt einer Dissektion resultieren kann (Goldfinger et al. 2014). Besonders gefährdet sind Männer über 65 Jahre, die durch Faktoren wie Nikotinkonsum, Fettleibigkeit, Diabetes mellitus, bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen und arterieller Hypertonie zur Risikogruppe gezählt werden (Allende-Vigo 2010, Hiratzka et al. 2010, Mokashi und Svensson 2019).

### 2.3.1. Notwendigkeit zur Unterscheidung von thorakalen und abdominellen Aortenaneurysmen

Ist von Aortenaneurysmen die Rede, so können diese am thorakalen Abschnitt der Aorta entstehen (thorakales Aortenaneurysma; TAA) oder im abdominellen Abschnitt (abdominelles Aortenaneurysma; AAA) vorliegen (Abbildung 5). Bauchaortenaneurysmen sind häufiger als TAA und liegen meist in der infrarenalen Region im Abdomen vor. Tritt ein Aneurysma im Thorax auf, so liegt die Wahrscheinlichkeit bei 60 %, dass es die Aortenwurzel oder den aufsteigenden Anteil betrifft. 40 % der TAA liegen im Bereich der absteigenden Aorta und nur 10% direkt am Bogen (Isselbacher 2005).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lokalisation von thorakalen und abdominellen Aortenaneurysmen und ihre Bezeichnung**

**A:** thorakales Aortenaneurysma (TAA) der Aortenwurzel; **B:** TAA am aufsteigenden Anteil der Aorta; **C:** TAA am Aortenbogen; **D:** TAA am absteigenden Anteil; **E:** abdominelles Aortenaneurysma (AAA)

Viele der vorliegenden Studien und tierexperimentellen Versuche begründen ihre Forschung auf Basis von abdominellen Aortenaneurysmen. Um jedoch ein grundlegendes Verständnis für die Entstehung thorakaler Aortenaneurysmen zu erhalten, ist es notwendig, die zugrunde liegenden Unterschiede in der Gefäßphysiologie, Zellbiologie und Gefäßmechanik zu verstehen. Die Pathophysiologie des thorakalen Abschnitts der humanen Aorta unterscheidet sich nicht nur in proteolytischen Profilen und Signalwegen von dem abdominellen Abschnitt, sondern auch in der Empfindlichkeit gegenüber atherosklerotischen Plaques. Gemeinsame Risiken, die zur Pathogenese der Erkrankungen beitragen, sind Fettleibigkeit und Nikotinkonsum, sowie ein erhöhtes Alter und das männliche Geschlecht (Ruddy et al. 2008). In einigen Fällen ist das TAA mit einem atherosklerotischen Plaque assoziiert, jedoch ist die Häufung hier deutlich niedriger als bei Patienten mit AAA. Ebenso erkranken Patienten mit KHK (Koronare Herzkrankheit), COPD (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*) und Diabetes mellitus häufiger an AAA, wohingegen Patienten mit TAA eher an Hypertension leiden und eine höhere genetische Komponente aufweisen (Ito et al. 2008). Die unterschiedliche Pathogenese lässt sich unter anderem aufgrund des embryonalen Ursprungs der Gefäßzellen erklären. Glatte Muskelzellen, welche sich im Aortenbogen ansiedeln, entstehen aus dem kardialen Neuralrohr und sind somit ektodermalen Ursprungs. Der deszendierende Anteil der thorakalen Aorta entstammt mesodermalen Vorläuferzellen, ebenso die abdominelle Aorta (Guo et al. 2006, Ito et al. 2008, Ruddy et al. 2013). Mit dieser ontogenetischen Differenz lässt sich die unterschiedliche Sensitivität auf spezielle Signalwege, mechanische Veränderungen und inflammatorische Mediatoren begründen und auch die zum Teil unterschiedlichen pathologischen Veränderungen erklären.

### **2.3.2. Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen**

Die zuvor beschriebenen hereditären Mutationen und Risikofaktoren sind wichtige Punkte, die zur Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen beitragen. Nicht jedes thorakale Aortenaneurysma kann auf eine dieser Ätiologien zurückverfolgt werden, jedoch helfen die beschriebenen Mutationen die Pathogenese besser zu verstehen und weitere Mediatoren eruieren zu können. Wichtige histopathologische Merkmale die im erkrankten Aortengewebe zu finden sind, sind Anomalien der Zell- und Matrixbestandteile in der Media, die die vSMCs, Elastin und Kollagen sowie Veränderungen in proteolytischen Enzymen einschließen (Tang et al. 2005). Der mediale Abschnitt der Gefäßwand verbreitert sich, es kommt zu einer erhöhten Proliferation von vSMCs, einer morphologischen Veränderung dieser Zellen und einem erhöhten apoptotischen Untergang. Weiterhin kommt es zu einer Destruktion von elastischen Fasern und einer gesteigerten Einlagerung von Mukopolysacchariden, was in der Literatur als zystische Medianekrose oder Degeneration beschrieben ist (Schlatmann und Becker 1977, Ihling et al. 1999, Lesauskaite et al. 2001, Lacolley et al. 2012). Hierbei wird die Beschaffenheit und Anfälligkeit der Wand durch die erhöhte Aktivierung von proteolytischen Enzymen, wie den MMPs (Longo et al. 2002, Theruvath et al. 2012, Belo et al. 2015), Cathepsinen (Jana et al. 2019) und weiteren inflammatorischen Mediatoren nachhaltig verändert (Pisano et al. 2017). Als Folge dieser Veränderungen kommt es zu einer verminderten Kontraktilität der Gefäßwand und einem Verlust der Widerstandsfähigkeit der Aorta und kann so schlimmstenfalls zur Ruptur des betreffenden Wandareals führen (Lesauskaite et al. 2001).

#### **2.3.2.1. Veränderungen der Extrazellulärmatrix und ihr Beitrag zur Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen**

Die Hauptkomponenten der arteriellen ECM setzen sich aus Elastin, Kollagen, Proteoglykanen (PGs) und Glykoproteinen zusammen. Circa 50 % des Trockengewichts größerer Arterien machen die elastischen Fasern und das fibrilläre Kollagen aus, die zudem

fast vollständig die mechanischen Eigenschaften der Aorta definieren (Jana et al. 2019). Elastische Fasern halten die Dehnbarkeit und Rückstoßeigenschaften im Blutgefäß aufrecht, während Kollagene für ihre Zugfestigkeit verantwortlich sind. 80 - 90 % des Gesamtkollagens in der Aorta besteht aus Kollagen Typ I  $\alpha$  1 und Typ III  $\alpha$  1 (COL1A1 und COL3A1) (Berillis 2013). Kollagenmoleküle werden unter anderem von Fibroblasten sezerniert und bestehen aus drei Peptidketten, den  $\alpha$ -Ketten. Diese können sich über kovalente Bindungen quervernetzen und Kollagenfibrillen bilden. Für die Fibrillenbildung müssen zuerst die Propeptide abgespalten werden. Im Anschluss kommt es zu einer von Lysyloxidasen medierten oxidativen Desaminierung, welche schließlich die Quervernetzung induziert. Die Ausrichtung der Fibrillen und das Verhältnis unterschiedlicher Kollagentypen werden durch die Ausrichtung der produzierenden Zellen und die Auswirkung mechanischer Kräfte beeinflusst. Angelagert an die kollagenen Fasern befinden sich Intermediärfilamente wie Biglykan, aber auch Proteoglykane und Glykosaminoglykane, die für die Homöostase und Funktion relevant sind (Lüllmann-Rauch 2012, Tsamis et al. 2013, Jana et al. 2019). Wie bereits beschrieben, kommt es durch den Phänotypenwechsel der vSMCs zu einer erhöhten Produktion von Kollagenen, gleichzeitig kommt es durch die Aktivität von MMPs, zu einem Abbau eben dieser ECM-Komponenten, was in unterschiedlichen Aussagen zur Menge der Kollagene im erkrankten Gewebe resultiert. In einigen Publikationen wird eine Reduktion der Kollagenmenge beschrieben, welche in einer verminderten Widerstandsfähigkeit und somit als prädisponierender Faktor für Aneurysmen anzusehen ist (de Figueiredo Borges et al. 2008). In anderen Studien wiederum konnte eine erhöhte Gesamtmenge an Kollagen gezeigt werden (Whittle et al. 1990, Wang et al. 2006, Berillis 2013). Das Verhältnis zwischen Kollagen Typ I und III scheint hier relevant zu sein, ebenso die strukturellen Veränderungen der Kollageneinlagerung im Gewebe (Vouyouka et al. 2001, Lindeman et al. 2010).

### **2.3.2.2. Matrixmetalloproteinasen und ihr Beitrag zur Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen**

Nicht nur in pathophysiologischen Vorgängen wie beim Aortenaneurysma kommt es zum Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix. Auch für physiologische Vorgänge wie die Wundheilung, in der Schwangerschaft oder während der Embryogenese sind proteolytische Enzyme unabdingbar (Wang und Khalil 2018). Diese enzymatischen Umbauvorgänge werden durch ein Zusammenspiel von Signalkaskaden reguliert, zu denen unter anderem die MMPs und ihre Inhibitoren, die TIMPs (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*), zählen (Nagase et al. 2006, Shen et al. 2015, Wang und Khalil 2018). Matrixmetalloproteinasen sind zinkabhängige Proteasen, die als inaktive Prä-Proenzyme, den sogenannten Zymogenen, sezerniert werden. Insgesamt besteht ihre Familie aus 25 bekannten Mitgliedern, von denen 23 im Menschen zu finden sind. Basierend auf der Organisation ihrer Domäne und des präferierten Substrates werden die MMPs in 5 funktionelle Subgruppen unterteilt. MMP2 und MMP9 gehören zu den Gelatinasen und sind in der Lage ECM-Komponenten, wie beispielsweise Kollagen Typ IV, V und XI, Laminine und Aggrecan aufzuspalten. MMP2 spaltet zusätzlich noch Kollagen Typ I, II und III, ähnlich zu den MMP-Kollagenasen. (Nagase et al. 2006, Wang und Khalil 2018). MMP2 wird konstitutiv durch Fibroblasten und vSMCs produziert (Wall et al. 2003, Wang und Khalil 2018). MMP9 hingegen wird von Neutrophilen sowie Makrophagen sezerniert und nicht konstitutiv von mesenchymalen Zellen produziert. Es benötigt inflammatorische Reize im Gewebe, um die MMP9-Synthese lokaler vSMCs und ECs zu stimulieren (Newman et al. 1994, Longo et al. 2002). Bereits auf transkriptioneller und translationaler Ebene sind MMPs im Gewebe streng reguliert, als posttranslatorischer Regulationsmechanismus sind TIMPs aktiv. Es ist nachgewiesen, dass Aortenzellen konstitutiv TIMP-1 und TIMP-2 produzieren und die größte inhibitorische Wirkung auf MMP9 von TIMP-1 ausgeht. TIMP-2 hingegen kann MMP2 und MMP9 zwar inhibieren, aber über einen Komplex der Membran-Typ 1-MMP (MT1-MMP) die MMP2-Aktivität stimulieren (Xiong et al. 2006). Im TAA konnten

erhöhte MMP2-Level festgestellt werden, wenn der ascendierende Anteil betroffen ist oder die Genese mit atherosklerotischen Plaques assoziiert ist. Eine Hypothese, die die Entstehung von TAAs erklären könnte, wäre eine frühe Aktivierung von MMP2 und eine Induktion des Phänotypenwechsel von aortalen vSMCs, was in einem gesteigerten proteolytischen Genexpressions-Profil resultiert. Durch die inflammatorischen Reize wird die gesteigerte Expression von MMP9 in vSMCs und ECs induziert (Jones et al. 2010, Theruvath et al. 2012). Dies führt zu einer gestörten Homöostase, das Gewebe verliert an Stabilität und Integrität und kann dem erhöhten Blutdruck auf Dauer nicht entgegenwirken. Als Folge kommt es zur Entstehung von Aortenaneurysmen oder Dissektionen (Keeling et al. 2005, Theruvath et al. 2012, Shen et al. 2015).

### 2.3.3. Aortenaneurysmen in der Tiermedizin

Aortendissektionen und Aneurysmen sind seltene Befunde in domestizierten Tierarten, weshalb es nur eine geringe Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen gibt (Scollan und Sisson 2014). Bei Katzen und Hunden wird in den publizierten Fällen häufig eine deutliche Hypertension und Veränderungen am Herzen festgestellt, bei denen eine Erweiterung des Aortendiameters im thorakalen Bereich als Nebenbefund aufgenommen wird (Wey und Atkins 2000, Scollan und Sisson 2014, Acierno et al. 2018). Bei einem Fallbericht eines zehnjährigen Springer-Spaniels mit akuter Paraparese, blutigem Punktat in der Thorako- und Abdominozentese und progredienter Verschlechterung des Allgemeinbefindens konnte in der Echokardiographie unmittelbar hinter der Aortenwurzel eine Dilatation der Aorta und eine Aussackung distal der Erweiterung festgestellt werden. In der Histopathologie konnten defragmentierte und veränderte elastische *Laminae*, sowie basophile Einlagerungen in der ECM festgestellt werden (Waldrop et al. 2003). Durch die immer häufiger auftretenden Fälle von Aortenabrissen bei Springpferden ist der Fokus auf die Pathogenese im Aortenbogen gelenkt worden (Marr et al. 1998, Ploeg et al. 2017). In den Publikationen von Ploeg et al. konnte ein gehäuftes Auftreten von Aortendissektionen und *Fistulae* bei Friesen festgestellt werden, welche in der Histopathologie mit Fibrose im Rupturgewebe, einer Degeneration und Fragmentierung von elastischen Fasern sowie einem erhöhten Anteil von Mukopolysacchariden in der Media einhergehen. Der erhöhte Anteil von mukoiden Ablagerungen in der Media ist vergleichbar mit der beim Menschen auftretenden Mediadegeneration (Ploeg et al. 2013, Ploeg et al. 2017). Bei Rindern wurde eine dem Marfan-Syndrom ähnliche Erkrankung entdeckt, welche aufgrund ihrer homolog im humanen Organismus auftretenden Symptome seinen Namen erhielt: bovines Marfan-Syndrom (Potter und Besser 1994). Die untersuchten Kälber zeigten beispielsweise abnormale Krümmungen der Wirbelsäule, lange und dünne Beine, Aortendilatationen, Mitralklappendefekte und Linsenektopien. In einer Studie aus dem Jahr 2012 konnte auch die genetische Komponente näher bestimmt werden, welche durch die FBN-1-Mutation die Anordnung und Verknüpfung der Mikrofibrillen behindert (Hirano et al. 2012). Zusammenfassend kann man festhalten, dass die meisten vorliegenden Publikationen Fallberichte sind. In der Pathohistologie sind aus der Humanmedizin bekannte Veränderungen zu sehen, wie die erhöhte Destruktion von elastischen *Laminae*, ein Umbau der ECM (Schlatmann und Becker 1977) und Veränderungen der glatten Muskelzellen bis hin zur Mediadegeneration (Ploeg et al. 2013, Ploeg et al. 2017).

### 2.3.4. Induktion von Aortenaneurysmen in der Grundlagenforschung

In den frühen 2000ern etablierten sich in der Forschung drei gängige Mausmodelle zur Induktion von Aortenaneurysmen (Pyo et al. 2000, Longo et al. 2002, Daugherty und Cassis 2004). Die Elastase-Perfusion an der infrarenalen Region der Aorta stellt eine der invasiveren Methoden dar. Die Abdomina der Mäuse werden unter Anästhesie eröffnet, ein definiertes Areal der infrarenalen Aorta kurzzeitig abgebunden und mittels Kanüle ein

Gemisch aus Kochsalzlösung und Typ I Pankreas-Elastase aus dem Schwein injiziert. Eine Dilatation von 50 – 70 % der Region wird bereits in den ersten fünf Minuten der Perfusion erreicht (Pyo et al. 2000). Ein weiteres Modell, bei der initial eine Laparotomie durchgeführt werden muss, ist die periaortale Calcium-Chlorid-Applikation. Hier wird das umliegende Gewebe unterhalb der renalen Blutgefäßabgänge bis zum caudalen Anteil der Aorta, der Aufzweigung der *Arteriae iliacae communes*, gelöst, anschließend mit der Calciumchloridlösung inkubiert, final mit Kochsalzlösung abgespült und das Abdomen der Maus wieder verschlossen (Longo et al. 2002). Die Methode mit der geringsten Invasivität und Manipulation am Aortengewebe selbst stellt die subkutane Applikation von Angiotensin-II dar. Diese Methode kann sowohl zur Induktion von thorakalen als auch von abdominalen Aneurysmen genutzt werden und wird meist mit einer prädisponierenden Mauslinie durchgeführt. Für abdominale Aneurysmen wird hier auf LDLR- (engl. *low density lipoprotein receptor*) oder ApoE- (Apolipoprotein-E) defiziente Mäuse zurückgegriffen, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit sichtbare abdominale Aneurysmen ausbilden. Die mit AngII gefüllten osmotischen Minipumpen werden den narkotisierten Mäusen in die Nackenfalte implantiert und halten je nach Volumen für bis zu 28 Tage (ALZET®; osmotische Pumpen) (Daugherty et al. 2000). Bei der Forschung im Bereich von thorakalen Aortenaneurysmen wird zumeist AngII in Kombination mit einer genetisch modifizierten Mauslinie benutzt, bei der die Defizienzen häufig auf Grundlage bekannter hereditärer Erkrankungen wie dem Marfan-Syndrom (FBN1) und dem Loeys-Dietz-Syndrom (TGFB2) basieren (Daugherty und Powell 2014). Um zelltypspezifische Auswirkungen auf die Entstehung von Aortenaneurysmen gewinnen zu können oder angeborene Einflüsse im Versuchsmodell zu reduzieren, können induzierbare Mausmodelle eingesetzt werden. Diese ermöglichen eine sowohl zeitliche als auch ortsspezifische Deletion von Genen. Ein Beispiel für ein induzierbares Mausmodell mittels Cre/loxP-Rekombinationssystem wird im Verlauf dieser Arbeit beschrieben und genutzt (Hall et al. 2009).

## 2.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Bmper und Bmp4 auf die Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen *in vivo* zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine *in vivo* Mausstudie durchgeführt, bei der Angiotensin-II über eine Erhöhung des Bluthochdruckes zur Induktion von Aortenaneurysmen genutzt wurde. Im ersten Versuchsteil dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Teil-Defizienz von Bmper den synthetisierenden Phänotyp der glatten Muskelzellen begünstigt. Dies konnte in *in vitro* Vorversuchen der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden. Ebenso galt es zu klären, ob es durch die Defizienz von Bmper zu einer Destruktion der Gefäßwand im Modellorganismus kommt und ob bekannte Mediatoren von thorakalen Aortenaneurysmen nachgewiesen werden können.

Der zweite Versuchsteil beschäftigte sich mit der Pathogenese von Aortenaneurysmen nach Depletion von Bmp4 in vSMCs. Ähnlich zu Bmper scheint auch ein Fehlen von Bmp4 in glatten Muskelzellen den synthetisierenden Phänotypen zu begünstigen und die damit einhergehende Inflammation und Destruktion im Gewebe zu fördern. Diese Veränderungen in der Expression der Markerproteine, soll durch die vorliegende Arbeit mit molekularbiologischen Verfahren quantifiziert werden.

### 3. Tiere und Material

#### 3.1. Tiere

Mäuse	Bezugsquelle
C57/BL6-N - BMPER +/- +	Eigene Zucht AG Moser, Freiburg, DE
C57/BL6-N - BMPER +/- -	Eigene Zucht AG Moser, Freiburg, DE
MYH11- CreERT/ BMP4flox	Eigene Zucht AG Moser, Freiburg, DE

Tabelle 1: Tiere

#### 3.2. Geräte und Gebrauchsgegenstände

Geräte und Gebrauchsgegenstände	Hersteller
Aortenscherer	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Axiomager Z	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Bechergläser 100–600 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Bioruptor®	Diagenode s.a., Liège, BE
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad GmbH, München, DE
Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels, 18 Taschen	Bio-Rad GmbH, München, DE
Criterion Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad GmbH, München, DE
Dampfsterilisator Varioklav Typ 500	H+P Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
Dewargefäß	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra, Isernhagen, DE
Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan-2	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Erlenmeyerkolben 100–250 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Färbekasten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Färbeküvetten aus Glas	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Feinscherer	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Flaschen 100–2000 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Gefrierschrank -20 °C Öko super	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
Geldokumentationssystem	Peqlab GmbH, Erlangen, DE
Gelkammern	Bio-Rad GmbH, München, DE
Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Heizblock Thermo-Block TDB-120	A.Hartenstein, Würzburg, DE
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heizblock Thermomixer F1.5	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heizmatte	Trixie Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Tarp, DE
Homogenisatorstempel 1,5ml	neoLab GmbH, Heidelberg, DE
Infrarot-Wärmelampe Sanitas SIL 16	Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, DE
Isofluran- Verdampfer Vapor 19.1	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, DE
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Kryoboxen Rotilabo	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kryostat CM1510S	Leica Microsystems, Wetzlar, DE

<b>Kühlschrank +4 °C Premium</b>	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
<b>Magnetrührer RCT basic</b>	IKA, Staufen, DE
<b>Messzylinder</b>	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
<b>Messzylinder 500–1000 ml</b>	Vitlab GmbH, Großostheim, DE
<b>Mini Trans-Blot Cell</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Mini-Protean Tetra Cell</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Nadelhalter</b>	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
<b>Objektträgerkästen</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<b>Pinzetten, gerade und gebogen</b>	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
<b>Pipettboy Pipetus-akku</b>	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
<b>Pipetten 0,1–1000 µl</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Plattformschüttler Polymax 1040</b>	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
<b>PowerPAC 3000</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Präparatmappe</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<b>Rotilabo-Mini-Zentrifuge</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<b>Rührfische</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<b>S1000 Thermal Cycler</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Schallkopf GE i13L, 10 MHz</b>	GE Vingmed Ultrasound, Horten, NW
<b>Sicherheitsarbeitsplatz WIBObjekt Economy</b>	Weiss GWE GmbH, Hude, DE
<b>Spektrophotometer Nanodrop 2000-C</b>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
<b>Spektrophotometer SpectraMax Plus</b>	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riß, DE
<b>Stereomikroskop Stemi 2000-C</b>	Carl Zeiss AG, Jena, DE
<b>Trans-Blot® Turbo™ Transfer System</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Ultra-Clear Water Purification System</b>	Siemens, Barsbüttel, DE
<b>Ultraschallgerät, GE Vivid 7 Dimension</b>	GE Healthcare, Chicago
<b>Vortexer Genius 3 Vortex</b>	Ika, Staufen, DE
<b>Vortexer Lab Dancer</b>	Ika, Staufen, DE
<b>Vortexer MS2 Minishaker</b>	Ika, Staufen, DE
<b>Waage BP 211 D</b>	Sartorius AG, Göttingen, DE
<b>Waage BP 4100 S</b>	Sartorius AG, Göttingen, DE
<b>Waage Kern EMB 500-1</b>	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
<b>Wärmeschrank</b>	Memmert GmbH, Schwabach, DE
<b>Western Blot Imager ChemiDoc</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Zellkulturbank Clean Air</b>	Clean Air GmbH, Hilden, DE
<b>Zentrifuge Centrifuge 5415D</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Zentrifuge Centrifuge 5417R</b>	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Tabelle 2: Geräte und Gebrauchsgegenstände

### 3.3. Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>„Microseal B“, versiegelnde PCR-Klebefolie</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>96-Well Semi-Skirted PCR Plate</b>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
<b>ALZET Mini-Osmotic Pumps Model 2004</b>	DURECT Corporation, Cupertino, USA
<b>Aquasonic 100 Ultraschallgel</b>	Parker Laboratories, Fairfield, US

<b>Chromatographiepapier Whatman</b>	Schleicher & Schuell/Whatmann, Kent, GB
<b>Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels, 18 Taschen</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Deckgläschen (24 x 60 mm)</b>	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
<b>Durapore™ Rollenpflaster</b>	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
<b>Einbettungsbehälter „Tissue Tek Cryomold“</b>	Sakura Finetek, Staufen, DE
<b>Filterpipettenspitzen „Art Tips“ 1000 µl</b>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
<b>Filterpipettenspitzen „Filter Tips“ 100 µl</b>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
<b>Filterpipettenspitzen „Filter Tips“ 0,1–2 µl</b>	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
<b>Handschuhe „Gentle Skin“</b>	Meditrade, Kiefersfelden, DE
<b>Hard-Shell®96-Well PCR Plate</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Kanülen 20G, 24G, 26G</b>	B. Braun, Melsungen, DE
<b>Kanülen 30G</b>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<b>Küvetten aus Polystyrol</b>	Sarstedt, Nümbrecht, DE
<b>Laemmli Sample Buffer 4fach</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Laufpuffer Tris/Glycine 10fach</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Nair Enthaarungscreme</b>	Church & Dwight Co., Ewing, US
<b>Neopren-Handschuhe</b>	Ansell Healthcare, Brüssel, BE
<b>Nitril-Handschuhe Nitra-Tex</b>	Ansell Healthcare, Brüssel, BE
<b>Nitrozellulose- „Blotting“-Membran</b>	Amersham GE Healthcare Europe, München, DE
<b>Objektträger Super Frost plus</b>	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
<b>Parafilm M</b>	Bemis Packaging Germany, Rheinbach, DE
<b>Pasteur-Plastikpipetten 3 ml</b>	Ratiolab, Dreieich, DE
<b>PCR Single Cap 8er Softstrips 0,2 ml</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisches Oldendorf, DE
<b>PCR Single Cap SoftTubes 0,2 ml</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisches Oldendorf, DE
<b>Pipettenspitzen 10 µl TipOne</b>	Starlab, Hamburg, DE
<b>Pipettenspitzen 100–1000 µl</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
<b>Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml</b>	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
<b>Reaktionsröhrchen 15–50 ml</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
<b>Maiskeimöl</b>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
<b>Skalpell Nr. 10</b>	PFM Medical AG, Köln, DE
<b>Spritzen 1–20 ml</b>	B. Braun, Melsungen, DE
<b>Spritzenvorsatzfilter Acrodisc</b>	Pall GmbH, Dreieich, DE
<b>Stabpipetten 5–25 ml</b>	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
<b>Tissue-Tek O.C.T.</b>	Sakura Finetek, Staufen, DE
<b>Trans-Blot Turbo Midi 0.2 µm PVDF Transfer Packs</b>	Bio-Rad GmbH, München, DE
<b>Tücher Foliodrape</b>	Hartmann, Heidenheim, DE
<b>Wattestäbchen, unsteril</b>	Applied SA, Châtel-St-Denis, CH
<b>Wundnaht 3-0 Mersilene, geflochten</b>	Ethicon, Norderstedt, DE

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

### 3.4. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Acrylamid	Appllichem GmbH, Darmstadt, DE
Agarosepulver	Lonza, Verviers, BE
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE
Bradford-Dye	Bio-Rad GmbH, München, DE
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Chloroform	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
4',6-Diamin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
ECL-Lösungen	GE Healthcare Europe, München, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
Glycerin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Igepal	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
IQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München, DE
Isopropanol/2-Propanol	VWR International, Darmstadt, DE
Magermilchpulver	Bio-Rad GmbH, München, DE
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	VWR International, Darmstadt, DE
Mowiol 4-88	Merck Darmstadt, DE
N-Propyl-Gallat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, DE
Normales Eselserum	Dako Cytomation, Hamburg, DE
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
PBS-Tabletten	Gibco life Technologies, Darmstadt, DE
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Proteinase Inhibitor Cocktail	BD Biosciences, Heidelberg, DE
QIAzol®-Lysereagenz	Qiagen GmbH, Hilden, DE
RNAse away	Molecular BioProducts, San Diego, US-CA
Salzsäure (HCL)	Carl Roth GmbH
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad GmbH, München, DE
Tris Ultra	Appllichem GmbH, Darmstadt, DE
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

### 3.5. Puffer und Lösungen

#### Zellyse

<u>RIPA-Puffer (Stammlösung)</u>	<u>50 ml</u>		
	2,5 ml	Tris-HCl (1 mol/l) (pH 8,0)	
	100 µl	EDTA (0,5 M) (pH 8,0)	
	1,5 ml	NaCl (5 mol/l)	
	5 ml	Igepal 10 %	
	1,25 ml	Natriumdeoxycholat 20 %	
	0,25 ml	SDS 20 %	
	39,4 ml	H <sub>2</sub> O	

#### SDS-PAGE

<u>Trenngelpuffer</u>	<u>200 ml</u>	36,3 g	Trisbase (1,5 mol/l)
		200 ml H <sub>2</sub> O	
		NaOH/HCl zur pH-Einstellung (pH 8,8)	
<u>Sammelgelpuffer</u>	<u>200 ml</u>	12,1 g	Tris-HCl (0,5 mol/l)
		200 ml H <sub>2</sub> O	
		NaOH/HCl zur pH-Einstellung (pH 6,8)	
<u>Ladepuffer</u>			
<u>6 x Stock</u>	<u>7,4 ml</u>	0,5 ml	H <sub>2</sub> O
		1,5 ml	Tris-HCl (0,5 mol/l) (pH 6,8)
		2,4 ml	Glycerin
		2,4 ml	SDS 10 %
		0,6 ml	Bromphenolblau 0,5 %
<u>Gebrauchslösung</u>	<u>100 µl</u>	92,5 µl	Ladepuffer 6 x Stock
		7,5 µl	β-Mercaptoethanol
<u>Laufpuffer</u>			
<u>10 x Stock</u>	<u>1 l</u>	30,25 g	Trisbase
		144,25 g	Glycin
		10 g	SDS
		1 l	H <sub>2</sub> O
<u>Gebrauchslösung</u>	<u>1 l</u>	100 ml Laufpuffer 10 x Stock	
		900 ml H <sub>2</sub> O	
<b>Western Blot</b>			
<u>Transferpuffer</u>			
<u>10 x Stock</u>	<u>1 l</u>	30,25 g	Trisbase
		144,25 g	Glycin
		1 l	H <sub>2</sub> O
<u>Gebrauchslösung</u>	<u>1 l</u>	100 ml Transferpuffer 10 x Stock	
		200 ml Methanol	
		700 ml H <sub>2</sub> O	
<u>TBS Puffer</u>			
<u>10 x Stock pH 7,4</u>	<u>1 l</u>	24,22 g	Trisbase
		87,66 g	NaCl
		1 l	H <sub>2</sub> O
<u>Gebrauchslösung</u>	<u>1 l</u>	100 ml	TBS-Puffer 10 x Stock

(TBST-Puffer)		899,5 ml 500 µl	H <sub>2</sub> O Tween 20
<u>Absättigungslösung</u> (3%)	<u>50 ml</u>	1,5 g 50 ml	Milchpulver TBST-Puffer
<u>PonceauS</u>	<u>100 ml</u>	0,1 g 95 ml 5 ml	PonceauS-Pulver H <sub>2</sub> O Essigsäure
<b>Genotypisierung</b> <b>DNA-Lysepuffer</b> verdünnt	<u>100 ml</u>	10 ml  1 ml 2 ml 4 ml 83 ml	Tris-HCl (1 mol/l) (pH 8,0), 1:10  EDTA (0,5 mol/l) (pH 8,0) SDS 10 % NaCl (5 mol/l) H <sub>2</sub> O
<b>TAE-Puffer</b> <u>50 x Stock</u>	<u>1 l</u>	242 g 57,1 ml 100 ml auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen	Trisbase Essigsäure EDTA (0,5 mol/l) (pH 8,0)
<u>Gebrauchslösung</u>	<u>2 l</u>	40 ml 1960 ml	TAE-Puffer 50 x Stock H <sub>2</sub> O
<b>Ladepuffer</b> <u>Stocklösung</u>	<u>10 ml</u>	25 µl 25 µl 3 ml 6,95 ml	Bromphenolblau Xylene Cyanol FF Glycerin H <sub>2</sub> O
<u>Gebrauchslösung</u>	<u>1 ml</u>	500 µl 500 µl 40 µl	Glycerin H <sub>2</sub> O Stocklösung
<b>Histologie:</b>			
<b>Reaktionspuffer Zymogen-Versuch:</b>			
<u>Stocklösung</u>	<u>50 ml</u>	0,2 mM 5 mM 150 mM 50mM	Natriumazid CaCl <sub>2</sub> NaCl TrisHCl
<u>Gebrauchslösung</u>	<u>10ml</u>	1ml 9ml	Stocklösung H <sub>2</sub> O

### 3.6. Kits

Kits	Hersteller
<b>EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
<b>In Situ Cell Death detection Kit, TMR red</b>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

<b>iScript™ cDNA Synthesis Kit</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>iQ™ SYBR® Green Supermix</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Färbekit: Elastica van Gieson</b>	Morphisto® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, DE
<b>TaqMan universal PCR Master Mix</b>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Tabelle 5: Kits

### 3.7. Primer

#### 3.7.1. Primer: Qualitative Genotypisierungs-PCR

Alle Primer stammen von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, DE)

Bezeichnung		Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur (°C)
<b>BMP4 loxP2</b>	fwd	AGACTCTTTAGTGAGCATTTC AAC (25)	55
	rev	AGCCCAATTTCCACA ACTTC (20)	
<b>Cre 12026</b> <b>Cre 12028</b>	fwd	TGACCCCATCTCTTCACTCC(20)	60
	rev	AGTCCCTCACATCCTCAGGTT (21)	
<b>mCV2down</b> <b>mCV2up</b> <b>pGN1</b>	fwd/rev	AGTCTCCTCCTATGTTTCTTGC (22)	55
	fwd	TCTCTTTGGTGATGCTATTGTT (22)	
	rev	ACCCTCTGTGTCTCCTCTGTTAA (22)	
<b>oIMR 7338</b> <b>oIMR 7339</b>	fwd	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT (24)	60
	rev	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC(25)	

Tabelle 6: Primer Genotypisierung

#### 3.7.2. Primer: Quantitative SybrGreen Realtime-PCR

Alle Primer stammen von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, DE)

Bezeichnung		Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur (°C)
<b>M36B4</b>	fwd	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT (21)	62
	rev	CCGCAGGGGCAGCAGTGGT (19)	
<b>mBMP4</b>	fwd	CACGAAGAACATCTGGAGAAC (21)	58
	rev	CCCTTGAGGTAACGATCGGCT (21)	
<b>mID-1</b>	fwd	CTACGACATGAACGGCTGCTACTC (24)	61,5
	rev	CTTGCTCACTTTGCGGTTCT (20)	
<b>mMMP2</b>	fwd	GCTGGGAGCATGGCGATGGATAC (22)	62
	rev	GGAAGCGGAATGGAACTTC (20)	
<b>mSMA</b>	fwd	CCCAGACATCAGGGAGTAATG (21)	62

	rev	TCTATCGGATACTTCAGCGTC (21)	
--	-----	----------------------------	--

Tabelle 7: Primer SybrGreen

### 3.7.3. Primer: Quantitative Taqman-Realtime-PCR

Bezeichnung	Annealing-Temperatur (°C)	Hersteller
mACTB	62	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
mMMP9	62	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Tabelle 8: Primer Taqman

### 3.8. Marker

Marker	Hersteller
Proteinmarker Precision Plus Protein Dual Color	Bio-Rad GmbH, München, DE
SSL-Marker	Eurogentec, Lüttich, BE

Tabelle 9: Marker

### 3.9. Enzyme und Inhibitoren

Enzyme / Inhibitoren	Hersteller
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
GoTaq® Hot Start Polymerase	Promega GmbH, Walldorf, DE
Phosphatase – Inhibitor	Merck, Darmstadt, DE
Protease - Inhibitor	Merck, Darmstadt, DE
Proteinase-K	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

Tabelle 10: Enzyme/ Inhibitoren

### 3.10. Antikörper

#### 3.10.1. Western Blot

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Actin $\alpha$ -Smooth muscle monoclonal mouse	1 : 5000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Anti- $\alpha$ -Tubulin monoclonal mouse	1 : 5000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Anti-Biglycan polyclonal goat	1 : 1000	Abcam®, Cambridge, UK
Anti-BMP4 polyclonal rabbit	1 : 1000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte DE
Anti-GAPDH polyclonal rabbit	1 : 5000	EnoGene Biotech, New York, US
Anti-Myosin, smooth muscle heavy chain 1 und 2 antibody, monoclonal rabbit	1 : 10000	Abcam®, Cambridge, UK
Anti-MMP2 polyclonal rabbit	1 : 1000	Abcam®, Cambridge, UK
Anti-MMP9 polyclonal rabbit	1 : 1000	Abcam®, Cambridge, UK

<b>Anti- Phospho-SMAD1/5/9 monoclonal rabbit</b>	1 : 1000	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
<b>Anti- SMAD5 polyclonal rabbit</b>	1 : 1000	Cell Signaling Technology, Leiden, NL

Tabelle 11: Primärantikörper Western Blot

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-goat IgG/HRP conjugated</b>	1 : 5000	R&D Systems, Wiesbaden, DE
<b>Anti-mouse IgG/HRP conjugated</b>	1 : 5000	R&D Systems, Wiesbaden, DE
<b>Anti-rabbit IgG/HRP conjugated</b>	1 : 10000	Thermo Scientific, Dreieich, DE

Tabelle 12: Sekundärantikörper Western Blot

### 3.10.2. Histologie

Die Verdünnung der Negativkontrollen ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Primärantikörpers.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-Actin <math>\alpha</math>-Smooth muscle monoclonal mouse FITC conjugated</b>	1 : 300	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, DE
<b>Anti- Biglycan polyclonal goat</b>	1 : 200	Abcam®, Cambridge, UK
<b>Anti-Collagen I polyclonal rabbit</b>	1 : 200	Abcam®, Cambridge, UK
<b>Anti-Collagen III polyclonal rabbit</b>	1 : 200	Abcam®, Cambridge, UK
<b>Anti- ID1 polyclonal rabbit</b>	1 : 100	Abcam®, Cambridge, UK
<b>Anti-Myosin, smooth muscle heavy chain 1 und 2 antibody, monoclonal rabbit</b>	1 : 200	Abcam®, Cambridge, UK
<b>Anti- MMP2 polyclonal rabbit</b>	1 : 200	Abcam®, Cambridge, UK
<b>Anti- MMP9 polyclonal rabbit</b>	1: 100	Abcam®, Cambridge, UK
<b>Negative control goat IgG</b>	-	Dako Cytomation, Hamburg, DE
<b>Negative control mouse IgG2A-FITC</b>	-	Dako Cytomation, Hamburg, DE
<b>Negative control rabbit IgG</b>	-	Dako Cytomation, Hamburg, DE

Tabelle 13: Primärantikörper Histologie

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H+ L)	1 : 500	Invitrogen, Karlsruhe, DE
CF™ 594 rabbit anti-goat IgG (H+L)	1 : 1000	Sigma- Aldrich, Schnelldorf, DE

Tabelle 14: Sekundärantikörper Histologie

### 3.11. Medikamente/ Injektionslösungen

Medikamente/ Injektionslösungen	Hersteller
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
<i>Aqua ad injectabilia</i>	B. Braun, Melsungen, DE
Bepanthen Augen und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE
Carprofen	Injektionslösung Pfizer, Berlin, DE
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

Tabelle 15: Medikamente/ Injektionslösungen

### 3.12. Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems GmbH, München, DE
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems GmbH, München, DE
AxioVision40 Release 4.8.2.0	Carl Zeiss GmbH, Jena, DE
Bio-Rad CFX Manager Version 3.1	Bio-Rad GmbH, München, DE
<i>Gene ontology database</i> (Ashburner et al. 2000, Gene Ontology 2021)	The Gene Ontology, worldwide database
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, La Jolla, US-CA
Image Lab Version 4.0	Bio-Rad GmbH, München, DE
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, US
Zen 3.1 blue edition	Carl Zeiss GmbH, Jena, DE

Tabelle 16: Software

## 4. Methoden

### 4.1. Tierexperimentelle Versuche

Zum 01.02.2018 wurde das Tierversuchsvorhaben mit der Bezeichnung „Die Rolle des BMP Signalwegs in der Entwicklung von Aortenaneurysmen“ gemäß §8 des Tierschutzgesetzes durch das Regierungspräsidium Freiburg genehmigt (Aktenzeichen 35-9185.81 /G-17/123). Die Haltung und Durchführung des Versuchsvorhabens erfolgte in der Versuchstierhaltung CEMT in Freiburg, die Tötung und Organentnahme im kardiologischen Forschungslabor. Die Tiere entstammten aus eigener Zucht. Durch die Gruppenhaltung von zwei bis maximal fünf Tieren in einzelbelüfteten IVC-Käfigen (SealSafe Plus, Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg, DE) mit staubarmem Espeneinstreu (TAPVEI Estonia OÜ, Harjumaa, EST) und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, wurden standardisierte Bedingungen sichergestellt. Der Zugang zu frischem Wasser und Futter (Alleinfuttermittel) war zu jeder Zeit möglich. Ausnahmen zur Gruppenhaltung bildeten Tiere, die sozial unverträglich waren oder aus gesundheitlichen Gründen von der Gruppe isoliert werden mussten. Die Einteilung der Mäuse in die Versuchs- und Kontrollgruppen erfolgte randomisiert. Bei der Durchführung sowie der anschließenden Datenauswertung wurde auf eine Verblindung der versuchsdurchführenden Personen geachtet.

#### 4.1.1. Die C57/BL6-N Bmper Mäuse

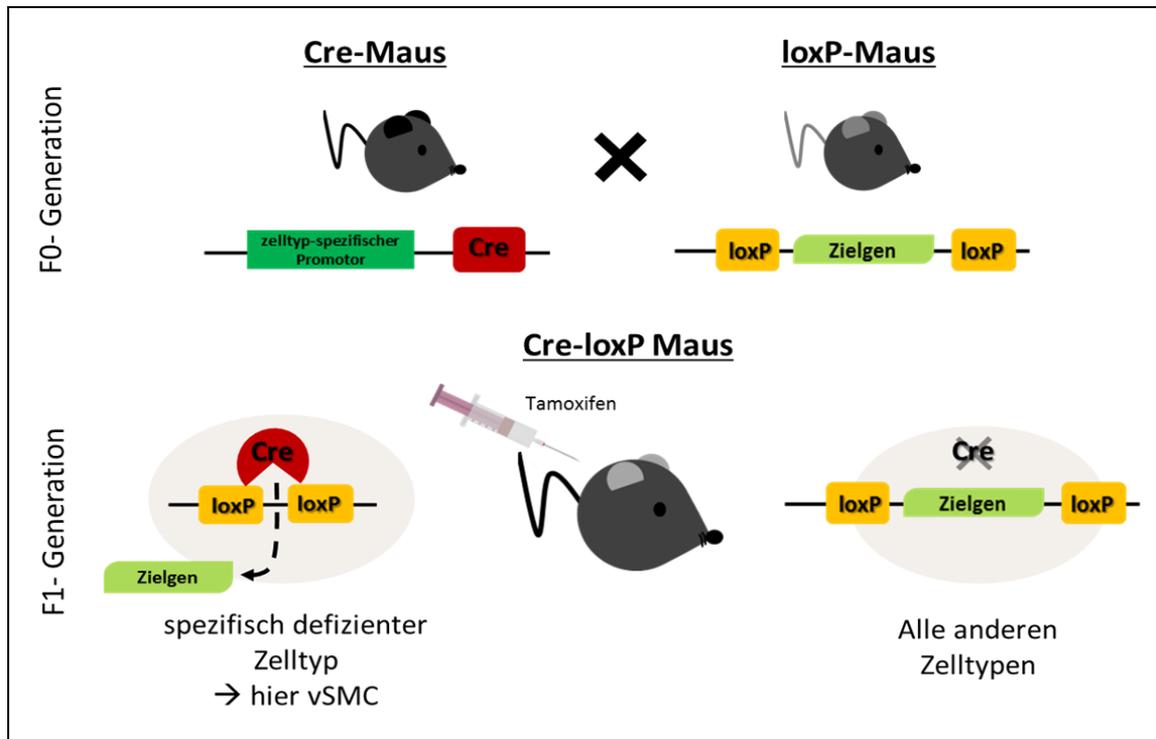
Die Mäuse, die in der Bmper-Linie in die Studie aufgenommen wurden, sind durch Verpaarung von heterozygoten Bmper-Mäusen und Wildtyp-Mäusen der Linie C57BL/6-N entstanden. Homozygote-Mäuse sind nicht erwünscht, da sie perinatal letal sind. Untersuchungen führen diese Letalität vor allem auf die Fehlbildung der trachealen Knorpelspangen und des distalen Lungenabschnittes zurück (Ikeya et al. 2006, Zakin et al. 2008, Kelley et al. 2009).

#### 4.1.2. Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Induzierbare transgene Mausmodelle ermöglichen die Aktivierung oder Entfernung von Genen in spezifischen Zellen und Geweben zu einem festgelegten Zeitpunkt. Cre (engl. *Cyclization recombination*) ist eine Rekombinase mit der Fähigkeit markierte Gensequenzen herauszuschneiden und die entstandenen DNA-Abschnitte wieder zu verbinden. Das Zielgen, welches durch die Rekombinase herausgeschnitten werden soll, muss zuvor durch sogenannte „loxP“-Stellen (engl. *locus of crossing over in P1*) markiert werden. Dieser Vorgang wird in der Literatur als „floxyen“ bezeichnet. Hierfür wird die Cre-Rekombinase-tragende Linie mit einer zweiten „gefloxyten“ Linie gekreuzt, sodass in der F1-Generation das gewünschte Gen herausgeschnitten wird (Pechisker 2004, Friedel et al. 2011).

Eine Defizienz von Genen während der Entwicklung der Mäuse kann zu Folgeschäden in der Entwicklung oder sogar zu einer embryonalen oder postnatalen Letalität führen. Um dies zu umgehen, wird Cre mit einem Ligand-bindenden Östrogenrezeptor (ER) kombiniert. Der Rezeptor spricht aufgrund einer Mutation nicht mehr auf körpereigenes Östrogen an, sondern kann nur noch durch synthetische Östrogene, wie Tamoxifen, aktiviert werden. Neben der planbaren Induktion des „Knockouts“ kann die Cre-Rekombinase durch einen vorgeschalteten spezifischen Promotor auf einen bestimmten Zell- oder Gewebetyp begrenzt werden. Injiziert man den Mäusen nun zu einem festgelegten Zeitpunkt Tamoxifen, kommt es zelltypspezifisch zu einer Aktivierung von Cre, dem Herausschneiden des Zielgens im Nukleus und somit zu einer zell- oder gewebsspezifischen Abschaltung

des Gens (Friedel et al. 2011). Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung des Cre/LoxP-Systems.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Cre/LoxP-System, modifiziert nach Pechischer 2004**

Durch die Verpaarung einer Cre-Maus mit einer loxP-Maus wird in der F1-Generation die Cre-loxP Maus erhalten. Durch Tamoxifeninjektion wird die Cre-Rekombinase in glatten Muskelzellen aktiviert und schneidet dort das Zielgen heraus. In anderen Zellen bleibt die Expression bestehen.

#### 4.1.2.1. Die Myh11-CreERT2/Bmp4flox Mäuse

Für diese Studie wurde mittels des oben erläuterten Rekombinationssystems die Mauslinie Myh11-CreERT2/Bmp4flox erzeugt. Hierfür wurden die Linien BL/6-Tg(Myh11-cre/ERT2)<sup>1Soff</sup> und B6.129BS-Bmp4tm4Blh miteinander verpaart. Durch die Injektion von Tamoxifen kommt es zur Defizienz von Bmp4 in glatten Muskelzellen. Myh11 (*Myosin heavy chain 11*) wird als zelltypspezifischer Promotor der Cre-Rekombinase vorgeschaltet und führt so ausschließlich in glatten Muskelzellen zum „floxen“ des Zielgens Bmp4.

#### 4.1.2.2. Injektion von Tamoxifen

Vor Versuchsbeginn wurde einem Teil der Mäuse im Alter von 15-17 Wochen über einen Zeitraum von fünf Tagen täglich 100 µl in Maiskeimöl gelöstes Tamoxifen (10 mg/ml) intraperitoneal appliziert. Der Beginn des Versuchs startete frühestens zehn Tage nach der letzten Injektion.

