

AUS DER KLINIK FÜR ALLGEMEIN-, VISZERAL-, GEFÄß- UND

TRANSPLANTATIONSSCHIRURGIE

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. J. WERNER

Die Progression des abdominellen Aortenaneurysmas

MOLEKULARE PROZESSE DER GEFÄßWAND IM RAHMEN DER

ANEURYSMAPROGRESSION UND IDENTIFIKATION NEUER

DIAGNOSTISCHER UND THERAPEUTISCHER ZIELE

HABILITATIONSSCHRIFT

FÜR DAS FACH CHIRURGIE

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

VORGELEGT VON DR. MED. GABOR GÄBEL

2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 3

2. Teilprojekte und Bedeutung der Arbeiten für das Fachgebiet 5

2.1 Identifizierung von Unterschieden zwischen atherosklerotischen Läsionen der Aorta und
abdominellen Aortenaneurysma..... 5

 2.1.1 *Histologische Unterschiede* 5

 2.1.2 *Unterschiede in der Genexpression von atherosklerotischen und aneurysmatischen
Läsionen der infrarenalen Aorta* 6

 2.1.3 *Bedeutung der identifizierten Unterschiede* 8

2.2 Identifizierung von Unterschieden zwischen Aneurysmahals und gesunder Aortenwand..... 10

 2.2.1 *Histologische Unterschiede* 10

 2.2.2 *Unterschiede auf Ebene der Genexpression von Aneurysmahals des infrarenalen
Aortaaneurysmas und gesunder Aortenwand* 11

 2.2.3 *Bedeutung der identifizierten Unterschiede* 12

2.3 Identifizierung von Unterschieden zwischen stabilem und rupturiertem abdominellen
Aortenaneurysma 14

 2.3.1 *Histologische Unterschiede* 15

 2.3.2 *Unterschiede auf Ebene der Genexpression von stabilen und rupturierten infrarenalen
Aortaaneurysmen* 17

 2.3.3 *Bedeutung der identifizierten Unterschiede* 19

2.4 Identifizierung von Unterschieden zwischen Tiermodellen und humanen Veränderungen beim
abdominellen Aortenaneurysma..... 23

 2.4.1 *Histologischer Vergleich der Mausmodelle mit humanen AAA* 23

 2.4.2 *Vergleich der Genexpression der Mausmodelle mit humanem infrarenalem
Aortaaneurysma* 25

 2.4.3 *Bedeutung der identifizierten Unterschiede* 28

3. Zusammenfassung 29

4. Literatur 31

5. Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsleistung..... 36

1. Einleitung

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems waren im Jahr 2015 nach Angaben des Statistischen Bundesamtes mit 38,5% aller Todesfälle die führende Todesursache in Deutschland. Dabei waren ca. 60 % der Todesfälle auf kardiale Ereignisse zurückzuführen, während die restlichen 40 % durch degenerativen Veränderungen des peripheren Gefäßsystems, v.a. der supraaortalen hirnversorgenden Gefäße (A. carotis) und der Bauch-Becken-Beinarterien, bedingt waren (Statistisches Bundesamt, Fachserie 12, Reihe 4, 2015).

Neben den atherosklerotischen Gefäßerkrankungen des peripheren Gefäßsystems stellt die Ruptur eines abdominellen Aortenaneurysmen (AAA) in den Industrienationen ebenfalls eine der führenden Todesursachen bei Männern dar. Laut Statistischem Bundesamt starben in Deutschland im Jahr 2015 3725 Menschen an den Folgen dilatativer Veränderungen der Hauptschlagader. Dies liegt vor allem daran, dass die Erkrankung des AAA in den meisten Fällen asymptomatisch verläuft und in Deutschland derzeit per Zufall festgestellt wird. Im Falle einer Ruptur des AAA ist eine Notfallversorgung nur in weniger als der Hälfte der Fälle noch möglich. Die Sterberate bei Ruptur liegt aber auch trotz Versorgung hoch¹. Das Rupturrisiko für kleine AAA (<50 mm) ist gering und liegt bei <1%/Jahr. Es steigt aber rasch an mit Werten von über 30-50%/Jahr, wenn der Aneurysmadurchmesser 80 mm übersteigt². Die Behandlung von AAAs besteht aus einer chirurgischen Exklusion des erweiterten Aortensegmentes. Heutzutage stehen uns 2 chirurgische Behandlungsverfahren zur Verfügung: Die offene Resektion des Aneurysmas und Ersatz durch Anlage eines Kunststoffinterponates sowie die endovaskuläre Therapie durch transfemorale Implantation eines Stentssystems (EVAR = endovascular aneurysm repair). Die Wahl des Verfahrens ist abhängig von AAA-spezifischen Charakteristiken (z.B. Halslänge, Zugangsgefäße, Tortosität) als auch Patienteneigenschaften (Alter, Gebrechlichkeit)³. Die Mehrzahl der Patienten wird aktuell endovaskulär behandelt, da die offene Therapie mit einer signifikant erhöhten perioperativen Mortalität von 4-5% für Männer und 6-8% für Frauen assoziiert ist⁴. Dadurch, dass die schonendere endovaskuläre Therapie mit hohen Reinterventionsraten und einem Restrisiko für Rupturen assoziiert ist, wird die bevorzugte Anwendung dieses Therapieverfahrens zunehmend kritisch diskutiert (<https://www.nice.org.uk/guidance/gid-cgwave0769/documents/short-version-of-draft-guideline>).