#### 4.1.3. Tiermodell zur Induktion von Aortenaneurysmen

Mit einem Alter von 18-20 Wochen wurden die männlichen Mäuse in den Versuch aufgenommen, je nach Linie erfolgte vorab die Applikation von Tamoxifen (siehe 4.1.2.2). Jede Maus in der Versuchstierhaltung wurde nach dem Absetzen mittels Ohrstanze

markiert, der ausgestanzte Gewebsteil wurde zur Genotypisierung genutzt. Vor Versuchsbeginn wurde jedes Tier anhand dieser Genotypisierung einer Versuchsgruppe zugeordnet. Zu Beginn des Versuchs wurden die Tiere gewogen und anschließend in eine Narkosekammer überführt.

#### 4.1.3.1. Anästhesie und Analgesie

Die Narkose erfolgte mittels 5 % Isofluran/ 100 % Sauerstoff (600 ml/min) – Gemisch. Nach der Überprüfung der Narkosetiefe wurde die Maus auf einer Heizmatte positioniert und die Isofluran-Narkose mittels Maske fortgeführt. Abhängig von der Atemfrequenz und dem Bedarf der Maus wurde die Dosis des Isoflurans angepasst (2 – 5 %), der Sauerstofffluss lag nun bei 100 ml/min. Nach GV-SOLAS ist bei einer Monoanästhesie mit Isofluran die chirurgische Toleranz nur unter hohen Dosen erreichbar und führt aufgrund der Kardiotoxizität zu einem niedrigen Blutdruck (GV-SOLAS 2015). Um die chirurgische Toleranz bei niedriger Isoflurandosis zu erreichen, erfolgte eine präemptive Analgesie durch die subkutane Gabe von 100µl Carprofen (5 mg/kg KG). Bei Bedarf erfolgte eine weitere Gabe Carprofen einen Tag post-OP.

#### 4.1.3.2. Vorbereitung der Mäuse für die Echokardiographie

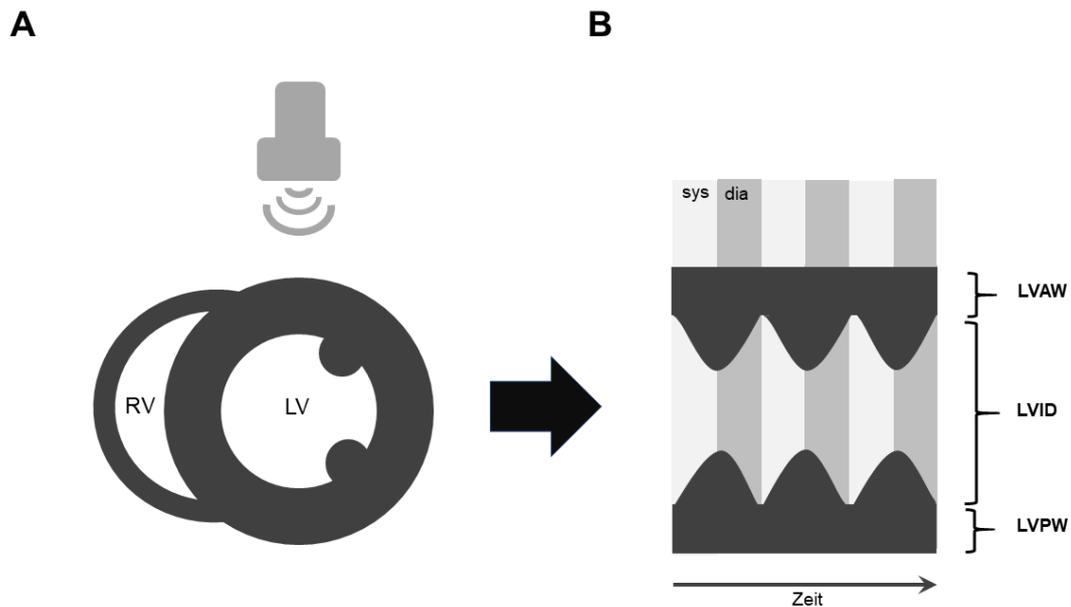
Zur Vermeidung von Hornhautulzera wurden die Augen mit Augensalbe geschützt, das Auskühlen der Tiere wurde durch eine Heizmatte verhindert. Die Tiere wurden für die Echokardiographie auf dem Rücken liegend mit Rollenpflaster vorsichtig an den Extremitäten fixiert und anschließend wurde der Brustbereich, sowie der angrenzende abdominelle Hautbereich mit Enthaarungscreme enthaart.

#### 4.1.3.3. Echokardiographie

Schallwellen mit einer Frequenz zwischen 16 kHz und 1 GHz werden als Ultraschall bezeichnet. In der Medizintechnik werden diese Wellen durch das Anlegen einer elektrischen Wechselspannung erzeugt, die zur Verformung der Keramikelemente im Ultraschallkopf führt. Ankommende Schallwellen, die vom Körpergewebe reflektiert werden, können umgekehrt wieder im Schallkopf mittels eines *Transducers* in elektrische Spannungen umgewandelt werden. Schallwellen können von biologischem Gewebe teils reflektiert oder transmittiert werden. Anhand des umgewandelten Signals können Grenzflächen lokalisiert und rekonstruiert und die Beschaffenheit des Gewebes charakterisiert werden (Schmidt 2004).

Die sonographische Messung wurde mit einem Vivid 7 Dimension-Ultraschallgerät mit i13L Probe-Schallkopf (10 MHz) unter der Verwendung von Ultraschallgel durchgeführt. Die Messungen wurden an Tag 0 und Tag 28 nach Implantation der osmotischen Pumpe durchgeführt.

Zur Evaluation der Herzleistung wurde das Herz im Schall in der links-parasternalen Kurzachse (SAX) angeschnitten und die optimale Position auf Höhe der Papillarmuskeln aufgesucht (Abbildung 7: Schematische Darstellung des 2D- und M-Modus). Stellte sich der linke Ventrikel möglichst rund dar (Schnittebene 90° zum Schallkopf) und waren die Wandseiten gut darstellbar, wurde das Gerät auf Bewegungs-Modus (*Motion-Mode*) eingestellt. Der Cursor wurde auf die Stelle des größten Durchmessers gesetzt, das Anschneiden der Papillarmuskeln war zu vermeiden (Gardin et al. 1995, Kawahara et al. 2005).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des 2D- und M-Modus**

**A:** links-parasternaler Kurzachsenanschnitt des Herzens im 2D-Modus; **B:** Im M-Mode (Bewegungsmodus; engl. *motion-mode*) können Bewegungsmuster von Geweben über ein Ort-Zeit-Diagramm beurteilt werden. Hier dargestellt ist die Wandbewegung des linken Ventrikels. Die linksventrikuläre Vorderwand (LVAW); der Innendurchmesser (LVID) und die linksventrikuläre Hinterwand werden jeweils in der Systole (sys) und Diastole (dia) vermessen.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde eine Herzfrequenz von circa 380 – 480 Schlägen pro Minute angestrebt. Im M-Mode wurden anschließend die Vorderwand (systolisch LVWAs; diastolisch LVAWd), der enddiastolische Innendurchmesser (LVIDd), der endsystolische Innendurchmesser (LVIDs) sowie die Hinterwanddicke (LVPWd; LVPWs) ausgemessen. Aus diesen Werten lassen sich die Ejektionsfraktion (*ejection fraction* = EF) und die Verkürzungsfraktion (*fractional shortening* = FS) berechnen (Tabelle 17: Berechnung der Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion ) (Kawahara et al. 2005).

Parameter	Formel zur Berechnung
EDV ( $\mu\text{l}$ )	$\text{LVIDd}^3$
ESV ( $\mu\text{l}$ )	$\text{LVIDs}^3$
EF (%)	$((\text{LVIDd}^3 - \text{LVIDs}^3) / \text{LVIDd}^3) * 100$
FS (%)	$((\text{LVIDd} - \text{LVIDs}) / \text{LVIDd}) * 100$

**Tabelle 17: Berechnung der Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion (Kawahara et al. 2005)**

EF = Auswurfraction; FS = Verkürzungsfraktion; EDV = Enddiastolisches Volumen; ESV = Endsystolisches Volumen; LVIDd = diastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser; LVIDs = systolischer linksventrikulärer Innendurchmesser

Neben der Bestimmung der Herzleistung wurde die sonographische Messung der Aortendurchmesser an vier definierten Punkten durchgeführt. Diese Messungen sollten Aufschluss über die Dilatation der Aorta und die Entstehung von Aneurysmen im noch lebenden Modellorganismus geben. Die Messpunkte sind wie in der schematischen Grafik (Abbildung 8: Schematische Darstellung der sonographischen Messpunkte an der Aorta) an der *Pars ascendens*, *Pars transversa* auf Höhe der *Arteria carotis communis sinistra*, *Pars descendens* und der *Pars abdominalis aortae* festgelegt. Gemessen wurde bei größtem systolischem Diameter.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der sonographischen Messpunkte an der Aorta**

Die Messpunkte zur sonographischen Evaluation der Aortendilatation liegen, wie in der Grafik dargestellt, an der *Pars ascendens*, *Pars transversa* auf Höhe der *Arteria carotis communis sinistra*, *Pars descendens* und der *Pars abdominalis aortae*.

#### 4.1.3.4. Implantation der Minipumpen

Nach der Echokardiographie wurden die Mäuse auf den Bauch gelegt, fixiert und anschließend die Nackenfalte mittels Skalpell enthaart. Anschließend erfolgte die Desinfektion mit Hilfe von 70 %igem Ethanol. Für die Implantation der osmotischen Minipumpe wurde eine kleine, circa 2 cm lange Inzision gesetzt, mit der Pinzette durch stumpfe Präparation eine Tasche gebildet und die Pumpe subkutan mit der Öffnung von der Inzision abgewandt, hineingeschoben. Durch Einzelknopfnähte mit nicht resorbierbarem Fadenmaterial wurde die Wunde abschließend verschlossen. Die Minipumpen der Firma Alzet® besitzen eine osmotische Schicht, durch die kontinuierlich über 28 Tage eine Menge von 1 µg/kg/min einer Solvens an das Tier abgegeben wird. In der Versuchsgruppe wurde als Wirkstoff Angiotensin-II appliziert, in der Kontrollgruppe wurden die Pumpen mit dem Solvens 0,9 % Natriumchlorid befüllt (Daugherty und Cassis 2004). Post-operativ wurden die Mäuse für die weitere Verlaufskontrolle erneut gewogen. Zum Aufwachen wurden die Tiere in einen separaten Käfig gelegt, der mittels Rotlichtlampe gewärmt wurde. Waren alle Tiere in einem wachen und munteren Zustand, wurden sie wieder in ihre ursprünglichen Käfige und Gruppenverbände zurückgesetzt. Die operierten Tiere wurden zur Evaluation der Belastung einen Tag nach der Operation und danach bis zum terminalen Tag des Versuchs im wöchentlichen Rhythmus gewogen. Die Abbruchkriterien wurden im Versuchsantrag klar definiert und eingehalten, alle Handlungen wurden dokumentiert.

#### 4.1.3.5. Entnahme der Aorten und Organe

Die Organentnahme fand 28 Tage nach der Implantation statt. Vor der Tötung und der Entnahme der Organe wurde *in vivo* nochmals eine Echokardiographie zur Bestimmung der Herzfunktion und der aortalen Durchmesser durchgeführt. Diese sollten Veränderungen in der Herzfunktion und den aortalen Gefäßabschnitten aufzeigen. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Sicherstellung des Todes wurde die Maus in Rückenlage fixiert und mit 70% igem Ethanol benetzt. Vor Eröffnung des Tierkörpers wurde zur erneuten Kontrolle des Genotypes ein Stück der Schwanzspitze entfernt und bei -20 °C bis zur Aufreinigung und PCR- (engl. *polymerase chain reaction*) Durchführung gelagert. Im ersten Schritt wurde die Hautschicht der Maus vom Becken bis zum Sternum mit einem Längsschnitt eröffnet und oberhalb des Brustkorbs bis zum Hals

eingeschnitten. Um ein großes Sichtfeld zu erhalten, wurde die Haut an Thorax und Abdomen zur Seite präpariert und mit Kanülen befestigt. Um ein Verletzen der inneren Organe zu verhindern wurde der Thorax vorsichtig, beidseits unterhalb des Sternums, durch das Durchtrennen der Rippen eröffnet. Anschließend wurden das Mediastinum und die Lunge gelöst und das Sternum seitlich weggeklappt und befestigt. Die Organe mussten für die Folgeversuche weitestgehend blutleer sein. Dafür wurde zuerst die *Vena cava* zwischen *V.portae* und den Nierenabgängen eröffnet, im Anschluss wurde die Maus ausgehend vom linken Ventrikel mit 0,9 %iger-NaCl-Lösung durchspült, bis die Lungenlappen und die Leber eine blutleere Farbe angenommen hatten. Die Lunge, der Thymus sowie die Leber und der Gastrointestinaltrakt wurden entfernt und verworfen. Mittels einer feinen Pinzette und einer Aortenschere wurden unter dem Binokular die Nieren und ihre Abgänge freipräpariert sowie die gesamte Aorta von Fett und umliegendem Gewebe bis zu den Abgängen der *Aa. Iliacae externae* befreit. Eine Niere wurde geteilt und in vorbereitete Reaktionsgefäße für PCR und Western Blot überführt. Diese wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Aorta wurde in Aortenbogen, deszendierenden thorakalen und abdominellen Anteil unterteilt und jeweils für Proteinanalysen und PCR verwendet. Das Herz wurde ebenfalls in drei Anteile zerteilt und in die Reaktionsgefäße gefüllt, die *Basis cordis* wurde in mit Tissue-Tec-O.C.T-Compound-gefüllte Kryoschalen eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Die aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen bestehende Masse wurde später bei unter 10 °C geschnitten. Ebenso wurde die zweite Niere für die Histologie eingebettet. Nach Beenden der Organentnahme wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

## 4.2. Molekularbiologie

### 4.2.1. DNA-Gewinnung aus einer Biopsie von der Maus

Beim Absetzen der Mäuse in der dritten oder vierten Lebenswoche wurde eine Ohrmarkierung angebracht, deren ausgestanztes Gewebestück zur Genotypisierung verwendet wurde. Um eventuelle Fehlerquellen auszuschließen, wurde den Tieren bei der Organentnahme ein circa 2 mm großes Stück der Schwanzspitze entfernt, welches zur Kontrolle des Genotypes verwendet wurde. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Lysispuffer versetzt. Für den Mastermix zur Lysierung der Schwanzspitzen wurden DNA-Lysispuffer 400 µl pro Probe verwendet, sowie je 6 µl Proteinase-K hinzugefügt. Bei der Genotypisierung mittels Ohrstanzprobe wurde eine Menge von 200 µl DNA-Lysispuffer und 3 µl Proteinase-K pro Probe eingesetzt. Im weiteren Verlauf der DNA-Gewinnung werden die Mengen für die Ohrstanzproben in Klammern angegeben.

Nach Zugabe des Mastermix wurden die Proben bei 55 °C und 1000 rpm (engl. *rounds per minute*) über Nacht im Schüttler belassen. Nach circa 12 h wurden die Proben bei 4°C und 15.682 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand von 300 µl (150 µl) wurde mit derselben Menge Isopropanol in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, kurz auf dem Vortex gemischt und anschließend wieder bei 4 °C und 15.682 x g über 20 min zentrifugiert. Es erfolgte eine erneute Abnahme des Überstandes mit der Pipette, sodass nur noch das ausgefällte Zellpellet im Gefäß zurückblieb. Die ausgefällte DNA wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen, auf dem Rüttler erneut aufgelöst und wieder für 10 min bei 15.682 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der entstandene Überstand komplett abgenommen, verworfen und die pelletierte DNA bei 50 °C circa 10 min getrocknet, bis das restliche Ethanol verdampft war. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend in 60 µl (30 µl) Wasser (*aqua ad. inj.*) resuspendiert und für weitere 2 h bei 50 °C und 300 rpm im Heizschüttler geschwenkt.

#### 4.2.2. RNA Isolation aus thorakalen Aortenabschnitten

Zunächst wurden die Gewebestücke auf Eis aufgetaut und in eine Petrischale gegeben, welche sich auf Trockeneis befand. Hier wurden die Aortenstücke mittels Skalpell zerkleinert und anschließend als kleine Stückchen wieder in das Reaktionsgefäß überführt, in das zusätzlich 100 µl QIAzol® Lysis Reagent pipettiert wurde. Mit Hilfe von Druck und Drehbewegungen konnte die Aorta in der Lösung zermahlen werden und die RNA aus den Zellen isoliert werden. Die weiteren Schritte des Protokolls werden im Verlauf tabellarisch aufgeführt, die Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur unter einem Abzug.

Durchführung	Dauer
1. Zugabe von 400 µl QIAzol® Lysis Reagent	
2. Vortexen und Inkubation bei Raumtemperatur	5 min
3. Zugabe von 100 µl Chloroform, dann 15 s vortexen	
4. Inkubation bei Raumtemperatur	10 min
5. Bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren	15 min
6. 1 µl Glykogen in ein neues Reaktionsgefäß	
7. Wässrige Phase mit RNA abnehmen (Menge liegt zwischen 250 und 300 µl)	
8. Fällung von DNA/RNA: Anschließend 250 µl Isopropanol, mehrmals invertieren	
9. Bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren	10 min
10. Überstand abnehmen, ein kleiner Rest darf übrig bleiben	
11. Waschschrift: 500 µl 75 % Ethanol zugeben	
12. Bei 7.500 x g und 4 °C zentrifugieren	5 min
13. Überstand erst mit 1000 µl Pipette abnehmen und dann mit 100 µl Pipette, um das Pellet zu schützen	
14. Pellet über Kopf trocknen lassen	10 min
15. 10 µl Nuklease-freies Wasser hinzugeben und das Pellet resuspendieren	
16. Bei 60 °C inkubieren	10 min
17. Kurz zentrifugieren und 1 µl DNase hinzufügen	
18. DNA-Verdau bei 37 °C	30 min
19. Inaktivierung der DNase: bei 70 °C inkubieren	15 min
20. Die Probe zentrifugieren und bei – 80 °C aufbewahren	

Tabelle 18: Protokoll für die RNA-Isolierung aus Mausartenproben

Sollte im Anschluss an die Gewinnung der RNA der weitere Aufreinigungsschritt erfolgen, dann konnten die Proben sofort in Ammoniumacetat bei -20 °C über Nacht eingefroren werden. Ansonsten konnte dies mit den bei -80 °C gelagerten Proben zu einem beliebigen Zeitpunkt angeschlossen werden.

##### 4.2.2.1. Aufreinigung der gewonnenen RNA

Um die Qualität der RNA zu verbessern und Verunreinigungen durch QIAzol® Lysis Reagent zu reduzieren, wurde im Anschluss an die RNA-Präparation ein Aufreinigungsschritt durchgeführt. Hierzu wurde zu der in 10 µl-Nuklease-freiem Wasser gelösten RNA 1 µl Ammoniumacetat (7,5 M), 27,5 µl 100 %iges Ethanol und 1 µl Glykogen gegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die weiteren Schritte sind folgend tabellarisch aufgelistet (Tabelle 19).

Durchführung		Dauer
1.	bei 20.000 x g und 4 °C wird die Probe zentrifugiert	10 min
2.	Überstand vorsichtig abnehmen	
3.	Waschschritt 600 µl 75 % Ethanol auf das Pellet geben	
4.	Bei 4 °C und 7500 x g zentrifugieren	5 min
5.	Überstand vollständig entfernen und das Pellet trocknen lassen	15 min
6.	10 µl Nuklease-freies Wasser hinzugeben und das Pellet resuspendieren	
7.	Messung der RNA Menge, Lagerung bei -80 °C	∞

Tabelle 19: Protokoll für die Aufreinigung der RNA nach Isolation

#### 4.2.3. Herstellung von cDNA aus RNA

Vor dem Umschreiben der RNA in cDNA (*complementary oder copy DNA*) musste die Konzentration von RNA in der Probe gemessen werden, dies geschah mittels Nanodrop Messung. Dafür wurden die RNA-Isolate auf Eis aufgetaut, auf dem Vortexer durchgemischt und anschließend zentrifugiert. Als Standard wurde 1 µl aus einem Gemisch von 9 µl Nuklease-freiem Wasser und 1 µl Glykogen verwendet, um eine Erhöhung des Messwertes durch das Glykogen aus der Aufreinigung ausschließen zu können. Im Anschluss wurde von jeder Probe die RNA-Menge in 1 µl gemessen. Um die Konzentration der cDNA zu normen, wurde berechnet, wieviel µl der RNA-Probe mit der Menge x RNase-freies-Wasser verdünnt werden muss, um eine Gesamtmenge von 15 µl zu erhalten. Zum Umschreiben wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit verwendet. Hier wurden zuerst 4 µl des *iscript reaction mix* (bestehend aus verschiedenen Reaktionspuffern, dNTPs, Oligo(dT)s und zufälligen Hexamer Primern) zur Probe zugegeben, zum Schluss noch 1 µl der reversen Transkriptase, sodass die Gesamtreaktion 20 µl beinhaltete (Tabelle 20: Herstellung von cDNA). Danach wurden die Proben vor dem Einfrieren bei -20 °C auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt.

Reaktionsschritte	Zeit	Temperatur
Inkubation ( <i>engl. Priming</i> )	5 min	25 °C
Umschreiben RNA zu cDNA (reverse Transkription)	20 min	46 °C
Inaktivierung der reversen Transkriptase	1 min	95 °C

Tabelle 20: Herstellung von cDNA

#### 4.2.4. Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction, PCR*) dient der Vervielfältigung (Amplifikation) bereits kleiner Mengen genetischen Erbguts (DNA), die dann zum Nachweis, zur Untersuchung und Sequenzierung dienen können. Durch Hitze (ca. 92 °C) wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten, dieser Vorgang heißt Denaturierung. Nach einer Temperaturerniedrigung können die hinzugefügten Oligonukleotidsequenzen, auch Primer genannt, an die komplementären Nukleinsäuresequenzen binden (Hybridisierung). Die Primer sollen die zu amplifizierenden Sequenz flankieren und nur zur Vervielfältigung dieses Abschnittes führen. Die Primer sind somit individuell auszuwählen und sollten vor dem eigentlichen Probendurchlauf auf ihr Temperaturoptimum geprüft werden. Heutzutage verwendet man eine thermostabile Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird und im Gegensatz zu ihren Vorgängern nicht durch den Denaturierungsschritt inaktiviert wird. Diese ist in der Lage an das 3' Ende des Primers zu binden und entlang der Matrize (Mutterstrangs) die

dNTPs (2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphate) komplementär anzuheften. Durch die Wiederholung des individuellen Temperaturzyklus erhält man über 1 Millionen Kopien der gewünschten DNA-Sequenz (Saiki et al. 1988, Joppien et al. 2010).

#### 4.2.4.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung von 1,5 % Agarosegel wurden 2,25 g Agarosepulver in 150 ml einfach TAE-Puffer gelöst. Die beiden Komponenten wurden in einem Erlenmeyerkolben bei 800 Watt, 2-3 min in der Mikrowelle aufgekocht. Das Pulver war vollständig gelöst, wenn die Flüssigkeit durchsichtig und frei von größeren Luftblasen war. Unter dem Abzug wurden 7 µl Ethidiumbromid in den Erlenmeyerkolben pipettiert und die Lösung durch Schwenken homogenisiert. Damit wurde eine Gelelektrophoresekammer mittlerer Größe befüllt. Zur Taschenbildung wurden im letzten Schritt Kämme mit entsprechender Kammeranzahl eingesetzt und das Gel für 20 min zum Aushärten unter dem Abzug belassen.

Nach der Aushärtung wurde das Gel in die Laufkammer überführt und dort mit einfach TAE-Puffer übergossen bis die Kammer ausreichend gefüllt war. Um ein Einfallen der Kammern oder deren Füllen mit Luft zu verhindern, wurden erst jetzt die Kämme aus dem Gel entfernt. In jede Geltasche wurden 30 µl PCR-Probe inklusive 5 µl *Loading-dye* (0,25 % Bromophenol blau, 0,25 % Xylocyanol und 30 % Glycerol) pipettiert. Für die Auswertung wurde in die erste und letzte Kammer je 9 µl SSL-Marker pipettiert, dazwischen eine Wasserprobe (25 µl + 5 µl Loading dye), die Positiv- und Negativkontrolle und die auszuwertenden Proben. Die Auftrennung dauert nun bei 150 Volt, 3 Ampere und 300 Watt circa 40 min, wobei die negativgeladene DNA entlang des elektrischen Gradienten Richtung Anode wanderten. Die entstandenen Banden unterschiedlich großer Nukleotidsequenzen konnten durch die Interkalation mit Ethidiumbromid nun unter UV-Belichtung dargestellt, fotografiert und analysiert werden.

##### 4.2.4.1.1. Myh11-CreERT2/Bmp4lox

Die zuvor gereinigten DNA-Proben wurden in der Linie Myh11-CreERT2/Bmp4lox hinsichtlich zweier Genabschnitte analysiert, die in zwei PCR-Durchläufen amplifiziert wurden und anschließend mittels Ethidiumbromid-Gelelektrophorese sichtbar gemacht wurden. Zum Nachweis dieser Genabschnitte wurden 2 unterschiedliche Mastermixe vorbereitet, da jeweils andere Primer für die Detektion genutzt werden müssen.

Für den PCR-Nachweis von Myh11-CreERT2 und Bmp4loxP, ergab sich ein Ansatz von 25 µl pro PCR-Tube. Der Einsatz von Schwanzprobe und Ohrstanze unterschied sich hier lediglich bei BMP4loxP, da hier 5 µl Schwanzisolat und nur 2,5 µl Ohrisolat eingesetzt wurden. Es sollte bei jeder Genotypisierung darauf geachtet werden, dass in jedem Lauf eine Positiv- und eine Negativkontrolle zur Verifizierung vorhanden sind.

PCR Ansatz Myh11-CreERT2		PCR Ansatz Bmp4loxP	
H <sub>2</sub> O	16,375 µl	H <sub>2</sub> O	15,3 µl (17,8 µl)
Reaktionspuffer	2,5 µl	Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	Primer fwd	0,5 µl
Primer 12026	0,5 µl	Primer rev	0,5 µl
Primer 12028	0,5 µl	dNTP <sub>s</sub>	1 µl
Primer fwd oIMR7338	0,5 µl	Taq Polymerase	0,2 µl
Primer rev oIMR7339	0,5 µl	DNA	5 µl (2,5 µl)
dNTP <sub>s</sub>	0,5 µl		

Taq Polymerase	0,125 µl		
DNA	2 µl		

Tabelle 21: Ansatz der Master-Mixe für die Genotypisierungs-PCR von Myh11-CreERT2 und Bmp4loxP

Im Thermocycler wurden nun die Genabschnitte mit den angegebenen Programmzyklen vervielfältigt.

PCR Protokoll Myh11-CreERT2		PCR Protokoll Bmp4loxP	
94 °C	2 min	94 °C	5 min
94 °C	30 sek	94 °C	20 sek
60 °C	30 sek	55 °C	30 sek
72 °C	30 sek	72 °C	1 min
72 °C	3 min	72 °C	4 min
4 °C	∞	4 °C	∞

Tabelle 22: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von Myh11-CreERT2 und Bmp4loxP

Nach der Vervielfältigung der Sequenzen wurden die Proben wie in 4.2.4.1 für die Gelelektrophorese vorbereitet. Nach dem Lauf wurden die Banden mittels Geldokumentationssystem von Peqlab auf dem Gel sichtbar gemacht. Ein beispielhaftes Ergebnis für die Detektion dieser Linie findet sich in Abbildung 9. Als Marker wurde die SmartLadder SF 100 bis 1000 bp (Basenpaare) genutzt. Die vorhergesagte Größe der PCR-Produkte liegt bei Bmp4loxP für Wildtypen bei 180 bp und bei geflochten Mäusen bei 220 bp. Für Myh11-CreERT2 wurde für die Kontrolle eine Bande der Größe 324 bp erwartet, für die rekombinante Linie ist eine zweite Bande auf Höhe von 287 bp zu sehen.

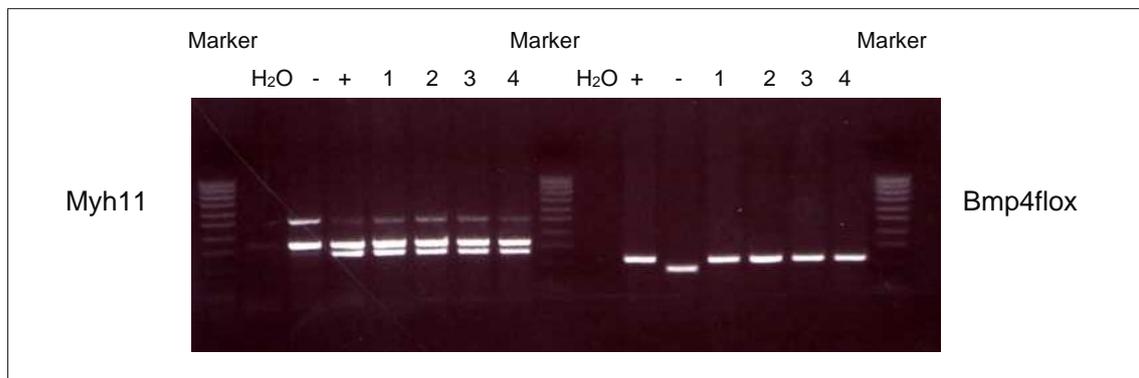


Abbildung 9: Beispielhaftes Ergebnis der Genotypisierung von Myh11-CreERT2/Bmp4lox Mäusen

Genotypisierungs-Banden der Versuchstiere; die Zahlen kennzeichnen die Probennummer  
 Myh11 → Nachweis der Cre-Rekombinase: Die Cre-Rekombinase ist an den Promotor Myh11 gekoppelt, der in dieser Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert wird. + = Positiv-Kontrolle enthält das Cre-Rekombinase (Doppelbande); - = Negativ-Kontrolle ohne Cre-Rekombinase; Myh11: *Myosin-heavy-chain-1*;  
 Bmp4lox → Nachweis der loxP-Sequenz: In diesem Fall wird hier das Bmp4-codierende Gen amplifiziert und dargestellt. + = Positiv-Kontrolle zeigt das zu floxende Gen an; - = Negativ-Kontrolle zeigt an, dass es eine Maus vom Wildtyp ist.

#### 4.2.4.1.2. Bmper-Linie

Die Proben aus der DNA-Isolierung wurden auch hier wieder in ein PCR-Tube vorgelegt, für Schwanzisolate 4 µl und für Ohrisolat 2 µl, die dann durch den Mastermix auf ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz aufgefüllt wurden.

Das Resultat der Genotypisierung waren Wildtypen und heterozygote Genträger, da die Zucht homozygoter Tiere aufgrund von Missbildungen und Letalität nicht erwünscht ist. Es

wurden pro Probe zwei Ansätze pipettiert, die jeweils mit zwei unterschiedlichen Primern amplifiziert wurden. Im ersten Ansatz war das pCV2up und pCV2 down und für den zweiten Ansatz pGN1 und pCV2 (Tabelle 23). Der erste Ansatz detektierte das Bmper-Gen und sollte bei allen Tieren vorhanden sein, der zweite Ansatz diente zum Nachweis der Defizienz des Bmper-Gens durch eingebrachte transgene DNA und war nur bei heterozygot-defizienten Mäusen zu sehen.

PCR Ansatz Bmper		PCR Protokoll Bmper	
H <sub>2</sub> O	16,3 µl (18,3 µl)	94 °C	5 min
Reaktionspuffer y	2,5 µl	94 °C	30 sek
Primer fwd	0,5 µl	55 °C	30 sek
Primer rev	0,5 µl	72 °C	30 sek
dNTP <sub>s</sub>	1 µl	72 °C	7 min
Taq Polymerase	0,2 µl	4 °C	∞
DNA	4 µl (2 µl)		

Tabelle 23: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von Bmper

Nach der Belichtung konnte die Genotypisierung ausgewertet werden. Waren zwei Banden sichtbar war die Maus heterozygot-Bmper-defizient (+/d), war nur bei einer der zwei pipettierten Ansätze eine Bande sichtbar, so handelte es sich um eine Wildtypmaus (WT) (Abbildung 10). Die erwartete Größe der Wildtypbande liegt bei 540 bp, die Bande für die heterozygote Defizienz bei 454 bp. Auch hier wurde die SmartLadder SF 100 bis 1000 bp genutzt.

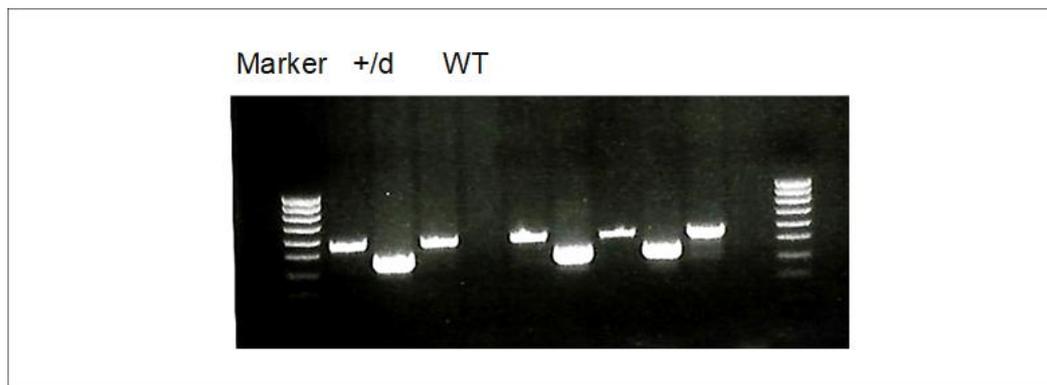


Abbildung 10: Beispielhaftes Ergebnis der Genotypisierung von Bmper-Mäusen

Sind beide Banden sichtbar, so handelt es sich um eine heterozygot Bmper-defiziente Maus. Wird nur eine Bande detektiert, handelt es sich um eine Wildtypmaus. +/d = heterozygot Bmper-defiziente Maus; WT = Wildtyp Maus

#### 4.2.5. Quantitative Real-Time PCR

Dieses Verfahren basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber eine Echtzeit-Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung erfolgt in einem Thermocycler, der in Echtzeit die Fluoreszenz der Proben misst. Mit Hilfe des inaktiven Fluoreszenzfarbstoffs SybrGreen-I, welcher an die entstandene doppelsträngige DNA binden kann, wird das PCR-Produkt quantifiziert. Die Fluoreszenz entsteht erst durch die Interkalation von SybrGreen-I und ist proportional zur Menge der amplifizierten PCR-Produkte. Übersteigt dieses Signal nun die Hintergrundfluoreszenz erstmals signifikant, wird dies als CT-Wert (engl. *cycle threshold*) oder Schwellenwert-Zyklus bezeichnet. Mit diesem Werten kann die unterschiedliche Expression im Verhältnis zu ihrem Referenzgen

(Kontrolle) in der jeweiligen Probe berechnet werden. Die Berechnung erfolgt mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Formel (Livak und Schmittgen 2001).

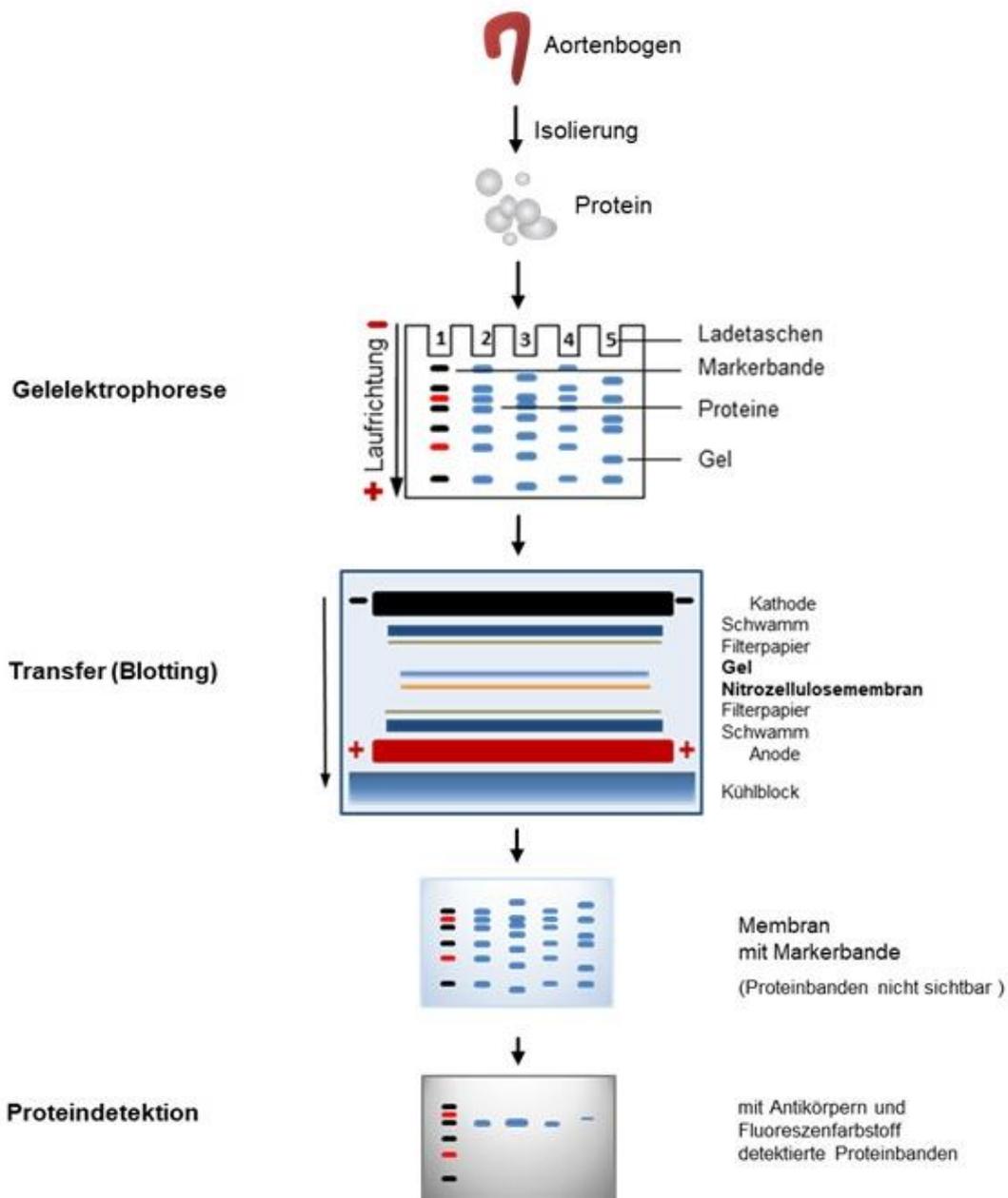
$$\begin{aligned}\Delta C_t (\text{Probe}) &= C_t \text{ Zielgen (Probe)} - C_t \text{ Referenzgen (Probe)} \\ \Delta C_t (\text{Kontrolle}) &= C_t \text{ Zielgen (Kontrolle)} - C_t \text{ Referenzgen (Kontrolle)} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle}) \\ \text{Expression des Zielgens in der Probe} &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$

Im Anschluss an die Amplifikation wird bei SybrGreen eine Schmelzkurve angefertigt, bei der für das Produkt spezifischen Schmelztemperatur. Hierbei spalten sich die Doppelstränge in Einzelstränge auf und SybrGreen wird erneut frei. Ist die gemessene Fluoreszenz nur durch das gewünschte Produkt entstanden, ist hier ein definierter „Peak“ in der Stärke des Fluoreszenzabfalls zu sehen.

Eine spezifischere und sensitivere Methode der Real-Time PCR kann mittels Taqman-PCR durchgeführt werden. Jedes Genexpression-Assay enthält einen spezifischen Primer und eine Sonde. Die Sonde ist am 5' - Ende mit einem Farbstoff markiert, am 3' - Ende befindet sich ein *Minor Groove Binder* (MGB) sowie ein nicht-fluoreszierender *Quencher* (NFQ), welcher das Signal unterdrückt. Nachdem die doppelsträngige cDNA denaturiert wurde, hybridisiert der spezifische Primer und die Sonde am Einzelstrang. Mittels der unmarkierten Primer kann nun die Taq-DNA-Polymerase neue Stränge synthetisieren. Erreicht die Taq-DNA-Polymerase die Sonde, so wird der Fluoreszenzfarbstoff vom *Quencher* getrennt. Am Ende jeder Elongation wird, wie auch bei SybrGreen-I, das entstandene Fluoreszenzsignal gemessen (ThermoFisher 2020). Durch die Kopplung der Sonde an einen anderen Reporterfarbstoff kann sogar das Kontrollgen gleichzeitig mit unserem Zielgen amplifiziert werden. Die Berechnung ist identisch mit dem SybrGreen-Protokoll. Bei der Taqman-PCR ist eine Schmelzkurve aufgrund des inversen Verfahrens, bei der es im Vergleich zur SybrGreen zur Interkalation und während der Schmelzkurve zur erneuten Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes kommt, nicht möglich.

#### 4.2.6. Proteinanalytische Methode

Dieses Verfahren, bestehend aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, dient der Quantifizierung von Proteinen. Im ersten Schritt werden die Proteine aus dem Gewebe lysiert und aufgespalten, dann kommt es mittels Elektrophorese zur vertikalen Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe und zuletzt zum Übertragen (engl. *blotting*) auf eine Trägermembran. Nach dem so genannten Western Blot-Verfahren kann anschließend das Protein mittels Antikörperbindung und durch Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden (Abbildung 11: Ablauf der Proteinquantifizierung von Gewinnung bis zur Detektion mittels Western Blot Verfahren, modifiziert nach Joppin ).



**Abbildung 11: Ablauf der Proteinquantifizierung von Gewinnung bis zur Detektion mittels Western Blot Verfahren, modifiziert nach Joppien et al 2010**

Nach der Proteinisolierung aus den Aortenbögen werden die Taschen des Gels mit einer definierten Menge Lysat gefüllt. Die Proteine werden während des Elektrophoreseverfahrens vertikal nach ihrer Größe (kDa) aufgetrennt. Im Anschluss wird das Gel mit einer Membran in einer Blot-Kassette geschichtet und in die Transferkammer mit Transferpuffer gestellt. Hier wird durch ein elektrisches Feld das Protein horizontal vom Gel auf die Membran transferiert (engl. *Blotting*), dies ist das eigentliche Western Blot-Verfahren. Im letzten Schritt wird ein Primär- und Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper ist an eine Meerrettichperoxydase gekoppelt. Durch Chemilumineszenz werden elektromagnetische Strahlungen im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts emittiert und im Imager durch Aufnahme dokumentiert. Nun kann die Höhe des Proteins anhand des definierten Markers bestimmt werden und die Proteinmenge anhand der Bandengröße und Intensität kalkuliert werden.

#### 4.2.6.1. Proteingewinnung aus Aortenbögen

Zur groben Zerkleinerung der Aorten wurden die auf Eis gelagerten Proben in einer Petrischale mit dem Skalpell bearbeitet und wieder in das ursprüngliche Reaktionsgefäß überführt. Pro Probe wurden 100 µl RIPA-Puffer (RIPA + Proteaseinhibitor (1:200) + Phosphataseinhibitor (1:50)) zu den Aortenstücken hinzugefügt und mit einem elektrischen Homogenisator mechanisch weiter zerkleinert. Die Proben wurden für 20 min bei 4 °C auf einem Schwenktisch inkubiert, bevor sie für 10 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### 4.2.6.2. Proteinquantifizierung mittels Bradford Assay

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Assay genutzt. Der Assay beruht auf der Bindung des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau an die gelösten Proteine und der anschließend stattfindenden Absorptionmessung. Das optimale Absorptionsspektrum des Protein-Farbstoff-Komplexes liegt bei 595 nm, in ungebundener Form liegt die Absorption des rötlichen Farbstoffes bei 470 nm. Für die Herstellung von 1 ml Bradford-Reagenz wurden 200 µl Bradford-dye und 800 µl *Aqua bidest* benötigt.

Um die Proben messen zu können, wurde mit Hilfe von BSA (Bovines Serumalbumin) eine aufsteigende Standardreihe (0 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 10 µg/ml) angefertigt, die zur Erstellung einer Standardkurve diente. Für die 4 Standards wurde je 1 ml Bradfordreagenz sowie 0, 1, 2 oder 5 µl BSA der Konzentration 2 µg/µl in die Messküvetten pipettiert. Für die Bestimmung der Proteinmengen wurden je 1 ml Bradfordreagenz in die Küvetten vorgelegt und 2 µl der Probe zugefügt. Vor dem Messen wurde jede Küvette mit Parafilm bedeckt, einmal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte nach erneutem Invertieren mittels Spektrophotometer bei 595 nm Wellenlänge. Anhand der gemessenen Extinktion konnte die Proteinmenge berechnet werden.

#### 4.2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor dem eigentlichen „Blotten“ der Proteine findet die diskontinuierliche SDS- (engl *sodium dodecyl sulfate*) PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) statt. Diskontinuierlich bedeutet in diesem Fall, dass die Proteine während der Elektrophorese zwei Gele mit unterschiedlichem pH-Wert und Porengröße durchlaufen. Die Proben werden in die Taschen des Sammelgels pipettiert, konzentrieren sich an der Grenzfläche zum Trenngel und anschließend migrieren die durch SDS negativ geladenen Proteine durch das erzeugte elektrische Feld im Trenngel Richtung Anode. Hier ist es wichtig zu wissen, dass kleinere Proteine die Poren des Gels schneller passieren als größere und somit am unteren Pol des Gels zu detektieren sind. Für die Kontrolle der angelegten Spannung, die adäquate Migration der Proteine durch das Gel, sowie für die Kontrolle der später zu interpretierenden Proteingröße in kDA, ist das Pipettieren eines Markerfarbstoffes unerlässlich (Joppien et al. 2010).

Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten mit einem Hohlraum von 1,5 mm Breite in einer Klemmvorrichtung befestigt. Mit einer Stabpipette wurde das zuvor gemischte Trenngel (Tabelle 24) in den Spalt zwischen den Glasplatten eingegeben und vorsichtig mit 70 %igem Ethanol (EtOH) bedeckt. Das Ethanol sorgt für das Verdrängen der entstandenen Gasbläschen und führt zu einer waagerechten, glatten Oberkante. Die Polymerisation dauerte circa 30 min, in dieser Zeit wurden die Proben vorbereitet. War das Gel fest, so wurde das EtOH verworfen und mit destilliertem Wasser mehrfach ausgewaschen. Im

nächsten Schritt wurde das Sammelgel auf die Oberkante pipettiert und ein Trennkamm blasenfrei in das noch flüssige Gel gesetzt. Für eine ausreichende Polymerisation der Komponenten sind vor allem TEMED (Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) unerlässlich, zur Überprüfung der Festigkeit kann der Überschuss im Falcon genutzt werden.

Material	Trenngel 12%	Sammelgel 5%
Wasser	3,5 ml	2,85 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Acrylamid	4 ml	0,85 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
TEMED	14 µl	10 µl
10% APS	100 µl	100 µl

Tabelle 24: Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese

#### 4.2.6.4. Probenvorbereitung

Nachdem die Konzentrationen der jeweiligen Proben bestimmt wurden, wurden diese auf eine definierte vergleichbare Menge in µg genormt. Um eine einheitliche Konzentration in den benötigten 50 µl zu erhalten, wurde der Rest mit RIPA-Puffer aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden 10 µl Ladepuffer pipettiert, der aus β-Mercaptoethanol und *Loading dye* bestand. β-Mercaptoethanol und SDS führen zur Aufspaltung der Disulfidbrücken, die für die typische Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine verantwortlich sind. Für den Denaturierungsvorgang wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt und kurz zentrifugiert, danach waren die Proben zum Beladen der Taschen vorbereitet.

Reagenz	Menge
Proteinprobe	x µl (je nach Proteinkonzentration)
RIPA-Puffer + SDS	50 µl - x
β-Mercaptoethanol	0,75 µl
Loading-Dye	9,25 µl

Tabelle 25: Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Für die Auswertung der Nitrocellulosemembran ist es wichtig einen Marker (*Precision Plus Protein Dual Color Standard*) mitlaufen zu lassen. Er erleichtert die Kontrolle des Elektrophoresefortschrittes und definiert die Masse der in den entstehenden Banden angesammelten Proteinen. In die erste und letzte Tasche des Gels wurden jeweils 7,5 µl des Markers pipettiert. Waren alle Proben in die Taschen geladen worden, wurde der Elektrophoretank mit Laufpuffer bis zur Markierung kurz oberhalb des Gels aufgefüllt. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine lief die Gelelektrophorese für ca. 1,5 bis 2 h bei einer schrittweisen Erhöhung der Spannung auf 150 V.

#### 4.2.6.5. Proteintransfer mittels Western Blot-Verfahren

Nach dem Auftrennen der Proteine folgte der Proteintransfer von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran - dieser Vorgang ist das eigentliche „Blotten“. Bevor das Gel aus der Vorrichtung genommen wurde, wurde das Wet-(Tank-)Blot-System der Firma Bio-Rad vorbereitet. Der Transferpuffer sollte bereits einen Tag vorher angesetzt werden, da dieser auf 4 °C heruntergekühlt werden sollte, um eine zu hohe Temperatur und das Schmelzen des Gels während des Transfers zu verhindern. Die benötigte Membran, sowie Schwämme

und Filterpapier inkubierten für ca. 5 min bei Raumtemperatur im Puffer. Die Glasplatten mit dem Gel wurden aus der Halterung entnommen, die Deckplatte vom Gel gelöst und mit einem Schaber das überschüssige Sammelgel entfernt. Auf einer speziellen Lochplatte (Blotkassette) wurden die eingeweichten Schichten, sowie das gelöste Gel, in vorgegebener Reihenfolge positioniert: Schwamm – Filterpapier – Gel – Membran – Filter – Schwamm. Vor dem Schließen der Lochplatte wurden entstandene Luftblasen zwischen den Schichten nach außen verdrängt, sodass die Nitrozellulosemembran vollen Kontakt zum Gel hatte. Die Kassette wurde in den Transfertank überführt, hier war es wichtig, dass das Gel zur Kathode ausgerichtet wurde und sich die Membran auf Seite der Anode befand. Der Tank wurde mit kaltem Transferpuffer und einem Kühlelement befüllt, die Kammer verschlossen und circa eine Stunde bei 100 V, 400 mA und 400 W laufen gelassen (Joppien et al. 2010).

#### 4.2.6.6. Absättigung der freien Proteinbindungsstellen auf der Membran

Nach dem Transfer wurde die Membran blockiert, um spätere unspezifische Bindungen an freien Proteinen abzusättigen. Um den Erfolg des „Blottens“ und die Menge aller Proteine sichtbar zu machen, kann die Membran wahlweise vor dem Blockieren mit Ponceaurot angefärbt werden. Das Auflichtbild der gefärbten Banden kann als Ladekontrolle bei der Auswertung der spezifischen Banden herangezogen werden. Für das Blockieren wurde die Membran in eine Schale mit 10 ml 3 %iger Magermilch gelegt, welche aus Magermilchpulver und TBST (*Tris-buffered saline with Tween 20*) bestand und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch inkubiert wurde. Nach dem Blockieren wurde die überschüssige Milch abgeschüttet und durch einen in Magermilch verdünnten Primärantikörper ersetzt. Der Primärantikörper wurde bei 4 °C über Nacht auf dem Schwenktisch inkubiert, ein Austrocknen der Membran muss verhindert werden.

#### 4.2.6.7. Proteindetektion

Zur Proteindetektion werden in der Regel zwei verschiedene Antikörper (AK) verwendet. Als Beispiel dient die Ladekontrolle GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Dies ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, welches unabhängig von Zellstatus und -typ immer gleich reguliert ist und sich daher als Proteinstandart nutzen lässt (engl. *Housekeeping gene*). Der primäre Antikörper anti-GAPDH, produziert im Kaninchen, bindet spezifisch an das Protein auf der Membran. Dieser inkubierte über Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C, es folgen Waschschriffe von 3 x 5 min mit TBST. Als Sekundärantikörper wurde in diesem Fall ein anti- Kaninchen-AK gewählt, welcher an das Reporterenzym HRP (engl. *Horseradish peroxidase*; Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Dieser Sekundärantikörper wurde wieder in 10 ml 3%iger Milch verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurde der AK verworfen und die Membran wieder Waschschriffen von 3 x 5 min mit TBST unterzogen. Bevor die Membran belichtet wurde, wurde diese in einer neuen Schale ca. 60 Sekunden lang mit einem ECL (engl. *enhanced chemiluminescence*) -Gemisch überspült. Das Substrat ECL enthält Luminol, welches durch das HRP oxidiert wird und eine Chemilumineszenzreaktion auslöst. Die Membran wurde dann im Analysegerät (ChemiDoc™MP Imaging System, Bio-Rad, DE) je nach Intensität der Banden zwischen 60 s und 15 min belichtet und mehrere Bilder aufgenommen, eine Überbelichtung der Banden kann das Messergebnis verfälschen. Die Auswertung erfolgte mittels Image Lab 4.0 Software von Bio-Rad. Durch die Markerbande konnte die detektierte Bande einer Proteingröße zugeordnet werden, die in diesem Fall 35-37 kDA betrug.

#### 4.2.6.8. Optimierte Methodik zur Proteinbestimmung

Im ersten Versuchsteil, der die Proben der Bmper-Linie betraf, war die Proteinmenge in den Aortenproben gering. Zudem konnten die Membranen aus dem ersten Durchlauf nicht alle miteinander verglichen werden, was eine erneute Elektrophorese nötig machte und zu einem erhöhten Verbrauch der Proben führte. Um eine höhere Proteinmenge zu erhalten wurden die Aortenbögen der zweiten Mauslinie mit RIPA-Puffer in spezielle Reaktionsgefäße mit Kügelchen überführt und 3 x 20 s hochfrequent geschüttelt. Durch das im RIPA-Puffer enthaltene SDS schäumte das Lysat auf, daher war eine kurze Pause auf Eis notwendig. Im nächsten Schritt wurde das Lysat im Reaktionsgefäß in den *Bioruptor* gestellt, der mittels Ultraschall zur weiteren Aufspaltung des Gewebes führte und unerwünschte DNA-Verunreinigungen minimierte. Nach der Proteinquantifizierung und Probenvorbereitung wurden die größeren Criterion-Tanks mit TRIS/Glycine/SDS-Puffer (Firma Biorad) befüllt. Die Proben wurden auf zwei Gele mit 18 Taschen aufgetragen. Hierfür wurden die Gradientengele Criterion™ TGX™ 4 - 15 % genutzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele im Trans-Blot® Turbo™-Transfer System auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) -Membran übertragen. Hierzu wurden die vorbereiteten Transfer-Pakete der Firma Biorad in der Größe Midi verwendet, die Transferzeit betrug 8 min. Dies ermöglichte es, dass alle Proben auf standardisierten Gelen parallel gelaufen sind. Durch die Optimierung konnte zusätzlich mehr Protein aus dem Gewebestück des Aortenbogens gewonnen werden.

#### **4.2.7. Proteom-Array – Kollaboration**

Um neue, weitere regulierte Mediatoren identifizieren und die Wirkungsweise von Bmp4 und Bmper besser verstehen zu können, wurden Aortenbogen-Proben der Mäuse für die Massenspektrometrie (MSI) in Kollaboration mit Prof. Dr. Oliver Schilling, Institut für Klinische Pathologie des Universitätsklinikum Freiburg, analysiert. Hierfür wurden Aortenbogenproben der in dieser Arbeit genutzten Mauslinien nach Induktion der Aortenaneurysmen mittels AngII an die Arbeitsgruppe Schilling übergeben. Nach Durchführung der MSI wurden die Proteom-Daten von Prof. Dr. Schilling mittels MSStatsTMT ausgewertet. Die Gene Ontology Datenbank ermöglicht durch ihre Sammlung an Informationen zu Proteinen und den zugehörigen Signalwegen eine Unterteilung in Gruppen, was die Auswertung der MSI-Daten erleichtert und einen ersten Überblick verschafft. Die GO-Datenbank deckt drei Bereiche ab: „Zelluläre Komponente“, „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“. Jeder dieser Termini ist mit einem Namen, einer Nummer und den damit assoziierten Daten hinterlegt und ordnet die in der MSI-regulierten Proteine diesen Bereichen zu (Ashburner et al. 2000, Gene Ontology 2021). Hat man die übergeordneten Prozesse identifiziert, können einzelne interessante Kandidaten herausgesucht und mittels weiterer Methoden näher untersucht werden, was Teil der vorliegenden Arbeit war.

### **4.3. Histologische Methoden**

#### **4.3.1. Anfertigung von histologischen Schnitten**

Die Aortenschnitte, welche für die histologische Untersuchungen genutzt wurden, wurden in einem früheren Projekt in der Arbeitsgruppe gewonnen, da die von mir gewonnenen Aorten für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendet wurden. Um eine Verminderung der genutzten Versuchstiere zu erreichen, wurde auf eine Gewinnung neuer Aortenproben für die histologischen Markierungen verzichtet und die bei -20 °C gelagerten Schnitte verwendet. Hergestellt wurden die Schnitte von Kora Pröiß und Ann-Kathrin Baur nach folgendem Protokoll. Die Aorta wurde fettfrei präpariert und in drei Einzelstücken als Aortenbogen, thorakaler Aortenabschnitt und abdominaler Abschnitt in Tissue-Tek O.C.T.-

Einbettmedium in dafür vorgesehene Einbettboxen gebettet. Die Behälter wurden zum schnelleren Erstarren des Einbettmediums auf Trockeneis positioniert und anschließend bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert. Mittels Kryostat wurden die in Blöcken befindlichen Aortenabschnitte in ca. 8 µm dicke Schnitte geschnitten und auf die Objektträger gebracht. Der Aortenbogen wurde in Längsschnitten präpariert, der thorakale und abdominelle Abschnitt in Querschnitten. Auf jedem Objektträger befanden sich 3 (*Arcus aortae*) oder 6 Schnitte (*Aorta thoracica* und *abdominalis*), die immer abwechselnd auf 15 Objektträger verteilt wurden. Dies garantierte bei der Durchführung der (immun-)histologischen Markierungen, dass die natürliche Varianz des Gewebes mitbeurteilt werden konnte.

#### 4.3.2. Elastica-Färbung nach van Gieson

Zur Beurteilung der elastischen Fasern und deren Integrität in der aortalen Wand wurden die thorakalen Aortenschnitte der Bmper-Linie mittels trichromatischer Elastica Färbung nach van Gieson angefärbt. Alle Komponenten, die zur Färbung notwendig waren, sind im genutzten Färbekit der Firma Morphisto© enthalten. Zellkerne werden durch das in Weigerts Stammlösung 1 und 2 enthaltene Eisenhämatoxylin braun-schwarz angefärbt, Bindegewebe erscheint im Schnitt gelb, Muskel und Zellplasma rot und die elastischen Fasern tiefviolett. Nach dem Auftauen der Schnitte und Beschriften der Objektträger wurden diese nach dem in Tabelle 26 aufgeführtem Protokoll in Färbeküvetten gefärbt.

Schritt Nr.	Durchführung	Dauer
1	Inkubation in Resorcin-Fuchsin	15 min
2	mit fließendem Leitungswasser spülen	1 min
3	Inkubation in Weigerts Eisenhämatoxylin	5 min
4	Bläuen in Leitungswasser	10 min
5	Inkubation in 1%igem Salzsäure-Alkohol	10 s
6	Spülen mit Aqua dest.	5 s
7	Inkubation in Pikrofuchsin Lösung nach van Gieson	5 min
8	Spülen mit Aqua bi-dest.	5 s
9	Eindecken mit Kaiser Glyceringelatine	
	Lagerung bei Raumtemperatur	

Tabelle 26: Protokoll für die Elastica-Färbung der Gefrierschnitte nach van Gieson

#### 4.3.3. Immunfluoreszenzmarkierung

Das Verfahren der Immunhistochemie dient dem *in-situ* Nachweis der Proteinexpression und kann neben der Stärke der Expression auch Aufschluss über die Lokalisation der Proteine im Aortengewebe geben. Durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern auf die histologischen Schnitte kommt es zu Antikörper-Antigen Reaktionen und somit zur Bildung von Immunkomplexen. Ist der primäre Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, spricht man von direkter Immunfluoreszenz. Für diese Arbeit wurde die indirekte Methode, die ähnlich der Detektion im Western Blot funktioniert, genutzt. Nach Zugabe der Primärantikörper, hier MMP2 und MMP9, wurden die Schnitte mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem-Sekundärantikörper inkubiert, der später in der Fluoreszenzmikroskopie zu einem sichtbaren Signal führt. Als Negativkontrolle dienten

Immunglobuline aus der gleichen Spezies wie der spezifische Primärantikörper, die in derselben Konzentration eingesetzt wurden. Dies diente der Identifikation von unspezifischen Antikörperreaktionen. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu verhindern, wurden die Schnitte zu Beginn noch 60 min in 10 % Eselserum inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt. Die grüne Fluoreszenzfarbe der elastischen Fasern entstand durch die Detektion der Autofluoreszenz nach Anregung im FITC-Kanal. Die Fixierung und Waschschritte wurden in lichtundurchlässigen Färbeküvetten auf dem Schwenktisch durchgeführt, die Inkubation in dafür vorgesehenen dunklen Feuchtekkammern. Das Protokoll aus Tabelle 27 war bei allen genutzten Antikörpern identisch.

Schritt Nr.	Durchführung	Temperatur	Dauer
1	Auftauen, trocknen und beschriften	RT	20 min
2	Fixierung mit -20 °C kaltem Aceton	4 °C	20 min
3	Waschen mit PBS -/-	RT	3 x 5 min
4	Blockieren mit 10 %igem normalem Eselserum	RT	60 min
5	Waschen mit PBS -/-	RT	5 min
6	Inkubation mit Primärantikörper	4 °C	Über Nacht
7	Waschen mit PBS -/-	RT	3 x 5 min
8	Inkubation mit sekundär-Antikörper und DAPI	RT	60 min
9	Waschen mit PBS -/-	RT	5 x 5 min
10	Eindecken mit Mowiol und Trocknen	RT	
11	Lichtgeschützte Lagerung	4 °C	

Tabelle 27: Protokoll für die Immunfluoreszenzmarkierung der Gefrierschnitte

#### 4.3.4. TUNEL-Assay

Die TUNEL-Methode (engl. *terminal desoxynucleotidyl transferase– mediated dUTPbiotin nick end labeling*) dient zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen in Geweben und somit zur Identifizierung von apoptotischen Vorgängen. Verwendet wurde hierfür das „*In Situ Cell Death Detection*“ Kit der Firma Roche Applied Sciences. An den freien 3'OH-Enden der DNA-Bruchstücke wurden durch die „Terminal-desoxynucleotidyl-Transferase“ (TdT) fluoreszenzgekoppelte UDP-Nukleotide gebunden, die in der Mikroskopie als rot leuchtende Punkte in den Zellkernen erscheinen. Durch die Inkubation mit DAPI, welches den Zellkern anfärbt, können die TUNEL-Signale auf diesen Bereich lokalisiert werden. Als Positivkontrolle wurde der Gewebeschnitt zuvor mit DNase vorbehandelt. Eine Negativkontrolle, bei der die *labeling solution* ohne Enzymlösung aufgetragen wurde, diente zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz. Für diesen Versuch wurden Querschnitte des deszendierenden thorakalen Anteils der Aorta verwendet. Die Waschschritte erfolgten wieder in lichtundurchlässigen Färbeküvetten auf dem Schwenktisch, die Inkubation in dafür vorgesehenen dunklen Feuchtekkammern. Eine Temperatur von 37 °C wurde durch die Inkubation im Brutschrank sichergestellt.

Schritt Nr.	Durchführung	Temperatur	Dauer
1	Auftauen, trocknen und beschriften	RT	20 min
2	Fixierung mit 4 %igem in PBS gelöstem PFA, pH 7,4	RT	20 min

3	Waschen mit PBS -/-	RT	30 min
4	Permeabilisieren mit 4 °C kaltem 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 % Natriumcitrat	Auf Eis	2 min
5	Waschen mit PBS -/-	RT	5 min
6	Inkubation mit TUNEL Reaktionslösung	37 °C	60 min
7	Waschen mit PBS -/-	RT	3 x 5 min
8	Inkubation mit DAPI	RT	10 min
9	Waschen mit PBS -/-	RT	3 x 5 min
10	Eindecken mit Mowiol und Trocknen	RT	
11	Lichtgeschützte Lagerung	4 °C	

**Tabelle 28: Protokoll für die TUNEL-Färbung auf Gefrierschnitten**

Die Auswertung erfolgte zum einen durch den optischen Vergleich der mikroskopischen Bildaufnahmen und in einem weiteren Schritt durch die Quantifizierung der punktförmigen roten Signale im Gewebe. Hierfür wurde in der 200fachen Vergrößerung ein definiertes Areal (ROI = *region of interest*) der Größe 3 x 5 cm auf einem Bildausschnitt platziert und die darin befindlichen apoptotischen Zellkerne gezählt. Von jeder Maus wurden zwei bis drei Schnitte ausgewertet und ein Mittelwert erstellt.

#### 4.3.5. Funktionelle Versuche - Zymogen Versuch

Die Regulierung der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen im Gewebe ist sehr komplex und stellt eine Herausforderung für die Quantifizierung dar. MMP2 und MMP9 (Gelatinase A und B) besitzen eine für sie charakteristische Gelatinaseaktivität, die mittels *in-situ* Zymografie nachgewiesen werden kann. Zur Durchführung des Versuchs wurde das EnzCheck© Kit der Firma Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes) genutzt. In diesem Kit ist eine spezielle DQ-Gelatine (engl. *Dye quenched gelatin*; Gelatine mit unterdrückter Fluoreszenz) enthalten, die auf die histologischen Gewebeschnitte aufgetragen wird. Sind die MMPs im Gewebe aktiv kommt es zur Verdauung der Gelatine und zur Freisetzung des grünen Fluoreszenzfarbstoffes. Die Negativkontrolle wurde generiert, in dem die Schnitte mit 20 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) vorinkubiert wurden, EDTA die Metallionen komplexiert und so die katalytische Aktivität der Gelatinase A und B hemmt. Zur Herstellung der Substratlösung wurde ein Reaktionspuffer benötigt. Die Gelatine wurde für eine Konzentration von 1 mg/ml lichtgeschützt in H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend für die Substratlösung im Verhältnis 1:50 mit dem Reaktionspuffer gemischt. Die Durchführung des Zymografie-Assays ist in Tabelle 29 dargestellt. Die Fixierung und die Waschschritte erfolgten in lichtundurchlässigen Färbeküvetten auf dem Schwenktisch, die Inkubation in dafür vorgesehenen dunklen Feuchteammern. Eine Temperatur von 37 °C wurde durch die Inkubation im Brutschrank sichergestellt.

Schritt Nr.	Durchführung	Temperatur	Dauer
1	Auftauen, trocknen und beschriften	RT	20 min
2	Inkubation der Negativkontrolle mit 20 mM EDTA	RT	60 min
3	Waschen mit PBS -/-	RT	3 x 5 min
4	250µl Substratlösung pro Objektträger auftragen und mit Parafilm abdecken; Inkubation	37 °C	120 min

5	Abspülen mit <i>Aqua dest.</i>	RT	
6	Fixieren in 4 % neutral gepuffertem Formalin	RT	10 min
7	Waschen mit PBS -/-	RT	3 x 5 min
8	Inkubation mit DAPI	RT	10min
9	Waschen mit PBS -/-	RT	2 x 5 min
10	Eindecken mit Mowiol und Trocknen	RT	
11	Lichtgeschützte Lagerung	4 °C	

Tabelle 29: Protokoll für das *in situ*-Zymogen- Assay

#### 4.3.6. Auflichtmikroskopie

In der Auflichtmikroskopie wurde die Elastica-Färbung nach van Gieson unter Verwendung einer Halogenlampe betrachtet. Hierbei wurden die Aortenquerschnitte in der 100fachen, 200fachen und 400fachen Vergrößerung angesehen und mit der AxioCam-HR-Kamera und Axiovision Rel 4.8 Software dokumentiert und ausgewertet.

#### 4.3.7. Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe des Axioplan-2-Fluoreszenzmikroskops und einer Quecksilberlampe wurden die immunhistochemisch gefärbten Aortenquer- und längsschnitte in der 100fachen, 200fachen und 400fachen Vergrößerung angesehen und analysiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels AxioCam HR-Kamera, die Auswertung mittels Axiovision Rel 4.8 Software. Im späteren Verlauf wurde der neu angeschaffte Axioimager Z mit der Software Zen 3.1 blue edition genutzt.

### 4.4. Statistik

Bei den erhobenen Daten dieser Arbeit handelt es sich in erster Linie um eine Orientierungsstudie mit dem Ziel medizinisch relevante Zusammenhänge zu verstehen. Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen wurde mittels GraphPad Prism 8.0 durchgeführt. Für die ausgewerteten sonographischen Daten wurde die graphische Darstellung in Form eines Säulendiagramms gewählt, der Fehlerbalken gibt den Standardfehler (SEM) an. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft, was aufgrund der kleinen Gruppengröße nicht immer aussagekräftig war. In diesem Fall wurde zusätzlich eine optische Prüfung der Datensätze auf Normalverteilung durchgeführt. Ausreißer wurden mittels Krupps-Test identifiziert und bei einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  ausgeschlossen. Die sonographischen Daten wurden mit Hilfe eines gepaarten t-Tests auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle mit einem Signifikanzniveau von 5 % ( $p \leq 0,05$ ) wurden als signifikant angenommen und mit Sternen markiert. (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ). Für die PCR-, Western Blot- und histologischen Daten wurde die Darstellung als Punktdiagramm mit SEM-Balken gewählt. Da es sich um statistische Vergleiche mehrerer Gruppen mit zwei-Variablen handelt, wurde zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der zweifaktorielle ANOVA genutzt. Als Post-hoc-Test wurde der Bonferroni-Holm-Test mit angeglichenen Signifikanzen verwendet. Zur besseren Übersicht wurden die Signifikanz zwischen der Wildtyp und Bmper-Gruppe mit \* angegeben, die Signifikanz zwischen NaCl und AngII mit # vermerkt.

#### **4.5. Abgrenzung des Eigenanteils der vorliegenden Arbeit zu vorherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe**

Die in diesem Kapitel angeführten Methoden wurden von mir durchgeführt und ausgewertet, andernfalls wurde dies durch Nennung kenntlich gemacht. Die durchgeführten Versuche und Ergebnisse sind Folgestudien zu den Arbeiten von Kora Pröls und Dr. Ann-Kathrin Baur, welche ihre Arbeiten zu Beginn meiner Studien bereits fertig gestellt hatten. Dr. Ann-Kathrin Baur untersuchte in ihrer Arbeit den Einfluss von Bmp4 auf die Funktion von vaskulären glatten Muskelzellen. Sie verglich nach Induktion von Aortenaneurysmen mittels AngII die Expression von glatten Muskelzellmarkern in thorakalen und abdominellen Aortenschnitten mittels Immunfluoreszenzmarkierung (Baur 2015). In meiner Studie beziehen sich die Daten auf den Aortenbogen, da hier aufgrund der embryonalen Genese der Zellen, ein stärkerer Einfluss von BMP-Signalwegsmittgliedern auf die Umbaumechanismen im Gewebe nach Induktion eines Aneurysmas erwartet wird. Die von mir selbst generierten Aortenbogen-Proben wurden vollständig für die Proteinanalysen verwendet. Um die Anzahl der Tiere im Versuch zu reduzieren, wurden die noch vorhandenen, nicht gefärbten Gewebeschnitte der Aortenbögen von Dr. Ann-Kathrin Baur verwendet und von mir nach oben aufgeführten Methoden angefärbt. Kora Pröls beschäftigt sich in ihrer Arbeit unter anderem mit dem Einfluss einer Bmp4-Defizienz in vaskulären glatten Muskelzellen auf die Genese von thorakalen Aortenaneurysmen im Ang-II induzierten Mausmodell. Hierfür fertigte sie Gewebeschnitte der Aortenbögen an und markierte diese mit unterschiedlichen Antikörpern (Pröls 2018). In der Folgestudie, welche von mir durchgeführt wurde, wurden neue Aortenproben von mir gewonnen. Die Aortenbögen wurden für die Proteinquantifizierung mittels Western Blot-Verfahren genutzt, der Übergang zum thorakalen Abschnitt und ein Teil des thorakalen Abschnitts zur Beurteilung der Expression auf RNA-Ebene genutzt. Diese ergänzen und stützen die von Kora Pröls gewonnenen Daten, weshalb sich im Verlauf der Arbeit auf die zuvor gewonnenen Daten ihrer Immunfluoreszenzmarkierungen bezogen wird.

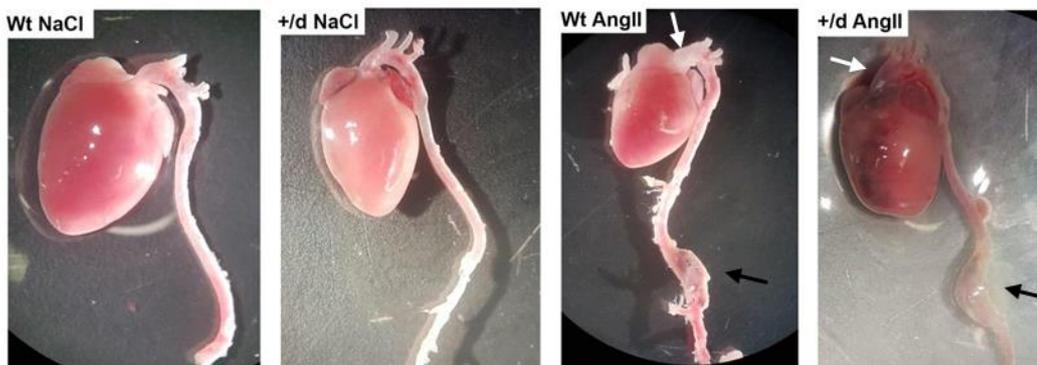
## 5. Ergebnisse

Die Forschungsergebnisse zur Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen sind noch sehr lückenhaft und fordern die weitere Aufschlüsselung der betreffenden Signalwege und Pathomechanismen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bmper und Bmp4 auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen im *in vivo*-Mausmodell untersucht. In der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, konnte bereits gezeigt werden, dass ein Fehlen von BMP4 in humanen glatten Muskelzellen zur Ausprägung des synthetisierenden vSMC-Phänotyps führt. Ebenso konnte eine vermehrte Expression von Kollagen und Fibrillin, sowie eine Reduktion von Elastin in der extrazellulären Matrix festgestellt werden (Pröll 2018). Diese Faktoren scheinen begünstigend für die Entstehung von Aortenaneurysmen im thorakalen Abschnitt zu sein. Im ersten Versuchsteil wurde mit C57BL/6-Bmper Mäusen gearbeitet und mittels Western Blot, RT-PCR und histologischen Analysen Daten erhoben und ausgewertet. Der zweite Versuchsteil bezieht sich auf die Myh11-CreERT2/BMP4flox- Linie, hier wurden Expression- und Proteinanalysen durchgeführt. Diese Ergebnisse ergänzen zuvor durchgeführte histologische und immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen von Kora Pröll (Pröll 2018).

### 5.1. Die Auswirkungen der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen

#### 5.1.1. Die exemplarische makroskopische Betrachtung der Aorten von Mäusen der Bmper-Studie nach Entnahme

In diesem *in vivo*-Mausmodell wurden zwischen 18 und 21 Wochen alten C57BL/6-N Bmper Mäusen osmotische Minipumpen in die Nackenfalte implantiert, die über 28 Tage kontinuierlich Angiotensin-II verabreichte und so zur Induktion von Aneurysmen führte. In der Kontrollgruppe wurde isotone Kochsalzlösung (NaCl) als Solvens eingesetzt. Die Mäuse wurden randomisiert anhand ihres Genotyps in 4 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe stellten Wildtyp-Mäuse (Wt) mit NaCl dar, die zweite Gruppe heterozygote Bmper-defiziente (Bmper<sup>+d</sup>) Mäuse mit NaCl. Gruppe 3 bestand aus Wt-Mäusen, Gruppe 4 aus Bmper<sup>+d</sup> Mäusen, die beide mit AngII behandelt wurden. In Abbildung 12 sind exemplarische Bilder der entnommenen Aorten mit Herz aus allen Versuchsgruppen nach der Entnahme dargestellt.



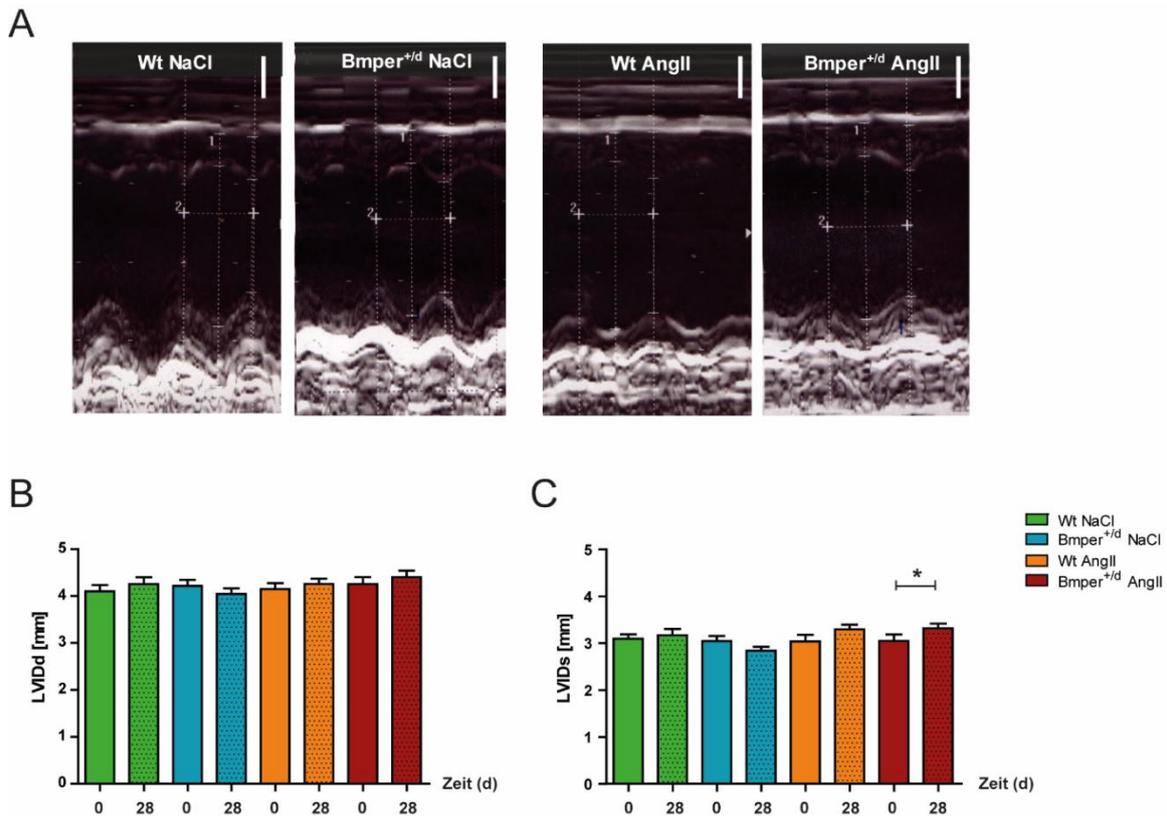
**Abbildung 12: Exemplarische Aufnahmen nach Entnahme der Aorten**

Die Fotografien zeigen durch ein Stereomikroskop aufgenommene Mausexemplare in einer Petrischale mit PBS. Diese Aufnahmen stellen repräsentative Beispiele aus allen Versuchsgruppen dar. Wt= Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Die weißen Pfeile weisen auf die Dilatation im Aortenbogen hin, die schwarzen Pfeile auf die abdominellen Aneurysmen.

In den mit NaCl-behandelten Gruppen war kein Unterschied am Aortenbogen zu sehen (Wt NaCl n=11; Bmper<sup>+/-d</sup> NaCl n=10). Nach Austritt aus dem Herzen bis zum abdominalen Teil war der Aortendurchmesser unverändert, die Wand bei der Präparation elastisch und robust. Durch die Gabe von AngII kam es in der Wildtyp-Gruppe bei 7 Tieren bereits zu einer Dilatation des ascendierenden und transversen Anteils des Aortenbogens (Wt AngII n=10). Einige der Aorten waren durch einen höheren Fettanteil, im Vergleich zu mit NaCl-behandelten Mäusen, bedeckt. Bei vereinzelt Tieren war das Aortengewebe empfindlicher und rupturierte durch leichten Zug oder falsche Griffe mit der Pinzette. In dieser Gruppe wurde bei 2 Mäusen ein abdominales Aneurysma diagnostiziert. Verabreichte man der Bmper<sup>+/-d</sup>-Gruppe AngII so zeigte sich auch hier in 8 Tieren eine Erweiterung des Aortenbogens, die sich teilweise über den descendierenden Anteil erstreckte (Bmper<sup>+/-d</sup> AngII n=10). Auch hier wurde bei 4 von 10 Tieren ein abdominales Aneurysma festgestellt, bei 2 der 4 Tiere führte eine Ruptur zum Versterben innerhalb des Versuches und wurde während der Obduktion festgestellt. Eine weitere Verminderung der Elastizität und Widerstandsfähigkeit des Aortengewebes, während der Präparation der Aorten, durch die heterozygote Defizienz, konnte nicht festgestellt werden.

### **5.1.2. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Herzleistung**

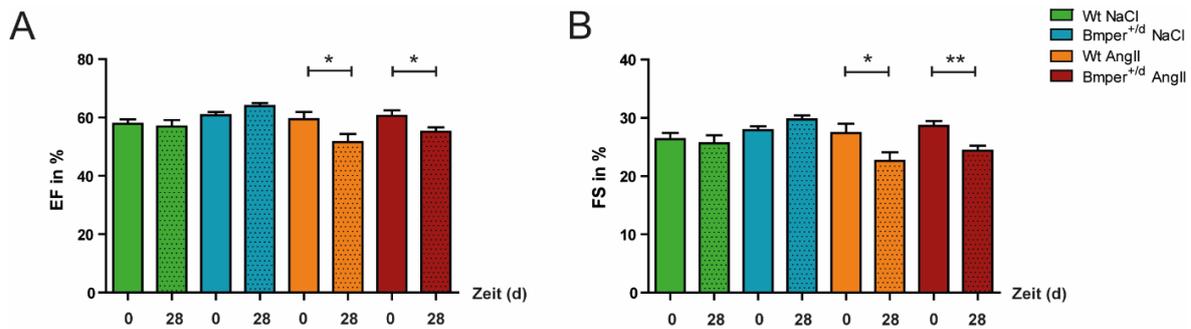
Die echokardiographische Untersuchung der Mäuse wurde an Tag 0, also vor Implantation der Pumpen und an Tag 28 durchgeführt. Die wiederholten Messungen sollten Aufschluss über die Auswirkung des AngII-induzierten Bluthochdrucks auf die Herzleistung geben und somit die Wirksamkeit für die erfolgreiche Applikation darstellen.



**Abbildung 13: Vergleich der Innendurchmesser des linken Ventrikels von Tag 0 zu Tag 28**

**A:** Exemplarische Darstellung der sonographischen Aufnahmen im M-Mode **B:** Innendurchmesser in der Diastole, **C:** Innendurchmesser in der Systole. Es zeigt sich in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung der linksventrikulären Innendurchmesser während der Diastole. Unter Gabe von AngII zeigt sich eine Tendenz zur Dilatation in der Systole, die in Kombination mit der +/d Bmper-Defizienz sogar signifikant ist. LVIDd = diastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser; LVIDs = systolischer linksventrikulärer Innendurchmesser; Wt NaCl: n = 11; Bmper<sup>+/d</sup> NaCl: n = 10; Wt AngII: n = 10; Bmper<sup>+/d</sup> AngII: n = 10; \*: p < 0,05; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

In Abbildung 13 sind die Veränderungen der Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole (B) und Systole (C) von Tag 0 zu Tag 28 dargestellt. Abbildung 13 A zeigt die exemplarische Auswahl der sonographischen Aufnahmen im M-Mode. Der enddiastolische Innendurchmesser (B) zeigt in keiner Gruppe Veränderungen der Messwerte. Der Innendurchmesser am Ende der Systole (C) zeigt nur durch die Infusion von AngII eine Erhöhung des Innendurchmessers, welcher bei Bmper<sup>+/d</sup> Tieren sogar zu einer signifikanten Dilatation des linken Ventrikels führt (p = 0,03; M (Mittelwert) Tag 0 = 3,05 mm; Tag 28 = 3,31 mm). Aus den erhobenen Messwerten lassen sich nun das prozentuale Auswurfvolumen (EF; *ejection fraction*) und die Verkürzungsfraction (FS; *fractional shortening*) berechnen.



**Abbildung 14: Vergleich der Auswurf- und Verkürzungsfraction von Tag 0 zu Tag 28**

**A:** Veränderung der Ejektionsfraktion **B:** Veränderung der Verkürzungsfraction. Es zeigt sich unter Basalbedingungen keine Veränderung, nach Gabe von Ang-II ist die EF und FS sowohl in Wt als auch in Bmper<sup>+/d</sup>-Mäusen signifikant reduziert. EF = Ejektionsfraktion; FS = Verkürzungsfraction; Wt NaCl: n = 11; Bmper<sup>+/d</sup> NaCl: n = 10; Wt AngII: n = 10; Bmper<sup>+/d</sup> AngII: n = 10; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Die in Abbildung 14 A dargestellte Ejektionsfraktion gibt das prozentuale Blutvolumen an, welches die linke Kammer während der Systole verlässt (Kresken et al. 2017). Normale Werte liegen zwischen 59,91 % ± 8,15 %, eine Verschlechterung deutet auf eine systolische Dysfunktion und somit eine herabgesetzte Herzleistung hin (Vinhas et al. 2013). Ein weiterer Faktor zur Evaluation der Herzleistung ist die Verkürzungsfraction. Sie stellt das Verhältnis zwischen systolischer Verkürzung und enddiastolischem Ventrikeldurchmesser, angegeben in Prozent, dar (Kresken et al. 2017). Die Mäuse in den NaCl- Kontrollgruppen zeigen auch 28 Tage nach Implantation der Pumpen eine gleichbleibende Herzleistung. Die mit AngII infundierten Gruppen hingegen zeigen eine signifikante Reduktion des Auswurfvolumens sowie der Kontraktilität des linken Ventrikels. Bei den Wildtyp AngII Mäusen beträgt die Differenz nach 28 Tagen für die EF im Mittel 7,8 % (p = 0,02; M Tag 0 = 59,4 %; Tag 28 = 51,6 %), die FS verschlechterte sich im Mittel um 4,8 % (p = 0,02; M Tag 0 = 27,4 %; Tag 28 = 22,6 %). Bei den Bmper<sup>+/d</sup> Mäusen mit AngII verschlechterte sich die EF im Mittel um 5,5 % (p = 0,04; M Tag 0 = 60,6 %; Tag 28 = 55,1 %), die Verkürzungsfraction um 4,2 % (p = 0,008; M Tag 0 = 28,6 %; Tag 28 = 24,4 %).

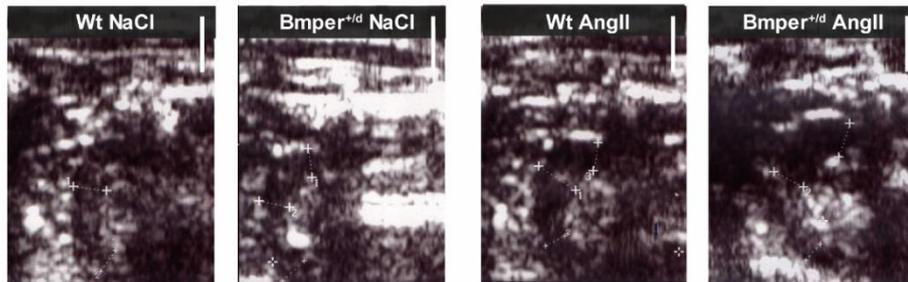
Zusammenfassend stellt sich heraus, dass die Gabe von AngII in den Versuchsgruppen zu einer signifikanten Verminderung der Herzleistung führt. Die heterozygote Defizienz von Bmper bei den Mäusen allein jedoch nimmt keine Auswirkung auf die Herzleistung. Bei den Bmper<sup>+/d</sup> Mäusen führt die Kombination mit AngII zu einer stärkeren Reduktion der Auswurf- und Verkürzungsfraction als bei den Wildtyp-AngII Mäusen.

### 5.1.3. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Aortendiameter

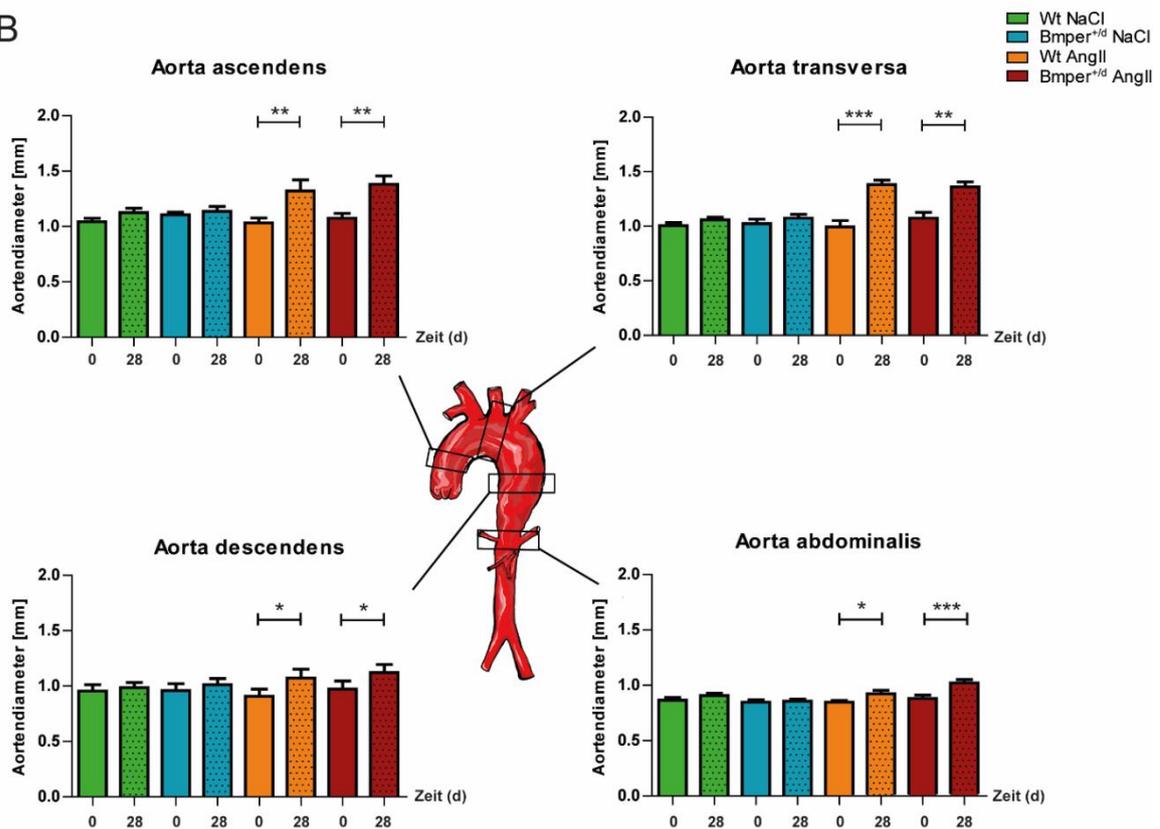
Neben der echokardiographischen Untersuchung wurde die sonographische Messung der Aortendiameter an vier definierten Punkten durchgeführt (Abbildung 15). Diese Messung sollte Aufschluss über die Dilatation der Aorta und die Entstehung von Aneurysmen im noch lebenden Tier geben. Die Messwerte in den Kontrollgruppen (NaCl) unterscheiden sich nach 28 Tagen nicht von den Messungen des Durchmessers zu Versuchsbeginn. Durch die Behandlung mit AngII kann in beiden Versuchsgruppen eine signifikante Dilatation des Aortendiameter an allen Messpunkten festgestellt werden. Besonders deutlich wird diese Erweiterung im Bereich der *Pars ascendens aortae*, mit im Mittel um 0,29 mm (p = 0,009; M Tag 0 = 1,03 mm; Tag 28 = 1,32 mm) und an der *Pars transversa aortae* mit 0,39 mm (p < 0,001; M Tag 0 = 0,99 mm; Tag 28 = 1,38 mm) bei den AngII Wildtyp-Mäusen. Die Auswirkung auf den deszendierenden Anteil (p = 0,02; M Tag 0

= 0,91 mm; Tag 28 = 1,07 mm) und den abdominellen Teil fallen geringer aus ( $p = 0,02$ ; M Tag 0 = 0,85 mm; Tag 28 = 0,92 mm). Bei den heterozygot Bmper-defizienten Mäusen beträgt die Dilatation im Mittel bei der *Pars ascendens* 0,31mm ( $p = 0,003$ ; M Tag 0 = 1,07 mm; Tag 28 = 1,38 mm), im *pars transversa* 0,29 mm ( $p = 0,002$ ; M Tag 0 = 1,07 mm; Tag 28 = 1,36 mm) und der *Pars descendens* mit 0,15 mm im Mittel ( $p = 0,01$ ; M Tag 0 = 0,97 mm; Tag 28 = 1,12 mm). Die starke Signifikanz in der *Pars abdominalis* der Bmper<sup>+/-</sup>-Mäuse ist auf die Erweiterung durch die zwei Aneurysmen zurückzuführen, im Mittel beträgt diese 0,14 mm ( $p < 0,001$ ; M Tag 0 = 0,88 mm; Tag 28 = 1,02 mm).

A



B



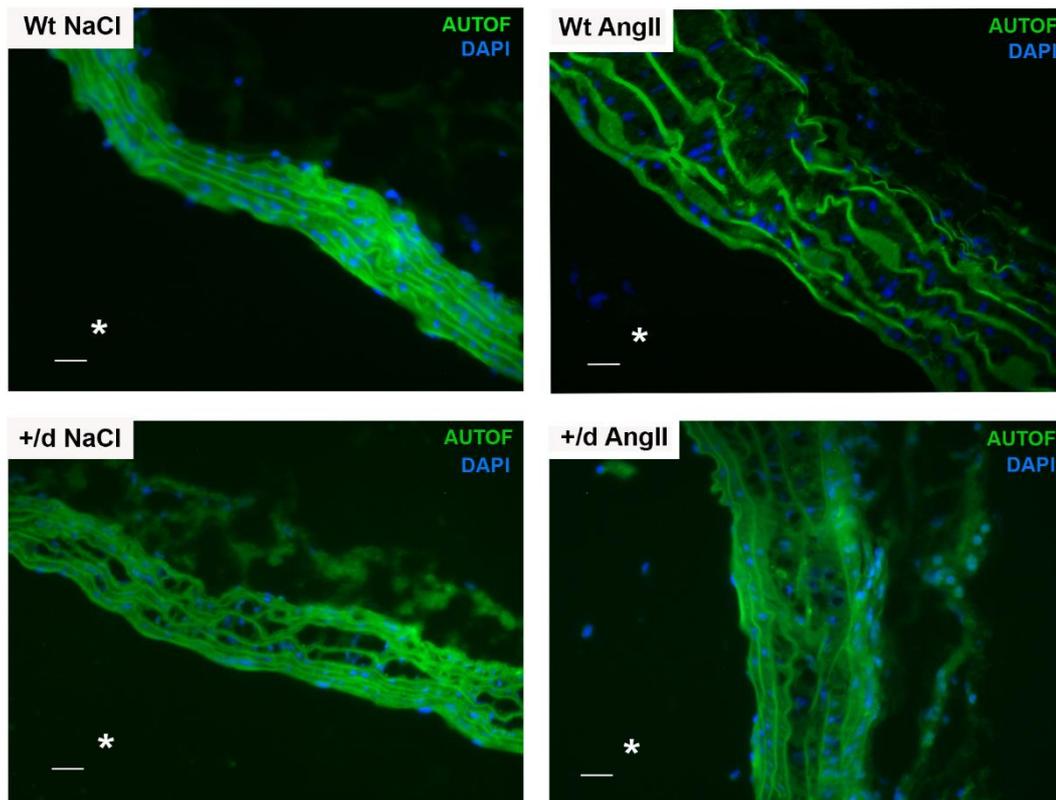
**Abbildung 15: Vergleich der Aortendurchmesser von Tag 0 zu Tag 28**

**A:** Exemplarische sonographische Aufnahmen der Aortenbögen; **B:** Mittels Ultraschalles wurden an vier definierten Messpunkten der Aorta die Durchmesser in der Systole ermittelt. An allen Messpunkten ist unter Basalbedingungen kein Unterschied messbar. Unter Ang-II Gabe dilatiert sich an allen Messpunkten die Aorta signifikant. Wt NaCl:  $n = 11$ ; Bmper<sup>+/-</sup> NaCl:  $n = 10$ ; Wt AngII:  $n = 10$ ; Bmper<sup>+/-</sup> AngII:  $n = 10$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/- = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Zusammenfassend kann auch hier eine starke Auswirkung von AngII auf die Dilatation der Aorta, besonders im Bereich des Aortenbogens, festgestellt werden. Eine Auswirkung der heterozygoten Defizienz von Bmper konnte mit dieser Untersuchungsmethode nicht gezeigt werden.