In Anbetracht dieser Tatsache und, dass ein hohes perioperatives Risiko bei der offenen präventiven Ausschaltung eingegangen wird, bekommt eine mögliche medikamentöse Stabilisierung von kleinen Aneurysmen („keep small aneurysms small“), als auch von bereits endovaskulär versorgten AAAs, sowohl von Patientenseite als auch von einem sozioökonomischen Standpunkt aus einen hohen Stellenwert. Zur Entwicklung solcher medikamentösen Therapieansätze ist es notwendig die pathophysiologischen Prozesse, die das Aneurysmawachstum und die Destabilisierung der Aortenwand steuern, genauer zu untersuchen und zu verstehen. Insbesondere da aktuell die Prozesse der Aneurysmainduktion beim Menschen weitestgehend unklar sind und hier nur wenige mögliche Faktoren wie stattgehabte entzündliche Prozesse bzw. Expositionen diskutiert werden⁵.

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die molekularbiologischen Prozesse der Aneurysmaprogression genauer zu untersuchen und Unterschiede in den verschiedenen Krankheitsstadien als auch zu anderen vaskulären Pathologien herauszuarbeiten, um Angriffsziele für neue therapeutische und diagnostische Strategien zu identifizieren.

2. Teilprojekte und Bedeutung der Arbeiten für das Fachgebiet

2.1 Identifizierung von Unterschieden zwischen atherosklerotischen Läsionen der Aorta und abdominellem Aortenaneurysma

AAAs werden oft dem atherosklerotischen Krankheitspektrum zugeordnet. Tatsächlich werden sie häufig als ‚atherosklerotische‘ Aneurysmen bezeichnet⁶. Zwar teilen die atherosklerotischen Gefäßpathologien und das AAA eine ganze Reihe von Risikofaktoren (Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen) und häufig liegen beide Veränderungen bei einigen Patienten gleichzeitig vor⁷. Jedoch wurde gezeigt, dass die kardiovaskulären Risikofaktoren nur schwach assoziiert sind mit dem Auftreten einer AAA Ruptur⁸. Weiterhin sind Aneurysmata selten an Gefäßabschnitten zu finden, die prädisponiert sind für atherosklerotische Ablagerungen (z.B. Femoralisarterie, Koronararterien oder Aortenbogen). Epidemiologisch gibt es somit zwar einige Übereinstimmungen, dennoch ist unklar ob die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Veränderungen, die zur Progression der Erkrankungen führen sich ähneln bzw. gleichen.

2.1.1 Histologische Unterschiede

Histologisch nachgewiesen ist, dass im Vergleich zur gesunden Aorta (Abbildung 1A) beide Pathologien starke chronisch entzündliche Veränderungen aufweisen (Abbildung 1B und 1C). Jedoch zeigen sich Unterschiede bezüglich der nachgewiesenen Zellpopulationen und der Lokalisation der entzündlichen Infiltrate. Bei atherosklerotischen Läsionen sind die entzündlichen Infiltrate vor allem in der Intima und Adventitia lokalisiert, während beim AAA die entzündlichen Zellverbände in der Media und Adventitia akkumulieren. Hinsichtlich der Zellpopulationen finden sich in der atherosklerotisch-veränderten Aortenwand vor allem Monozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen und Schaumzellen. In der aneurysmatischen Aortenwand sind es vor allem Natural-Killer-Zellen, Neutrophile, Plasmazellen und T- und B-Lymphozyten, die sich in tertiären Follikeln organisieren⁹.