#### **5.1.4. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf histomorphologische Veränderungen des Aortengewebes**

Die Auswirkung von AngII auf den thorakalen Aortenabschnitt konnte bereits *in vivo* durch die verminderte Herzleistung und die Dilatation der Aorta festgehalten werden. Ein Effekt durch die heterozygote Defizienz von Bmper konnte in den sonographischen Abschnitten noch nicht gezeigt werden. In Abbildung 16 sind je eine repräsentative Aufnahme des Aortenbogengewebes pro Versuchsgruppe dargestellt. Die Aortenwand der Wildtyp-NaCl Gruppe ist schmal, die elastischen Fasern sind kompakt und parallel angeordnet mit dem restlichen Gewebe der Media verbunden. Am äußeren Rand befindet sich ein geringer Anteil an Adventitia, der zum Teil durch technische Umstände, während der Anfertigung der Gefrierschnitte, abgelöst wurde. Eine deutliche Verbreiterung der Gefäßwand durch die Gabe von AngII wird im rechten, oberen Bild gezeigt. Die Wand wirkt aufgeschwemmt, die Fasern liegen nicht mehr in allen Abschnitten parallel, wodurch die Media ihre ursprüngliche Gewebsdichte verliert. Einzelne Fasern weisen spindelförmige Auftreibungen mit schwächerem Signal auf. Das linke untere Bild spiegelt die unbehandelte heterozygot Bmper-defiziente Mausgruppe wider. Die Wanddicke ist vergleichbar mit jener in der Wildtypgruppe. In Teilen der Aorta zeigen sich löchrige Veränderungen in der Media, die im weiteren Verlauf als zystische Hohlräume beschrieben werden können. Diese Veränderungen können in der mit AngII behandelten Wildtyp-Gruppe nicht festgestellt werden. Verabreicht man den Bmper<sup>+/-d</sup>-Mäusen AngII, so erhält man eine verstärkte Mischung aus beiden Phänotypen. Die zystischen Hohlräume treten öfter auf und können nur teilweise von den Aufschwemmungen der Aortenwand abgegrenzt werden. Auch hier zeigen sich strukturelle Veränderungen der einzelnen elastischen Fasern, ebenso kann eine Erhöhung des Anteils der Adventitia festgestellt werden.



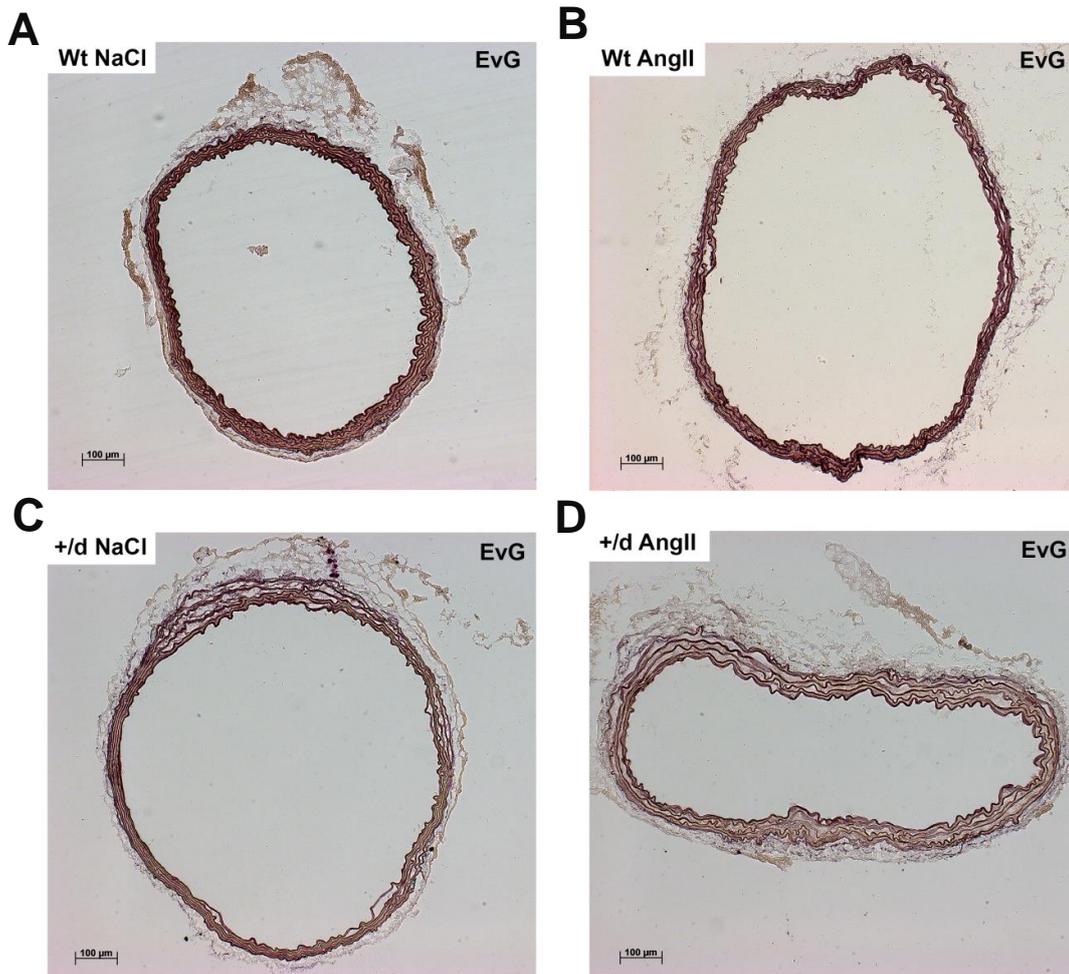
**Abbildung 16: Beurteilung histomorphologischer Veränderungen der Mauseorten anhand ihrer Autofluoreszenz**

Die physiologische Wandstruktur der murinen Aorta wird durch die Gabe von AngII deutlich aufgelockert und destruiert. Durch die heterozygote Defizienz von Bmper (+/d) kommt es zu blasenartigen Auftreibungen in der Wand, welche durch die zusätzliche Gabe von AngII zu Brüchen der elastischen Fasern und somit zur Wandinstabilität führt. \* = Lumen; Grün = Autofluoreszenz; blau = DAPI- Zellkernfärbung; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II, Maßstab = 20 µm

### 5.1.5. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die strukturellen Veränderungen der elastischen *Laminae* mittels Elastica van Gieson Färbung

Nach der Charakterisierung der morphologischen Veränderungen der Gefäßwände anhand der Autofluoreszenz, wurden Querschnitte aus dem absteigenden Ast der thorakalen Aorta mit einer Elastica-Färbung nach van Gieson angefärbt. Diese Färbung ermöglicht die Beurteilung der violett-schwarzen elastischen Fasern, der in Gelb gefärbten Muskel- und Bindegewebsschichten und des roten Kollagens. Die in Abbildung 17 gezeigten Aufnahmen in 100facher Vergrößerung dienen der Übersicht. Die Aorten der mit NaCl-behandelten Wildtyp-Mäuse zeigen eine schmale Wandstruktur, die sich durch eine homogene Anordnung von tief-violetten elastischen *Laminae* und einem mit Kollagen, Bindegewebe und Muskeln gefüllten Zwischenraum kennzeichnet. In den mit AngII-behandelten Mäusen lockern und lösen sich zum Teil die elastischen Fasern vom umliegenden Gewebe und zerstören. Vergleicht man die Bmper<sup>+d</sup> Mäuse mit den NaCl Wildtyp kommt es ebenfalls zu einer Auflockerung des Gewebes, die sich als aufgetriebene, zystische Hohlräume zwischen den elastischen Fasern darstellen. Diese Veränderung konnte bereits in der Autofluoreszenz dargestellt werden. Unter AngII kann dieser Effekt durch die Auftreibung

der gesamten Wand verstärkt werden. Wie auch in den AngII Wildtypen können bereits in der 100fachen Vergrößerung Destruktionen in den elastischen Fasern festgestellt werden.

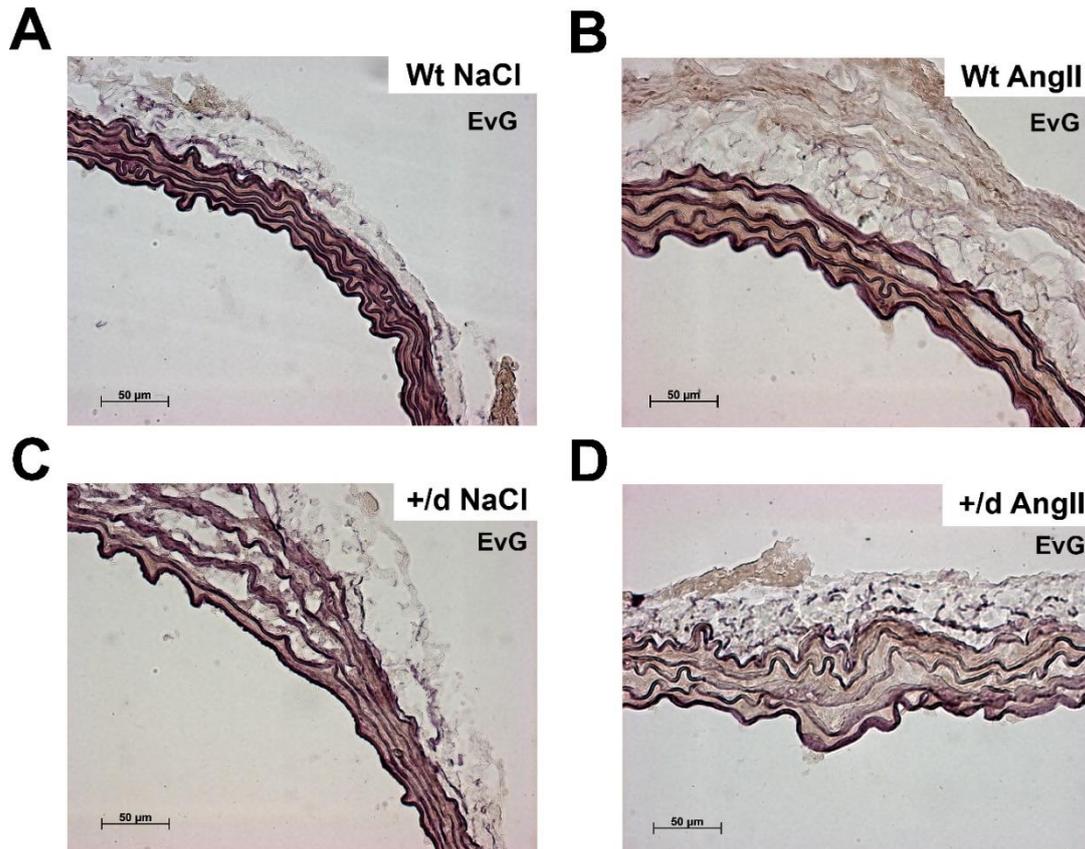


**Abbildung 17: Übersichtsdarstellung von Aorten gefärbt mit der Elastica-Färbung nach van Gieson in 100facher Vergrößerung**

**A:** Wildtyp NaCl, **B:** Wildtyp AngII, **C:** Bmper<sup>+/d</sup> NaCl, **D:** Bmper<sup>+/d</sup> AngII. Durch die heterozygote Defizienz von Bmper kommt es zu einer zystischen Destruktion in der Gefäßwand, die durch die Applikation von AngII zunimmt und zusätzlich zu vermehrten Strangbrüchen in den elastischen Fasern führt.

Wt NaCl: n = 4; Wt AngII: n = 4; Bmper<sup>+/d</sup> NaCl: n = 4; Bmper<sup>+/d</sup> AngII: n = 6; NaCl = osmotische Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt; AngII = osmotische Minipumpen mit Angiotensin-II gefüllt; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse

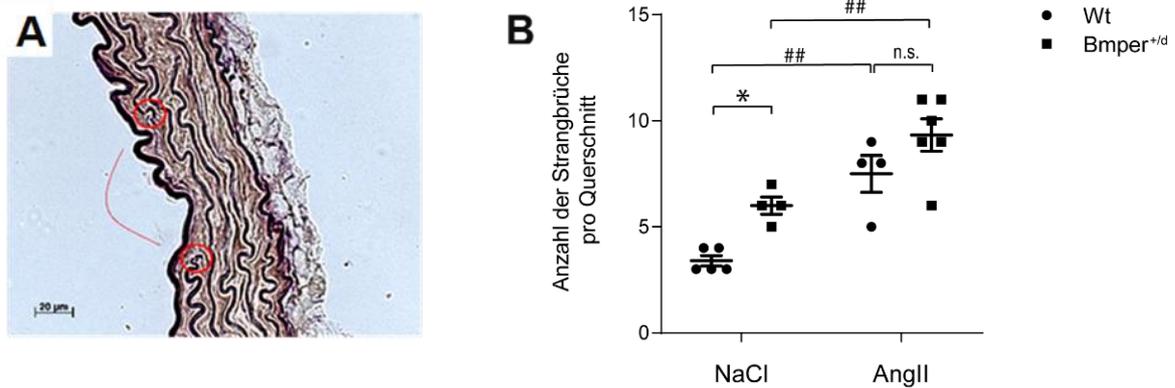
Mit dem 40fach-Objektiv können die Befunde aus der 10fachen Vergrößerung nochmals verdeutlicht werden (Abbildung 18). Besonders hervorzuheben sind die Destruktionen und lytischen Veränderungen, die durch die heterozygote Defizienz von Bmper auftreten und durch die Gabe von AngII noch verstärkt werden können. Die Verminderung der Elastizität und Robustheit der Aorten lässt sich durch das Auftreten von Strangbrüchen innerhalb der elastischen *Laminae* erklären.



**Abbildung 18: Elastica-Färbung nach van Gieson in 400facher Vergrößerung**

**A:** Wildtyp NaCl, **B:** Wildtyp AngII, **C:**  $Bmper^{+/d}$  NaCl, **D:**  $Bmper^{+/d}$  AngII. Durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* kommt es zu einer zystischen Destruktion in der Gefäßwand, die durch die Applikation von AngII zunimmt und zusätzlich zu vermehrten Strangbrüchen in den elastischen Fasern führt. Wt NaCl: n = 4; Wt AngII: n = 4;  $Bmper^{+/d}$  NaCl: n = 4;  $Bmper^{+/d}$  AngII: n = 6; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot *Bmper*-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

In Abbildung 19 A ist ein Beispiel für einen Bruch der elastischen Faser markiert. In Abbildung 19 B wurde die Summe der Strangbrüche pro aortalem Querschnitt quantifiziert und ausgewertet. Hier zeigt sich, dass bereits durch die Defizienz von *Bmper* signifikant mehr destruierte *Laminae* gezählt werden können. Durch die Gabe von AngII kommt es dann sowohl in der Wildtyp als auch in der  $Bmper^{+/d}$  Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung rupturierter Wandschichten.



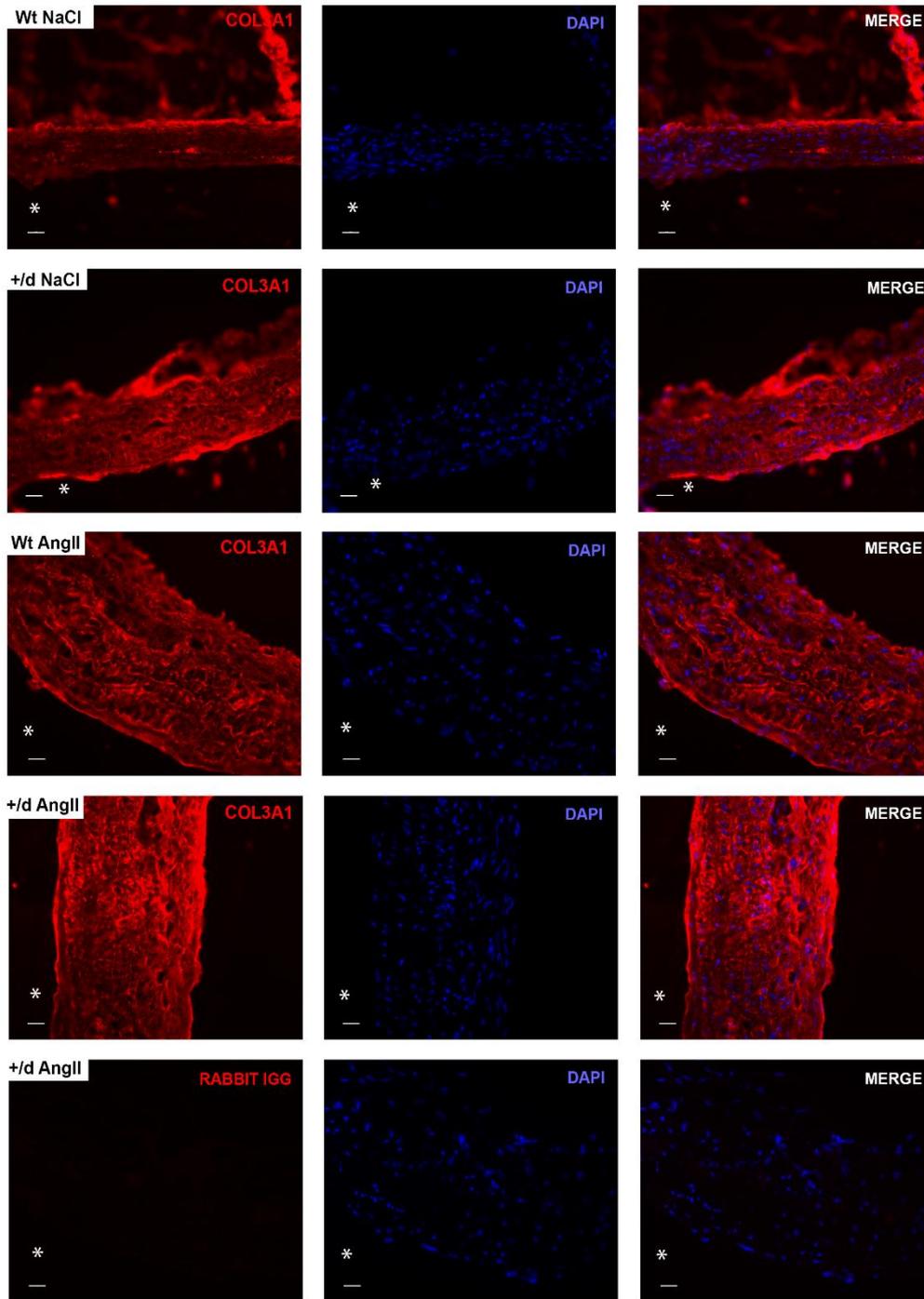
**Abbildung 19: Quantifizierung der rupturierten elastischen *Laminae* im Aortenquerschnitt**

**A:** Beispiel einer rupturierten elastischen Lamina nach Elastica von Gieson-Färbung; Maßstab = 20 µm;

**B:** Quantifizierung der einzelnen rupturierten Fasern in der thorakalen descendierenden Aorta. Durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Rupturen. Durch die Gabe von AngII kann sowohl in den Wildtypen, als auch in den *Bmper*<sup>+d</sup>-Mäusen eine signifikante Zunahme gezeigt werden. Wt NaCl: n = 5; *Bmper*<sup>+d</sup> NaCl: n = 4; Wt AngII: n = 4; *Bmper*<sup>+d</sup> AngII: n = 6; \*: Wt vs. *Bmper*<sup>+d</sup>; \* = p < 0,05; # = NaCl vs. AngII; ## = p < 0,01; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot *Bmper*-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

### 5.1.6. Die Auswirkung der heterozygoten-*Bmper*-Defizienz auf die Extrazellulärmatrix-Komponente Kollagen im Aortenbogen

Neben elastischen Fasern sind Kollagene in der extrazellulären Matrix von thorakalen Aorten als eine der Hauptkomponenten beschrieben. Die zuvor gezeigten histomorphologischen Veränderungen lassen auf Abweichungen in der Kollagenexpression schließen, die durch folgende Immunfluoreszenzmarkierung mit spezifischen Antikörpern gegen Col1A1 und Col3A1 analysiert wurden. Abbildung 20 zeigt beispielhaft das Expressionsniveau und -muster von Col3A1 in den Aortenbögen von allen vier Versuchsgruppen. Die Wildtypkontrollmäuse zeigen eine schwache Expression von Col3A1 im Bereich der Intima und Media, jedoch eine erhöhte, gleichmäßige Expression in der Adventitia. Durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* kann eine erhöhte und homogene Expression im Bereich der Intima und Media festgestellt werden, die sich auch durch die Infusion von AngII hervorrufen lässt. Die Expression in der Adventitia zeigt keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine weitere Steigerung des Fluoreszenzsignals durch die Infusion von AngII in den *Bmper*<sup>+d</sup> Mäusen kann vermutet, aber nicht belegend in allen Aufnahmen gezeigt werden.

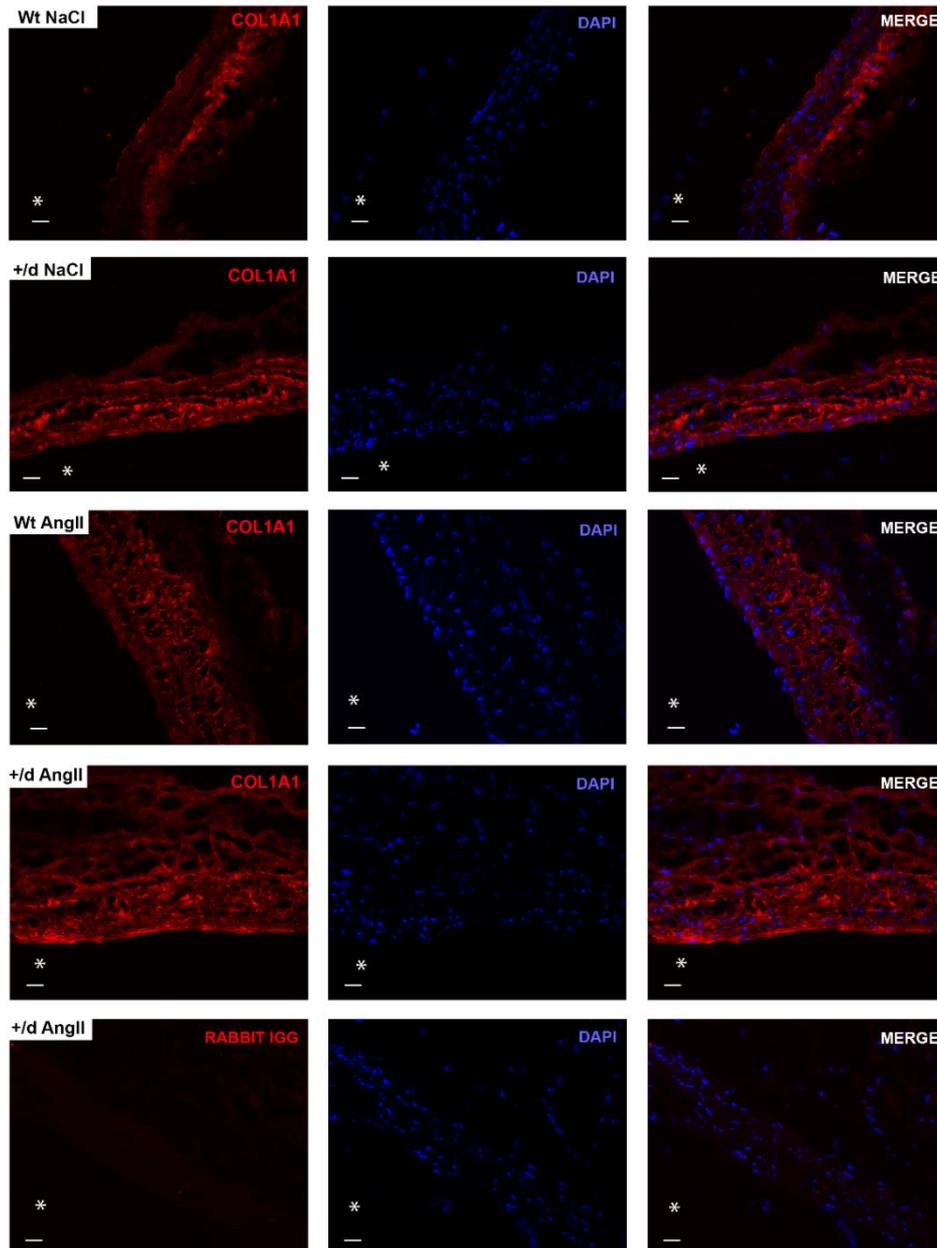


**Abbildung 20: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Col3A1 – Antikörper im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Col3A1- Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*-Bilder aus der Col3A1 Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. Es zeigt sich sowohl durch die Defizienz von Bmper als auch durch die Gabe von AngII eine deutliche Steigerung der Expression von Col3A1 im Aortenbogen der Mäuse. n = 4; rot = Col3A1; blau = DAPI-Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20 µm

Die Kollagen Typ1, alpha-1 Immunfluoreszenzmarkierung in Abbildung 21 zeigt ähnliche Expressionsmuster, wie die in Abbildung 20 gezeigte Col3A1 Fluoreszenzmarkierung. In den Wildtyp-Mäusen sind Expressionen in der *Tunica adventitia*, sowie ein sehr schwaches Signal in der *Tunica intima* zu erkennen. Liegt eine heterozygote Defizienz von Bmper im

Gewebe vor, so erstreckt sich die Expression auf die Bereiche der Intima und Media, das Signal in der Adventitia nimmt im Vergleich zum Wildtyp ab. Infundiert man die Wildtyp-Mäuse mit AngII so verringert sich das Signal in der Adventitia und verteilt sich homogen auf die Media, in der Intima ist kein Signal zu erkennen. Die mit AngII behandelten *Bmper*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigen lediglich eine geringe Erhöhung. Zusammenfassend zeigt sich eine erhöhte Expression der Kollagentypen I und III, welche auf eine stärkere Fibrosierung des Gewebes durch die heterozygote *Bmper*-Defizienz hindeutet.



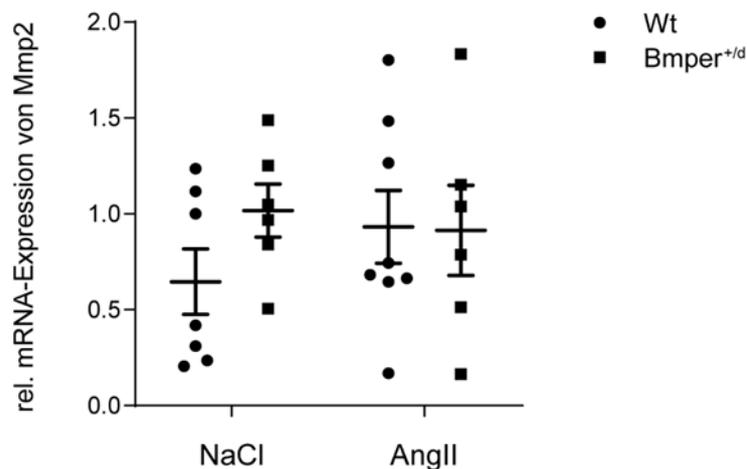
**Abbildung 21: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Col1A1 – Antikörper im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Col1A1- Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: Merge-Bilder aus der Col1A1- Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. Es zeigt sich sowohl durch die Teildefizienz von *Bmper*, als auch durch die Gabe von AngII eine deutliche Steigerung der Expression von Col1A1 im Aortenbogen der Mäuse.; n = 3; rot = Col1A1; blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/- = heterozygot *Bmper*-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20  $\mu$ m

### 5.1.7. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen

Durch die heterozygote Defizienz von Bmper zeigten sich bereits destruierte elastische *Laminae*, eine zystische Veränderung in der *Tunica media* und eine veränderte Zusammensetzung von Kollagenfasern. Matrixmetalloproteinasen werden in der Literatur als eine weitere wichtige Komponente für die Entstehung von Aortenaneurysmen genannt (siehe Kapitel 2.3.2.2). Mit Hilfe von Expressionsanalysen auf RNA-Ebene und durch Immunfluoreszenzmarkierungen soll die Präsenz von Mmp2 und Mmp9 im Aortenbogen nachgewiesen werden. Die Aktivität der Gelatinasen soll zusätzlich durch einen funktionellen Versuch evaluiert werden (Hadler-Olsen et al. 2010).

Für die Expressionsanalyse auf RNA-Ebene wurde ein Stück der thorakalen deszendierenden Aorta jeder Maus verwendet und mittels SybrGreen-Farbstoffes und spezifischen Mmp2-Primer in der RT-PCR ausgewertet.

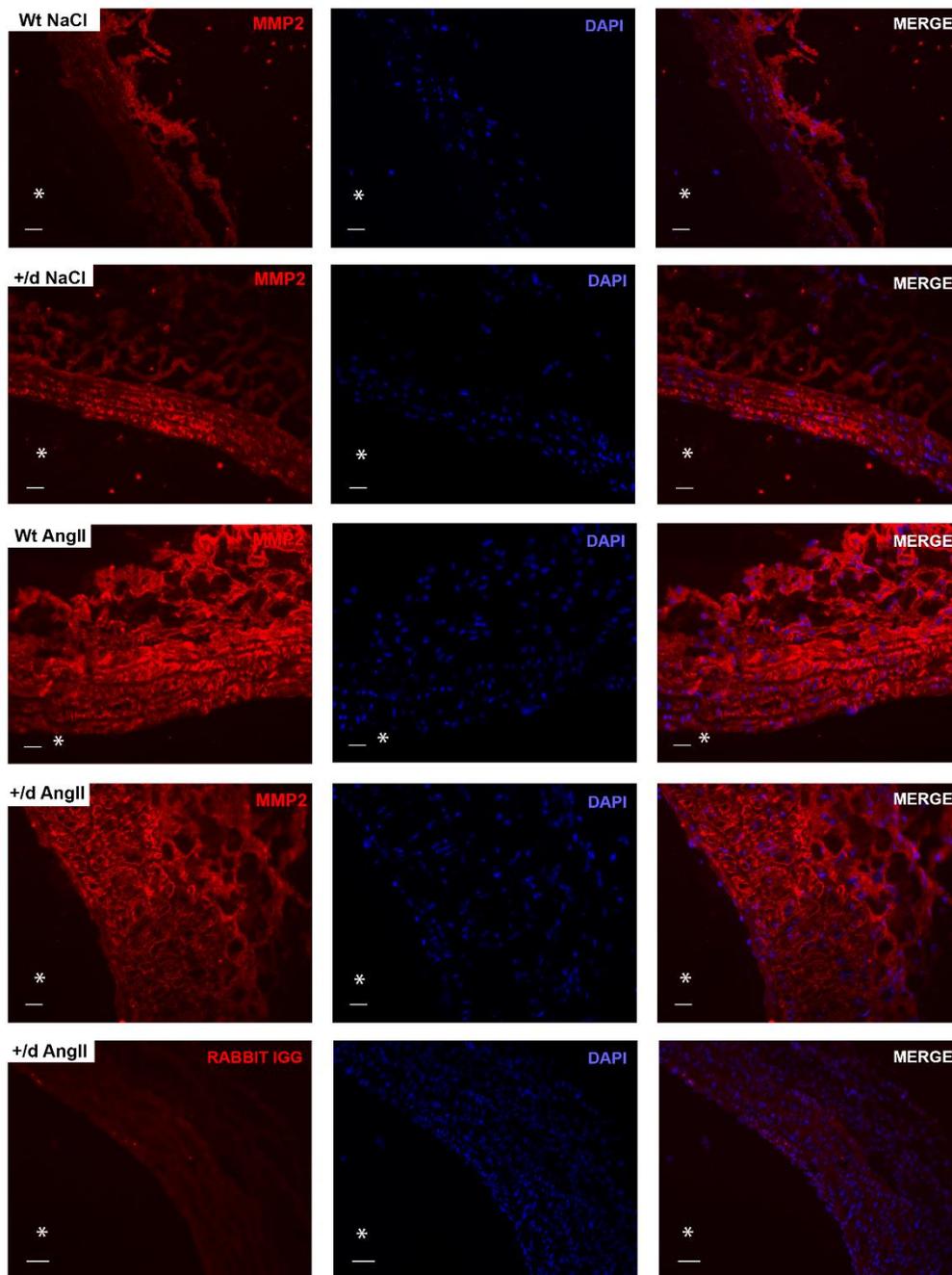


**Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von Mmp2 in der thorakalen Aorta**

Unter Basalbedingungen zeigt sich durch die heterozygote Defizienz von Bmper eine Tendenz zur Expressionssteigerung von Mmp2. In den AngII Gruppen kann durch die hohe Streuung keine einheitliche Aussage getroffen werden. Wt NaCl: n = 7; Bmper<sup>+/-</sup> NaCl: n = 6; Wt AngII: n = 8; Bmper<sup>+/-</sup> AngII: n = 6. NaCl = osmotische Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt; AngII = osmotische Minipumpen mit Angiotensin-II gefüllt; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/- = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse

Es zeigt sich in Abbildung 22, dass bereits unter Basalbedingungen in der NaCl Wildtyp-Gruppe eine hohe Streuung in der Expression von Mmp2 vorliegt. Durch die heterozygote Defizienz von Bmper wird das Expressionsniveau angehoben. Bei den mit AngII behandelten Gruppen wird im Mittel die Expression zur Kontrollgruppe erhöht, ist jedoch durch die hohe Streuung bei kleiner Gruppengröße nicht signifikant.

Die Expression von Mmp2 auf mRNA-Ebene lässt sich auch in der Immunfluoreszenzmarkierung mit spezifischem Mmp2-Antikörper nachvollziehen. In Abbildung 23 ist im unbehandelten Wildtyp eine schwache Mmp2-Expression in der Media zu erkennen, die in der Adventitia zunimmt. Bei den Bmper<sup>+/-</sup> Mäusen, die mit dem Solvent NaCl behandelt wurden, zeigt sich eine stärkere Mmp2-Expression in der Media. Infundierte man die Wildtyp-Mäuse mit AngII so steigert sich die Expression deutlich im Vergleich zur NaCl behandelten Gruppe. Die Expression von Mmp2 ist stärker und gleichmäßiger verteilt als bei den Bmper<sup>+/-</sup>-NaCl Mäusen, das Signal im Bereich der Adventitia nimmt deutlich zu. Die Expression in den mit AngII behandelten heterozygot-defizienten Mäusen ist vergleichbar mit der Wildtyp-AngII Gruppe

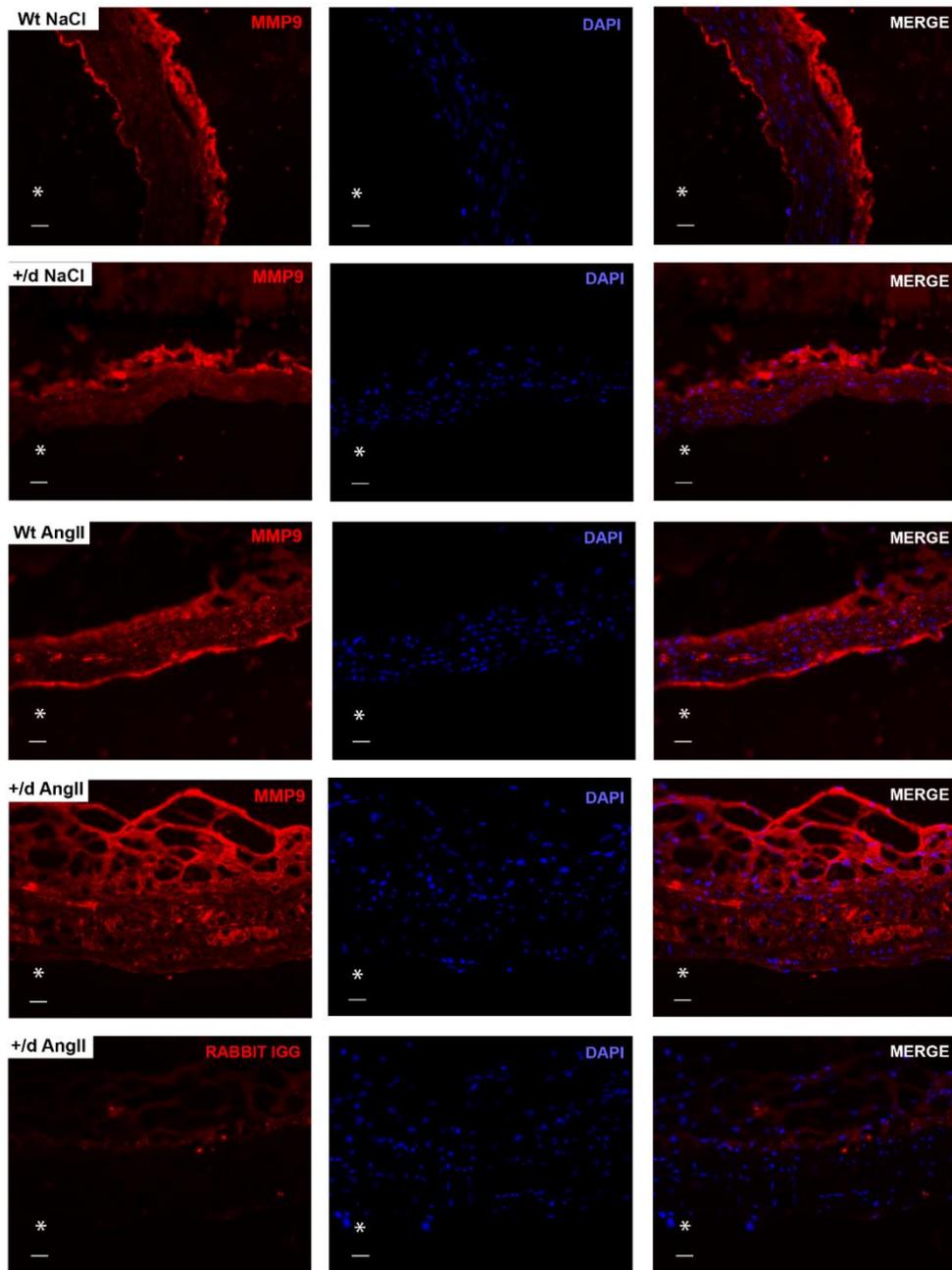


**Abbildung 23: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Mmp2 – Antikörper im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Mmp2-Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*-Bilder aus der Mmp2-Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. Es zeigt sich durch die Defizienz von Bmper im Vergleich zur Wt-Maus eine homogenere Expression von Mmp2 in allen Wandabschnitten. Durch die Gabe von AngII wird die Expression von Mmp2 deutlich stärker, dieses kann durch die Defizienz von Bmper nicht mehr potenziert werden.  $n = 3$ ; rot = Mmp2; blau = DAPI-Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20  $\mu\text{m}$

In Abbildung 24 ist die Mmp9-Antikörper Markierung zu sehen. Unter Basalbedingungen liegt Mmp9 nur im Endothel und in der Adventitia vor. Durch die heterozygote Defizienz von Bmper kommt es, ähnlich wie bei Mmp2, zu einer erhöhten Expression in der Media. Dies kann auch in den mit AngII-infundierten Gruppen dargestellt werden. Lediglich im Endothel

scheint die heterozygote Defizienz von *Bmper* in einer verminderten Expression von *Mmp9* zu resultieren. Durch die Gabe von AngII und der heterozygoten Defizienz kann das Signal von *Mmp9* in der Adventitia und Media nochmals verstärkt werden.

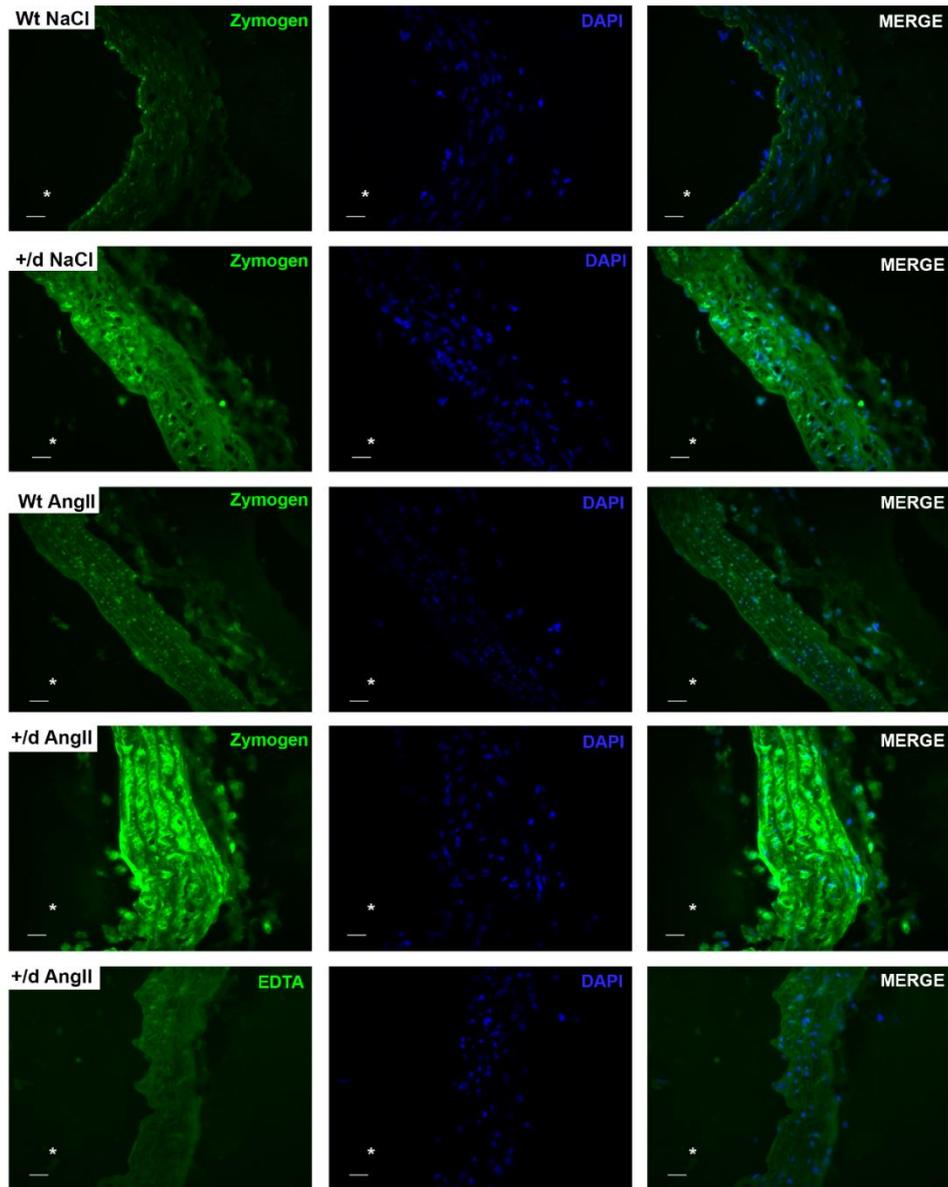


**Abbildung 24: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit *Mmp9* – Antikörper im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der *Mmp9*-Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*-Bilder aus der *Mmp9*-Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. In allen Versuchsgruppen kommt es zu einer erhöhten und homogeneren Expression von *Mmp9* in allen Wandabschnitten. Jedoch scheint die Expression von *Mmp9*, durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* in beiden Gruppen in einer Verminderung des Signals im Endothel zu resultieren.  $n < 4$ ; rot = *Mmp9*; blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot *Bmper*-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20 µm

Matrixmetalloproteinasen werden als inaktive Prä-Proenzyme, die so genannten Zymogene, sezerniert. Eine erhöhte Expression ist somit kein Maßstab für die reelle Aktivität im Gewebe. Mittels *in-situ* Zymogen Test kann die aktive Form von Mmp9 und Mmp2 in Geweben nachgewiesen werden. Auf die Gewebeschnitte wurde die im Kit enthaltene DQ-Gelatine aufgetragen, welche als Substrat für die aktiven MMP-Gelatinasen diente. Wurde die Gelatine zersetzt so kam es zur Freisetzung des grünen Fluoreszenzfarbstoffes, welcher mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert werden konnte. In der Auswertung kann eine Aussage über die Verteilung der aktiven MMPs, sowie deren Aktivitätsintensität getätigt werden. Für die Negativkontrolle wurden die Gewebsschnitte mit dem Chelatbildner EDTA (Ethylendiamintetraacetat) vorbehandelt. EDTA fängt die für die Aktivität der Zymogene notwendigen Zink-Ionen ab (Zhang et al. 2009) und verhindert somit die Zersetzung der Gelatine auf den Schnitten. Durch die Autofluoreszenz der Aortenwand bleibt somit auch in der Negativkontrolle ein schwaches grünes Signal sichtbar. Abbildung 25 zeigt eine beispielhafte Übersicht der mikroskopischen Aufnahmen der mit DQ-Gelatine behandelten Aortengewebeschnitte. In den Wildtyp-Mäusen konnte unter Basalbedingungen lediglich eine Aktivität der MMPs im Endothel, vereinzelt auch in der Adventitia festgestellt werden. Durch die Gabe von AngII kann, im Gegensatz zu den Antikörperfärbungen, keine Veränderung in der Signalstärke gezeigt werden. Eine deutliche Steigerung des freigewordenen Fluoreszenzfarbstoffes und somit eine erhöhte Aktivität der Gelatinasen liegt hingegen in den Bmper<sup>+d</sup> Mäusen vor. Besonders im Bereich der Media kann eine Zunahme der Fluoreszenz festgestellt werden. Diese kann durch die zusätzliche Gabe von AngII nochmals deutlich potenziert werden.

Zusammenfassend kann eine erhöhte Expression von Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 sowie deren Aktivitätssteigerung im Gewebe gezeigt werden.



**Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahmen des *in-Situ*-Zymogen-Assays im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen des *in-situ* Zymogen-Assays von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*-Bilder aus dem Zymogen-Assay und der DAPI-Zellkern Färbung. Durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* kommt es im Aortengewebe, vor allem im Bereich der Media zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Dies kann durch die zusätzliche Gabe von AngII nochmals verstärkt werden. Das schwache, dunkelgrüne Signal des Gewebes ist auf die Autofluoreszenz zurückzuführen. +/d = *Bmper*<sup>+/d</sup>; n = 3; grün = proteolytisch umgesetzte DQ-Gelatine als Maß für die Enzymaktivität; blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot *Bmper*-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20 µm

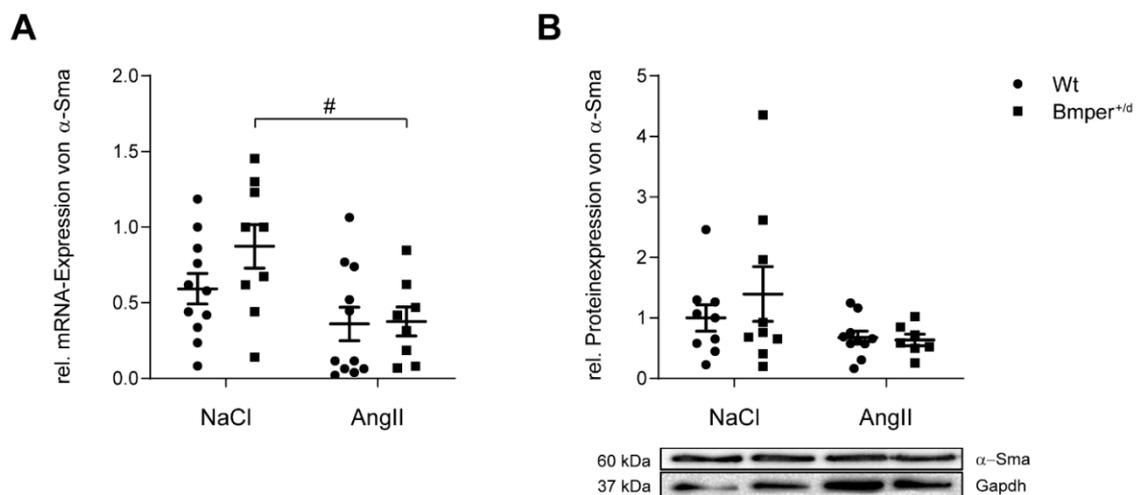
### 5.1.8. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf die glatten Muskelzellen

Die Daten aus den zuvor erhobenen histomorphologischen Versuchen (siehe 5.1.4 und 5.1.5) lassen auch Veränderungen im Bereich der Media vermuten, die insbesondere den Verlust der Integrität der glatten Muskelzellen sowie ihren programmierten Zelltod betreffen. Der Verlust der Integrität kann infolge des Phänotypen-Switch auftreten und durch einen Verlust der vSMC-spezifischen Marker und eine erhöhte Produktion von extrazellulären Matrix-Komponenten wie Kollagenen zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Marker *alpha-smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) und *Myosin heavy chain 11* (MYH11) als vSMC-spezifische Marker genutzt.

#### 5.1.8.1. Die Veränderung der Expression von $\alpha$ -Sma

In Abbildung 26 A ist sowohl die relative mRNA Expression als auch die Proteinexpression von  $\alpha$ -Sma im Aortengewebe der vier Versuchsgruppen analysiert worden. Auf mRNA-Ebene zeigt sich durch die heterozygote Defizienz von Bmper ein leichter Anstieg von  $\alpha$ -Sma im Gewebe. Infundierte man die beiden Versuchsgruppen mit AngII so zeichnet sich ein Verlust von  $\alpha$ -Sma ab. Dieser Verlust ist in der Bmper<sup>+/-</sup>-defizienten Gruppe signifikant.

Auch auf Proteinebene (Abbildung 26B) konnte mittels Western Blot die Reduktion von  $\alpha$ -Sma in den mit AngII behandelten Gruppen im Vergleich zu mit NaCl-infundierten Mäusen gezeigt werden. Der Anstieg von  $\alpha$ -Sma in der Bmper<sup>+/-</sup>-NaCl-Gruppe zeichnet sich durch die hohe Streuung hier nur sehr leicht ab.



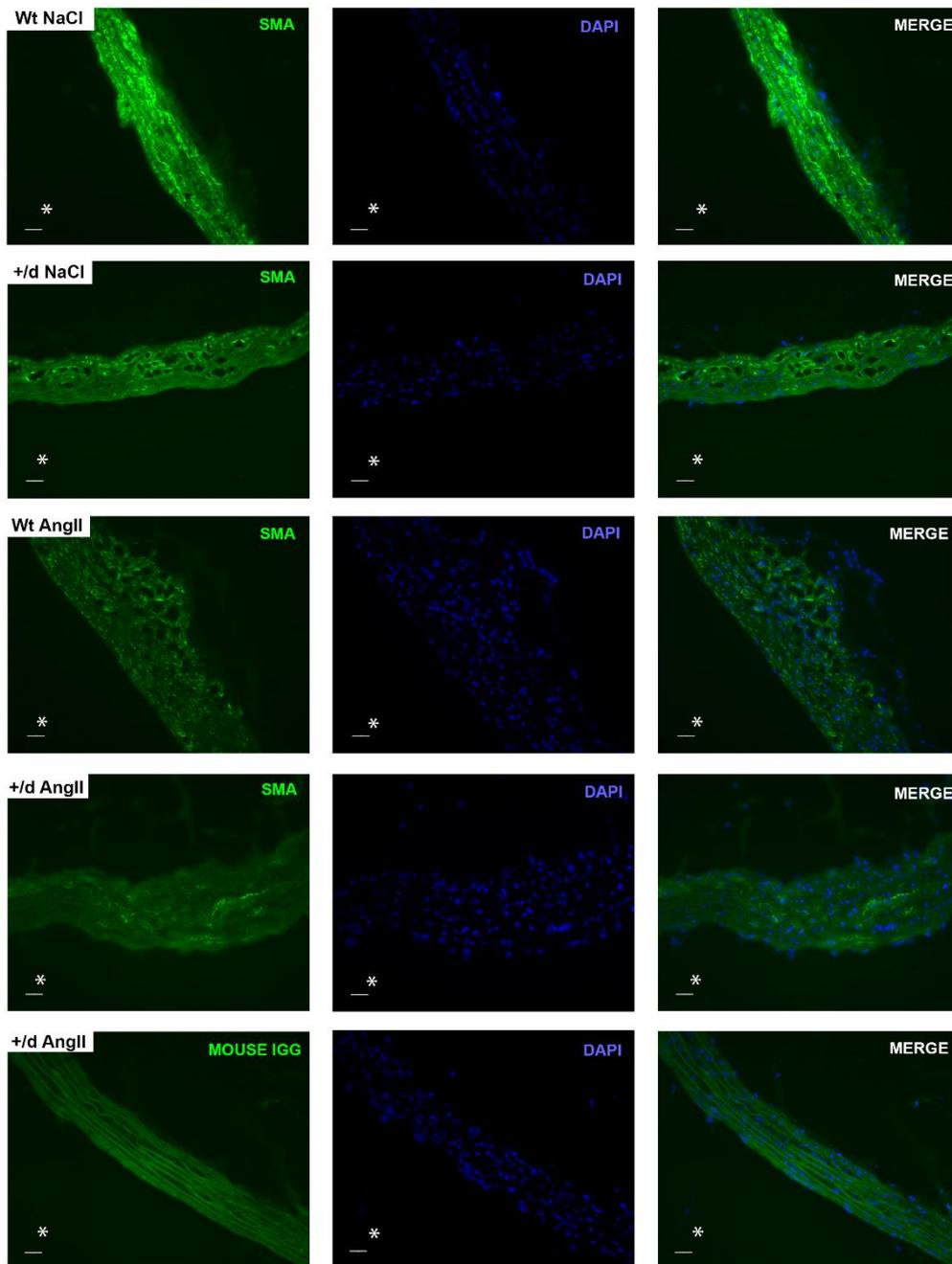
**Abbildung 26: Relative mRNA- und Proteinexpression von  $\alpha$ -Sma im thorakalen Aortengewebe**

**A:** Die rel. mRNA-Expression von  $\alpha$ -Sma wird durch die Gabe von AngII deutlich reduziert, die Reduktion ist in der Bmper<sup>+/-</sup>-Gruppe signifikant. Wt NaCl: n = 11; Bmper<sup>+/-</sup> NaCl: n = 9; Wt AngII: n = 11; Bmper<sup>+/-</sup> AngII: n = 8

**B:** Im Western Blot konnte die Tendenz zur Reduktion von  $\alpha$ -Sma in den AngII-Gruppen auf Proteinebene nochmals bestätigt werden. Wt NaCl: n = 9; Bmper<sup>+/-</sup> NaCl: n = 9; Wt AngII: n = 10; Bmper<sup>+/-</sup> AngII: n = 7; # = NaCl vs. AngII, p < 0,05; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/- = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Zur Vervollständigung der Daten wurde eine Immunhistofluoreszenzmarkierung mit direkt gelabeltem FITC- $\alpha$ -Sma-Antikörper durchgeführt, der ein hellgrünes Signal im Vergleich zur dunkelgrünen Gewebsautofluoreszenz liefert (Abbildung 27). In den mit NaCl-behandelten Wildtyp-Mäusen zeigt sich ein homogen verteiltes Signal in der gesamten Media. Eine deutliche Reduktion des Signals kann sowohl durch die heterozygote Bmper-Defizienz als

auch durch die Behandlung mit AngII gezeigt werden. Hier konnte sich die zuvor gezeigte erhöhte Expression von  $\alpha$ -Sma in den heterozygot-defizienten Mäusen nicht reproduzieren lassen.

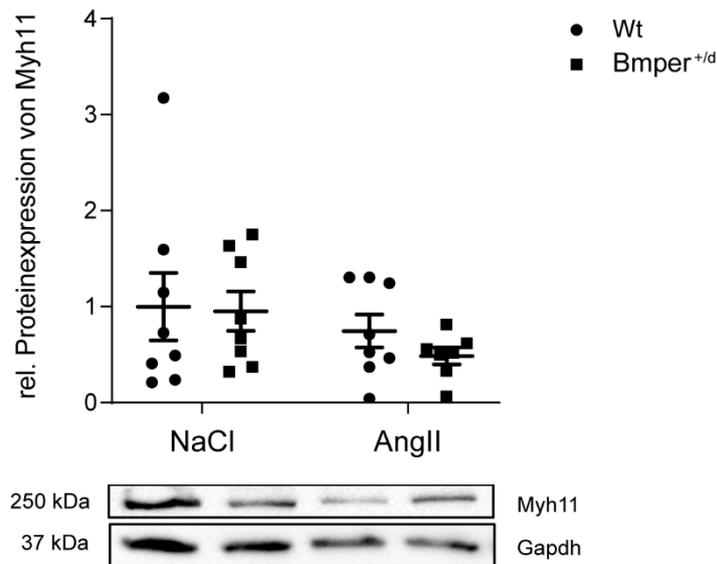


**Abbildung 27: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit  $\alpha$ -Sma Antikörper im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der  $\alpha$ -Sma -Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*-Bilder aus der  $\alpha$ -Sma -Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. Es zeigt sich sowohl durch die Defizienz von *Bmper* als auch durch die Gabe von AngII eine deutliche Reduktion der Expression von  $\alpha$ -Sma im Aortenbogen der Mäuse. +/d = *Bmper*<sup>+/-</sup>; n = 4; hellgrün =  $\alpha$ -Sma; dunkelgrün = Autofluoreszenz; blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot *Bmper*-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20  $\mu$ m

### 5.1.8.2. Die Veränderung der Expression von Myh11

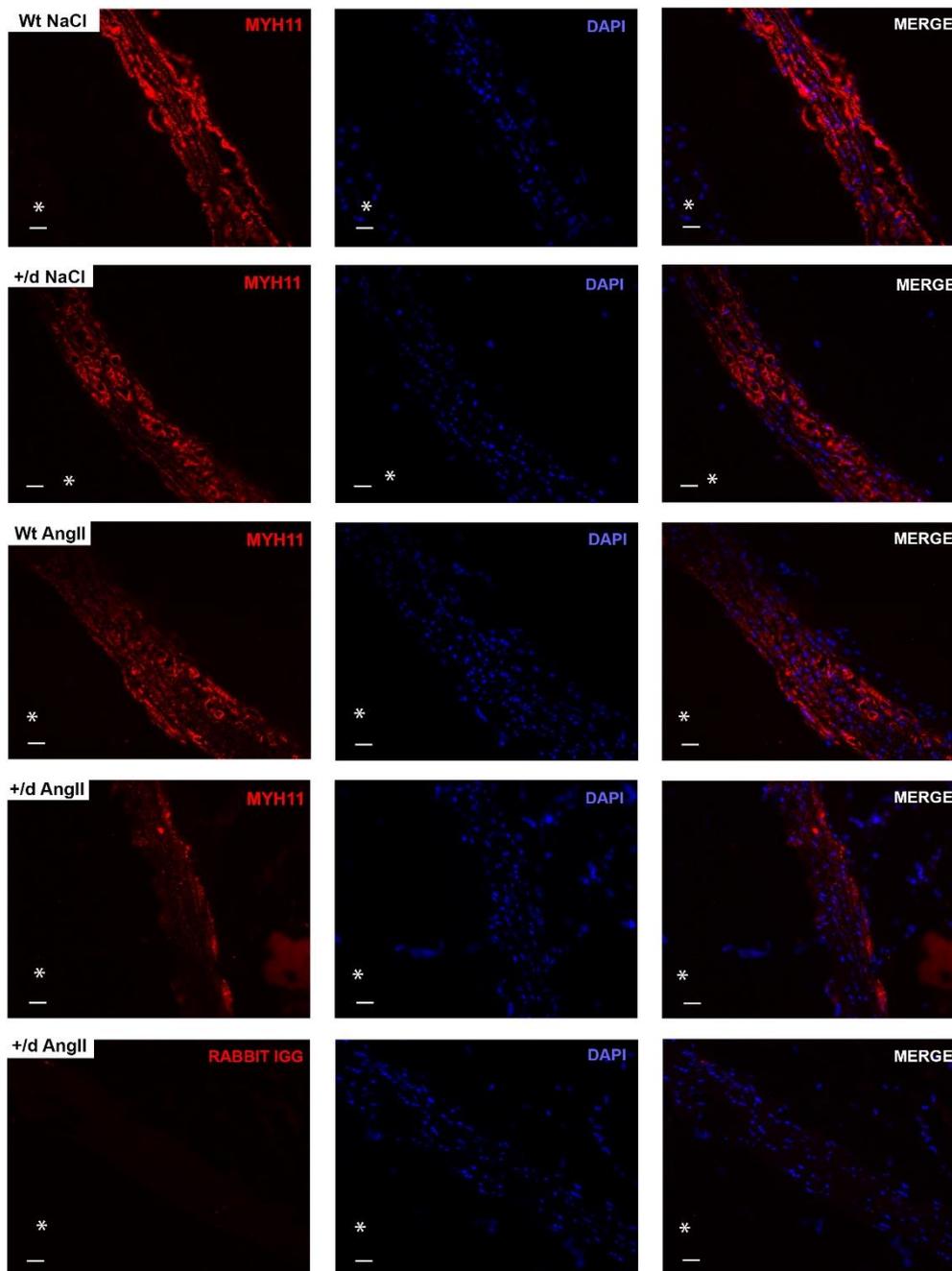
Ein weiterer, deutlich spezifischerer vSMC-Marker ist Myh11. Abbildung 28 zeigt, dass für Myh11 auf Proteinebene keine signifikante Veränderung durch die heterozygote Defizienz von Bmper festgestellt werden kann. Jedoch zeigt sich eine geringgradige Reduktion des kontraktiven Markers für die mit AngII-behandelten Gruppen. Diese Verminderung von Myh11 konnte in Bmper<sup>+/-</sup> Mäusen mit AngII-Behandlung nochmals verstärkt gezeigt werden.



**Abbildung 28: Relative Proteinexpression von Myh11 im Aortenbogen**

Im Western Blot zeigt sich eine geringe Reduktion von Myh11 auf Proteinebene unter AngII-Behandlung. Der Verlust des vSMC-Markers Myh11 wird in der Bmper<sup>+/-</sup> AngII-Gruppe noch deutlicher. Wt NaCl: n = 8; Bmper<sup>+/-</sup> NaCl: n = 8; Wt AngII: n = 8; Bmper<sup>+/-</sup> AngII: n = 7; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/- = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Auch hier wurde eine Immunhistofluoreszenzmarkierung mit spezifischem Antikörper gegen Myh11 durchgeführt, die exemplarische Übersicht ist in Abbildung 29 dargestellt. In den Wildtyp-Mäusen zeigt sich in der Media eine homogene Expression von Myh11 in den Gefäßwänden. In der mit NaCl behandelten Bmper<sup>+/-</sup>-Gruppe zeigte sich eine Reduktion der Expression von Myh11 im medialen Gefäßwandabschnitt. Interessanterweise war das Signal im Bereich der zystischen Hohlräume stärker als im restlichen Gewebe. Auch die Behandlung mit AngII in der Wildtypgruppe nimmt einen reduzierenden Einfluss auf die Expression von Myh11. In den Bmper<sup>+/-</sup>-AngII Mäusen war nahezu kein Signal mehr erkennbar. Diese stärkere Reduktion, im Vergleich zu den anderen Gruppen, konnte bereits im Western Blot gezeigt werden.



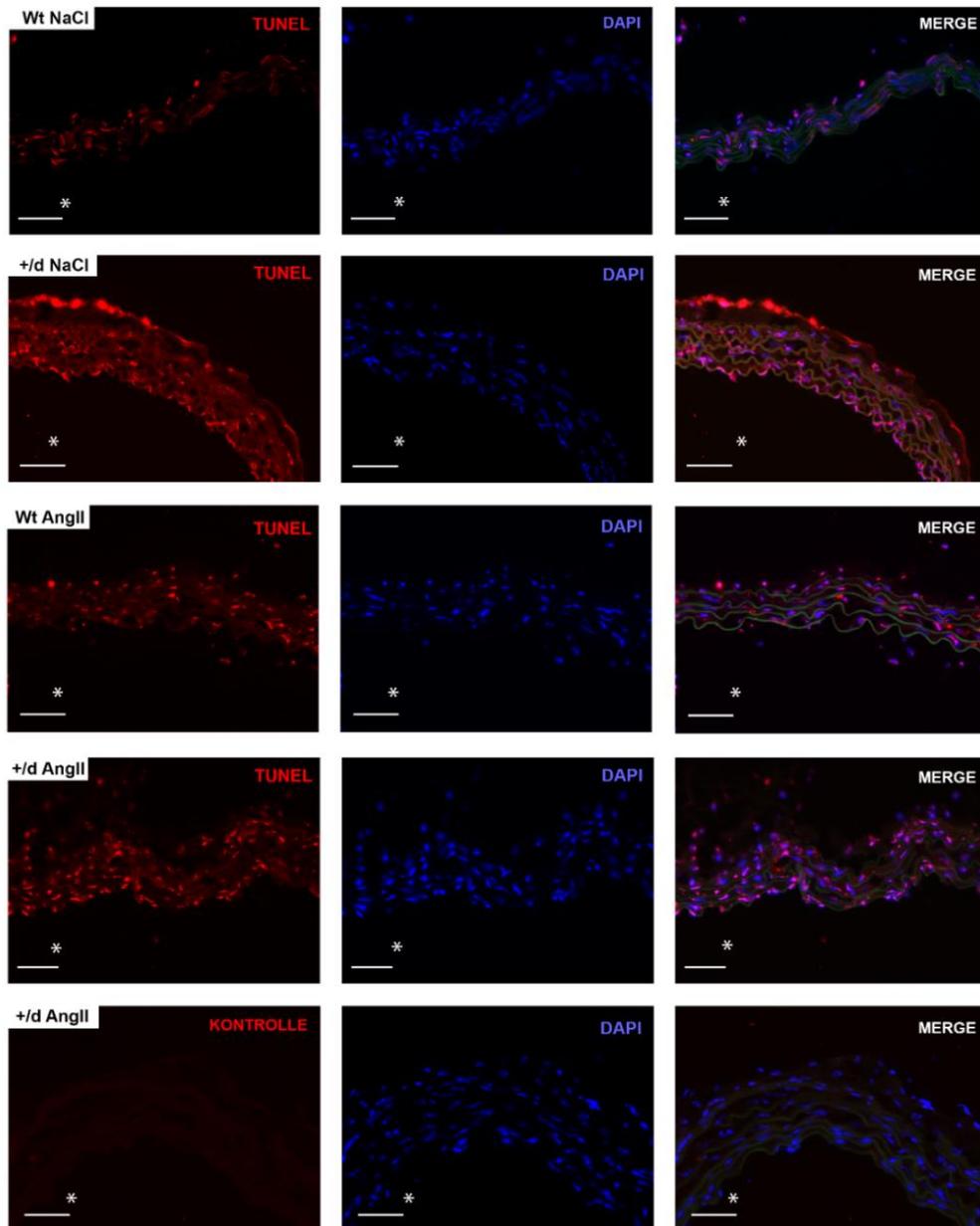
**Abbildung 29: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Myh11 Antikörper im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Myh11-Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*-Bild aus der Myh11 Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. Es zeigt sich sowohl durch die Defizienz von Bmper, als auch durch die Gabe von AngII eine Reduktion der Expression von Myh11 im Aortenbogen der Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. In der +/d-AngII-Gruppe kann diese Reduktion nochmals verstärkt werden. +/d = Bmper<sup>+/-</sup>; n = 4; rot = Myh11; blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20µm

### 5.1.9. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper Defizienz auf den apoptotischen Zelluntergang im Gewebe

Um die Homöostase in unseren Geweben aufrecht zu erhalten, nutzen die Zellen unseres Körpers den Mechanismus des programmierten Zelltodes, auch Apoptose genannt. Während physiologischer Vorgänge, wie beispielsweise der Embryogenese, für die Gewebemöostase oder durch die Regulierung des Immunsystems werden chemische und physikalische Reize induziert, die zum apoptotischen Untergang der Zelle führen (Kyrylkova et al. 2012). Morphologisches Kennzeichen für die Apoptose ist die Kondensation und Fragmentierung des Kerns und später der gesamten Zelle in membrangebundene apoptotische Zellkörperchen. Diese werden durch Phagozytose von nahegelegenen Zellen aufgenommen und rufen somit, im Vergleich zur Nekrose, keine Entzündungsreaktion hervor (Banfalvi 2017). Mit Hilfe der TUNEL-Methode (engl. *TdT – mediated dUTP-biotin nick end labeling*) können die während der Apoptose durch Endonukleasen freigelegten 3'-OH-Gruppen der DNA-Fragmente mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert und betrachtet werden.

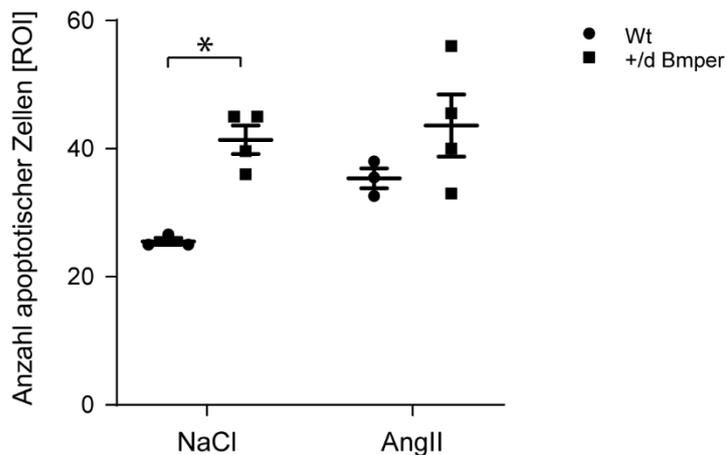
In Abbildung 30 ist eine Übersicht der repräsentativen Aufnahmen des TUNEL-Assays mit 20fach Objektiv dargestellt. In den mit NaCl-behandelten Wildtyp-Mäusen zeigt sich eine leichte und homogene Verteilung von apoptotischen Zellkernen. Im Merge-Bild kann gezeigt werden, dass es sich um Zellkerne handelt, da sie nach der Überlagerung mit der DAPI-Zellkernfärbung als violette Punkte darstellbar sind. Vergleicht man die Wildtyp-NaCl-Mäuse mit der Bmper<sup>+/-</sup> Gruppe so zeigt sich bereits hier eine deutliche Zunahme der apoptotischen Vorgänge besonders im Bereich des Endothels und der Media (Wildtyp NaCl: 26 Apoptosevorgänge vs. Bmper<sup>+/-</sup> NaCl: 41 Apoptosevorgänge im Mittel). Behandelte man die Wildtyp-Mäuse mit Angiotensin-II so steigerte sich die Apoptoserate im Vergleich zur NaCl Gruppe, jedoch geringer als unter heterozygoter Bmper-Defizienz (Wildtyp NaCl: 26 Apoptosevorgänge vs. Wildtyp AngII = 35 Apoptosevorgänge im Mittel). Im Stressmodell, also in der Bmper<sup>+/-</sup> AngII-Gruppe, konnte ebenfalls eine stark erhöhte Anzahl von apoptotischen Zellkernen im Vergleich zur Wildtyp-NaCl Gruppe festgestellt werden. In Bereichen, bei denen es zu einer vermehrten Bildung von Adventitia gekommen ist, konnte auch hier eine deutliche Zunahme roter Signale festgestellt werden. Vergleicht man die Bmper<sup>+/-</sup> -Gruppe in ihrer Behandlung so konnte hier keine deutliche Potenzierung des Signals durch die zusätzliche Gabe von AngII gezeigt werden. (Bmper<sup>+/-</sup> NaCl: 41 Apoptosevorgänge vs. Bmper<sup>+/-</sup> AngII: 44 Apoptosevorgänge im Mittel).



**Abbildung 30: TUNEL-Assay zur Bestimmung der apoptotischen Zellen in der thorakalen Aorta**

Linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der TUNEL-Färbung in der 200fachen Vergrößerung; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*-Bild aus der TUNEL-Färbung, der DAPI-Zellkern Färbung und den autofluoreszierenden elastischen Fasern. Es zeigt sich eine erhöhte Steigerung der Apoptose in den mit AngII-behandelten Mäusen. Am stärksten jedoch ist die erhöhte Apoptoserate in den  $Bmper^{+/d}$  Mäusen mit und ohne AngII-Behandlung zu sehen.  $+/d = Bmper^{+/d}$ ;  $n < 4$ ; rot = TUNEL-Färbung; blau = DAPI- Zellkernfärbung; grün= Autofluoreszenz; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse;  $+/d$  = heterozygot  $Bmper$ -defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 50  $\mu m$

Diese Daten wurden in einem Punktdiagramm, gezeigt in Abbildung 31, aufgetragen und stellen eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen durch die heterozygote Defizienz von  $Bmper$  unter der Behandlung mit NaCl ( $p = 0,01$ ) dar.



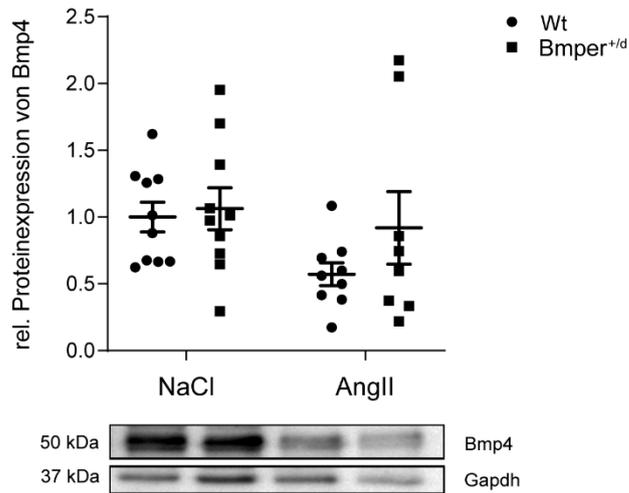
**Abbildung 31: Quantifizierung der Apoptosevorgänge in der TUNEL-Färbung**

Die Auswertung der TUNEL-Färbung erfolgte durch Zählen apoptotischer Zellkerne in einem definierten Bereich der Gefäßwand in der 200fachen Vergrößerung. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der gezählten apoptotischen Zellen von einer Maus auf unterschiedlichen Gewebeschnitten dar. Die Apoptosevorgänge nehmen, im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle, durch die heterozygote Defizienz von Bmper signifikant zu.  $n < 4$ ; Wt vs. Bmper<sup>+/-</sup>; \* =  $p < 0,05$ ; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/- = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

#### 5.1.10. Die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz auf den BMP-Signalweg

Um die Auswirkung der heterozygoten-Bmper-Defizienz in dem genutzten Tiermodell besser verstehen zu können, ist es notwendig sich die nachgeschalteten Signalwege anzuschauen. Obwohl die Auswirkung von Bmper auf unterschiedliche Signalkaskaden bislang unzureichend erforscht ist, wurde in dieser Arbeit lediglich der Fokus auf die Regulation der Expression von Bmp4 und die Interaktion mit der Smad-abhängigen Signalkaskade gelegt.

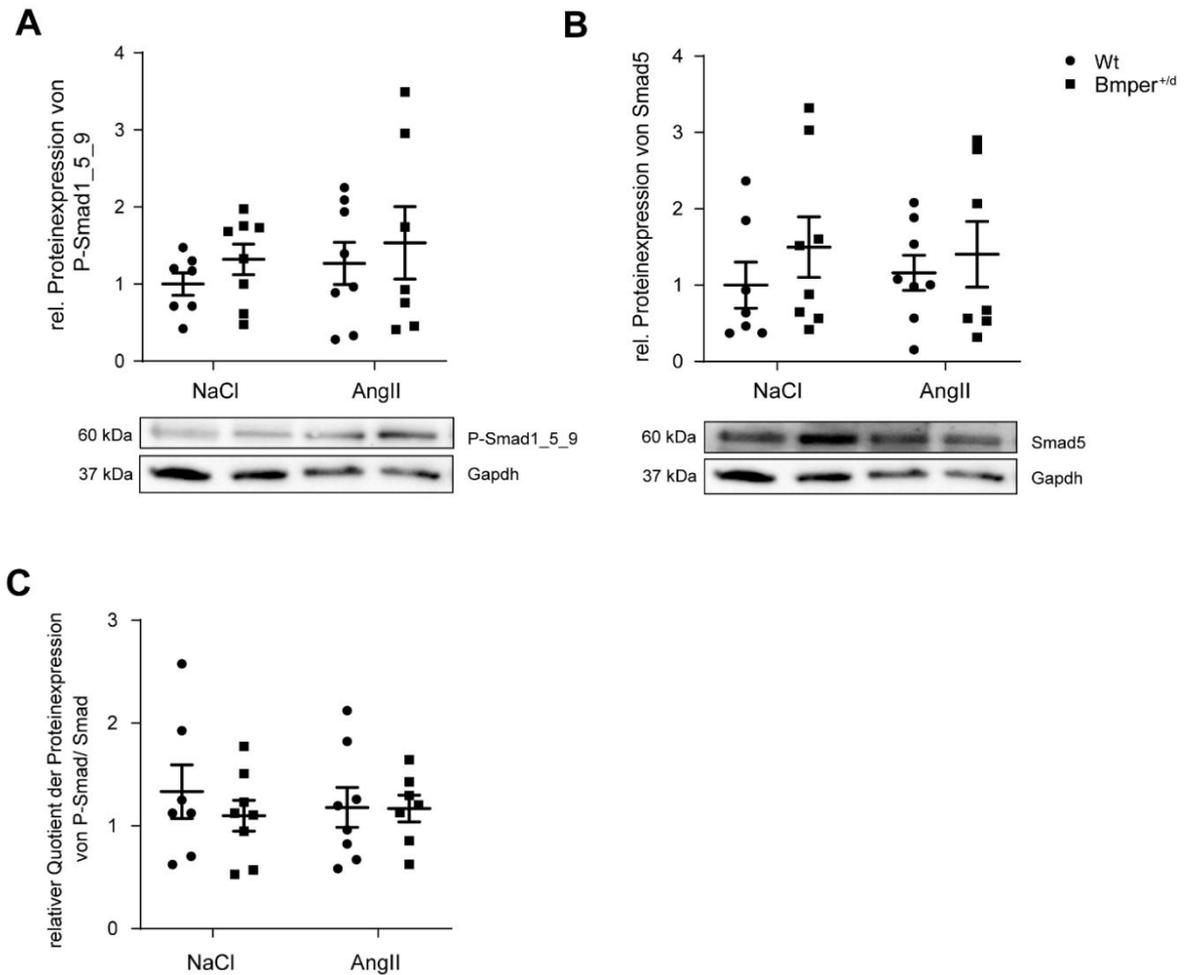
Die Regulation von Bmp4 wurde mittels Western Blot überprüft, die relativen Proteinexpressionen sind in Abbildung 32 dargestellt. Die mit NaCl-behandelten Mäuse zeigen in beiden Versuchsgruppen im Mittelwert vergleichbare Expressionslevel von Bmp4. Die Proteinexpression wird jedoch durch AngII herunterreguliert. Diese Regulation kann durch die hohe Streuung in den Bmper<sup>+/-</sup> Mäusen mit AngII-Behandlung nicht so deutlich gezeigt werden, wie bei den Wildtypen mit AngII. Die heterozygote Defizienz zeigt somit keine genotypabhängige Regulation von Bmp4.



### Abbildung 32: Relative Proteinexpression von Bmp4 im Aortenbogen

Die Proteinexpression von Bmp4 wird durch die Gabe von AngII im Aortenbogen vermindert, durch die heterozygote Defizienz von Bmper kann keine Regulation festgestellt werden. Wt NaCl: n = 10; Bmper<sup>+/-</sup> NaCl: n = 9; Wt AngII: n = 9; Bmper<sup>+/-</sup> AngII: n = 8; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/- = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

In der BMP-Signalkaskade sind die zentralen intrazellulären Mediatoren Smads. SMAD wird durch die Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase phosphoryliert und kann dann einen Komplex mit CO-SMAD eingehen, in den Nukleus translozieren und dort die Expression von beispielsweise ID1 steuern (Valdimarsdottir et al. 2002). Um die Aktivierung des Smad-Signalwegs untersuchen zu können, wurde die relative Proteinexpression von phosphoryliertem Smad (P-Smad) im Verhältnis zum gesamten Smad untersucht und ein Quotient daraus gebildet. In Abbildung 33A ist die relative Proteinexpression von P-Smad1\_5\_9, in B ist die relative Expression von Smad5 dargestellt. Abbildung 33C zeigt die interpretierbaren Daten nach Bildung des P-Smad/Smad-Quotienten. Durch die hohe Streuung kann keine klare Aussage getroffen werden, jedoch zeigt sich eine Tendenz zur Verminderung von P-Smad und somit einer Herabregulierung des Signalwegs durch die heterozygote Defizienz von Bmper.

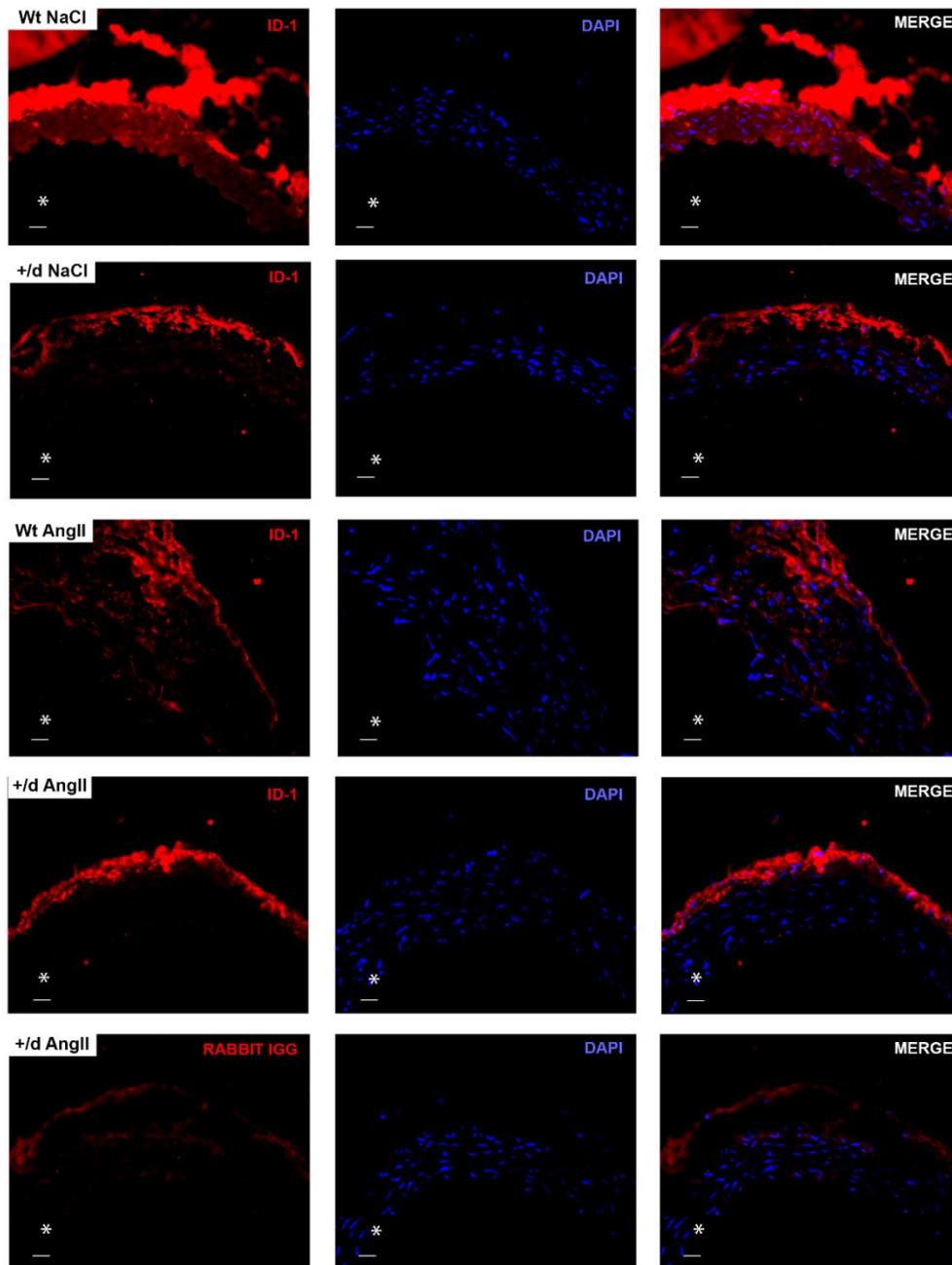


**Abbildung 33: Relative Proteinexpression von Smad und P-Smad im Aortenbogen**

**A:** zeigt die relative Proteinexpression von P-Smad1, 5 und 9. Der Blot zeigt, dass die Expression von phosphoryliertem Smad in der Bmper<sup>+d</sup> NaCl Gruppe im Vergleich zum Wildtyp tendenziell gesteigert ist. Durch die hohe Streuung ist dieser Unterschied bei den AngII Gruppen nicht so stark. **B:** zeigt die relative Proteinexpression von Smad5. Es zeigt sich in allen Gruppen eine hohe Streuung, jedoch ist die Expression von Smad5 in den Bmper<sup>+d</sup> Mäusen im Mittel höher als in den Wt- Gruppen **C:** zeigt den berechneten Quotienten aus P-Smad zu Smad. Diese Abbildung zeigt, dass in den Bmper<sup>+d</sup>-Mäusen in beiden Gruppen geringgradig weniger P-Smad vorliegt als bei den Wildtypmäusen. AngII hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Smad. Wt NaCl: n = 7; Bmper<sup>+d</sup> NaCl: n = 8; Wt AngII: n = 8; Bmper<sup>+d</sup> AngII: n = 7; P = phosphoryliert; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Der in der Signalkaskade dem Smad-Signalweg untergeschaltete Mediator ist unter anderem Id1 (engl. *DNA-binding protein inhibitor-1*). Mit einem spezifischen Antikörper gegen Id1 wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung auf Gewebeschnitten des thorakalen Aortenabschnitts von Mäusen durchgeführt. Aufgrund der stark abweichenden Signalintensität zwischen Media und Adventitia, wurden die mikroskopischen Bilder mit zwei Belichtungszeiten aufgenommen. In Abbildung 34 wurde der Fokus auf die Expression in Media und Endothel gelegt, hier ist die Adventitia stark überbelichtet und kann daher nicht beurteilt werden. Die Expression von Id1 ist in allen Bildern der Übersicht sehr

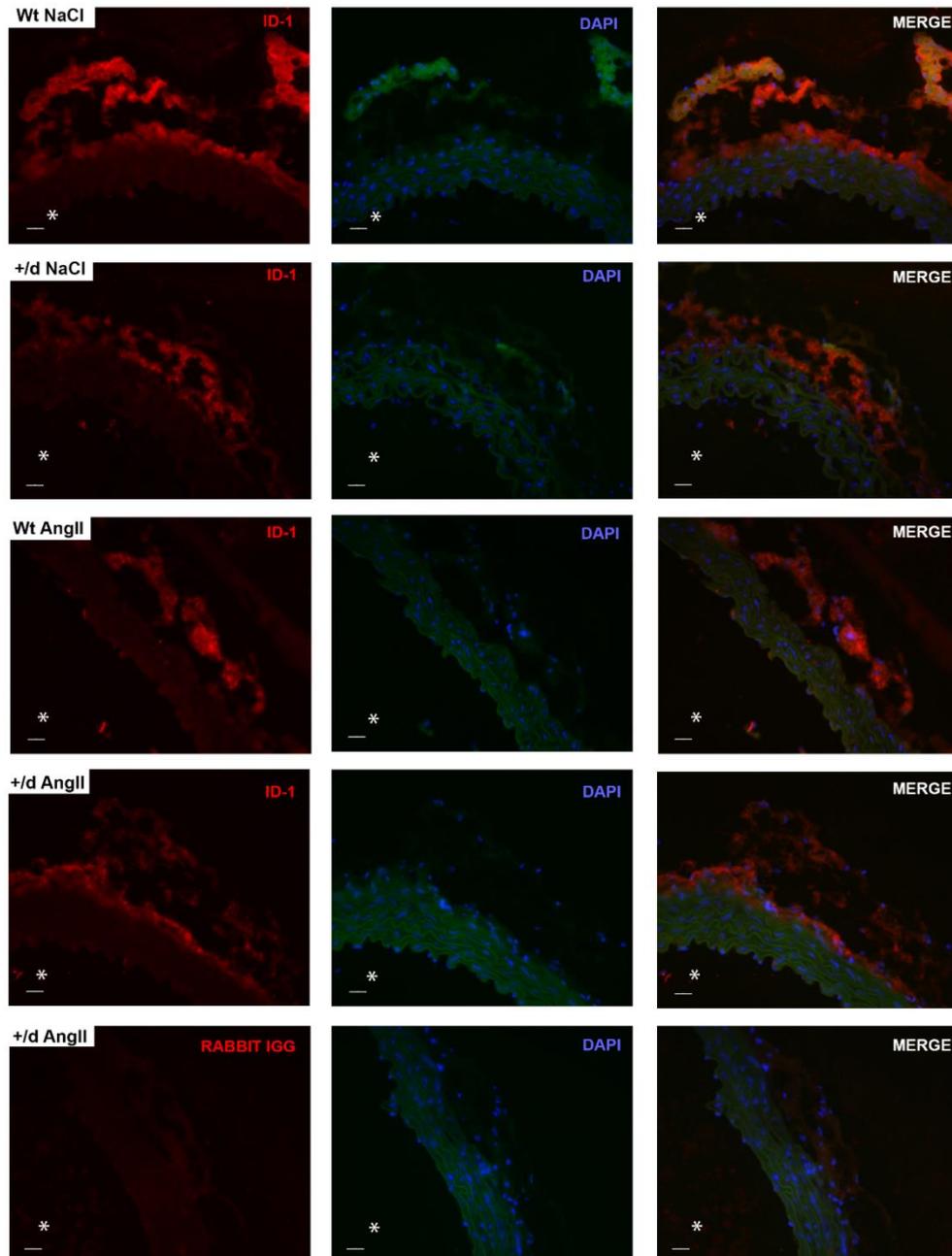
schwach, jedoch kann man eine leichte Herabregulation durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* in der mit NaCl- und der mit AngII-behandelten Gruppe, im Vergleich zum Wildtyp sehen. Die Expression bei den *Bmper*<sup>+d</sup> Mäusen ist in der Media, ähnlich der Negativkontrolle, nicht vorhanden. In den Wildtyp-Mäusen kann noch ein schwaches Signal im Bereich der Media und des Endothels wahrgenommen werden.



**Abbildung 34: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Id1 Antikörper zur Beurteilung der Expression in der Tunica media und Endothel der thorakalen Aorta**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Id1 Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv, die Belichtungszeit ist angepasst an die Expression in Media und Endothel; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: Merge-Bilder aus der Id1-Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung; Die Id1 Expression in der Media und dem Endothel ist durch die heterozygote Defizienz geringgradig erniedrigt, unter AngII kann kein Unterschied zur Wildtypkontrolle gezeigt werden. Die Expression von Id1 im Gewebe ist in allen Versuchsgruppen sehr schwach. +/d = *Bmper*<sup>+d</sup>; n= 3; rot = Id1; blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot *Bmper*-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20 µm

In der Übersicht in Abbildung 35 kann für die Adventitia keine klare Aussage getroffen werden. Die Expression von Id1 in der Adventitia ist in den Wildtyp-Mäusen geringgradig stärker als in den anderen Gruppen. Die Expressionsintensität durch die heterozygote Defizienz von Bmper und die AngII-Applikation unterscheiden sich jedoch visuell nicht voneinander.

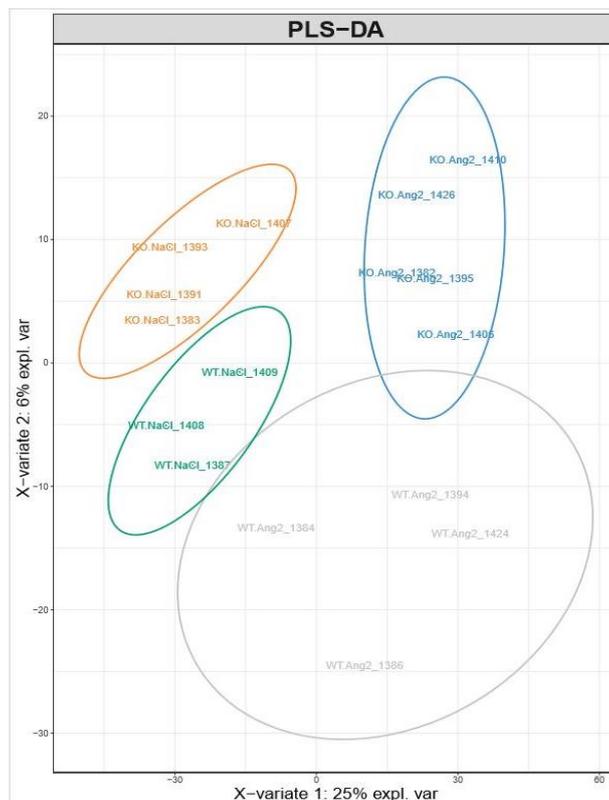


**Abbildung 35: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Id1 Antikörper zur Beurteilung der Expression in der Tunica adventitia der thorakalen Aorta**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Id1-Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv, die Belichtungszeit ist angepasst an die Expression in der Adventitia; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: Merge-Bilder aus der Id1-Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung; Die Expression von Id1 in der Adventitia war in den Wildtypmäusen mit NaCl am stärksten. Die verbleibenden Gruppen zeigten keinen Unterschied in der Signalintensität. +/d = Bmper<sup>+/d</sup>; n= 3; rot = Id1; blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20 µm

### 5.1.11. Durchführung eines Proteom-Arrays: Eine Übersichtsdarstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bekannten Marker wie Kollagene und MMPs, welche mit der Pathogenese von Aortenaneurysmen assoziiert sind, in Bezug auf die globale heterozygote Defizienz von Bmper in der Maus untersucht. Um neue, weitere regulierte Mediatoren identifizieren und die Wirkungsweise von Bmper besser verstehen zu können, wurden Aortenbogen-Proben der Mäuse für die Massenspektrometrie (MSI) in Kollaboration mit Prof. Dr. Oliver Schilling, Institut für Klinische Pathologie des Universitätsklinikum Freiburg, analysiert. Die Grafiken wurden im Rahmen der ersten Auswertung von Prof. Schilling erstellt und geben einen Überblick über die regulierten Proteine und deren Einfluss auf biologische Prozesse. Abbildung 36 ist die Darstellung einer Regressionsanalyse und (engl. *partial least squares discriminant*; PLS-DA) veranschaulicht, dass die Gruppen sich in ihrem gemessenen Proteom klar voneinander abgrenzen, lediglich zwischen den AngII behandelten Mäusen können deutlichere Überlappungen festgestellt werden. Im Gesamtergebnis wurden in dieser Analyse 2875 regulierte Proteine festgestellt.