Die glatten Muskelzellen der Media proliferieren bei atherosklerotischen Läsionen. Beim AAA zeigt sich eine Ausdünnung durch vermehrte Apoptose neben einer progressiven Destruktion der Elastasefasern. Cholesterin-Ablagerungen finden sich beim Aortenaneurysma im adhärennten Thrombus während sie bei atherosklerotischen Wandveränderungen im Intima-Media-Grenzbereich anzutreffen sind.

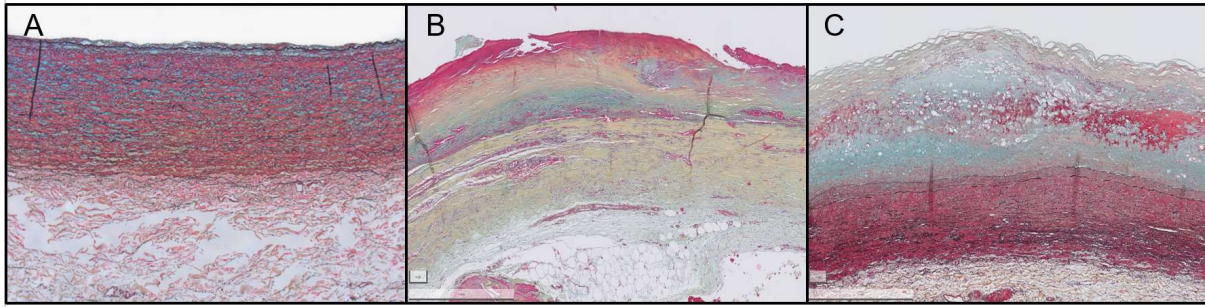


Abbildung 1. Histologische Unterschiede anhand einer Movat-Färbung von (A) gesunder gegenüber (B) aneurysmatischer und (C) atherosklerotischer Aortenwand (Movat-Färbung; 5-fache Vergrößerung). Im Vergleich zur normalen infrarenalen Aorta (A) ist das AAA (B) charakterisiert durch den adhärenenten Thrombus mit Cholesterol-Einschlüssen (rot) über einer Kollagen-reichen (gelb), Elastin- (schwarz), Proteoglykan- (blau) und glatten Muskelzell- (rot) armen Media sowie fettig degenerierten Adventia. Beachtenswert sind die extensive Neovaskularisation sowie die großen lymphatischen Infiltrate (lilla Zellen) im Media-Adventia-Übergangsbereich. Bei atherosklerotisch-veränderter abdominaler Aortenwand (C) sind die Cholesteroleinschlüsse im Intima-Media-Übergangsbereich, ebenso die entzündlichen Infiltrate. Die Media und Adventitia darunter sind weitestgehend intakt. Es zeigt sich lediglich eine Proliferation der glatten Muskelzellen (rot). Eine vermehrte Neovaskularisation oder fettige Degeneration im Media-Adventia-Übergangsbereich lässt sich in der atherosklerotisch veränderten Aortenwand nicht nachweisen.

2.1.2 Unterschiede in der Genexpression von atherosklerotischen und aneurysmatischen Läsionen der infrarenalen Aorta

Im Rahmen einer internationalen Kooperation wurden Genexpressionsuntersuchungen (Microarray) durchgeführt, um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in der Transkription von Aortenwandgewebe dieser beiden Pathologien zu identifizieren¹⁰. Aneurysmagewebe von 20 Patienten mit intermediär-großen AAA (≤ 55 mm) und 29 Patienten mit großen AAA (> 55 mm) sowie atherosklerotische Aortenwandproben (9 Patienten) wurde mit gesunder Aortenwand von Organspendern (10 Patienten) verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede und keine Gemeinsamkeiten bezüglich der differentiell exprimierten Gene. Auch bei der Untersuchung der aktivierten und deaktivierten Signalwege zeigten sich komplett gegensätzliche Ergebnisse (Tabelle 1).

Während bei den aneurysmatischen Gewebeproben vor allem inflammatorische Signalwege aktiviert und metabolische Signalwege sowie oxidative Phosphorylation deaktiviert waren, zeigte sich bei den atherosklerotischen Aortenwandproben eine Aktivierung der metabolischen Signalwege und der oxidativen Phosphorylation sowie eine Deaktivierung der inflammatorischen Antwort.

Dadurch, dass kleine und große AAAs isoliert analysiert wurden, konnten wir trotz der großen Übereinstimmung der Transkriptome auch vereinzelte Unterschiede finden. Das bemerkenswerteste

Kategorie	KEGG Signalweg	N	n	P Wert
AAA (> 55 mm) Hochregulierte Gene	Cytokine-cytokine receptor interaction	267	20	2.52*10 ⁻¹⁷
	Chemokine signaling pathway	190	14	3.53*10 ⁻¹²
	Hematopoietic cell lineage	88	10	9.95*10 ⁻¹¹
	Primary immunodeficiency	35	7	1.89*10 ⁻⁰⁹
	Cell adhesion molecules (CAMs)	134	9	7.87*10 ⁻⁰⁸
	Intestinal immune network for IgA production	50	6	6.70*10 ⁻⁰⁷
	Cytosolic DNA-sensing pathway	56	6	1.15*10 ⁻⁰⁶
	NOD-like receptor signaling pathway	62	6	1.86*10 ⁻⁰⁶
	Jak-STAT signaling pathway	155	8	2.30*10 ⁻⁰⁶
	T cell receptor signaling pathway	108	7	2.40*10 ⁻⁰⁶
AAA (> 55 mm) Herunterregulierte Gene	Metabolic pathways	1104	78	1.05*10 ⁻²⁴
	Huntington's disease	185	31	3.64*10 ⁻²⁰
	Oxidative phosphorylation	135	27	8.60*10 ⁻²⁰
	Alzheimer's disease	169	28	2.45*10 ⁻¹⁸
	Parkinson's disease	133	25	7.70*10 ⁻¹⁸
	Ribosome	88	18	1.32*10 ⁻¹³
	Cardiac muscle contraction	79	16	4.25*10 ⁻¹²
	Focal adhesion	201	23	8.41*10 ⁻¹²
	Vascular smooth muscle contraction	115	17	1.27*10 ⁻¹⁰
	Fatty acid metabolism	42	10	1.70*10 ⁻⁰⁸
AVK Hochregulierte Gene	Metabolic pathways	1104	147	1.49*10 ⁻⁴³
	Oxidative phosphorylation	135	49	5.68*10 ⁻³⁵
	Parkinson's disease	133	46	7.03*10 ⁻³²
	Huntington's disease	185	52	4.11*10 ⁻³¹
	Alzheimer's disease	169	48	5.02*10 ⁻²⁹
	Ribosome	88	35	6.28*10 ⁻²⁷
	Focal adhesion	201	38	1.90*10 ⁻¹⁶
	Spliceosome	128	29	8.16*10 ⁻¹⁵
	Cardiac muscle contraction	79	21	2.63*10 ⁻¹²
	Proteasome	48	17	2.63*10 ⁻¹²
AVK Herunterregulierte Gene	Cytokine-cytokine receptor interaction	267	8	5.69*10 ⁻⁰⁷
	Hematopoietic cell lineage	88	5	5.93*10 ⁻⁰⁶
	Chemokine signaling pathway	190	6	8.64*10 ⁻⁰⁶
	Regulation of actin cytoskeleton	216	5	2.00*10 ⁻⁰⁴
	Graft-versus-host disease	42	3	3.00*10 ⁻⁰⁴
	Jak-STAT signaling pathway	155	4	6.00*10 ⁻⁰⁴
	Pathogenic Escherichia coli infection	59	3	6.00*10 ⁻⁰⁴
	NOD-like receptor signaling pathway	62	3	6.00*10 ⁻⁰⁴
	Toll-like receptor signaling pathway	101	3	2.10*10 ⁻⁰³
	Prion diseases	35	2	3.70*10 ⁻⁰³

Tabelle 1. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Signalwege AAA vs AVK (N, Gesamtzahl der Gene assoziiert mit dem Signalweg; n, Anzahl differenziell exprimierter Gene aus dem Signalweg; aus Gäbel & Biros et al. Oncotarget 2015)

Ergebnis bezüglich Immunität war, dass eines der wichtigsten T-Zell-regulierenden Gene *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein* (CTLA4 oder CD152) ausschließlich in kleinen AAA vermehrt exprimiert wurde. Außerdem konnten wir zeigen, dass nur in großen AAA eine exzessive Infiltration von CD8⁺ T-Zellen bei gleichzeitig aktivierter Genexpression für das CD8A Molekül vorhanden ist.