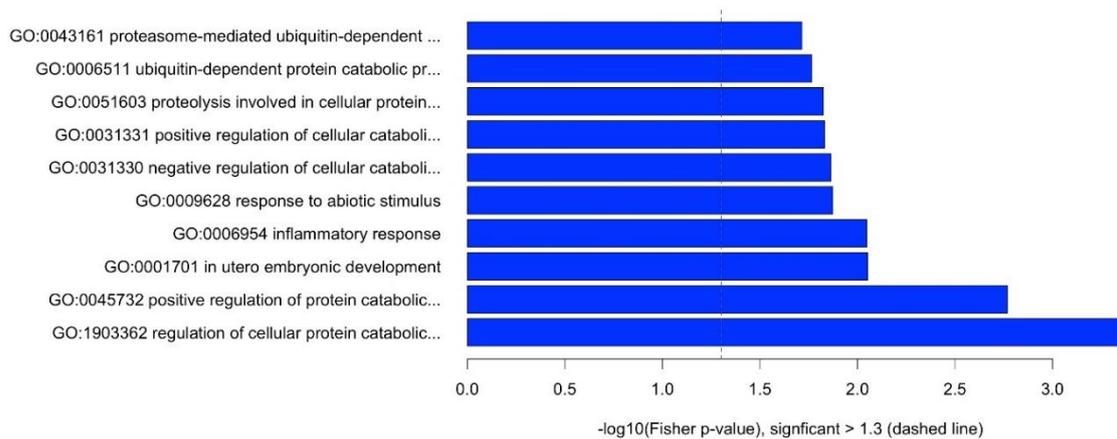
**Abbildung 36: PLS-DA Auswertung der Proteomanalyse aus Aortenbogenlysaten**

Dargestellt sind die einzelnen Proben, welche in den Proteomscreens mit einbezogen wurden, aufgetragen nach ihrem individuellen Proteincluster. Hierfür wurde die PLS-DA Methode (engl. *Partial least squares discriminant analysis*) genutzt. Die Ellipsen stellen das dazugehörige Konfidenzintervall von 95% dar. Die Gruppencluster sind bis auf die AngII Gruppen voneinander abgegrenzt. Wt NaCl: n= 3; KO (Bmper<sup>+d</sup>) NaCl = 4; Wt AngII: n=4; KO (Bmper<sup>+d</sup>) AngII: n= 5; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Gruppen einander gegenübergestellt und die regulierten Proteine verglichen. In Abbildung 37 ist eine Übersicht für die Zuordnung in die spezifischen GO-Gruppen dargestellt. Verglichen wurde die Analyse der Wildtyp NaCl-Mäuse mit den heterozygot-defizienten Bmper Mäusen. Diese Prozesse sind alle signifikant reguliert, da die Signifikanz hier mit einem Schwellenwert von größer 1,3 festgelegt wurde.

Durch die heterozygote Defizienz kommt es zu einem signifikant erhöhten Abbau von zellulären Proteinen, welche unter „*regulation of cellular protein catabolic process*“ zusammengefasst sind. Ebenso kommt es durch Ubiquitin-abhängige Prozesse (GO-Nummer: 0006511), durch das Proteasom initiierte Ubiquitine (GO-Nummer: 0043161) und Proteolyse (GO-Nummer: 0051603) zum Abbau von Proteinen. Interessanterweise wird durch die *Bmper*<sup>+/-d</sup> Defizienz auch die Gruppe der inflammatorischen Antwort (GO-Nummer: 0006954) signifikant reguliert, was unter anderem bereits durch die erhöhte Expression von MMPs gezeigt werden konnte.

#### Wt NaCl vs. *Bmper*<sup>+/-d</sup> NaCl

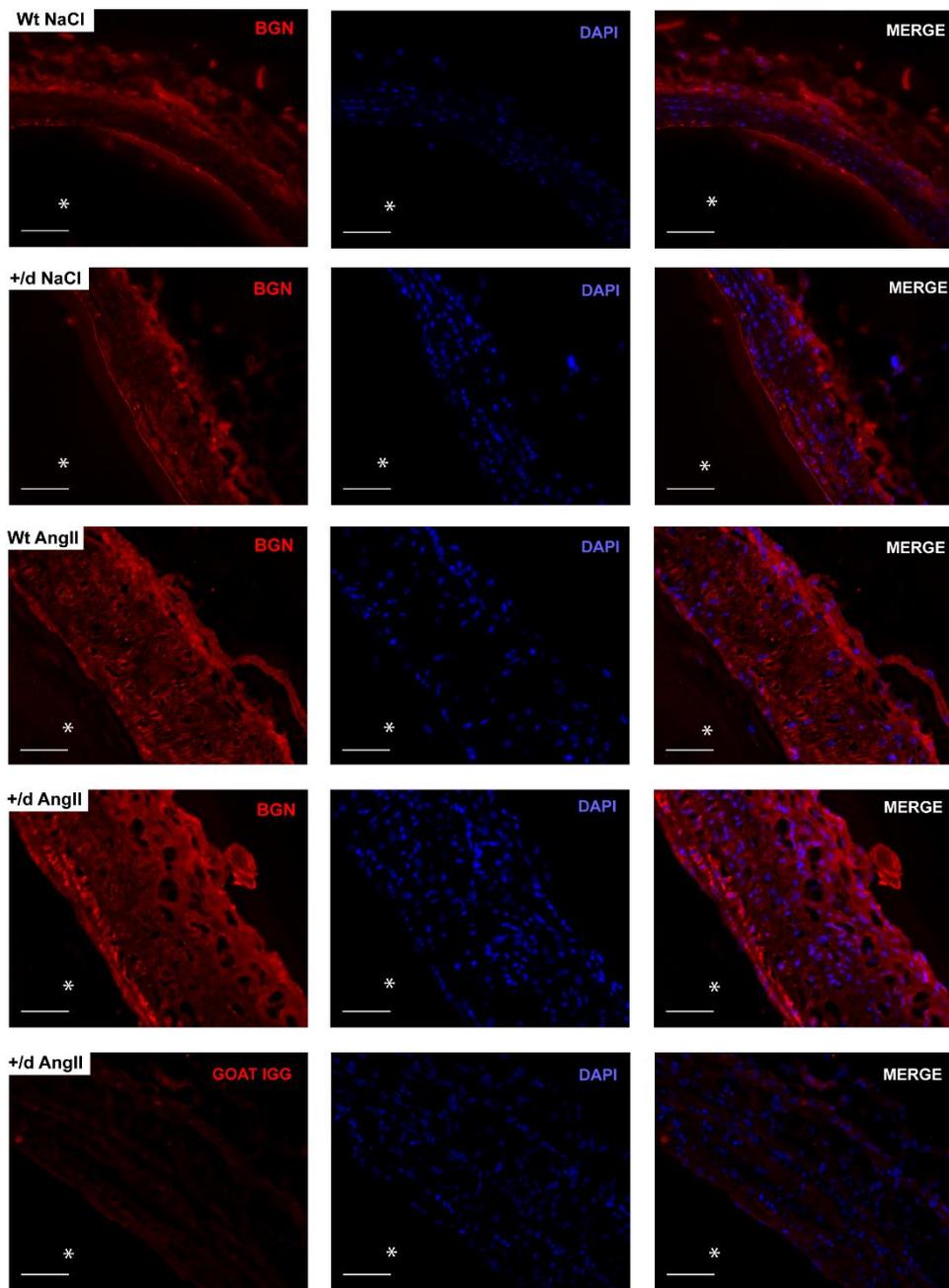


**Abbildung 37: Gene Ontology klassifizierte Auswertung des Proteomscreens der Wt NaCl vs. *Bmper*<sup>+/-d</sup> Mäuse**

Die GO-Gruppen stellen eine Zusammenfassung der durch die *Bmper*<sup>+/-d</sup> Defizienz regulierten biologischen Prozesse dar. Die hier aufgeführten signifikant regulierten GO-Gruppen kennzeichnen sich durch katabole und proteolytische Aktivitäten im Aortengewebe der Mäuse. Des Weiteren ist die inflammatorische Antwort durch die Defizienz signifikant reguliert.

Neben erhöhten proteolytischen Prozessen konnten auch erhöhte Expressionsmuster im Bereich der Extrazellulärmatrix gemessen werden. In vorläufigen Daten wurde durch die *Bmper*<sup>+/-d</sup>-Defizienz das signifikant regulierte Protein Biglykan identifiziert. Gelistet wird es unter anderem unter der GO für Biologische Prozesse, zu der der Blutgefäßumbau (*Blood vessel remodeling*; GO-Nummer:0001974) zählt (Ashburner et al. 2000, Gene Ontology 2021). Biglykan zählt zu den Proteoglykanen (engl. *leucine-rich repeat proteoglycan*; SLRP) und sorgt für die Kollagenfibrillenbildung in Knorpeln und Knochen, aber auch in Blutgefäßen, weshalb sich zur weiteren Analyse dieses Proteins entschieden wurde (Shimizu-Hirota et al. 2004).

In Abbildung 38 ist die exemplarische Übersicht der Immunfluoreszenzmarkierung von Biglykan im Aortenbogen der vier Versuchsgruppen dargestellt. In Wildtyp-Mäusen mit NaCl-Behandlung zeigt sich eine starke Expression in der Adventitia und im Endothel. Durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* kann, neben der in den Wildtypen beschriebenen Expression, eine leichte Zunahme in der *Tunica media* gezeigt werden. Diese Expressionssteigerung in der Media wird unter AngII-Behandlung deutlich homogener und somit auch verstärkt. Hier konnte zwischen den Wildtyp-Mäusen und der *Bmper*<sup>+/-d</sup>-AngII-Gruppe kein Unterschied festgestellt werden.

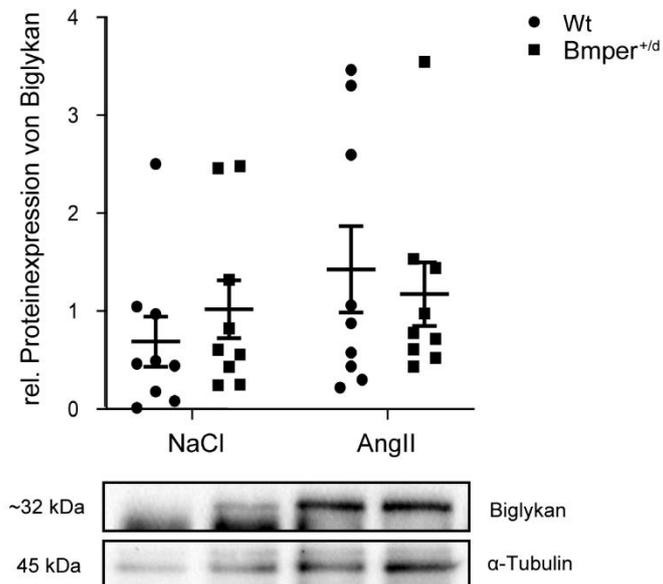


**Abbildung 38: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Biglykan-Antikörper im Aortenbogen**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Biglykan (Bgn)-Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*- Bilder aus der Bgn-Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. Es zeigt sich sowohl durch die Defizienz von Bmper, eine leichte Expressionssteigerung von Bgn in der Media. Durch die Gabe von AngII kann in beiden Versuchsgruppen eine deutliche Steigerung der Expression von Biglykan im Aortenbogen der Mäuse gezeigt werden. +/d =  $Bmper^{+/d}$ ; n = 3; rot = Biglykan (Bgn); blau = DAPI- Zellkernfärbung; \* = Gefäßlumen Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 50  $\mu$ m

Um die visuellen Unterschiede quantifizieren zu können wurden Western Blots durchgeführt. Hier konnten sich die in der Immunfluoreszenzmarkierung gewonnenen Daten nicht so deutlich bestätigen lassen, der Graph zu Auswertung ist Abbildung 39 zu entnehmen. Die relative Proteinexpression von Biglykan nimmt im Mittel bei den  $Bmper^{+/d}$ -NaCl-Mäusen im Vergleich zur Wildtypgruppe zu. Die starken Schwankungen der

Mittelwerte in allen Gruppen, im Vergleich zur Wildtyp-NaCl-Gruppe, sind durch einige wenige Proben mit höherer Expression zu erklären. Es wäre notwendig die Stichprobenanzahl zu erhöhen, um klarere Ergebnisse zu erhalten.



#### Abbildung 39: Relative Proteinexpression von Biglykan im Aortenbogen

Auf Proteinebene kann ein sehr schwacher Anstieg von Biglykan durch die heterozygote-Defizienz von Bmper festgestellt werden. Eine Veränderung durch die Gabe von AngII ist aufgrund der hohen Streuung nicht feststellbar;

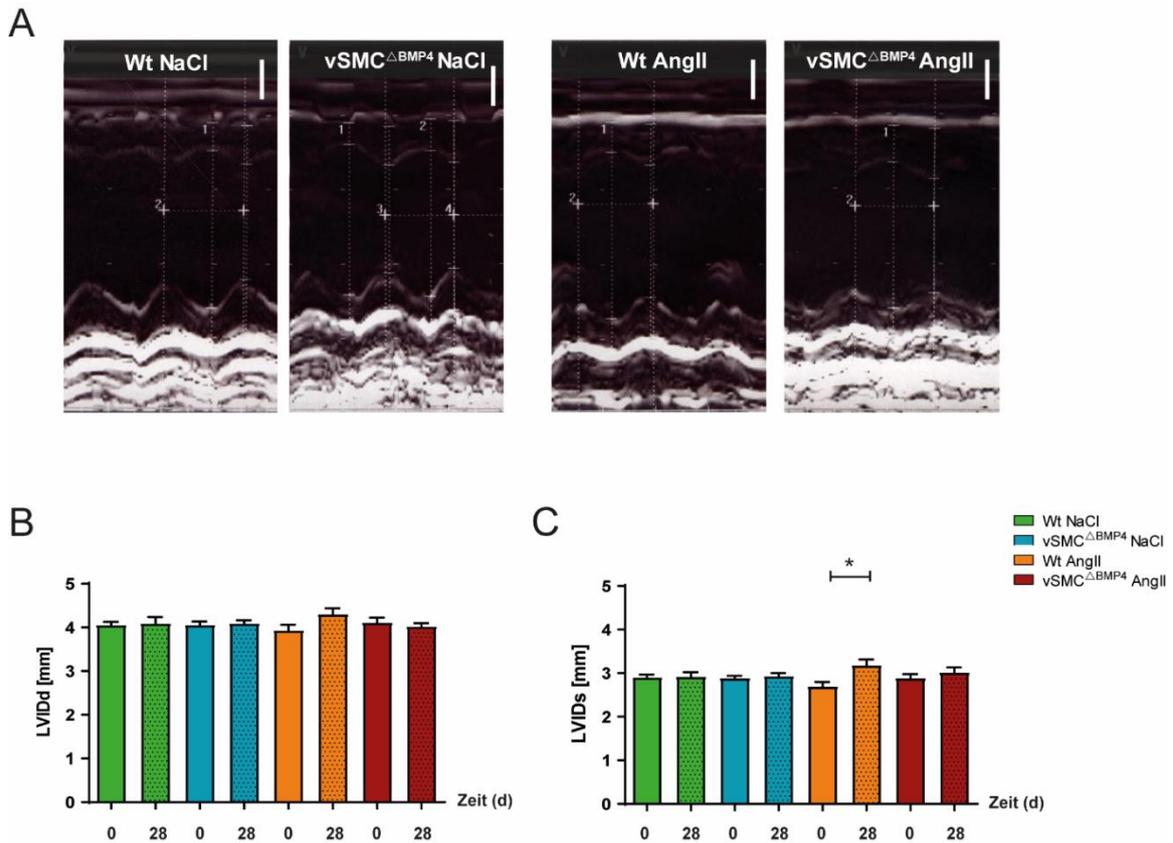
n = 9; Wt = Wildtyp-Mäuse; +/d = heterozygot Bmper-defiziente Mäuse; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

## 5.2. Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Deletion

Im zweiten Versuchsteil wurde die Mauslinie Myh11-CreERT2/Bmp4flox genutzt. Auch diesen Mäusen wurden osmotische Minipumpen in die Nackenfalte implantiert, die in der Versuchsgruppe über 28 Tage kontinuierlich Angiotensin II (AngII) verabreichte und so zur Induktion von Aneurysmen führte. In der Kontrollgruppe wurde ebenfalls isotonische Kochsalzlösung als Solvens eingesetzt. Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt, hiervon wurde die Hälfte im Anschluss mit Tamoxifen induziert. Dies aktiviert die in glatten Muskelzellen exprimierte Cre-Rekombinase und führt durch Herausschneiden von Exonen des Bmp4-kodierenden Genabschnittes zur Inhibition der Expression in diesem Zelltyp (siehe 4.1.2). Als Bezeichnung für die zur Gruppe zugehörigen Mäuse wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Abkürzung vSMC<sup>ΔBMP4</sup> verwendet. Die Wildtyp-Mäuse wurden erneut mit Wt gekennzeichnet. Diese Daten ergänzen die Dissertationsergebnisse von Kora Pröhl, welche die Immunhistofluoreszenzfärbungen durchgeführt und ausgewertet hat (Pröhl 2018).

### 5.2.1. Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die Herzleistung

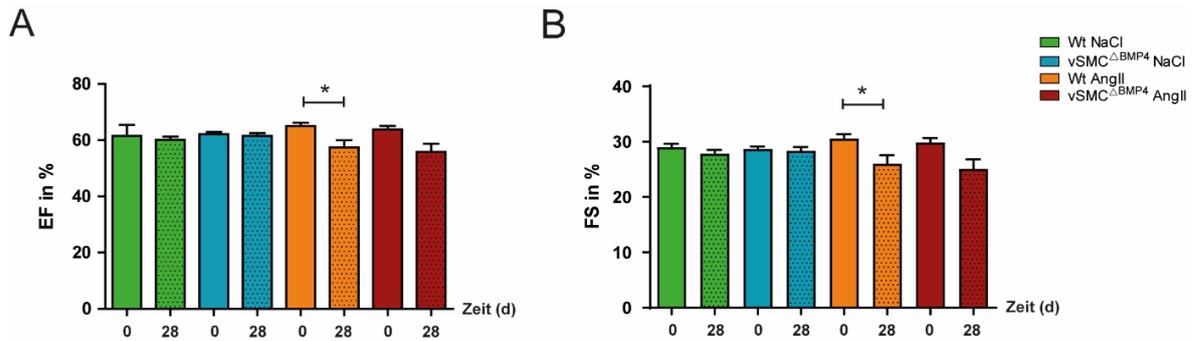
Abbildung 40 veranschaulicht die Veränderungen der Innendurchmesser des linken Ventrikels in Diastole und Systole von Tag 0 bis Tag 28. Für den Innendurchmesser der Diastole (Abbildung 40A) lassen sich nach 28 Tagen keine signifikanten Unterschiede feststellen, lediglich in der mit AngII behandelten Wildtypgruppe kommt es zu einer leichten Erweiterung des Ventrikeldurchmessers (M Tag 0 = 3,94 mm; Tag 28 = 4,31 mm). In der Systole veränderte sich der linksventrikuläre Innendurchmesser ebenfalls nicht durch die vSMC-spezifische Defizienz von Bmp4. Wie auch in der Diastole, zeigt sich eine Dilatation in der mit AngII behandelten Wildtypgruppe, die in der Systole signifikant ist ( $p= 0,025$ ; M Tag 0 = 2,72 mm; Tag 28 = 3,18 mm).



**Abbildung 40: Vergleich der Innendurchmesser des linken Ventrikels von Tag 0 zu Tag 28**

**A:** Exemplarische Darstellung der sonographischen Aufnahmen im M-Mode; **B:** Innendurchmesser in der Diastole; **C:** Innendurchmesser in der Systole. Es zeigt sich in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung der linksventrikulären Innendurchmesser während der Diastole. Unter Gabe von AngII entsteht eine signifikante Dilatation in der Systole bei Wildtypmäusen. Wt NaCl: n = 12; vSMC $\Delta$ BMP4 NaCl: n = 12; Wt AngII: n = 10; vSMC $\Delta$ BMP4 AngII: n = 12; \*: p < 0,05; LVIDd = diastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser; LVIDs = systolischer linksventrikulärer Innendurchmesser; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC $\Delta$ BMP4 = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Neben den Innendurchmessern der linken Ventrikel wurde auch die Auswurfraction (EF) bestimmt. Die Auswurfsleistung verminderte sich bei den mit AngII infundierten Wildtyp-Mäusen signifikant, im Mittel betrug die Reduktion 6,9 % (p= 0,016; M Tag 0 = 64,3 %; Tag 28 = 57,4 %). Bei der mit AngII behandelten vSMC $\Delta$ BMP4- Gruppe verschlechterte sich die Herzleistung deutlich um 8 %, war jedoch nicht signifikant reguliert (p= 0,060; M Tag 0 = 63,8 %; Tag 28 = 55,8 %).



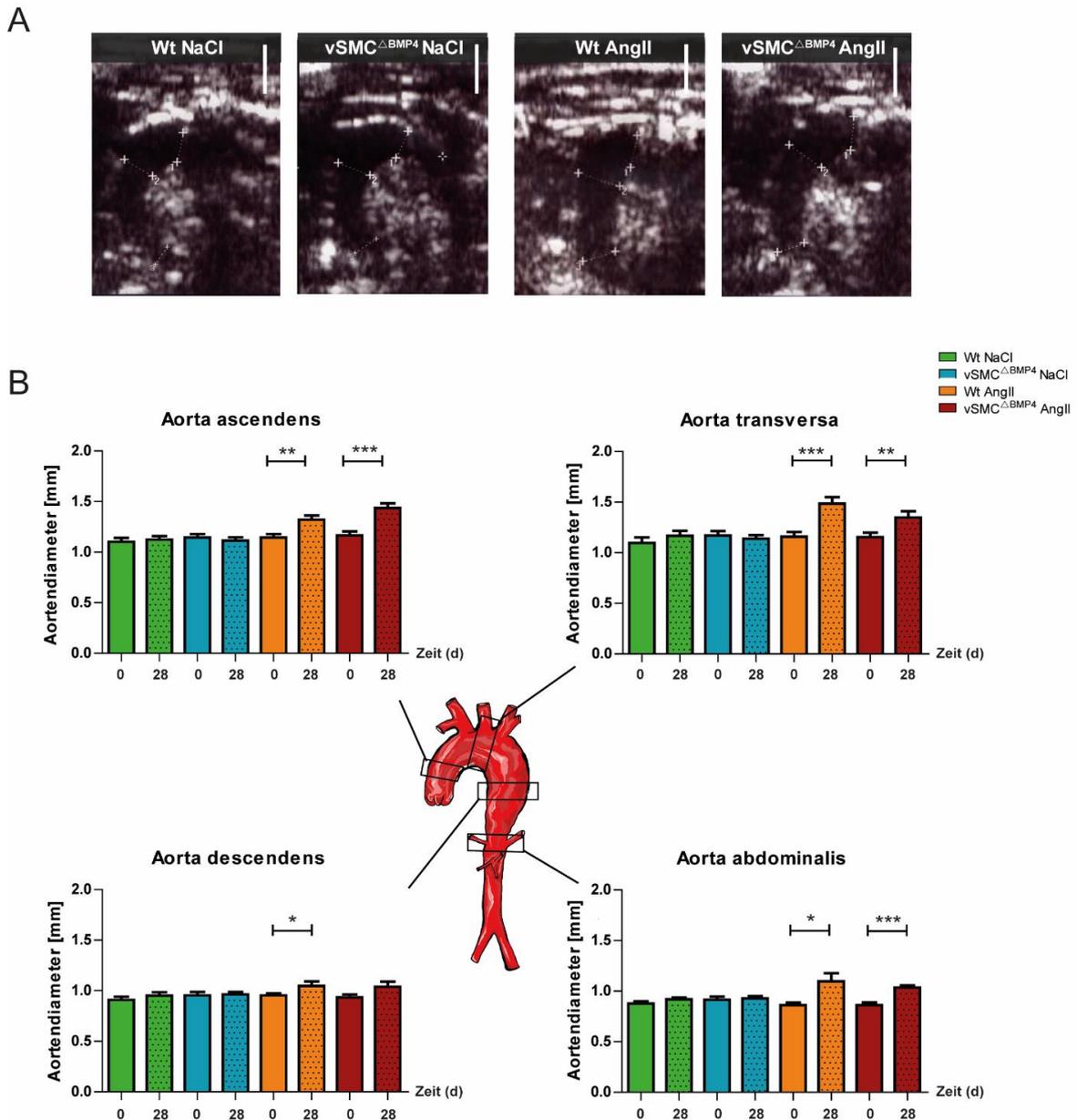
**Abbildung 41: Vergleich der Auswurf- und Verkürzungsfraction von Tag 0 zu Tag 28**

**A:** Veränderung der Ejektionsfraktion **B:** Veränderung der Verkürzungsfraction. Es zeigt sich unter Basalbedingungen keine Veränderung, nach Gabe von Ang-II ist die EF und FS signifikant verschlechtert. Auch bei cKo AngII kommt es zu einer Verschlechterung der Herzleistung. Wt NaCl: n = 12; vSMC $\Delta$ BMP4 NaCl: n = 12; Wt AngII: n = 10; vSMC $\Delta$ BMP4 AngII: n = 12; \*: p < 0,05; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC $\Delta$ BMP4 = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; EF = Ejektionsfraktion; FS = Verkürzungsfraction

Für die Verkürzungsfraction kann eine identische Aussage getroffen werden. Diese reduzierte sich bei den Wildtyp-AngII Mäusen im Mittel um 4,1% und ist somit signifikant reguliert (p= 0,017; M Tag 0 = 30,1 %; Tag 28 = 26 %). In der AngII vSMC $\Delta$ BMP4- Gruppe reduzierte sich die Verkürzungsfraction im Mittel ebenfalls um 4,7 % (p= 0,069; M Tag 0 = 29,8 %; Tag 28 = 25,1 %). Ausschlaggebender Faktor ist hier, wie bei den Bmper<sup>+/-d</sup> Mäusen auch, die Behandlung mit Angiotensin-II und weniger der genetische Einfluss in den Versuchsmäusen. Für den Versuchsaufbau bedeutet dies jedoch, dass die Behandlung mit AngII erfolgreich war.

### 5.2.2. Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die Aortendiameter

Neben der Herzleistung wurden, wie bereits bei den Bmper<sup>+/-d</sup> Mäusen, die Aortendiameter an Tag 0 und Tag 28 nach Implantation der Pumpen verglichen. Die Messpunkte lagen, wie in Abbildung 42 dargestellt, am ascendierenden, transversen, descendierenden und abdominalen Anteil der Aorta und wurden bei maximalem Lumen des Gefäßes ausgemessen. Bei den mit NaCl-behandelten Gruppen konnte in keiner Messung eine Differenz gesehen werden. Durch die AngII-Behandlung dilatierten die Aorten in allen Messbereichen, lediglich für die Messung im Bereich der Aorta *descendens* der vSMC $\Delta$ BMP4 Mäusen konnte keine signifikante Dilatation gemessen werden. Die stärksten Effekte zeigen sich im Bereich der Aorta *ascendens*, *transversa* und *abdominalis*. Bei den AngII-Wildtyp-Mäusen ist die Aorta *ascendens* im Mittel um 0,17 mm breiter als an Tag 0 (p = 0,003; M Tag 0 = 1,15 mm; Tag 28 = 1,32 mm), im transversen Anteil sogar um 0,33mm (p < 0,001; M Tag 0 = 1,16 mm; Tag 28 = 1,49 mm). Kombinierte man die AngII-Behandlung mit dem vSMC $\Delta$ BMP4-Knockout so dilatierete die Aorta im ascendierenden Anteil um 0,27 mm (p < 0,001; M Tag 0 = 1,17 mm; Tag 28 = 1,44 mm) und am Messpunkt der Aorta *transversa* um 0,19 mm (p= 0,001; Tag 0 = 1,16mm; Tag 28 = 1,35mm). Im Bereich der Aorta *abdominalis* erweiterte sich das Gefäß bei den AngII Wildtyp- Mäusen um 0,24 mm (p= 0,01; M Tag 0 = 0,86mm; 1,10mm) und bei den mit AngII-behandelten vSMC $\Delta$ BMP4-Mäusen um 0,18 mm (p < 0,001; M Tag 0 = 0,86 mm; Tag 28 = 1,04 mm).

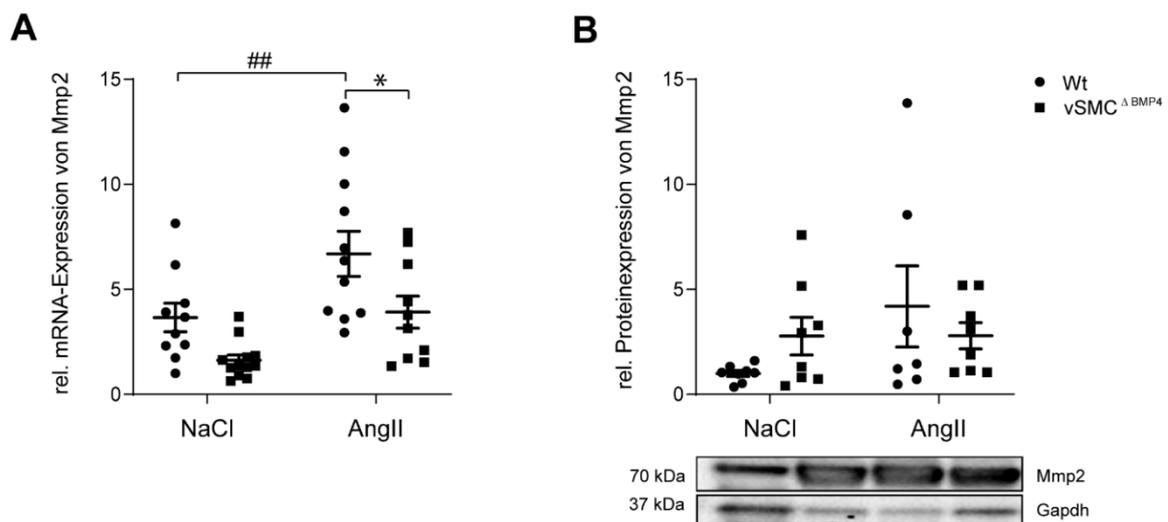


**Abbildung 42: Vergleich der Aortendurchmesser von Tag 0 zu Tag 28**

**A:** Exemplarische sonographische Aufnahmen der Aortenbögen. In den mit AngII behandelten Gruppen kann bereits optisch eine Erweiterung des Durchmessers festgestellt werden. **B:** Auswertung der gemessenen Diameter an den vier Messpunkten der Aorten. Für die Gruppe der vSMC $\Delta$ BMP4-AngII-Mäuse war die Veränderung des Querschnitts bis auf den descendierenden Anteil der Aorta signifikant, für die Wildtyp-AngII-Mäuse wurden an allen vier Messpunkten signifikante Unterschiede festgestellt. n = 11; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001 im Vergleich zu Tag 0. Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC $\Delta$ BMP4 = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

### 5.2.3. Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Der Einfluss von MMPs im Aortenaneurysma ist in der Literatur bereits beschrieben (siehe 2.3.2.2). Mit dem hier verwendeten Mausmodell soll untersucht werden, ob eine zelltypspezifische Deletion von Bmp4 in glatten Muskelzellen Auswirkung auf die Entstehung von Aortenaneurysmen hat und ob diese auch mit Expressionsveränderungen von MMPs auf mRNA und Proteinebene einhergeht. Kora Pröllß konnte in ihrer Dissertationsschrift zeigen, dass in der Immunfluoreszenzmarkierung für Mmp2 kaum ein Unterschied im thorakalen Aortengewebe nachgewiesen werden konnte, Mmp9 jedoch deutlich durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> heraufreguliert wurde (Pröllß 2018).



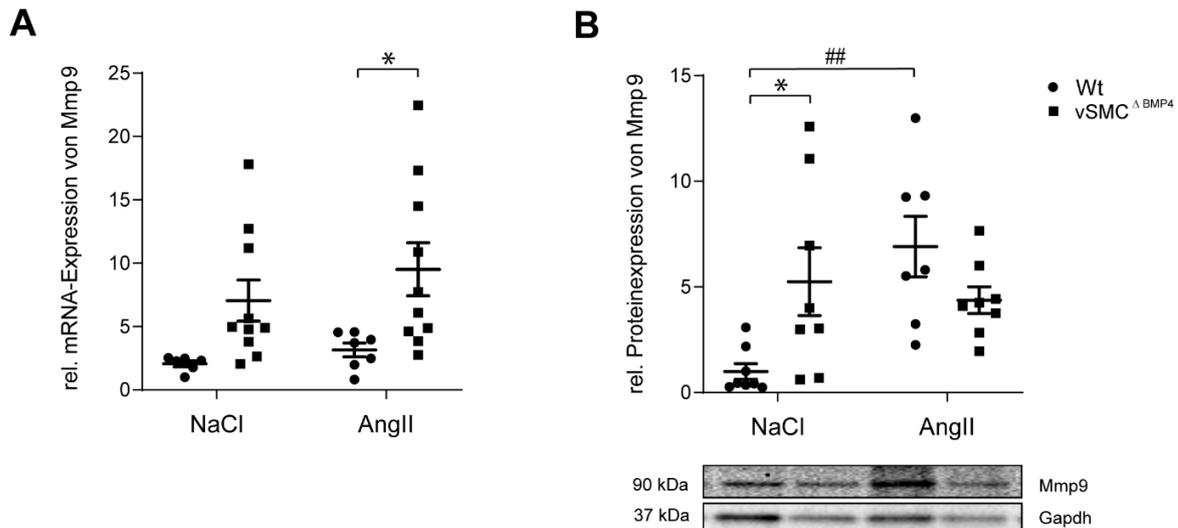
**Abbildung 43: Relative mRNA- und Proteinexpression von Mmp2 im thorakalen Aortengewebe**

**A:** Zeigt die Expression von Mmp2 auf mRNA-Ebene. Hier wird durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Deletion die Expression herabgesenkt, durch die Gabe von AngII kommt es zu einer Expressionssteigerung. Wt NaCl: n = 12; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> NaCl: n = 12; Wt AngII: n = 10; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> AngII: n = 12; **B:** Auf Proteinebene hingegen wird die Expression von Mmp2 durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Deletion im Aortengewebe gesteigert, ebenso durch die Gabe von AngII. Wt NaCl: n = 12; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> NaCl: n = 12; Wt AngII: n = 10; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> AngII: n = 12; \*: Wt vs vSMC<sup>ΔBMP4</sup>; \* = p < 0,05; # = NaCl vs. AngII; ## = p < 0,002; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

In Abbildung 43A ist die relative mRNA Expression von Mmp2 im thorakalen Aortengewebe dargestellt. Durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Deletion wird die Expression von Mmp2 auf mRNA Ebene herabreguliert, dies ist bei den mit AngII behandelten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp AngII signifikant. Behandelt man die Wildtyp-Mäuse mit AngII so wird die Expression von Mmp2 stark signifikant heraufreguliert. Auf Proteinebene kann die Herabregulation von Mmp2 in vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Mäusen nicht gezeigt werden, dies ist aus Abbildung 43B zu entnehmen. Jedoch wird auch hier durch die Gabe von AngII in beiden Genotyp-Versuchsgruppen die Mmp2 Proteinexpression gesteigert.

Eine umgekehrte Regulation findet sich bei der mRNA Expression von Mmp9. Hier kann durch AngII allein kein Anstieg verzeichnet werden, durch die Deletion von Bmp4 in vSMCs hingegen steigt unter Basalbedingungen die Mmp9 mRNA-Expression deutlich an. Dieser Effekt kann unter AngII Gabe signifikant belegt werden (Abbildung 44A). Mittels Western Blot wurde die Expression von Mmp9 auf Proteinebene untersucht, was in Abbildung 44B dargestellt wurde. Vergleicht man die -NaCl-Mäuse mit den vSMC<sup>ΔBMP4</sup>-NaCl-Mäusen, so zeigt sich ein signifikanter Anstieg von Mmp9. Ein weiterer signifikanter hochregulatorischer

Effekt, der auf mRNA Ebene nicht zu sehen war, zeigt sich bei den Wildtypmäusen nach AngII- Gabe.



**Abbildung 44: Relative mRNA- und Proteinexpression von Mmp9 im thorakalen Aortengewebe**

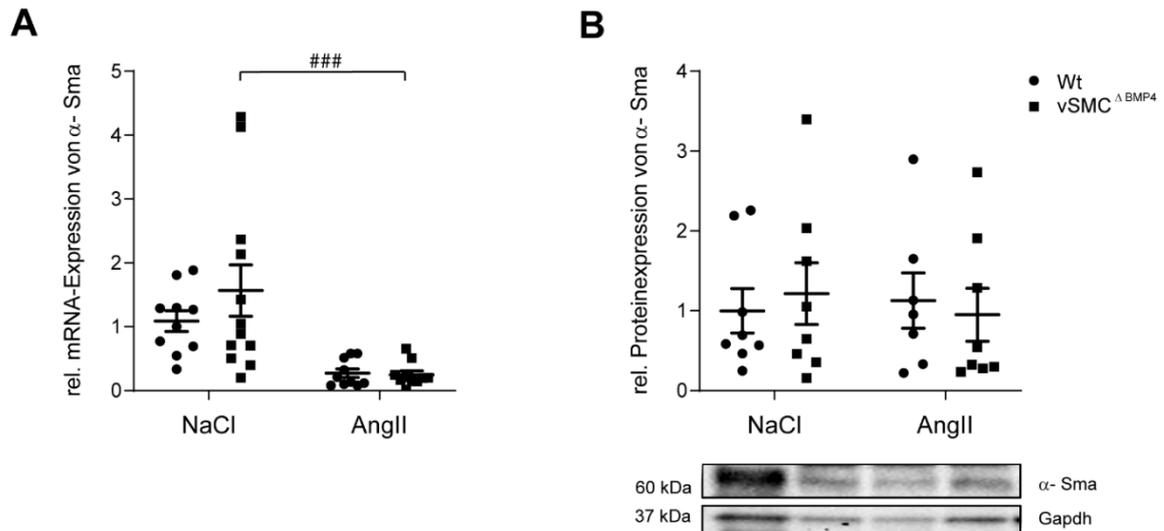
**A:** Zeigt die Expression von Mmp9 auf mRNA-Ebene. Hier wird durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Deletion die Expression gesteigert, durch die Gabe von AngII kommt es zu keiner Expressionsveränderung. Wt NaCl: n = 6; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> NaCl: n = 10; Wt AngII: n = 7; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> AngII: n = 10; **B:** Auf Proteinebene wird die Expression von Mmp9 durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Deletion im Aortengewebe gesteigert. Die Expressionssteigerung kann auch durch die Gabe von AngII hervorgerufen werden. Wt NaCl: n = 8; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> NaCl: n = 8; Wt AngII: n = 7; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> AngII: n = 8; \*: Wt vs vSMC<sup>ΔBMP4</sup>; \* = p < 0,05; # = NaCl vs. AngII; ## = p < 0,002; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Zusammenfassend kann man sagen, dass die molekularbiologischen Daten die Ergebnisse der Immunhistochemiefärbungen ergänzen und stützen. Somit kann festgehalten werden, dass durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Deletion mehr Mmp2 und 9 auf Proteinebene vorhanden ist.

#### 5.2.4. Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf die glatten Muskelzellen

Von besonderem Interesse ist bei der zelltypspezifischen Defizienz von Bmp4 die Auswirkungen auf den Zelltyp selbst - in diesem Fall die vaskulären glatten Muskelzellen. Vorarbeiten zeigten, dass es durch die Bmp4 Defizienz zu einer Reduktion der glatten Muskelzellmarker  $\alpha$ -Sma und Myh11 im Aortengewebe kommt, welches in Immunfluoreszenzmarkierungen gezeigt werden konnte (Pröbß 2018). Durch molekularbiologische Methoden, wie PCR und Western Blot, sollen die erhobenen histologischen Daten quantifiziert und verifiziert werden.

Für  $\alpha$ -Sma zeigt sich durch die Gabe von AngII eine deutliche Herabregulation auf mRNA Ebene in beiden behandelten Versuchsgruppen. Durch die geringgradig erhöhte Expression nach vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Deletion ist nach AngII-Gabe eine sehr stark signifikante Herabregulation zu erkennen. Dies ist Abbildung 45 A zu entnehmen. In Abbildung 45 B wurde die Expression von  $\alpha$ -Sma auf Proteinebene untersucht, hier zeigt sich durch die hohe Streuung keine klare Tendenz, die Mittelwerte der Versuchsgruppen sind auf beinahe identischem Niveau.

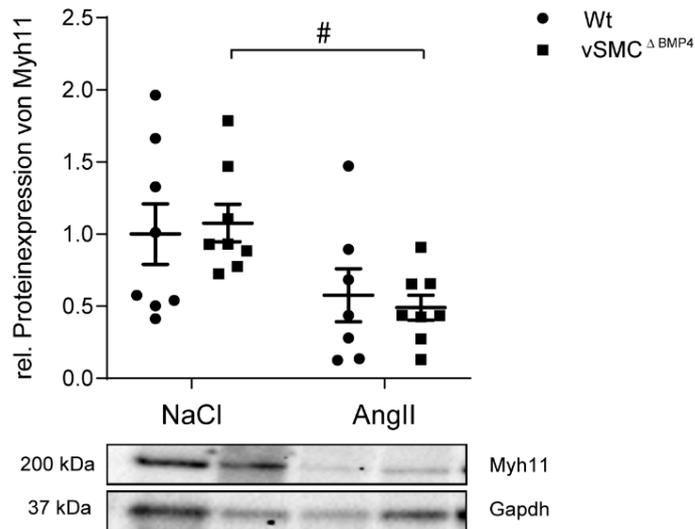


**Abbildung 45: Relative mRNA- und Proteinexpression von  $\alpha$ -Sma im thorakalen Aortengewebe**

**A:** Die rel. mRNA-Expression von  $\alpha$ -Sma wird durch die Gabe von AngII deutlich reduziert, die Reduktion ist in der vSMC $\Delta$ BMP4-Gruppe signifikant. Wt NaCl: n = 10; vSMC $\Delta$ BMP4 NaCl: n = 12; Wt AngII: n = 10; vSMC $\Delta$ BMP4 AngII: n = 10; **B:** Im Western Blot konnte die Tendenz zur Reduktion von  $\alpha$ -Sma in den AngII-Gruppen auf Proteinebene nicht gezeigt werden. Wt NaCl: n = 8; vSMC $\Delta$ BMP4 NaCl: n = 8; Wt AngII: n = 7; vSMC $\Delta$ BMP4 AngII: n = 8; ###: p < 0,001; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC $\Delta$ BMP4 = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Für Myh11 konnten, wie Abbildung 46 zu entnehmen ist, keine mRNA Daten generiert werden. Hier zeigt sich jedoch im Vergleich zur Proteinanalyse von  $\alpha$ -Sma eine deutliche Herabregulation von Myh11 durch AngII, was in den vSMC $\Delta$ BMP4 Mäusen zu einer signifikanten Verminderung führt. Durch die vSMC $\Delta$ BMP4 Deletion allein unter Kontrollbedingungen konnte kein Effekt gezeigt werden.

Vergleicht man die erhobenen molekularbiologischen Daten erneut mit den Immunfluoreszenzmarkierungen von Kora Pröll so zeigt sich hier, dass der dort gesehene Effekt von AngII auf  $\alpha$ -Sma nur für die mRNA Expression reproduziert werden konnte. Für Myh11 konnten in der Histologie keine Unterschiede visualisiert werden, jedoch zeigen die Western Blot Daten eine Verminderung von Myh11 nach AngII-Gabe. Hier konnte in beiden Fällen kein klarer Effekt durch die Deletion von Bmp4 in den vSMCs gezeigt werden (Pröll 2018).

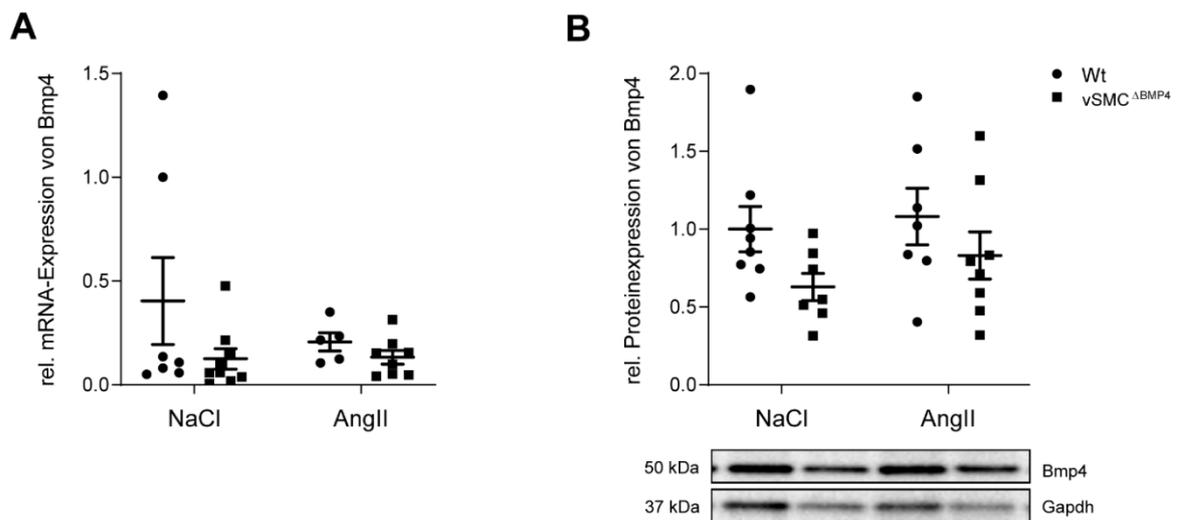


**Abbildung 46: Relative Proteinexpression von Myh11 im Aortenbogen**

Im Western Blot zeigt sich eine Reduktion von Myh11 auf Proteinebene unter AngII-Behandlung. Durch die vSMC $\Delta$ BMP4 allein konnte kein Effekt gezeigt werden. Wt NaCl: n = 8; vSMC $\Delta$ BMP4 NaCl: n = 8; Wt AngII: n = 7; vSMC $\Delta$ BMP4 AngII: n = 8; #: p < 0,05; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC $\Delta$ BMP4 = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

### 5.2.5. Die Auswirkung der vSMC-spezifischen Bmp4-Defizienz auf den BMP-Signalweg

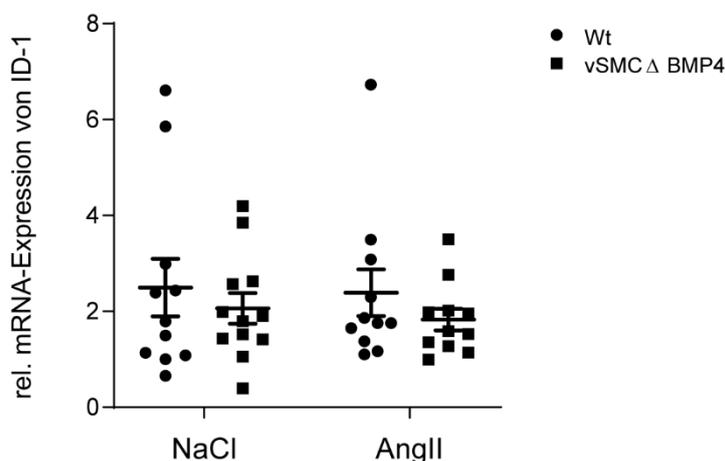
Für die Interpretation der Daten ist es notwendig, nicht nur die Wirkung von AngII zu bestätigen, sondern auch die Defizienz von Bmp4 nachzuweisen. In Abbildung 47A ist die Bmp4 Expression auf mRNA- Ebene im Gesamtgewebe des thorakalen Aortenabschnitt gemessen worden. Es wurden in diesem Versuchsaufbau Expressionsanalysen in nicht isolierten glatten Muskelzellen durchgeführt. Trotz der hohen Streuung in den mit NaCl behandelten Wildtyp-Mäusen kann eine schwache Reduktion von Bmp4 im Aortengewebe der vSMC $\Delta$ BMP4 Mäuse gezeigt werden. Deutlicher wird die Defizienz auf Proteinebene. Hier zeigt sich in den Wildtyp-Mäusen ein identischer Mittelwert mit und ohne AngII Infusion, der deutlich über dem der vSMC $\Delta$ BMP4 Deletion-Mäuse liegt. Durch die gemischten Zelltypen in den aortalen Gewebeproben, können keine Signifikanzunterschiede zwischen den Proben dargestellt werden (Abbildung 47 B). Hierfür hätten glatte Muskelzellen isoliert werden müssen.