Die Hochregulation der Expression für das *CTLA4* und *CD8A* Gen in kleinen bzw. großen AAA führte zu der Hypothese, dass die Verminderung der Genexpression von CTLA4 ein Schlüsselereignis bei der Progression von AAA darstellt, welcher die exzessive T-Zell-gesteuerte Immunantwort in der aneurysmatischen Gefäßwand vorantreibt.

CTLA4 ist ein Oberflächenmolekül der Zellwand, welches die adaptive Immunität von T-Zellen negativ beeinflussen kann und somit als „Ausschalter“ für die Immunantwort agiert¹¹. Das CD8A Molekül ist Bestandteil des CD8 Antigens, welches sich auf den meisten zytotoxischen T-Lymphozyten nachweisen lässt und als Co-Rezeptor mit dem T-Zell-Rezeptor agiert. Vorangegangene immunhistochemische Untersuchungen an humanen AAA Gewebe haben gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen die Aortenwand infiltrieren und zytotoxische Mediatoren – wie Perforine – freisetzen¹².

2.1.3 Bedeutung der identifizierten Unterschiede

Nicht nur histologisch, sondern auch von ihren Genexpressionsprofilen unterscheiden sich die Erkrankungen wesentlich, so dass sich schlussfolgern lässt, dass unterschiedliche Pathomechanismen vorliegen. Aufgrund dessen lassen sich wirksame Therapien zur Behandlung der Atherosklerose nicht ohne weiteres auf die Behandlung des AAA übertragen.

Die Manipulation von CTLA4 Spiegeln könnte eine therapeutische Option darstellen, um die Progression von AAA zu verzögern oder zu verhindern. Aktuell ist das CTLA4-basierende Biologika Abatacept (Orencia), ein rekombinantes Fusionsprotein aus der Fc Region des Immunglobulins G1 (IgG1) und der extrazellulären Domäne von CTLA4, für die Behandlung anderer Immunpathologien wie z.B. der rheumatoiden Arthritis zugelassen. Die Effekte beruhen auf der spezifischen Bindung an CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen. Dadurch wird die Bindung an den CD28-Rezeptor auf den T-Lymphozyten verhindert. Die Interaktion von CD28 und CD80/CD86 ist eine Bedingung für die T-Zell-Aktivierung (sogenannte Kostimulation). Die Hemmung der Kostimulation führt zu einer reduzierten T-Zell-Aktivierung, T-Zell-Proliferation und Antikörperbildung. Des Weiteren nimmt die Zytokinproduktion ab¹³.

Eine klinische Studie zur Behandlung von AAA mit CTLA4-basierenden Biologika ist bisher nicht geplant. Lediglich eine Studie (NCT03192969) zur Behandlung der Riesenzellararteritis war in Planung, wurde jedoch wieder zurückgezogen.

2.2 Identifizierung von Unterschieden zwischen Aneurysmahals und gesunder Aortenwand

In einem 2. Schritt wurde die Genexpression von vermeintlich gesundem Aortenwandgewebe aus dem proximalen Hals aneurysmatischer Aorten (n = 14) – üblicherweise die Verankerungszone für Aortenstentsysteme – mit der Genexpression gesunder Aortenwand von Organ Spendern (n = 8) verglichen¹⁴. Zusätzlich erfolgten histologische Untersuchungen.

2.2.1 Histologische Unterschiede

In Biopsien der Aortenwand aus dem Halsbereich lassen sich histologisch weitestgehend noch erhaltene Strukturen der Gefäßwand nachweisen mit geringeren Schädigungen der elastischen Fasern in der Media und weniger entzündlichen Infiltraten in der Adventitia. Bei der genaueren histologischen Untersuchung der Aneurysmahäse imponierten jedoch bereits die für Aneurysmen

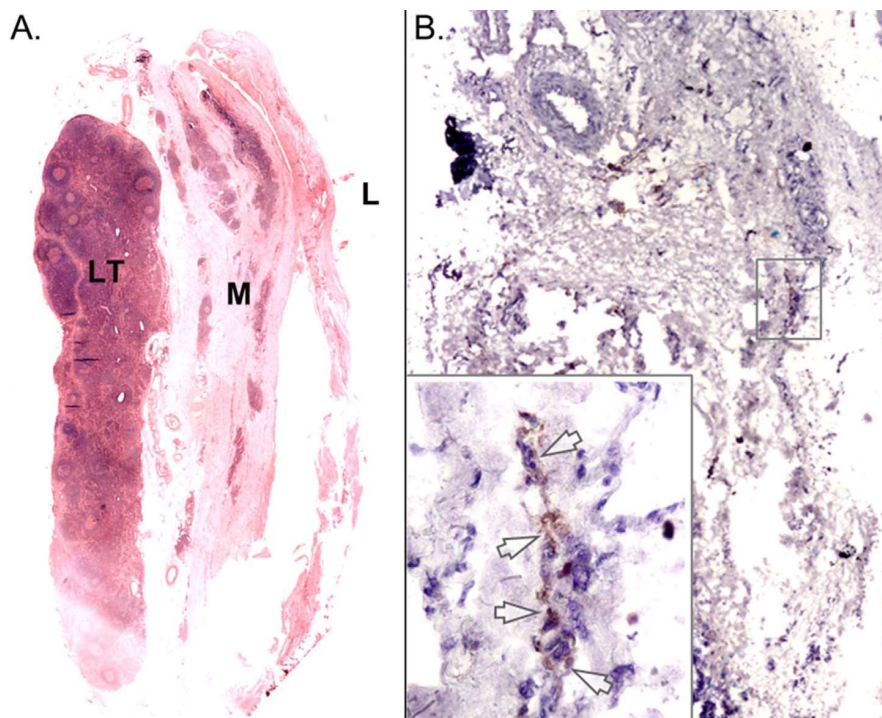


Abbildung 2. A) Hämatoxylin-Eosin Färbung einer Aortenwandgewebeprobe aus dem Hals eines humanen Aortenaneurysmas, wo sich tertiäre lymphatische Foklikel (LT = lymphoid tissue) in der Adventia nachweisen lassen. M, Media; L, Lumen des Gefäßes. B) Repräsentativer Ausschnitt einer immunohistochemischen Färbung für CD19 (braun, Pfeile) ebenfalls aus Aortenwandgewebeprobe vom Aneurysmahals. (aus: Biroš et al. *Atherosclerosis* 2014)

typischen tertiären lymphatischen Follikel im Adventitia-Media-Übergang. Es zeigten sich bei der immunhistochemischen Färbung vermehrt CD19 positive B-Lymphozyten in den Aneurysmahalsbiopsien, so dass hier bereits von einem frühen Erkrankungsstadium ausgegangen werden kann (Abbildung 2).

2.2.2 Unterschiede auf Ebene der Genexpression von Aneurysmahals des infrarenalen Aortaaneurysmas und gesunder Aortenwand

Insgesamt wurden 1047 differentiell exprimierte Transkripte (≥ 2 -fach; adjusted $p < 0,05$) zwischen AAA Hälsen und Kontrollbiopsien von Organspendern identifiziert (221 hoch- und 826 herunterreguliert). Wir führten eine Analyse der assoziierten Signalwege durch, um den biologischen Kontext der differentiell exprimierten Gene nachvollziehen zu können. Interessanterweise, konnte hier eine große Übereinstimmung zu den vorangegangenen Ergebnissen für Aortenaneurysmen nachgewiesen werden. Wir konnten auch hier für die hochregulierten Gene einen direkten Bezug zu Signalwegen der Immunantwort nachweisen. Die am signifikantesten aktivierten Signalwege waren *cytokine-cytokine receptor interaction* gefolgt vom *chemokine signaling pathway* und dem *antigen processing and presentation* KEGG Kategorien (Tabelle 2). Hochregulierte Gene in den Aneurysmahälsen mit Bezug zu den Signalwegen der Immunantwort waren folgende Zytokine: *IL1B* (4,01-fach, $p = 1,05 \cdot 10^{-2}$), *IL33* (3,06-fach, $p = 1,59 \cdot 10^{-2}$) und *interferon alpha 8* (4,25-fach, $p = 8,01 \cdot 10^{-3}$); Chemokine: *CCL3* (3,54-fach, $p = 2,43 \cdot 10^{-2}$), *CXCL12* (2,69-fach, $p = 2,85 \cdot 10^{-2}$), und *CXCL13* (2,87-fach, $p = 1,59 \cdot 10^{-2}$); Chemokine Rezeptoren: *CCR7* (2,64-fach, $p = 3,08 \cdot 10^{-2}$) und *CXCR4* (4,27-fach, $p = 3,35 \cdot 10^{-2}$); der B-Zell Maturationsmarker: *CD19* (3,14-fach, $p = 2,85 \cdot 10^{-2}$); das Macrophagen-Antigen: *CD44* (2,16-fach, $p = 8,01 \cdot 10^{-3}$); das natural killer cell associated protein: *NKTR* (2,64-fach, $p = 8,01 \cdot 10^{-2}$); und die MHC class II Moleküle: *HLA-DOA* (2,13-fach, $p = 2,11 \cdot 10^{-2}$) und *HLA-DOB* (2,53-fach, $p = 3,90 \cdot 10^{-2}$).