**Abbildung 47: Relative mRNA- und Proteinexpression von Bmp4 im thorakalen Aortengewebe**

**A:** Auf mRNA-Ebene kann durch die Deletion von Bmp4 in den vSMCs im Gesamtgewebe eine Herabregulation gezeigt werden. **B:** Die Proteinexpression von Bmp4 wird durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Defizienz herabreguliert, zur AngII kann keine klare Aussage getroffen werden. Wt NaCl: n = 10; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> NaCl: n = 9; Wt AngII: n = 9; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> AngII: n = 8; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

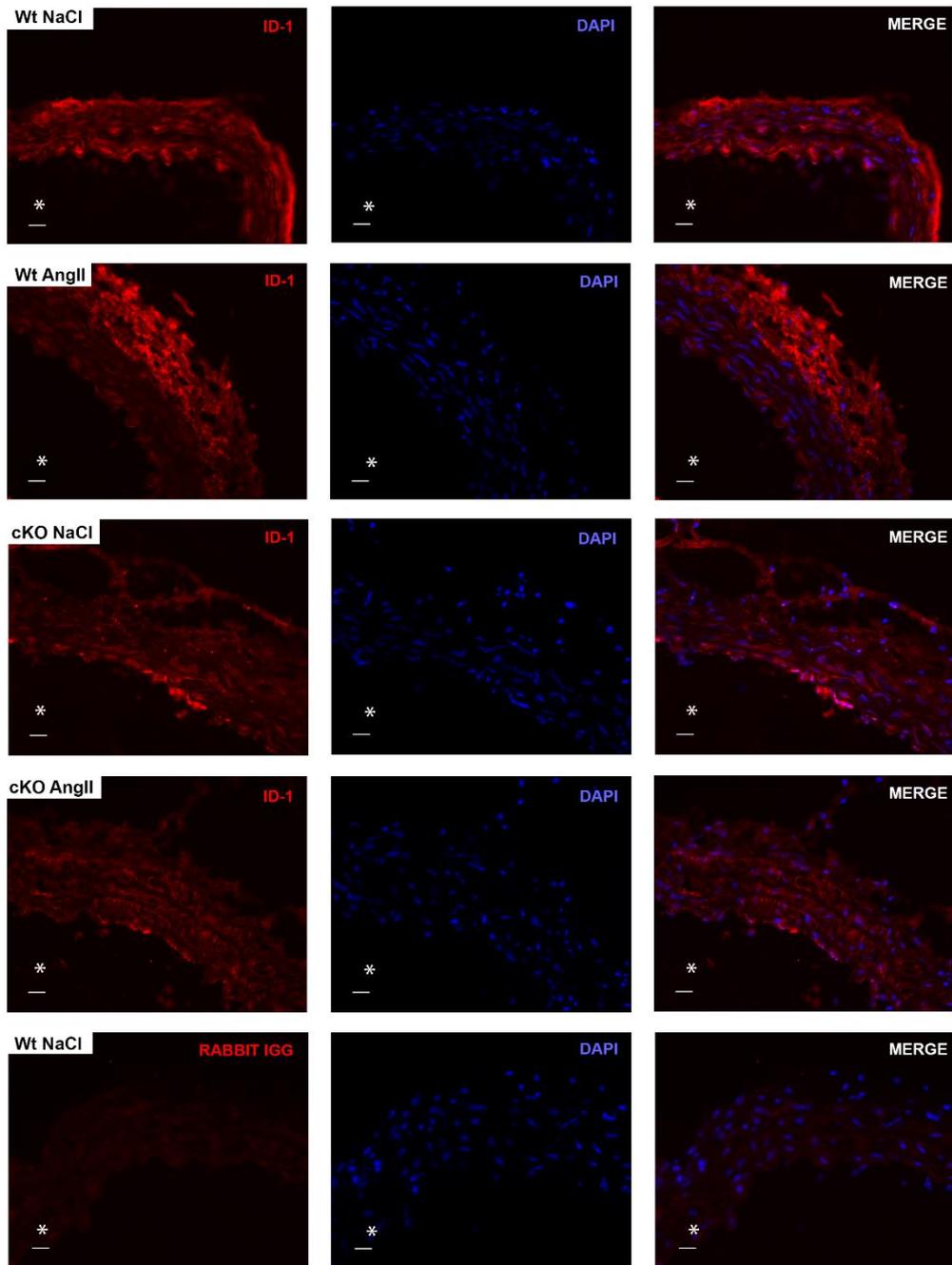
Wie auch im ersten Versuchsteil wurde Id1 als direktes Target des BMP-Signalwegs untersucht. Auf mRNA-Ebene zeigt sich in Abbildung 48 eine nicht signifikante schwache Herabregulation von Id1 in den vSMC<sup>ΔBMP4</sup>- Gruppen.



**Abbildung 48: Relative mRNA-Expression von Id1 im thorakalen Aortengewebe**

Die rel. mRNA-Expression von Id1 wird durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> sowohl für NaCl als auch für AngII leicht herabreguliert. Durch die Gabe von AngII kann im Mittel keine Veränderung in der Expression im Vergleich zur Wt-NaCl-Maus erreicht werden. Wt NaCl: n = 11; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> NaCl: n = 12; Wt AngII: n = 11; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> AngII: n = 11; Wt = Wildtyp-Mäuse; vSMC<sup>ΔBMP4</sup> = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II

Auf histologischer Ebene konnte in der Immunfluoreszenzmarkierung kein klares Ergebnis gezeigt werden. Es kommt zu einer geringgradigen Verminderung von Id1 in den Aortenschnitten der vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Mäuse, jedoch ist nach wie vor ein schwaches Signal in der Media zu erkennen.



**Abbildung 49: Immunhistofluoreszenzmarkierung mit Id1 Antikörper der thorakalen Aorta**

linke Spalte: exemplarische Aufnahmen der Id1-Markierung von allen Versuchsgruppen mit 40fach-Objektiv; mittlere Spalte: Zellkernfärbung mit DAPI; rechte Spalte: *Merge*- Bilder aus der Id1-Markierung und der DAPI-Zellkern Färbung. Durch die  $vSMC^{\Delta BMP4}$  kann in beiden Versuchsgruppen eine schwache Reduktion von Id1 in der Media erreicht werden. Durch die Gabe von AngII kann eine verstärkte Expression in der Adventitia und eine schwache Reduktion des Signals in der Media gezeigt werden. cKO =  $vSMC^{\Delta BMP4}$ ; n = 4; rot = Id1; blau = DAPI-Zellkernfärbung; Wt = Wildtyp-Mäuse;  $vSMC^{\Delta BMP4}$  = Mauslinie mit induzierter Bmp4-Defizienz in glatten Muskelzellen; NaCl = Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung; AngII = Minipumpen mit Angiotensin-II; Maßstab = 20  $\mu$ m

## 6. Diskussion

Unzureichende Erkenntnisse über die Pathogenese von Aortenaneurysmen und -dissektionen erschweren die Entwicklung einer erfolgversprechenden Therapie und somit einer nicht-invasiven und frühzeitigen Intervention. Die aortale Gefäßwand besteht aus verschiedenen Zellpopulationen und extrazellulärer Matrix. Als Reaktionen auf äußere Reize und Stimuli kann das Gewebe seine Funktion adaptieren, die Wandfestigkeit erhöhen und sich den hämodynamischen Veränderungen anpassen. Kompromisse in der funktionellen und strukturellen Integrität der Komponenten können dann jedoch zur Degeneration, biomechanischem Versagen und schlussendlich in der Entwicklung von Aneurysmen und Dissektionen resultieren (Shen et al. 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung des BMP-Signalwegs-Liganden Bmp4 und dem Modulator Bmper auf den Erhalt der funktionellen und strukturellen Integrität der Aortenwand in Bezug auf die Genese von thorakalen Aortenaneurysmen untersucht. *In vitro* Vorversuche der Arbeitsgruppe zeigten, dass mit BMPER-siRNA transfizierte PSMCs (engl. *human pulmonary artery smooth muscle cells*; humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen) mit einer stark reduzierten Expression von kontraktile Markern und einer erhöhten Produktion von inflammatorischen MMPs reagieren, welches eine Verschiebung hin zum synthetisierenden Phänotyp vermuten lässt (Baur 2015). Diese sind im Aortenaneurysma bekannte Mediatoren, die zu einem Umbau der Gefäßwand beitragen. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass Bmper auch im Aortengewebe Einfluss auf die physiologische Funktionalität der vSMCs nimmt und ein Fehlen von Bmper zur Entstehung von Aortenaneurysmen beitragen kann.

Im ersten Versuchsteil wurde die Auswirkung einer globalen heterozygoten Defizienz von Bmper auf die Funktion der glatten Muskelzellen, den Veränderungen in der extrazellulären Matrix und damit einhergehenden inflammatorischen Prozessen im murinen Modellorganismus veranschaulicht. Der zweite Versuchsteil befasst sich mit der Depletion von Bmp4 in vaskulären glatten Muskelzellen, welches auf zelltypspezifische Auswirkungen in diesem Krankheitsbild abzielt. Dass die Defizienz von Bmp4 in vSMCs zu einem Verlust der Integrität und Wandstabilität führt, welches auf ein erhöhtes Vorliegen des synthetisierenden Phänotyps, einer erhöhten Produktion von ECM und dem apoptotischen Untergang der vSMCs zurückzuführen ist, konnte bereits in der Promotionsschrift von Kora Pröhl im Jahr 2018 gezeigt werden (Pröhl 2018). Diese Ergebnisse werden, durch die im Rahmen dieser Arbeit mittels molekularbiologischer Analysen erhobenen Daten, quantifiziert und verifiziert.

### **6.1. Die Auswirkung der heterozygoten Defizienz von Bmper auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen im Mausmodell**

#### **6.1.1. Die heterozygote Defizienz von Bmper verändert den strukturellen Wandaufbau der thorakalen Aorta**

TGF- $\beta$  ist ein relevanter Wachstumsfaktor in der Differenzierung von vSMC und mediiert den Erhalt des kontraktile Phänotyps (Grainger 2004). BMPER ist ein extrazelluläres Glykoprotein, welches mit dem BMP4-Signalweg interagiert und somit auch Teil der TGF- $\beta$ -Superfamilie ist (Heinke et al. 2008). Um den Einfluss von Bmper auf die vSMCs im Aortenaneurysma-Modell untersuchen zu können, wurde eine Mauslinie mit globaler heterozygoter-Defizienz von Bmper mit C57/BL6N Hintergrund genutzt. Zur Evaluation der entstandenen Veränderungen an den murinen Aorten wurde nach Ablauf der 28 Tage eine sonographische Messung der Durchmesser durchgeführt. Es ist bekannt, dass der BMP-Signalweg auch Einfluss auf das Myokard nimmt, somit wäre eine Beeinträchtigung der Herzleistung durch die Defizienz nicht auszuschließen (Hanna und Frangogiannis 2019).

Die Auswertung ergab, dass Ang-II einen Effekt hin zur Dilatation zeigt, jedoch durch die heterozygote Defizienz von Bmper kein phänotypisches Muster erkennbar ist (**Abbildung 15**). Nach Auswertung der initial durchgeführten mikroskopischen Aufnahmen der Autofluoreszenz zeigt sich in den histologischen Gewebeschnitten eine Auflösung der kompakten medialen Wandstruktur (**Abbildung 16**). Die Media wirkt aufgetrieben und löchrig, die Zellen verlieren ihre Integrität im umliegenden Gewebe, welches vermutlich mit einem Umbau der extrazellulären Matrix einhergeht. Der beschriebene Phänotyp kann auch in den mit AngII behandelten heterozygot-defizienten Bmper Mäusen gezeigt werden, hier lässt sich durch die Gabe von AngII zusätzlich eine Verbreiterung der Wanddicke feststellen (Daugherty et al. 2010). Die beobachteten Veränderungen in der aortalen Wand sind vom Aussehen vergleichbar mit der zystischen Medianekrose. Dieser Begriff ist jedoch durch eine neue Nomenklatur obsolet und durch den Terminus „Mediadegeneration“, resultierend aus der Summe der einzelnen histopathologischen degenerativen Läsionen, als pathohistologisches Merkmal ersetzt worden (Halushka et al. 2016). Hier kommt es zu zysten-ähnlichen strukturellen Wandveränderungen die mit einer erhöhten Einlagerung basophiler ECM, dem Verlust von glatten Muskelzellen und der Destruktion von elastischen Fasern einhergehen (Waller et al. 1997, Yuan und Jing 2011). Um diese pathologischen Veränderungen besser charakterisieren zu können wurde eine Elastica-Färbung nach van Gieson durchgeführt, welche eine Beurteilung der dunkelviolet gefärbten elastischen *Laminae* ermöglicht. Durch die heterozygote Defizienz von Bmper kommt es zu aufgetriebenen und zum teils brüchigen Faserstücken, welche durch die Gabe von AngII noch gehäuft aufzufinden sind (**Abbildung 18; Abbildung 19**). Dieses Erscheinungsbild lässt auf eine erhöhte Destruktion der Gefäßwand und somit auf eine verminderte Wandstabilität und Integrität durch die heterozygote Defizienz von Bmper schließen und würde das Vorliegen einer Mediadegeneration untermauern (Yuan und Jing 2011). In einem Paper zur kardiovaskulären Pathologie wird empfohlen, weitere Färbungen wie beispielsweise Alcianblau zur Charakterisierung der Einlagerungen in der extrazellulären Matrix oder eine Movat Pentachromfärbung durchzuführen (Halushka et al. 2016). Für die Entstehung von Aortenaneurysmen bedeuten diese Befunde eine verminderte Elastizität und erhöhte Steifigkeit, die auf Dauer zu einer Dilatation im Gefäß führt und ein erhöhtes Risiko für Dissektionen und Rupturen birgt (Jana et al. 2019).

Ein weiterer Pathomechanismus, welcher zur verminderten Wandstabilität beiträgt, ist der erhöhte Untergang von vaskulären glatten Muskelzellen. Durch das Fehlen der kontraktiven Zellen verliert die Aortenwand ihren Tonus und ihre Stabilität und es kommt durch den meist erhöhten Blutdruck zu einer Dilatation und Ruptur der Gefäßwandanteile (He et al. 2006, Clarke et al. 2008). Um die Apoptosevorgänge in den Aortenschnitten evaluieren zu können, wurde das TUNEL-Assay durchgeführt. Hierbei werden durch die Apoptose entstandenen DNA-Fragmente mit fluoreszierenden Nukleotiden markiert, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. In **Abbildung 30** ist gezeigt, dass bereits in Wildtyp-Mäusen eine geringe Anzahl an apoptotischen Zellen vorliegt, welches durch den kontinuierlichen Umbau der Gefäßwand bedingt sein kann. Durch die Behandlung von Angiotensin-II ist ein Anstieg von apoptotischen Zellen bereits in einem vorherigen Versuch mit einer anderen Mauslinie gezeigt worden (Pröll 2018). Durch die Teildefizienz von Bmper ist ein deutlicher Anstieg von apoptotischen Vorgängen im Gewebe zu detektieren. Besonders im Bereich der Media und Adventitia steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen deutlich an. Dieser Eindruck lässt sich durch die Quantifizierung bestätigen. Hier zeigt sich, dass der Anstieg der Apoptosevorgänge durch die heterozygote Defizienz signifikant erhöht ist (**Abbildung 31**). Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen folgern, dass es durch die Teildefizienz von Bmper zu degenerativen Veränderungen sowie einem erhöhten apoptotischen Untergang der Zellen in der Media kommt.

### 6.1.2. Die heterozygote Defizienz von Bmper verschiebt das Gleichgewicht der vSMCs hin zum synthetisierenden Phänotyp.

Bevor es zur beschriebenen Apoptose der Zellen kommt, ist der Phänotypenwechsel der vSMCs ein frühes Ereignis in der Entstehung des thorakalen Aortenaneurysmas. Die Expressionsanalyse der kontraktile Marker des Aortengewebes ergab durch die heterozygote Defizienz von Bmper eine leicht gesteigerte Expression von  $\alpha$ -Sma auf mRNA- und Proteinebene (**Abbildung 26**). Diese gesteigerte Expression von  $\alpha$ -Sma konnte in der Immunfluoreszenz nicht belegt werden, hier kommt es zu einer deutlichen Herabregulation (**Abbildung 27**).  $\alpha$ -Sma wird in der Literatur als glatter Muskelzellmarker beschrieben, jedoch wird es ebenfalls von Myofibroblasten und Fibroblasten exprimiert, weshalb ein leichter Anstieg durch die Defizienz von Bmper auf eine Fibrosierung zurückzuführen sein kann (Owens et al. 2004, Jaminon et al. 2019). Als zweiter Marker des kontraktile Phänotyps wurde Myh11 gewählt, da dieser ausschließlich in differenzierten vSMCs exprimiert wird (Jaminon et al. 2019). Aus **Abbildung 28** ist zu entnehmen, dass Myh11 durch die heterozygote Bmper-Defizienz auf Proteinebene zum untersuchten Zeitpunkt nicht reguliert wird, sondern ausschließlich durch die Gabe von Angiotensin-II reduziert wird. In der Immunfluoreszenzmarkierung mit spezifischem Myh11-Antikörper kann aber, wie zuvor bei  $\alpha$ -Sma, eine verminderte Expression gezeigt werden (**Abbildung 29**). Um den Phänotypenwechsel sicher bestimmen zu können, müssen neben der Reduktion der kontraktile Marker auch die synthetisierenden Marker erhöht sein. Hier werden in der Literatur die MMP-Isoformen, sowie eine erhöhte Produktion von Kollagen-Typ I beschrieben (Rensen et al. 2007, Jaminon et al. 2019). Sowohl für Mmp2 und 9, als auch für Kollagen I konnte in den immunhistologischen Fluoreszenzfärbungen ein Anstieg durch die heterozygote Defizienz von Bmper gezeigt werden (**Abbildung 20; Abbildung 21; Abbildung 23; Abbildung 24**). Für Mmp2 konnte eine Tendenz zur Erhöhung auch mittels RT-PCR gezeigt werden (**Abbildung 22**). In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe konnte *in vitro* und *in vivo* ein stärkerer Effekt auf den Phänotypenswitch gezeigt werden. So zeigten die *in vitro* Versuche, bei denen PSMCs mit siRNA gegen BMPER transfiziert wurden, eine signifikante Reduktion der oben genannten vSMC-Marker, sowie eine erhöhte Produktion und Aktivität von MMPs (Baur 2015). Im Carotis-Ligatur-Modell, welches als Modell für die Neointimabildung nach Gefäßverletzung verwendet wird, führte eine Defizienz von Bmper zu einer erhöhten Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen, was durch die Identifikation des synthetisierenden Phänotyps der vSMCs erklärt werden konnte (Gösele 2019). Fasst man diese Befunde mit den hier vorliegenden Ergebnissen zusammen, zeigt sich, dass Bmper für den Erhalt des kontraktile Phänotyps wichtig ist und ein Fehlen zur Entstehung von Gefäßerkrankungen beitragen kann.

### 6.1.3. Die heterozygote Defizienz von Bmper fördert den Umbau der Extrazellulärmatrix

Neben den glatten Muskelzellen spielt auch die extrazelluläre Matrix eine zentrale Rolle in der Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen. 80-90% des Gesamtkollagens in der Aorta bestehen aus Kollagen Typ I  $\alpha$  1 und Typ III  $\alpha$  1 (COL1A1 und COL3A1) (Berillis 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter AngII-Applikation eine erhöhte und homogene Expression von Col1A1 und Col3A1 in der Immunfluoreszenzmarkierung vorliegt. Interessanterweise kann allein durch die heterozygote Defizienz von Bmper die Expression von Col1A1 und Col3A1 im Aortenbogen deutlich gesteigert werden (**Abbildung 20; Abbildung 21**). Der Expressionsanstieg durch die heterozygote Defizienz von Bmper korreliert mit der Verschiebung hin zum synthetisierenden Phänotyp der glatten Muskelzellen. Zusammengenommen führen diese Veränderungen zu einer erhöhten Wandsteifigkeit und in Kombination mit den brüchigen elastischen Fasern zu einer verminderten Elastizität und Adaptationsfähigkeit der aortalen Wand (Schulte et al. 1990, Berillis 2013, Salloum et al. 2016). Neben der Menge des

Kollagens scheint auch das Verhältnis zwischen Kollagen Typ I und III relevant zu sein (Vouyouka et al. 2001), ebenso die strukturellen Veränderungen der Kollageneinlagerung im Gewebe (Lindeman et al. 2010). Ob das Kollagengerüst eine physiologische Formation und somit auch physiologische Funktion übernehmen kann, könnte durch eine Massons-Trichrome Färbung und elektronenmikroskopische Aufnahmen näher bestimmt werden. Durch eine Färbung mit Pikro-Siriusrot könnte eine Veränderung im Verhältnis der beiden Kollagene durch die heterozygote Defizienz weiter charakterisiert werden und so detaillierte Aufschlüsse über Funktionsveränderungen und -verluste im behandelten Gewebe liefern (Vouyouka et al. 2001, Tsamis et al. 2013). Die Regulation der Kollagene durch die Teildefizienz von *Bmper* konnte bereits für die Neointimabildung *in vivo* gezeigt werden. Hier konnten RNA-Daten und Immunfluoreszenzfärbungen einen Anstieg im gesamten Bereich der Carotis-Gefäßwand zeigen (Gösele 2019).

Unter physiologischen Bedingungen wird die vaskuläre ECM kontinuierlich umgestaltet, sodass sie sich den stetig wechselnden Bedingungen durch beispielsweise Druck- und Strömungsänderungen oder Mikroläsionen anpassen kann. Dabei werden vorhandene Proteine proteolytisch abgebaut und durch neu synthetisierte Proteine ersetzt. Für diesen Vorgang sind mehrere fein regulierte Enzyme im Gewebe zuständig, zu denen unter anderem die MMPs gehören. Sie sind sehr gut erforscht und stellen im thorakalen Aortenaneurysma einen wichtigen pathophysiologischen Mediator dar (Jana et al. 2019). Durch eine Gefäßverletzung wird die Expression von MMP2 und MMP9 gesteigert, es kommt zum erhöhten Abbau der ECM und von Strukturproteinen wie Elastin, was in einer verminderten Wandstabilität resultiert, die die Aneurysmenbildung begünstigt (Ruddy et al. 2008, Theruvath et al. 2012, Wang und Khalil 2018, Jana et al. 2019). Für diese Arbeit wurde die Expression von *Mmp2* und *Mmp9* durch die heterozygote Defizienz von *Bmper* im Aortenaneurysma-Modell untersucht. RNA-Daten zeigen, dass die *Mmp2* mRNA-Expression unter basalen Bedingungen durch die Teildefizienz von *Bmper* deutlich ansteigt. Der Anstieg ist auf mRNA-Ebene mit der durch *AngII* vergleichbar (**Abbildung 22**). Diese Daten konnten auch in der Immunfluoreszenzmarkierung mit spezifischem Antikörper gegen *Mmp2* bestätigt werden. In Wildtyp-Mäusen zeigt sich lediglich im Bereich der Adventitia ein schwaches Signal, durch die Teildefizienz von *Bmper* kommt es auch im Bereich des Endothels und der Media zu einem starken und homogeneren Verteilungsmuster von *Mmp2* (**Abbildung 23**). Für *Mmp9* zeigt sich in den Wildtyp-Mäusen im Bereich des Endothels und der Adventitia ein starkes Fluoreszenzsignal. Auch hier kann durch die Defizienz von *Bmper* eine zusätzliche Expression in der Media gezeigt werden, die jedoch schwächer ist als die von *Mmp2* (**Abbildung 24**). Im Stressmodell stellt sich eine deutliche Erhöhung von *Mmp9* im gesamten Aortengewebe dar, was zusammen mit *Mmp2* zu einer hochgradigen Schwächung im Gewebe führen kann. Um auch die Aktivitätssteigerung der MMPs belegen zu können, wurde ein *in-situ* Zymogen-Assay durchgeführt. Durch die erhöhte Aktivität der Gelatinasen *Mmp2* und *Mmp9* kommt es zum proteolytischen Abbau der Gelatine und damit zur Freisetzung des Fluorochroms. In **Abbildung 25** bestätigt sich nicht nur das vermehrte Vorliegen der MMPs im Gewebe, sondern auch deren erhöhte Aktivität. Unter Basalbedingungen ist nur ein geringes hellgrünes Signal zu erkennen, welches sich durch die Teildefizienz von *Bmper* deutlich steigert. Durch das erhöhte Signal von *Mmp2* könnte man vermuten, dass diese Signalsteigerung vermehrt durch diese Isoform ausgelöst wird. Theruvath et al vermuten in einem Review-Paper eine frühe Aktivität von *Mmp2* in TAAs, welche von einer späteren erhöhten MMP9 Expression und Aktivität gefolgt wird. Durch TIMP-2 kann ein erhöhter Abbau von MMP2 erfolgen, jedoch kann auch durch die Aktivierung von MT1-MMP die Aktivität von MMP2 gesteigert werden (Theruvath et al. 2012). Interessanterweise konnte die  $\text{CaCl}_2$ - oder Elastase-Induktion von AAAs durch die Depletion von MMP2 gehemmt werden (Longo et al. 2002). Die Relevanz von MMP2 in der Entwicklung von TAAs konnte deutlich gezeigt werden (Xiong et al. 2006, Zhang et al. 2009, Belo et al. 2015, Shen et al. 2015), weshalb die erhöhte Expression von *Mmp2* durch die Teildefizienz von *Bmper* den Einfluss auf die Entstehung von TAAs bestärkt. Eine Vergleichsstudie zwischen TAA und

AAA im Mausmodell zeigte bereits *in vivo* eine erhöhte Expression von Mmp2 und Mmp9 durch die heterozygote Defizienz von Bmper. In weiteren *in vitro* Studien konnte durch Transfektion mittels BMPER-siRNA eine erhöhte Expression von MMP2 und 9 gezeigt werden und durch die *in vitro*-Zymographie auch eine erhöhte Aktivität der Gelatinasen (Baur 2015).

Durch die durchgeführte Proteomanalyse wurden neue durch Bmper regulierte Proteine gefunden. Insbesondere für Biglykan konnte sowohl auf Proteinebene als auch in der Immunhistologie eine gesteigerte Expression durch die Teildefizienz von Bmper gezeigt werden (**Abbildung 38**; **Abbildung 39**). Biglykan ist ein Proteoglykan, welches in der Extrazellulärmatrix der Gefäßwand zu finden ist. In der Literatur wird es im Zusammenhang mit Kollagenen und der Fibrosierung beschrieben, jedoch ist die genaue Funktion unzureichend erforscht. Bekannt ist jedoch, dass eine erhöhte Produktion von Biglykan in beispielsweise atherosklerotischen Veränderungen und auch in Restenosen nach Angioplastie gefunden wurden (Shimizu-Hirota et al. 2004). Eine weitere regulatorische Funktion von Biglykan ist die Inhibition von BMP4, indem es an Chordin bindet und dessen Bindung und somit Inhibition verstärkt (Moreno et al. 2005, Sedlmeier und Sleeman 2017). Somit führt die heterozygote Defizienz von Bmper zu einer vermehrten Produktion von Biglykan. Zusätzlich kann hierdurch Bmp4, welches ebenfalls protektive Auswirkungen auf die Entstehung von TAAs zeigt, inhibiert werden. Somit könnte Bmper zusätzlich auch über die Modulation der Extrazellulärmatrix, Einfluss auf den BMP-Signalweg nehmen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die festgestellten Veränderungen durch die heterozygote Defizienz in den Mäusen den charakteristischen Merkmalen, der für die Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen beschriebenen Pathologien, entsprechen. Es konnte in dieser Arbeit eine Veränderung der vSMCs hin zum synthetisierenden Phänotyp gezeigt werden bis hin zum apoptotischen Untergang dieser Zellgruppe. Es kommt zu einem Wandumbau mit vermehrten kollagenen Einlagerungen, einer Destruktion der elastischen Fasern, welches durch die erhöhte Aktivität von MMPs in der Gefäßwand erklärt werden kann. Die erhöhte Expression von MMPs wiederum steht im direkten Zusammenhang mit dem Vorhandensein des synthetisierenden Phänotyps der vSMCs.

#### 6.1.4. Die heterozygote Defizienz von Bmper und der Einfluss auf den Bmp4-Signalweg

Untersucht wurde die Auswirkung einer Teildefizienz von Bmper auf die Autoregulation von Bmp4 und dem Smad-Signalweg. In **Abbildung 32** ist die Expressionsanalyse von Bmp4 auf Proteinebene dargestellt. Hier zeigt sich durch die Teildefizienz von Bmper keine regulatorische Auswirkung auf die Expression von Bmp4. Durch AngII kommt es jedoch in beiden Versuchsgruppen zu einer Herabregulierung von Bmp4, die bei den Bmper<sup>+/-</sup> Mäusen jedoch nicht so ausgeprägt ist. Als untergeschalteten Mediator für den Bmp4-aktivierten Smad-Signalweg wird Smad1 und Smad5 in der Literatur beschrieben (Moya et al. 2012, Garcia de Vinuesa et al. 2016). Schaut man sich den Quotienten aus phosphoryliertem Smad und nicht-phosphoryliertem Smad an, so zeigt sich, dass durch die Teildefizienz eine geringgradige Verminderung der Signaltransduktion stattgefunden hat (**Abbildung 33**). Als direktes Zielgen des BMP4-Signalwegs wird ID-1 beschrieben. In **Abbildung 34** und **Abbildung 35** ist eine mit spezifischem Id-1 Antikörper durchgeführte Immunfluoreszenzaufnahme zu sehen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt sich sowohl durch die heterozygote Defizienz von Bmper als auch durch AngII eine geringe visuelle Verminderung des Fluoreszenzsignals, jedoch ist die basale Expression schon sehr schwach. Eine weitere Expressionsanalyse mittels Western Blot Verfahren war nicht erfolgreich, da das nur 18 kDa große Protein mit den von mir ausgetesteten Antikörpern, nicht detektiert werden konnte.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, kann man eine sehr schwache Herabregulation des BMP-Signalwegs über den kanonischen Smad-Weg nachweisen. Durch die globale heterozygote Defizienz von *Bmper* und die belegte konzentrationsabhängige Wirkung auf *Bmp4* ist die Einschätzung der Auswirkung deutlich erschwert – eine Kompensation oder nicht ausreichende Defizienz für diesen Signalweg könnte ursächlich für die schwachen Ergebnissen sein. Für die weitere Evaluation des Wirkmechanismus von *Bmper* sind weitere bekannte Signalwege, wie beispielsweise über den nicht-kanonischen Signalweg (MAPK, PI3K, JNK) über FGF (engl. *fibroblast growth factor*) oder den Notch-Signalweg abzuklären (Esser et al. 2015, Esser et al. 2018).

## 6.2. Die Auswirkung der vSMC-spezifischen *Bmp4* Defizienz auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen im Mausmodell

Neben *Bmper* wurde der Einfluss der vSMC-spezifischen Defizienz von *Bmp4* auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen untersucht. In dieser Fragestellung wurde der Fokus auf die molekularbiologische Regulation auf mRNA- und Proteinebene gelegt, lediglich für *Id1* wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt. Die echokardiographischen Daten zeigen, wie auch bei der *Bmper*-Linie keine Beeinträchtigung der Herzleistung durch die Depletion von *Bmp4* in den glatten Muskelzellen. Lediglich durch die Gabe von AngII konnte eine signifikante Reduktion der Ejektions- und Verkürzungsfraction gezeigt werden (**Abbildung 41**). Neben der Herzleistung wurde die Dilatation des Aortenbogens nach 28 Tagen gemessen. Auch hier zeigt sich in den mit NaCl-behandelten Mäusen kein Unterschied zwischen Wildtypen und defizienten Tieren, erst nach der Behandlung mit AngII können Effekte gezeigt werden. Besonders im ascendierenden Anteil der *Aorta thoracica* zeigen die AngII-vSMC<sup>ΔBMP4</sup>-Mäuse eine stark signifikante Erweiterung des Durchmessers (**Abbildung 42**). Es ist bekannt, dass der TGF-β-Signalweg Einfluss auf den thorakalen Aortenabschnitt nimmt, welches auf die ektodermale Herkunft der glatten Muskelzellen zurückzuführen sein kann (Shen et al. 2020). Auch in den anderen gemessenen Abschnitten kann durch AngII sowohl allein als auch in der Kombination mit der vSMC<sup>ΔBMP4</sup> eine Erweiterung der Aorta hervorgerufen werden. Wie bereits im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde auch für die vSMC<sup>ΔBMP4</sup>-Mauslinie die typischen TAA-assoziierten Marker untersucht. Hier zeigt sich in **Abbildung 43 B**, dass die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Defizienz, wie erwartet, zu einer Steigerung der Expression von *Mmp2* führt. Für *Mmp9* konnte die erhöhte Expression sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene, hier sogar signifikant, gezeigt werden. Dies ist **Abbildung 44** zu entnehmen. Zusätzlich wurden die glatten Muskelzellmarker  $\alpha$ -Sma und *Myh11* untersucht. Für  $\alpha$ -Sma konnte auf RNA-Ebene ein starker Effekt durch die Gabe von AngII gezeigt werden, jedoch nicht durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup>. Auf Proteinebene konnte aber auch dieser Effekt nicht gezeigt werden, da die Proben stark streuen (**Abbildung 45**). Um das Ergebnis besser interpretieren zu können, wurde die Proteinexpression von *Myh11* im Gewebe untersucht. Hier zeigt sich ebenfalls keine Veränderung durch die vSMC-spezifische *Bmp4* Defizienz (**Abbildung 46**). Abschließend kann man keine sichere Aussage über den vSMC-Phänotyp geben, jedoch deutet die erhöhte Expression von MMPs auf die Verschiebung zum synthetisierenden Phänotyp hin (Hennessy et al. 1996, Snoek-van Beurden und Von den Hoff 2005, Liu et al. 2015, Salloum et al. 2016). Zusammengefasst mit den Daten von Kora Pröiß, welche in der Immunfluoreszenzmarkierung eine gesteigerte Expression von Kollagenen und MMPs, sowie Destruktionen in der Gefäßwand zeigen konnte, fördert ein Fehlen von *Bmp4* in den vSMCs den synthetisierenden Phänotyp (Pröiß 2018).

Um die Effektivität der Depletion zu untersuchen, wurde der Smad-Signalweg näher untersucht. Für *Bmp4* selbst kann in **Abbildung 47** eine Herabregulation sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Da die Gewebeproben auch andere Zelltypen enthalten, ist auch keine vollständige Depletion vom *Bmp4* im

Aortengewebe erwartet worden. Hier wäre es notwendig, von zuvor induzierten Mäusen die vSMCs zu isolieren, zu kultivieren und anschließend die Expression auf RNA- und Proteinebene zu untersuchen. Als direktes Zielgen des Bmp-Signalwegs wird Id-1 untersucht. Hier zeigt sich lediglich eine minimale Herabregulation auf mRNA-Ebene (**Abbildung 48**). Auch für die Immunfluoreszenzmarkierung konnte kein starker Effekt gezeigt werden. Bei den vSMC<sup>ΔBMP4</sup>-Tieren wurde ein schwächeres Signal in der Media erwartet (**Abbildung 49**). Dies kann durch eine Kompensation des Bmp4-Signalwegs durch andere Signalwegs-Mitglieder oder einen autoregulatorischen Effekt der umliegenden Zellen erklärt werden (Miyazono et al. 2005). Möglicherweise ist der Effekt auf molekularbiologischer Ebene mit den gewählten Methoden und dazugehörigen Primern und Antikörpern nicht ausreichend quantifizierbar.

### 6.3. Herausforderung bei der Erklärung der zugrundeliegenden Signalwege

Shen et al. (2020) veranschaulichen in ihrem Review „Aortic Aneurysms and Dissections Series: Part II: Dynamic Signaling Responses in Aortic Aneurysms and Dissections“, dass die Signalwege, welche zur Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen und abdominalen Aortenaneurysmen beitragen, sehr komplex und bislang unvollständig erforscht sind. Hinzu kommt, dass Signalwegs-Mediatoren nicht nur konzentrationsabhängig wirken können, sondern auch unterschiedliche Wirkungsweisen auf Zelltypen oder Rezeptoren haben und somit auch zu gegenläufigen Zellantworten führen können. Die Aortenwand besteht aus Endothelzellen, welche über Zell-Zell-Kontakte oder Diffusion mit dem darunterliegenden medialen Gewebsanteil kommunizieren. Hier finden sich im Bindegewebe eingelagerte vaskuläre glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten, aber auch eingewanderte Immunzellen, die auf die Stimuli reagieren können (Shen et al. 2020). Sowohl für TGF- $\beta$  als auch für Bmp4 und BMP4 sind zelltypspezifische, pleiotrope Reaktionen im Gewebe nachgewiesen worden (Zhang L. et al. 2016, Davis Frank et al. 2019, Milewicz und Ramirez 2019). Zu BMP4 ist bekannt, dass es als Homo- oder Heterodimer mit BMP2 an die BMPRI und II binden kann (Miyazono et al. 2010) und wie die anderen TGF- $\beta$  Signalwegmitglieder der Autoregulation unterliegen (Lemmon et al. 2016, Zinski et al. 2018). Auch BMPER trägt konzentrationsabhängig zur Regulation von BMP4 bei, ebenso wie andere extrazelluläre Aktivatoren und Inhibitoren (Heinke et al. 2008, Katagiri und Watabe 2016). Versucht man den zugrundeliegenden Signalweg zu verstehen, ist es nicht ausreichend, wie in dieser Arbeit nur den kanonischen Signalweg über die SMAD-Kaskade und ID1 als Target anzuschauen. Als alternativer Signalweg können auch MAPK und PI3K/Akt aktiviert werden, die, wie in der Literatur beschrieben, auch in *ECM-Remodeling*, *Mediadegeneration* und erhöhtem inflammatorischen Signal resultieren können (Zhou et al. 2007, Dinesh und Reinhardt 2019). Additive, positive, negative oder synergistische Effekte können durch die Interaktion des BMP und TGF- $\beta$  Signalwegs mit MAPK, Wnt, Hedgehog (Hh), Notch, Akt/mTOR, oder miRNAs entstehen und die Effekte des BMP-induzierten Signals regulieren (Bostrom et al. 2011, Rahman et al. 2015).

### 6.4. Optimierungsmöglichkeiten der Methodik

Vor Antragsstellung und Versuchsdurchführung wurde der Ablauf des Tierversuchs hinsichtlich des 3R-Prinzips angepasst, dennoch sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit auch weitere Optimierungsmöglichkeiten diskutiert werden. Im Rahmen tierexperimenteller Arbeiten ist das 1959 von W. Russel und R. Burch veröffentlichte 3R-Prinzip relevant. Ziel dieses Prinzips ist es Tierversuche vollständig zu vermeiden (engl. *Replacement*), die Anzahl der verwendeten Tiere zu vermindern (engl. *Reduction*) und ihr Leiden auf ein unvermeidbares Maß zu reduzieren (engl. *Refinement*) (Russell und Burch 1959). Durch eine gewissenhafte Planung des Versuches und der vorab durchgeführten *in vitro* Studien

wurden die Punkte *replacement* und *reduction* vor Antragsstellung umgesetzt. Die Durchführung des Versuchs selbst unterlag strengen Kontrollen in der Zucht und Haltung der Tiere, der regelmäßigen Kontrolle während der Versuchsdurchführung und den vorab definierten Abbruchkriterien. Es wurde zur Induktion des Aortenaneurysmas die minimal-invasivste Methode, durch Angiotensin-II Verabreichung über Minipumpen im Nacken, gewählt (Daugherty und Cassis 2004). Für die spätere Durchführung wurden im Labor bereits etablierte Methoden verwendet und auf die Proben angepasst. Viele Organe wurden entnommen und für spätere Fragestellungen aufbewahrt, insofern sie für die jetzige Arbeit nicht relevant waren.

#### 6.4.1. Optimierungsmöglichkeiten im Rahmen der Versuche an der Maus

Die vorliegenden Ergebnisse weisen in beiden Versuchsteilen auf deutliche Veränderungen in der Gefäßmorphologie hin, die sich zum Teil auch in den PCR-Ergebnissen und auf Proteinebene im Western-Blot reproduzieren lassen. Die Ausprägung der Aneurysmen war jedoch zum Teil sehr schwach und makroskopisch nur als geringe Dilatation sichtbar. Es konnte unter der AngII- Behandlung zwischen Wildtyp und keiner der defizienten Linien ein Unterschied in der Häufigkeit und der Größe des Aneurysmas gezeigt werden. Die Mäuse wurden zwischen 18 und 20 Wochen in den Versuch aufgenommen, da angenommen wurden, dass dieses Alter der Zielgruppe über 60 Jahren entsprechen kann. Jackson Laboratory ordnet das Alter von 18-24 Monate alten C57BL/6J Mäusen einem humanen äquivalenten Alter von 56-69 Jahren zu (The Jackson Laboratory 2020). Dies bedeutet, dass die Mäuse möglicherweise auch noch zu jung waren und die mit höherem Alter assoziierten Wandveränderungen noch nicht ausreichend waren, um bei den defizienten Mauslinien eine erhöhte Prävalenz zur Aneurysmenbildung im thorakalen Abschnitt hervorrufen zu können. Eine interessante Fragestellung wäre somit, ob die genutzten Mauslinien in einem Alter von über 18 Monaten zu spontanen Aneurysmen neigen und ob eine Behandlung mit AngII in den defizienten Mauslinien zur Ausprägung eines Phänotypen, im Vergleich mit AngII-behandelten Wildtyp-Mäusen, neigen. Die Mäuse für diesen Versuch wurden mit einer Angiotensin-II Dosis von 1 µg/kg x min (Pumpe: Firma ALZET®, Modell 2004, Reservoirvolumen 200 µl) behandelt. Eine Verlängerung des Versuchs oder Erhöhung der Dosis ist in Bezug auf eine deutliche Verbesserung des angestrebten Ergebnisses eher fragwürdig. Zu Bedenken ist bei dieser Option die lange Planungszeit und Belegung der Maushaltung, jedoch auch die damit verbundenen, stark erhöhten Kosten.

Eine weitere pharmakologische Möglichkeit zur Induktion von thorakalen Aortenaneurysmen ist die Anwendung von  $\beta$ - Aminopropionitrile (BAPN), ein Inhibitor einer Lysyloxidase (Kanematsu et al. 2010). Der natürliche Alterungsprozess, bei dem es zu einer Destruktion der elastischen *Laminae* und einer Verminderung der Quervernetzung mit Kollagenen im Aortengewebe kommt, ist auf die Reduktion von Lysyloxidasen zurückzuführen. In Versuchen entwickelten mehr Mäuse sichtbare thorakale Aortenaneurysmen, wenn sie mit BAPN und AngII induziert wurden (Kanematsu et al. 2010). Dies könnte die Entstehung von Aneurysmen im Versuchsmodell begünstigen und somit die Wertigkeit der gewonnenen Proben steigern. Ebenso wäre es von großem Interesse die Proben von Mäusen ohne sichtbares Aneurysma mit jenen von stark ausgeprägten Aneurysmen zu vergleichen, um mögliche protektive Mechanismen erforschen zu können. Dieser Versuchsaufbau wäre einer reinen Verlängerung oder Dosiserhöhung von AngII vorzuziehen.

Zur Verbesserung des Versuchsergebnisses und einer optimierten Interpretation der Daten wäre es für den ersten Versuchsteil sinnvoll, die vorliegenden Daten durch Bmper-flox Mäuse zu ergänzen. Hierfür müsste eine induzierbare Mauslinie bezogen oder generiert werden, die nach Tamoxifen-Induktion Bmper aus allen Zelllinien oder kombiniert mit einem

Promotor herausschneidet und die Expression verhindert (siehe 4.1.2). Die Zucht von homozygot-defizienten Bmper Mäusen ist verboten, da die Jungtiere perinatal versterben. Die Letalität ist auf die Fehlbildung der trachealen Knorpelspannen und des distalen Lungenabschnittes zurückzuführen (Ikeya et al. 2006, Zakin et al. 2008, Kelley et al. 2009).

#### 6.4.2. Optimierungsmöglichkeiten der Proteindetektion

Bei der Proteindetektion mittels Western Blot-Verfahren konnten im zweiten Versuchsteil bessere Ergebnisse erzielt werden, nachdem das Protokoll optimiert wurde. Die bisher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Proteinquantifizierungen mittels Western Blot wurden mit Zellkulturproben durchgeführt oder nur geringen Anzahlen an Proben verwendet. Einige Blots mussten mehrfach durchgeführt werden, da die Auswertung der Banden nicht möglich war oder zu keinem einheitlichen Ergebnis führte. Ebenso konnte pro Gel nur eine maximale Anzahl von acht Proben und zwei Marker geladen werden, dies erschwert die Vergleichbarkeit enorm. Im zweiten Versuchsteil wurden die Proben durch die Nutzung des *Bioruptors* und speziellen Reaktionsgefäßen mit Kügelchen, welche die stabile Aortenwand im Lysispuffer besser aufspalten, behandelt. Die Nachbehandlung mittels Ultraschall führte zu einer erhöhten Proteinkonzentration pro Probe. Zuvor wurden die Gele und Puffer selbst hergestellt, jedoch können pro Elektrophoresekammer maximal zwei Gele gefahren werden, welches die Standardisierung des Verfahrens erschwert hat. Bei den Proben der Myh11CreERT2/Bmp4loxP-Linie wurden Gele und Laufpuffer der Firma Biorad bezogen, ebenso die vorbereiteten PVDF-Membranen für das Turboblot-Verfahren. Durch die erhöhte Proteinkonzentration pro  $\mu\text{l}$  konnten Gele mit 18 Taschen bezogen werden, welche es ermöglichten alle Proben auf zwei Gelen parallel der Elektrophorese zu unterziehen und anschließend im Turboblot auf die Membran zu übertragen. Diese Optimierungen ermöglichten eine höhere Standardisierung und Vergleichbarkeit der Proben, die Banden waren gleichmäßiger und besser auszuwerten. Trotz des verbesserten Verfahrens konnte das 18 kDa schwere ID1 Protein nicht detektiert werden, zur Detektion wurden drei unterschiedliche spezifische Antikörper ausprobiert.

Zusammenfassend konnte während der Generierung der vorliegenden Ergebnisse zusätzlich eine Optimierung der Methode zur Proteinquantifizierung in Mausproben etabliert werden. Dies ermöglichte für den zweiten Versuchsabschnitt und für die Beantwortung weiterer Fragestellungen eine Verbesserung der Datenqualität und Reduktion der Probenmenge.

## 7. Ausblick

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand im ersten Abschnitt darin, die Auswirkung einer globalen heterozygoten Defizienz von *Bmper* auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen *in vivo* zu untersuchen. Die gesammelten Daten zeigen, dass *Bmper* für die Gewebshomöostase in der Aorta notwendig ist und den kontraktile Phänotyp von vSMCs fördert. Interessant wäre die Auswirkung einer globalen homozygoten Defizienz von *Bmper* in der Aorta zu untersuchen, da die bekannte konzentrationsabhängige Wirkung die Interpretation der Daten erschwert. Durch die unterschiedliche Wirkung von *Bmper* auf Endothelzellen und vSMCs, ähnlich der für BMP4 beschriebenen zelltypspezifischen Wirkung, wäre eine induzierbare Knockoutlinie mit globaler Homozygotie oder zelltypspezifischer Defizienz von *Bmper* für weitere Versuche sinnvoll. Hier könnte der Promoter *Myh11* für glatte Muskelzellen genutzt werden, für Endothelzellen wäre der Promoter *Cadherin5* denkbar. Neben diesen Daten wäre ein Rettungsversuch (engl. *Rescue*) interessant. Hier würde den *Bmper*-defizienten Mäusen rekombinantes *Bmper*-Protein appliziert werden und untersucht, ob der ursprüngliche Wildtyp-Zustand wieder erreicht werden kann. Neben diesen Möglichkeiten wurde in der Optimierung des Mausversuchs bereits die Anwendung von BAPN oder der Einsatz von deutlich älteren Mäusen diskutiert. Diese Adaptierungen können auch auf die im zweiten Abschnitt eingesetzten *Myh11-CreERT2/BMP4loxP* Mäuse angewendet werden. Ebenso die Untersuchung weiterer Organe wie Herz und Niere. Für die weitere Charakterisierung von BMPER und dem BMP-SMAD-Signalweg ist es notwendig die Wirkung über die nicht-kanonischen Signalwege wie PI3K und MAPK zu analysieren. Vorversuche dieser Arbeitsgruppe *in vitro* zeigten zudem inhibitorische Auswirkung auf den IGF- (engl. *insulin-like growth factor*) Signalweg (Prölß 2018). Der Einfluss über Notch und dessen Wirkung auf die Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen ist ebenso von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden (Malashicheva et al. 2020). Diese Auflistung zeigt, wie wenig wir bislang über die Interaktion von *Bmper* mit spezifischen Zelltypen, aber auch Signalwegen wissen.

Für die *Myh11-CreERT2/Bmp4loxP* Linie wurden hauptsächlich Western Blots und PCRs durchgeführt und analysiert; diese ergänzen die zuvor erhobenen Daten der Immunfluoreszenzaufnahmen von Kora Prölß (Prölß 2018). Auch hier zeigt sich, dass die Defizienz von *Bmp4* in vSMCs zu einer erhöhten Anfälligkeit und Bildung von thorakalen Aortenaneurysmen führt. Es fördert in der Abwesenheit den synthetisierenden Phänotyp, resultiert in einem Umbau der ECM und erhöhtem inflammatorischen Signal und führt zum erhöhten apoptotischen Untergang der glatten Muskelzellen. Auch im Rahmen dieser Arbeit könnte ein *Rescue* Versuch mit rekombinantem *Bmp4*-Protein durchgeführt werden. Welche weiteren Zelltypen für Versuche von Interesse sein könnten, könnte eine Studie mit einer Reporter-Maus liefern. Hier ist das *Bmp-responsive element (Bre)*, welcher Smad-Bindungsstellen im *Id1*-Promotor entspricht, an GFP gekoppelt (Korchynskyi und ten Dijke 2002). Eine Induktion eines Aortenaneurysmas würde im Versuch Rückschlüsse auf die veränderte Expression und Aktivität in unterschiedlichen Zelltypen liefern. Interessant wäre auch die Auswirkung einer endothelspezifischen *Bmp4*-Defizienz im Aortenaneurysma zu untersuchen, die dafür benötigte *Cdh5Cre/Bmp4loxP* Maus ist bereits vorhanden. Im Rahmen der endothelspezifischen Defizienz von *Bmp4* wäre es interessant nicht nur die bisher bekannten Marker zu untersuchen, sondern einen Fokus auf die Zellkommunikation zwischen Endothelzellen und vSMCs zu legen. Dies könnte durch noch vorhandene Schnitte und einer durchgeführten Immunfluoreszenz-Antikörper-Markierung einfach verglichen werden. Für diese Mauslinie wurden, wie auch bei *Bmper*, Proben für die Proteomanalyse versendet. Die Daten konnten vor Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr eingesehen und ausgewertet werden. Diese können jedoch innovative und vielversprechende Daten über die Veränderungen durch die vSMC<sup>ΔBMP4</sup> Depletion liefern.

## 8. Zusammenfassung

### Der Einfluss von Bmper und Bmp4 auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen im Mausmodell

*Bone morphogenetic proteins* (BMPs) zählen zur *transforming growth-factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ )-Superfamilie und sind für die Regulation zahlreicher Signaltransduktionen, auch außerhalb von Knochen- und Knorpelgewebe, beteiligt. So ist bekannt, dass BMPs Einfluss auf die frühe Herzentwicklung nehmen und neben diesen auch die biologische Funktionalität und Homöostase der Blutgefäße beeinflussen. Bislang sind zwei hereditäre vaskuläre Erkrankungen direkt mit dem BMP-Signalweg assoziiert: hierzu zählen die pulmonal arterielle Hypertonie und die hereditäre Teleangiektasie. Die pleiotropen und zelltypspezifischen Effekte der BMPs auf Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen lassen weitere BMP-assoziierte kardiovaskuläre Erkrankungen vermuten. *In vitro* Vorversuche zeigten, dass BMP4 und der BMP-Modulator BMPER (*BMP endothelial cell precursor derived regulator*) den kontraktile Phänotyp von pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (engl. PASMCs) fördert und ein Fehlen zu einer erhöhten Proliferation und Migration, sowie in Synthese von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) resultiert (Baur 2015, Pröhl 2018). Dies führte zur Annahme, dass eine Dysregulation von BMP4 und BMPER durch biochemische und mechanische Reize mit strukturellen und funktionellen Veränderungen im Aortengewebe einhergeht und so zur Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen beitragen kann. Aortenaneurysmen sind eine tödliche Erkrankung, für die es zum jetzigen Zeitpunkt keine medikamentöse Therapie gibt, die die Progression nachweislich reduziert. Umso wichtiger ist die Erforschung der beteiligten Signalwege, die zu einer meist multifaktoriellen Pathogenese führen.

Für diese *in vivo* Studie wurde Mäusen für 28 Tage eine osmotische Minipumpe mit Angiotensin-II (AngII) in den Nacken implantiert und durch die Entstehung von Bluthochdruck zur Induktion von Aortenaneurysmen genutzt. Im ersten Versuchsabschnitt wurde mit der Mauslinie C57/BL6N-Bmper gearbeitet, bei der die Auswirkungen einer globalen heterozygoten Defizienz von Bmper auf die Pathomechanismen in der Gefäßwand und somit der Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen geklärt werden sollten. In der Echokardiografie zeigte sich bei den mit AngII behandelten Mäusen eine Dilatation des Aortenbogens, jedoch keine Veränderung des Durchmessers der Aorta durch die heterozygote Defizienz von Bmper. Histologische und molekularbiologische Daten zeigen einen Verlust von kontraktile vSMC-Markern, wie beispielsweise  $\alpha$ -Sma und Myh11, durch die heterozygote Defizienz von Bmper. Zusätzlich kam es zu einer Destruktion von elastischen Fasern, zu einer erhöhten Steifigkeit durch die Einlagerung von Kollagen in die Gefäßwand und der erhöhten Expression der typischen Marker Mmp2 und 9. Zusammengefasst resultieren diese Veränderungen in einem Verlust der Elastizität und Kontraktilität sowie einer Zunahme der Wandsteifigkeit, die eine Progression von Aortenaneurysmen im thorakalen Abschnitt begünstigen können.

In der zweiten hier durchgeführten Studie wurde die induzierte Defizienz von Bmp4 in vSMCs und die daraus resultierenden Veränderungen auf die Integrität und Funktionalität des Aortengewebes untersucht. So konnte in der vorliegenden Arbeit zwar keine deutliche Reduktion der kontraktile Marker auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden, jedoch lassen immunhistologische Färbungen aus einer früheren Arbeit und eine erhöhte Apoptoserate auf die Veränderung in der vSMCs Population schließen (Pröhl 2018). Im Aortengewebe der vSMC <sup>$\Delta$ BMP4</sup> Mauslinie konnte zudem eine erhöhte Expression von Mmp2 und Mmp9 gezeigt werden, welches mit den Daten aus den histologischen Untersuchungen auf den Wechsel vom kontraktile vSMC-Typ in einen synthetisierenden Phänotyp schließen lässt. Anhand dieser und der zuvor erhobenen Daten (Pröhl 2018) in diesem Projekt lässt sich ein protektiver Effekt von Bmp4 auf den Phänotyp der glatten Muskelzellen zeigen und ein protektiver Effekt für die Genese von thorakalen Aortenaneurysmen vermuten.

Somit bildet diese Arbeit eine wichtige Grundlage für das Verständnis des BMP-Signalwegs in Bezug auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen und der zugrundeliegenden Veränderungen der vaskulären glatten Muskelzellen. Auch für andere vaskuläre Erkrankungen, in denen die Veränderungen von vSMCs maßgeblich zur Genese der Pathologien beitragen, können diese Ergebnisse von hohem Interesse sein.

## 9. Summary

### The influence of Bmper and Bmp4 on the development of thoracic aortic aneurysms in mice

Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the transforming growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily and are involved in the regulation of numerous metabolic processes besides bone and cartilage tissue. It is known that BMPs have an influence on early cardiac development and, in addition to these, also affect the biological functionality and homeostasis of blood vessels. To date, two hereditary vascular diseases are directly associated with the BMP signaling pathway: pulmonary arterial hypertension and hereditary telangiectasia. The pleiotrophic and cell type-specific effects of BMPs on, e.g. endothelial cells and vascular smooth muscle cells suggest further BMP-associated cardiovascular diseases. *In vitro* preliminary experiments showed that BMP4 and the BMP-modulator BMPER (BMP endothelial cell precursor derived regulator) promote the contractile phenotype of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) and that a deficiency leads to increased proliferation and migration, as well as to the synthesis of matrix metalloproteinases (MMPs) (Baur 2015, Prölß 2018). Thus, the hypothesis is that dysregulation of BMP4 and BMPER by biochemical and mechanical stimuli is associated with structural and functional changes in aortic tissue and may contribute to the pathogenesis of thoracic aortic aneurysms. Aortic aneurysms are a fatal disease for which there is currently no drug therapy that has been shown to reduce progression. Therefore it is of utmost importance to investigate the involved signaling pathways such as the BMPs.

For this *in vivo* study, an osmotic mini-pump with Angiotensin-II (AngII) was implanted into the neck of mice for 28 days to induce aortic aneurysms via hypertension. In the first part of the study the mouse line C57/BL6N-Bmper was used to elucidate the effects of a global heterozygous deficiency of Bmper on pathomechanisms in the vessel wall and along this line the development of thoracic aortic aneurysms. Echocardiography showed a dilatation of the aortic arch in AngII treated mice, but no change in aortic diameter due to the heterozygous deficiency of Bmper. Histological and molecular biological data indicated the loss of contractile vSMC markers due to the heterozygous deficiency of Bmper. In addition, there was destruction of elastic fibers, increased stiffness due to the deposition of collagen in the vessel wall and an increased expression of Mmp2 and 9 that are typical markers for enhanced extracellular matrix remodeling. In summary, these changes result in a loss of elasticity and contractility as well as an increase in wall stiffness, which may favor a progression of aortic dilatation and dissection in the thoracic segment.

The second part of the study examined the induced deficiency of Bmp4 in vSMCs and the resulting changes in aortic tissue integrity and functionality. Although the present study could not show a significant reduction of contractile markers at the mRNA and protein level, immunohistological staining from a previous study and an increased rate of apoptosis suggest that the vSMCs are altered. In addition, an increased expression of Mmp2 and Mmp9 was shown in the aortic tissue of the vSMC<sup>ΔBMP4</sup> mouse line, which, together with the data from the histological examinations, suggests a change from the contractile vSMC type to a synthesizing phenotype. Based on these and the previously collected data, a protective effect of Bmp4 on the contractile vSMC phenotype is shown and, therefore, a protective effect against the genesis of thoracic aortic aneurysms can be assumed.

Thus, the current thesis provides an important basis for understanding the BMP-signaling pathway in relation to the development of thoracic aortic aneurysms and the underlying changes in vascular smooth muscle cells. These results may also be of great interest for other vascular diseases, in which the changes in vSMCs play a major role in the pathogenesis of diseases.

## 10. Literaturverzeichnis

Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., Jepson, R. E., Papich, M., Stepien, R. L. and Syme, H. M. (2018). "ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats." Journal of Veterinary Internal Medicine 32(6): 1803-1822.

Allende-Vigo, M. Z. (2010). "Pathophysiologic mechanisms linking adipose tissue and cardiometabolic risk." Endocrine Practice 16(4): 692-698.

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. and Sherlock, G. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nature Genetics 25(1): 25-29.

Atlas, S. A. (2007). "The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition." Journal of Managed Care Pharmacy 13(8 Suppl B): 9-20.

Banfalvi, G. (2017). "Methods to detect apoptotic cell death." Apoptosis 22(2): 306-323.

Baur, A.-K. (2015). Der Einfluss von BMPER auf die Funktion von vaskulären glatten Muskelzellen. Dr. med. dent., Monografie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Deutsche National Bibliothek. Zugriff 27.01.2021.

Belo, V. A., Guimaraes, D. A. and Castro, M. M. (2015). "Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension." Journal of Vascular Research 52(4): 221-231.

Berillis, P. (2013). "The Role of Collagen in the Aorta's Structure." The Open Circulation and Vascular Journal 6(1): 1-8.

Bobik, A. (2006). "Transforming growth factor-betas and vascular disorders." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 26(8): 1712-1720.

Bostrom, K. I., Rajamannan, N. M. and Towler, D. A. (2011). "The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens." Circulation Research 109(5): 564-577.

Cai, J., Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G. and ten Dijke, P. (2012). "BMP signaling in vascular diseases." FEBS Letters 586(14): 1993-2002.

Clarke, M. C., Littlewood, T. D., Figg, N., Maguire, J. J., Davenport, A. P., Goddard, M. and Bennett, M. R. (2008). "Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration." Circulation Research 102(12): 1529-1538.

Cunha, S. I., Magnusson, P. U., Dejana, E. and Lampugnani, M. G. (2017). "Deregulated TGF-beta/BMP Signaling in Vascular Malformations." Circulation Research 121(8): 981-999.

Daugherty, A. and Cassis, L. A. (2004). "Mouse models of abdominal aortic aneurysms." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24(3): 429-434.

- Daugherty, A., Manning, M. W. and Cassis, L. A. (2000). "Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice." Journal of Clinical Investigation 105(11): 1605-1612.
- Daugherty, A. and Powell, J. T. (2014). "Recent highlights of ATVB: aneurysms." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 34(4): 691-694.
- Daugherty, A., Rateri, D. L., Charo, I. F., Owens, A. P., Howatt, D. A. and Cassis, L. A. (2010). "Angiotensin II infusion promotes ascending aortic aneurysms: attenuation by CCR2 deficiency in apoE<sup>-/-</sup> mice." Clinical science (London, England : 1979) 118(11): 681-689.
- Davies, I. and Schofield, J. D. (1980). "Connective tissue ageing: The influence of a lathyrogen ( $\beta$ -aminopropionitrile) on the life span of female C57BL/1crfat mice." Experimental Gerontology 15(5): 487-494.
- Davis Frank, M., Daugherty, A. and Lu Hong, S. (2019). "Updates of Recent Aortic Aneurysm Research." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 39(3): e83-e90.
- de Figueiredo Borges, L., Jaldin, R. G., Dias, R. R., Stolf, N. A., Michel, J. B. and Gutierrez, P. S. (2008). "Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta." Human Pathology 39(3): 437-443.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft. (2019). "SFB/Transregio 259 Aortenerkrankungen." Access: 26.05.2020, from [https://www.dfg.de/gefoerderte\\_projekte/programme\\_und\\_projekte/listen/projektetails/index.jsp?id=397484323&sort=beginn\\_desc&prg=SFB&region=&wb=&prgvar=](https://www.dfg.de/gefoerderte_projekte/programme_und_projekte/listen/projektetails/index.jsp?id=397484323&sort=beginn_desc&prg=SFB&region=&wb=&prgvar=).
- Dinesh, N. E. H. and Reinhardt, D. P. (2019). "Inflammation in thoracic aortic aneurysms." Herz 44(2): 138-146.
- Dyer, L. A., Pi, X. and Patterson, C. (2014). "The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction." Trends in endocrinology and metabolism: TEM 25(9): 472-480.
- Esser, J. S., Rahner, S., Deckler, M., Bode, C., Patterson, C. and Moser, M. (2015). "Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway in Endothelial Cells Is Activated by BMPER to Promote Angiogenesis." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 35(2): 358-367.
- Esser, J. S., Steiner, R. E., Deckler, M., Schmitt, H., Engert, B., Link, S., Charlet, A., Patterson, C., Bode, C., Zhou, Q. and Moser, M. (2018). "Extracellular bone morphogenetic protein modulator BMPER and twisted gastrulation homolog 1 preserve arterial-venous specification in zebrafish blood vessel development and regulate Notch signaling in endothelial cells." The FEBS Journal 285(8): 1419-1436.
- Friedel, R. H., Wurst, W., Wefers, B. and Kuhn, R. (2011). "Generating conditional knockout mice." Methods in Molecular Biology 693: 205-231.
- Garcia de Vinuesa, A., Abdelilah-Seyfried, S., Knaus, P., Zwijsen, A. and Bailly, S. (2016). "BMP signaling in vascular biology and dysfunction." Cytokine and Growth Factor Reviews 27: 65-79.
- Gardin, J. M., Siri, F. M., Kitsis, R. N., Edwards, J. G. and Leinwand, L. A. (1995). "Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice." Circulation Research 76(5): 907-914.

- Gene Ontology, C. (2021). "The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine." Nucleic Acids Research 49(D1): D325-D334.
- Goldfinger, J. Z., Halperin, J. L., Marin, M. L., Stewart, A. S., Eagle, K. A. and Fuster, V. (2014). "Thoracic aortic aneurysm and dissection." Journal of the American College of Cardiology 64(16): 1725-1739.
- Gösele, R. R. (2019). Die Rolle von BMPER und BMP4 in der Neointimabildung. Dr. med, Monografie, Albert-Ludwigs Universität Freiburg im Breisgau, nicht veröffentlicht. Zugriff 27.01.2021.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. and ten Dijke, P. (2002). "Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors." EMBO Journal 21(7): 1743-1753.
- Grainger, D. J. (2004). "Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24(3): 399-404.
- Guo, D. C., Papke, C. L., He, R. and Milewicz, D. M. (2006). "Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms." Annals of the New York Academy of Sciences 1085: 339-352.
- GV-SOLAS. (2015). "Empfehlung zur Schmerztherapie bei Versuchstieren." Access: 15.06.2020, from <http://www.gv-solas.de/index.php?id=33>.
- Hadler-Olsen, E., Kanapathippillai, P., Berg, E., Svineng, G., Winberg, J. O. and Uhlin-Hansen, L. (2010). "Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity." Journal of Histochemistry and Cytochemistry 58(1): 29-39.
- Hall, B., Limaye, A. and Kulkarni, A. B. (2009). "Overview: generation of gene knockout mice." Current Protocols in Cell Biology Chapter 19: Unit 19 12 19 12 11-17.
- Halushka, M. K., Angelini, A., Bartoloni, G., Basso, C., Batoroeva, L., Bruneval, P., Buja, L. M., Butany, J., d'Amati, G., Fallon, J. T., Gallagher, P. J., Gittenberger-de Groot, A. C., Gouveia, R. H., Kholova, I., Kelly, K. L., Leone, O., Litovsky, S. H., Maleszewski, J. J., Miller, D. V., Mitchell, R. N., Preston, S. D., Pucci, A., Radio, S. J., Rodriguez, E. R., Sheppard, M. N., Stone, J. R., Suvarna, S. K., Tan, C. D., Thiene, G., Veinot, J. P. and van der Wal, A. C. (2016). "Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases - nomenclature and diagnostic criteria." Cardiovascular Pathology 25(3): 247-257.
- Hanna, A. and Frangogiannis, N. G. (2019). "The Role of the TGF-beta Superfamily in Myocardial Infarction." frontiers in Cardiovascular Medicine 6: 140.
- He, R., Guo, D. C., Estrera, A. L., Safi, H. J., Huynh, T. T., Yin, Z., Cao, S. N., Lin, J., Kurian, T., Buja, L. M., Geng, Y. J. and Milewicz, D. M. (2006). "Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections." Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 131(3): 671-678.
- Heinke, J., Kerber, M., Rahner, S., Mnich, L., Lassmann, S., Helbing, T., Werner, M., Patterson, C., Bode, C. and Moser, M. (2012). "Bone morphogenetic protein modulator

BMPER is highly expressed in malignant tumors and controls invasive cell behavior." Oncogene 31(24): 2919-2930.

Heinke, J., Wehofsits, L., Zhou, Q., Zoeller, C., Baar, K. M., Helbing, T., Laib, A., Augustin, H., Bode, C., Patterson, C. and Moser, M. (2008). "BMPER is an endothelial cell regulator and controls bone morphogenetic protein-4-dependent angiogenesis." Circulation Research 103(8): 804-812.

Heiss, C., Rodriguez-Mateos, A. and Kelm, M. (2015). "Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis." Antioxidants & redox signaling 22(14): 1230-1242.

Helbing, T., Rothweiler, R., Ketterer, E., Goetz, L., Heinke, J., Grundmann, S., Duerschmied, D., Patterson, C., Bode, C. and Moser, M. (2011). "BMP activity controlled by BMPER regulates the proinflammatory phenotype of endothelium." Blood 118(18): 5040-5049.

Hennessy, T. G., Smith, D., McCann, H. A., McCarthy, C. and Sugrue, D. D. (1996). "Thoracic aortic dissection or aneurysm: clinical presentation, diagnostic imaging and initial management in a tertiary referral centre." Irish Journal of Medical Science 165(4): 259-262.

Hiepen, C., Yadin, D., Rikeit, P., Dorpholz, G. and Knaus, P. (2016). "Actions from head to toe: An update on Bone/Body Morphogenetic Proteins in health and disease." Cytokine and Growth Factor Reviews 27: 1-11.

Hirano, T., Matsubashi, T., Kobayashi, N., Watanabe, T. and Sugimoto, Y. (2012). "Identification of an FBN1 mutation in bovine Marfan syndrome-like disease." Animal Genetics 43(1): 11-17.

Hiratzka, L. F., Bakris, G. L., Beckman, J. A., Bersin, R. M., Carr, V. F., Casey, D. E., Jr., Eagle, K. A., Hermann, L. K., Isselbacher, E. M., Kazerooni, E. A., Kouchoukos, N. T., Lytle, B. W., Milewicz, D. M., Reich, D. L., Sen, S., Shinn, J. A., Svensson, L. G., Williams, D. M., American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice, G., American Association for Thoracic, S., American College of, R., American Stroke, A., Society of Cardiovascular, A., Society for Cardiovascular, A., Interventions, Society of Interventional, R., Society of Thoracic, S. and Society for Vascular, M. (2010). "2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM Guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine." Journal of the American College of Cardiology 55(14): e27-e129.

Howard, D. P., Banerjee, A., Fairhead, J. F., Perkins, J., Silver, L. E., Rothwell, P. M. and Oxford Vascular, S. (2013). "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 127(20): 2031-2037.

Ihling, C., Szombathy, T., Nampoothiri, K., Haendeler, J., Beyersdorf, F., Uhl, M., Zeiher, A. M. and Schaefer, H. E. (1999). "Cystic medial degeneration of the aorta is associated with p53 accumulation, Bax upregulation, apoptotic cell death, and cell proliferation." Heart 82(3): 286-293.

- Ikeya, M., Kawada, M., Kiyonari, H., Sasai, N., Nakao, K., Furuta, Y. and Sasai, Y. (2006). "Essential pro-Bmp roles of crossveinless 2 in mouse organogenesis." Development 133(22): 4463-4473.
- Isselbacher, E. M. (2005). "Thoracic and abdominal aortic aneurysms." Circulation 111(6): 816-828.
- Ito, S., Akutsu, K., Tamori, Y., Sakamoto, S., Yoshimuta, T., Hashimoto, H. and Takeshita, S. (2008). "Differences in atherosclerotic profiles between patients with thoracic and abdominal aortic aneurysms." American Journal of Cardiology 101(5): 696-699.
- Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A. and Schurgers, L. (2019). "The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes." International Journal of Molecular Sciences 20(22).
- Jana, S., Hu, M., Shen, M. and Kassiri, Z. (2019). "Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm." Experimental and Molecular Medicine 51(12): 1-15.
- Jones, J. A., Barbour, J. R., Stroud, R. E., Bouges, S., Stephens, S. L., Spinale, F. G. and Ikonomidis, J. S. (2008). "Altered transforming growth factor-beta signaling in a murine model of thoracic aortic aneurysm." Journal of Vascular Research 45(6): 457-468.
- Jones, J. A., Spinale, F. G. and Ikonomidis, J. S. (2009). "Transforming growth factor-beta signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis." Journal of Vascular Research 46(2): 119-137.
- Jones, J. A., Zavadzkas, J. A., Chang, E. I., Sheats, N., Koval, C., Stroud, R. E., Spinale, F. G. and Ikonomidis, J. S. (2010). "Cellular phenotype transformation occurs during thoracic aortic aneurysm development." Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 140(3): 653-659.
- Joppien, S., Maier, S. L. and Wendling, D. S. (2010). Experimentelle Doktorarbeit Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, ISBN: 978-3437426964.
- Jufri, N. F., Mohamedali, A., Avolio, A. and Baker, M. S. (2015). "Mechanical stretch: physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells." Vascular Cell 7: 8.
- Kanematsu, Y., Kanematsu, M., Kurihara, C., Tsou, T. L., Nuki, Y., Liang, E. I., Makino, H. and Hashimoto, T. (2010). "Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice." Hypertension 55(5): 1267-1274.
- Katagiri, T. and Watabe, T. (2016). "Bone Morphogenetic Proteins." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 8(6).
- Katherine A., P. D. (2014). "Guidelines for Formatting Gene and Protein Names." Access: 10.02.2021, from <https://www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx>.
- Kawabata, M. (1998). "Signal transduction by bone morphogenetic proteins." Cytokine and Growth Factor Reviews 9(1): 49-61.

- Kawahara, Y., Tanonaka, K., Daicho, T., Nawa, M., Oikawa, R., Nasa, Y. and Takeo, S. (2005). "Preferable anesthetic conditions for echocardiographic determination of murine cardiac function." Journal of Pharmacological Sciences 99(1): 95-104.
- Keeling, W. B., Armstrong, P. A., Stone, P. A., Bandyk, D. F. and Shames, M. L. (2005). "An overview of matrix metalloproteinases in the pathogenesis and treatment of abdominal aortic aneurysms." Vascular and Endovascular Surgery 39(6): 457-464.
- Kelley, R., Ren, R., Pi, X., Wu, Y., Moreno, I., Willis, M., Moser, M., Ross, M., Podkowa, M., Attisano, L. and Patterson, C. (2009). "A concentration-dependent endocytic trap and sink mechanism converts Bmper from an activator to an inhibitor of Bmp signaling." Journal of Cell Biology 184(4): 597-609.
- Khanna, A. (2004). "Concerted effect of transforming growth factor-beta, cyclin inhibitor p21, and c-myc on smooth muscle cell proliferation." American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 286(3): H1133-1140.
- Korchynskiy, O. and ten Dijke, P. (2002). "Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter." Journal of Biological Chemistry 277(7): 4883-4891.
- Kresken, J., Wendt, R. and Modler, P. (2017). Praxis der Kardiologie Hund und Katze. Georg Thieme Verlag KG, Enke Verlag, ISBN: 978-3-13-219421-2.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. and Kiousi, C. (2012). Detection of Apoptosis by TUNEL Assay. Odontogenesis: Methods and Protocols. C. Kiousi. Totowa, NJ, Humana Press: 41-47.
- Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. and Michel, J. B. (2012). "The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles." Cardiovascular Research 95(2): 194-204.
- Lagna, G., Ku, M. M., Nguyen, P. H., Neuman, N. A., Davis, B. N. and Hata, A. (2007). "Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors." Journal of Biological Chemistry 282(51): 37244-37255.
- Leloup, A. J. A., Van Hove, C. E., De Moudt, S., De Meyer, G. R. Y., De Keulenaer, G. W. and Franssen, P. (2019). "Vascular smooth muscle cell contraction and relaxation in the isolated aorta: a critical regulator of large artery compliance." Physiological Reports 7(4): e13934.
- Lemmon, M. A., Freed, D. M., Schlessinger, J. and Kiyatkin, A. (2016). "The Dark Side of Cell Signaling: Positive Roles for Negative Regulators." Cell 164(6): 1172-1184.
- Lesauskaite, V., Tanganelli, P., Sassi, C., Neri, E., Diciolla, F., Ivanoviene, L., Epistolato, M. C., Lalinga, A. V., Alessandrini, C. and Spina, D. (2001). "Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors." Human Pathology 32(9): 1003-1011.
- Lindeman, J. H., Ashcroft, B. A., Beenakker, J. W., van Es, M., Koekkoek, N. B., Prins, F. A., Tielemans, J. F., Abdul-Hussien, H., Bank, R. A. and Oosterkamp, T. H. (2010). "Distinct defects in collagen microarchitecture underlie vessel-wall failure in advanced abdominal

aneurysms and aneurysms in Marfan syndrome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(2): 862-865.

Linke, W. A. and Pfitzer, G. (2011). Kontraktionsmechanismen. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. R. F. Schmidt, F. Lang and M. Heckmann. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 98-124.

Liu, J., Daugherty, A. and Lu, H. (2015). "Angiotensin II and Abdominal Aortic Aneurysms: An update." Current Pharmaceutical Design 21(28): 4035-4048.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-408.

Longo, G. M., Xiong, W., Greiner, T. C., Zhao, Y., Fiotti, N. and Baxter, B. T. (2002). "Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms." Journal of Clinical Investigation 110(5): 625-632.

Lüllmann-Rauch, R. (2012). Taschenlehrbuch Histologie, Thieme, ISBN: 978-3131292445

Malashicheva, A., Kostina, A., Kostareva, A., Irtyuga, O., Gordeev, M. and Uspensky, V. (2020). "Notch signaling in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysms: A bridge between embryonic and adult states." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1866(3): 165631.

Marr, C. M., Reef, V. B., Brazil, T. J., Thomas, W. P., Knottenbelt, D. C., Kelly, D. F., Baker, J. R., Reimer, J. M., Maxson, A. D. and Crowhurst, J. S. (1998). "Aorto-cardiac fistulas in seven horses." Veterinary Radiology and Ultrasound 39(1): 22-31.

Melo, L. G., Gneccchi, M., Ward, C. A. and Dzau, V. J. (2007). Vascular Remodeling in Health and Disease. Cardiovascular Medicine. J. T. Willerson, H. J. J. Wellens, J. N. Cohn et al. London, Springer London: 1541-1565.

Milewicz, D. M. and Ramirez, F. (2019). "Therapies for Thoracic Aortic Aneurysms and Acute Aortic Dissections." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 39(2): 126-136.

Miyazono, K., Kamiya, Y. and Morikawa, M. (2010). "Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction." Journal of Biochemistry 147(1): 35-51.

Miyazono, K., Maeda, S. and Imamura, T. (2005). "BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk." Cytokine and Growth Factor Reviews 16(3): 251-263.

Mokashi, S. A. and Svensson, L. G. (2019). "Guidelines for the management of thoracic aortic disease in 2017." General Thoracic and Cardiovascular Surgery 67(1): 59-65.

Moreno, M., Munoz, R., Aroca, F., Labarca, M., Brandan, E. and Larrain, J. (2005). "Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway." EMBO Journal 24(7): 1397-1405.

Moser, M., Binder, O., Wu, Y., Aitsebaomo, J., Ren, R., Bode, C., Bautch, V. L., Conlon, F. L. and Patterson, C. (2003). "BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation." Molecular and Cellular Biology 23(16): 5664-5679.

- Moser, M., Yu, Q., Bode, C., Xiong, J. W. and Patterson, C. (2007). "BMPER is a conserved regulator of hematopoietic and vascular development in zebrafish." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 43(3): 243-253.
- Moya, I. M., Umans, L., Maas, E., Pereira, P. N., Beets, K., Francis, A., Sents, W., Robertson, E. J., Mummery, C. L., Huylebroeck, D. and Zwijsen, A. (2012). "Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades." Developmental Cell 22(3): 501-514.
- Nagase, H., Visse, R. and Murphy, G. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovascular Research 69(3): 562-573.
- Nakaoka, T., Gonda, K., Ogita, T., Otawara-Hamamoto, Y., Okabe, F., Kira, Y., Harii, K., Miyazono, K., Takuwa, Y. and Fujita, T. (1997). "Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2." Journal of Clinical Investigation 100(11): 2824-2832.
- Newman, K. M., Jean-Claude, J., Li, H., Scholes, J. V., Ogata, Y., Nagase, H. and Tilson, M. D. (1994). "Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall." Journal of Vascular Surgery 20(5): 814-820.
- Olsson, C., Thelin, S., Stahle, E., Ekblom, A. and Granath, F. (2006). "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 114(24): 2611-2618.
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifkova, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A. and Whelton, P. K. (2018). "Hypertension." Nat Rev Dis Primers 4: 18014.
- Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H. and Miyazono, K. (2002). "Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells." Journal of Cellular Physiology 193(3): 299-318.
- Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." Physiological Reviews 75(3): 487-517.
- Owens, G. K., Kumar, M. S. and Wamhoff, B. R. (2004). "Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease." Physiological Reviews 84(3): 767-801.
- Park-Windhol, C. and D'Amore, P. A. (2016). "Disorders of Vascular Permeability." Annual Review of Pathology 11: 251-281.
- Pechisker, A. (2004). "Targeting your DNA with the Cre/loxP system." Access: 01.08.2020, from <http://www.scq.ubc.ca/targeting-your-dna-with-the-crelox-system/>.
- Pedroza, A. J., Koyano, T., Trojan, J., Rubin, A., Palmon, I., Jaatinen, K., Burdon, G., Chang, P., Tashima, Y., Cui, J. Z., Berry, G., Iosef, C. and Fischbein, M. P. (2020). "Divergent effects of canonical and non-canonical TGF-beta signalling on mixed contractile-synthetic smooth muscle cell phenotype in human Marfan syndrome aortic root aneurysms." Journal of Cellular and Molecular Medicine 24(3): 2369-2383.

- Petsophonsakul, P., Furmanik, M., Forsythe, R., Dweck, M., Schurink, G. W., Natour, E., Reutelingsperger, C., Jacobs, M., Mees, B. and Schurgers, L. (2019). "Role of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Calcification in Aortic Aneurysm Formation." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 39(7): 1351-1368.
- Pi, X., Lockyer, P., Dyer, L. A., Schisler, J. C., Russell, B., Carey, S., Sweet, D. T., Chen, Z., Tzima, E., Willis, M. S., Homeister, J. W., Moser, M. and Patterson, C. (2012). "Bmp6 inhibits endothelial expression of inflammatory adhesion molecules and protects against atherosclerosis." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 32(9): 2214-2222.
- Pinard, A., Jones, G. T. and Milewicz, D. M. (2019). "Genetics of Thoracic and Abdominal Aortic Diseases." Circulation Research 124(4): 588-606.
- Pisano, C., Balistreri, C. R., Ricasoli, A. and Ruvolo, G. (2017). "Cardiovascular Disease in Ageing: An Overview on Thoracic Aortic Aneurysm as an Emerging Inflammatory Disease." Mediators of Inflammation 2017: 1274034.
- Ploeg, M., Saey, V., de Bruijn, C. M., Grone, A., Chiers, K., van Loon, G., Ducatelle, R., van Weeren, P. R., Back, W. and Delesalle, C. (2013). "Aortic rupture and aorto-pulmonary fistulation in the Friesian horse: characterisation of the clinical and gross post mortem findings in 24 cases." Equine Veterinary Journal 45(1): 101-106.
- Ploeg, M., Saey, V., van Loon, G. and Delesalle, C. (2017). "Thoracic aortic rupture in horses." Equine Veterinary Journal 49(3): 269-274.
- Potter, K. A. and Besser, T. E. (1994). "Cardiovascular lesions in bovine Marfan syndrome." Veterinary Pathology 31(5): 501-509.
- Pröhl, K. (2018). Die Rolle von BMP4 und BMPER im Aortenaneurysma. Dr. med., Monografie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, nicht veröffentlicht. Zugriff 27.01.2021.
- Pyo, R., Lee, J. K., Shipley, J. M., Curci, J. A., Mao, D., Ziporin, S. J., Ennis, T. L., Shapiro, S. D., Senior, R. M. and Thompson, R. W. (2000). "Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms." Journal of Clinical Investigation 105(11): 1641-1649.
- Rahman, M. S., Akhtar, N., Jamil, H. M., Banik, R. S. and Asaduzzaman, S. M. (2015). "TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation." Bone Research 3: 15005.
- Rensen, S. S., Doevendans, P. A. and van Eys, G. J. (2007). "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity." Netherlands Heart Journal 15(3): 100-108.
- Ruddy, J. M., Jones, J. A. and Ikonomidis, J. S. (2013). "Pathophysiology of thoracic aortic aneurysm (TAA): is it not one uniform aorta? Role of embryologic origin." Progress in Cardiovascular Diseases 56(1): 68-73.
- Ruddy, J. M., Jones, J. A., Spinale, F. G. and Ikonomidis, J. S. (2008). "Regional heterogeneity within the aorta: relevance to aneurysm disease." Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 136(5): 1123-1130.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique London, Methuen, ISBN.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-491.
- Salloum, E., Bertrand-Grenier, A., Lerouge, S., Kauffman, C., Heon, H., Therasse, E., Salazkin, I., Roy Cardinal, M. H., Cloutier, G. and Soulez, G. (2016). "Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm: Follow-up with Noninvasive Vascular Elastography in a Canine Model." Radiology 279(2): 410-419.
- Sanchorawala, H. and Keaney, J. F. (1997). Physiology of Vascular Homeostasis. Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis. R. C. Becker. Boston, MA, Springer US: 139-153.
- Sawada, H., Chen, J. Z., Wright, B. C., Sheppard, M. B., Lu, H. S. and Daugherty, A. (2018). "Heterogeneity of Aortic Smooth Muscle Cells: A Determinant for Regional Characteristics of Thoracic Aortic Aneurysms?" Journal of Translational Internal Medicine 6(3): 93-96.
- Schlatmann, T. J. M. and Becker, A. E. (1977). "Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta." The American Journal of Cardiology 39(1): 21-26.
- Schmidt, G. (2004). Checkliste Sonographie: Physikalische und technische Grundlagen, Georg Thieme Verlag, ISBN: 9783131524638.
- Schulte, H. D., Bircks, W., Huberts, U. and Preusse, C. J. (1990). "Long-term results of surgical therapy of thoracic aortic aneurysm (dissection of the ascending aorta)." Langenbecks Archiv für Chirurgie. Supplement II. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie: 491-497.
- Scollan, K. and Sisson, D. (2014). "Multi-detector computed tomography of an aortic dissection in a cat." Journal of Veterinary Cardiology 16(1): 67-72.
- Sedlacek, H.-H. (2014). Immunologie - die Immunabwehr des Menschen: Schutz, Gefahren, Erkrankungen, De Gruyter, ISBN: 978-3110334326.
- Sedlmeier, G. and Sleeman, J. P. (2017). "Extracellular regulation of BMP signaling: welcome to the matrix." Biochemical Society Transactions 45(1): 173-181.
- Serpe, M., Umulis, D., Ralston, A., Chen, J., Olson, D. J., Avanesov, A., Othmer, H., O'Connor, M. B. and Blair, S. S. (2008). "The BMP-binding protein Crossveinless 2 is a short-range, concentration-dependent, biphasic modulator of BMP signaling in Drosophila." Developmental Cell 14(6): 940-953.
- Shen, M., Lee, J., Basu, R., Sakamuri, S. S., Wang, X., Fan, D. and Kassiri, Z. (2015). "Divergent roles of matrix metalloproteinase 2 in pathogenesis of thoracic aortic aneurysm." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 35(4): 888-898.
- Shen, Y. H., LeMaire, S. A., Webb, N. R., Cassis, L. A., Daugherty, A. and Lu, H. S. (2020). "Aortic Aneurysms and Dissections Series." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 40(3): e37-e46.
- Shen, Y. H., LeMaire, S. A., Webb, N. R., Cassis, L. A., Daugherty, A. and Lu, H. S. (2020). "Aortic Aneurysms and Dissections Series: Part II: Dynamic Signaling Responses in Aortic Aneurysms and Dissections." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 40(4): e78-e86.

- Shimizu-Hirota, R., Sasamura, H., Kuroda, M., Kobayashi, E., Hayashi, M. and Saruta, T. (2004). "Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration." Circulation Research 94(8): 1067-1074.
- Shui-Bo Zhu, J. Z., Zi-Zi Zhou, Er-Ping Xi, Rong-Ping Wang, Yu Zhang (2015). "TGF- $\beta$ 1 induces human aortic vascular smooth muscle cell phenotype switch through PI3K\_AKT\_ID2 signaling." American journal of translational research vol. 7(12): 2764-2774.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. and Knaus, P. (2009). "Recent advances in BMP receptor signaling." Cytokine and Growth Factor Reviews 20(5-6): 343-355.
- Snoek-van Beurden, P. A. and Von den Hoff, J. W. (2005). "Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors." Biotechniques 38(1): 73-83.
- Sorescu, G. P., Song, H., Tressel, S. L., Hwang, J., Dikalov, S., Smith, D. A., Boyd, N. L., Platt, M. O., Lassegue, B., Griendling, K. K. and Jo, H. (2004). "Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase." Circulation Research 95(8): 773-779.
- Sorescu, G. P., Sykes, M., Weiss, D., Platt, M. O., Saha, A., Hwang, J., Boyd, N., Boo, Y. C., Vega, J. D., Taylor, W. R. and Jo, H. (2003). "Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response." Journal of Biological Chemistry 278(33): 31128-31135.
- Statistisches Bundesamt. (2020). "Todesursache nach Krankheiten", Access: 26.05.2020, from <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>
- Sun, H. J., Wu, Z. Y., Nie, X. W. and Bian, J. S. (2019). "Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide." Frontiers in Pharmacology 10: 1568.
- Tang, P. C., Coady, M. A., Lovoulos, C., Dardik, A., Aslan, M., Elefteriades, J. A. and Tellides, G. (2005). "Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms." Circulation 112(8): 1098-1105.
- The Jackson Laboratory. (2020). "Life span as a biomarker." Access: 26.05.2020, from <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>.
- ThermoFisher. (2020). "So funktionieren TaqMan Assays." Access: 01.08.2020, from <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>.
- Theruvath, T. P., Jones, J. A. and Ikonomidis, J. S. (2012). "Matrix metalloproteinases and descending aortic aneurysms: parity, disparity, and switch." Journal of Cardiac Surgery 27(1): 81-90.
- Touyz, R. M. (2005). "Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II." Experimental Physiology 90(4): 449-455.

- Tsamis, A., Krawiec, J. T. and Vorp, D. A. (2013). "Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review." Journal of the royal society Interface 10(83): 20121004.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Science 150(3698): 893-899.
- Valdimarsdottir, G., Goumans, M. J., Rosendahl, A., Brugman, M., Itoh, S., Lebrin, F., Sideras, P. and ten Dijke, P. (2002). "Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells." Circulation 106(17): 2263-2270.
- Vinhas, M., Araujo, A. C., Ribeiro, S., Rosario, L. B. and Belo, J. A. (2013). "Transthoracic echocardiography reference values in juvenile and adult 129/Sv mice." Cardiovascular Ultrasound 11: 12.
- Vouyouka, A. G., Pfeiffer, B. J., Liem, T. K., Taylor, T. A., Mudaliar, J. and Phillips, C. L. (2001). "The role of type I collagen in aortic wall strength with a homotrimeric." Journal of Vascular Surgery 33(6): 1263-1270.
- Wagenseil, J. E. and Mecham, R. P. (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics." Physiological Reviews 89(3): 957-989.
- Waldrop, J. E., Stoneham, A. E., Tidwell, A. S., Jakowski, R. M., Rozanski, E. A. and Rush, J. E. (2003). "Aortic Dissection Associated with Aortic Aneurysms and Posterior Paresis in a Dog." Journal of Veterinary Internal Medicine 17(2): 223-229.
- Wall, S. J., Sampson, M. J., Levell, N. and Murphy, G. (2003). "Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts." British Journal of Dermatology 149(1): 13-16.
- Waller, B. F., Clary, J. D. and Rohr, T. (1997). "Nonneoplastic diseases of aorta and pulmonary trunk--Part IV." Clinical Cardiology 20(11): 964-966.
- Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., Idowu, O., Li, M., Shen, C., Hu, A., Haydon, R. C., Kang, R., Mok, J., Lee, M. J., Luu, H. L. and Shi, L. L. (2014). "Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases." Genes & Diseases 1(1): 87-105.
- Wang, X. and Khalil, R. A. (2018). "Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease." Advances in Pharmacology 81: 241-330.
- Wang, X., LeMaire, S. A., Chen, L., Shen, Y. H., Gan, Y., Bartsch, H., Carter, S. A., Utama, B., Ou, H., Coselli, J. S. and Wang, X. L. (2006). "Increased collagen deposition and elevated expression of connective tissue growth factor in human thoracic aortic dissection." Circulation 114(1 Suppl): I200-205.
- Wey, A. C. and Atkins, C. E. (2000). "Aortic Dissection and Congestive Heart Failure Associated with Systemic Hypertension in a Cat." Journal of Veterinary Internal Medicine 14(2): 208-213.
- Whittle, M. A., Hasleton, P. S., Anderson, J. C. and Gibbs, A. C. (1990). "Collagen in dissecting aneurysms of the human thoracic aorta. Increased collagen content and decreased collagen concentration may be predisposing factors in dissecting aneurysms." American Journal of Cardiovascular Pathology 3(4): 311-319.

- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. and Hogan, B. L. (1995). "Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse." Genes and Development 9(17): 2105-2116.
- Wong, G. A., Tang, V., El-Sabeawy, F. and Weiss, R. H. (2003). "BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1." American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism 284(5): E972-979.
- Xiong, W., Knispel, R., Mactaggart, J. and Baxter, B. T. (2006). "Effects of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 deficiency on aneurysm formation." Journal of Vascular Surgery 44(5): 1061-1066.
- Yang, P., Schmit, B. M., Fu, C., DeSart, K., Oh, S. P., Berceli, S. A. and Jiang, Z. (2016). "Smooth muscle cell-specific Tgfbr1 deficiency promotes aortic aneurysm formation by stimulating multiple signaling events." Scientific Reports 6: 35444.
- Yao, Y., Jumabay, M., Ly, A., Radparvar, M., Wang, A. H., Abdmaulen, R. and Bostrom, K. I. (2012). "Crossveinless 2 regulates bone morphogenetic protein 9 in human and mouse vascular endothelium." Blood 119(21): 5037-5047.
- Yuan, S.-M. and Jing, H. (2011). "Cystic medial necrosis: pathological findings and clinical implications." Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery 26: 107-115.
- Zakin, L., Metzinger, C. A., Chang, E. Y., Coffinier, C. and De Robertis, E. M. (2008). "Development of the vertebral morphogenetic field in the mouse: Interactions between Crossveinless-2 and Twisted Gastrulation." Developmental Biology 323(1): 6-18.
- Zhang L., Ye, Y., Long, X., Xiao, P., Ren, X. and Yu, J. (2016). "BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination." Oncotarget 7(47): 78206-78218.
- Zhang M. J., Zhou, Y., Chen, L., Wang, Y. Q., Wang, X., Pi, Y., Gao, C. Y., Li, J. C. and Zhang, L. L. (2016). "An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation." Histochemistry and Cell Biology 145(2): 119-130.
- Zhang, X., Shen, Y. H. and LeMaire, S. A. (2009). "Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved?" Vascular 17(3): 147-157.
- Zhou, Q., Heinke, J., Vargas, A., Winnik, S., Krauss, T., Bode, C., Patterson, C. and Moser, M. (2007). "ERK signaling is a central regulator for BMP-4 dependent capillary sprouting." Cardiovascular Research 76(3): 390-399.
- Zinski, J., Tajer, B. and Mullins, M. C. (2018). "TGF-beta Family Signaling in Early Vertebrate Development." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 10(6).

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klopffleisch für sein Interesse an meinem Thema und für die Übernahme der Arbeit an der veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Plendl für Ihre Unterstützung bei der Einreichung meiner Arbeit bedanken.

Meiner Betreuerin PD. Dr. Jennifer Eßer und Herrn Prof. Dr. Martin Moser danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Vergabe des Promotionsthema. Besonderen Dank gilt Frau Eßer für die fachliche Expertise und ihre Geduld, auch während ihrer Elternzeit, stets für die auftretenden Schwierigkeiten und Fragen meinerseits ein offenes Ohr zu haben. Ihre Betreuung und Unterstützung bei der Durchsicht meiner Dissertation haben einen wesentlichen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Achim Lothar, der mir bei den ersten Echokardiographien mit seiner Expertise zur Seite stand und mich bei der Auswertung der generierten Daten unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt zudem allen Mitarbeitern und Doktoranden meiner Arbeitsgruppe. Frau Bianca Engert danke ich nicht nur für die hervorragende Einarbeitung in die unterschiedlichen Methoden und die unermüdliche Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche, sondern auch für den humorvollen Austausch in manch langer Wartezeit. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle auch an Viktor Schmitz, der bereits die Hälfte des Studiums, aber auch die Laborzeit mit seiner lustigen und aufmunternden Art begleitet hat und den ich hoffentlich noch lange für einen privaten und fachlichen Austausch zu meinem Freundeskreis zählen darf.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch das „Fill in the gap-Stipendium“ bedanken.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die stets an mich geglaubt haben und mir mein Studium und die Dissertation erst ermöglicht haben. Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen meinen Freunden. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Partner bedanken, der mir jeden Tag zur Seite steht und mir Rückhalt gibt, wann immer ich ihn brauche.

## **12. Finanzierungsquellen/Interessenskonflikte**

In den ersten sechs Monaten wurden die Arbeiten durch eine 65 %-Anstellung in der Abteilung finanziell unterstützt, weitere vier Monate durch das fill-in-the-gap Stipendium der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

## **13. Eidesstattliche Erklärung**

### **Erklärung über Beteiligung Dritter**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Neu-Isenburg, den 15.04.2021

Lena Meier