Vergleichbar zu der vorangegangenen Studie an Aneurysmasäcken gehörten die *metabolic pathways* und *oxidative phosphorylation* zu den am signifikantesten deaktivierten Signalwegen.

Kategorie	KEGG Signalweg	N	n	P Wert
Aneurysmahals Hochregulierte Gene	Cytokine-cytokine receptor interaction	267	16	$8.67 \cdot 10^{-12}$
	Chemokine signaling pathway	190	10	$5.76 \cdot 10^{-07}$
	Cytosolic DNA-sensing pathway	56	6	$4.06 \cdot 10^{-06}$
	Leukocyte transendothelial migration	118	7	$1.75 \cdot 10^{-05}$
	Intestinal immune network for IgA production	50	5	$3.02 \cdot 10^{-05}$
	Cell adhesion molecules (CAMs)	134	7	$3.02 \cdot 10^{-05}$
	Hematopoietic cell lineage	88	5	$4.00 \cdot 10^{-04}$
	Antigen processing and presentation	89	5	$4.00 \cdot 10^{-04}$
	Jak-STAT signaling pathway	155	6	$5.00 \cdot 10^{-04}$
	Pathways in cancer	330	8	$1.00 \cdot 10^{-03}$
Aneurysmahals Herunterregulierte Gene	Metabolic pathways	1104	73	$9.17 \cdot 10^{-21}$
	Ribosome	88	20	$2.05 \cdot 10^{-15}$
	Huntington's disease	185	25	$7.18 \cdot 10^{-14}$
	Focal adhesion	201	23	$2.58 \cdot 10^{-11}$
	Parkinson's disease	133	19	$3.72 \cdot 10^{-11}$
	Proteasome	48	11	$8.19 \cdot 10^{-09}$
	Alzheimer's disease	169	18	$1.43 \cdot 10^{-08}$
	Oxidative phosphorylation	135	15	$1.77 \cdot 10^{-07}$
	ECM-receptor interaction	84	11	$2.57 \cdot 10^{-06}$
	Vascular smooth muscle contraction	115	12	$8.06 \cdot 10^{-06}$

Tabelle 2. Aktivierte und deaktiverte Signalwege anhand der KEGG Analyse im Gewebe aus dem Aneurysmahals (N, Gesamtzahl der Gene assoziiert mit dem Signalweg; n, Anzahl differenziell exprimierter Gene aus dem Signalweg; aus: *Biros et al. Atherosclerosis 2014*)

2.2.3 Bedeutung der identifizierten Unterschiede

Die mithilfe von Microarrays bestimmten globalen Genexpressionsprofile aus den nicht-dilatierten Hälsen von aneurysmatischen Aorten zeigen, dass die meisten hochregulierten Gene in diesem Bereich – vergleichbar den Genexpressionsprofilen aus Aneurysmasackgewebe - eine Assoziation zur Immunantwort haben und die herunterregulierten Gene zu metabolischen Signalwegen und oxidativer Phosphorylierung. Während die Hälse zwar makroskopisch nicht dilatiert sind und vermeintlich gesund aussehen, so zeigen sie doch histologisch bereits typische inflammatorische Veränderungen von aneurysmatischen Aortensegmenten in der Media-Adventia und zusätzlich auch bereits Bruchstellen der elastischen Fasern in der Media.

Die Inaktivierung der metabolischen Signalwege (*metabolic, ribosome, proteasome und oxidative phosphorylation*) wird zum einen dadurch erklärt, dass einige der herunterregulierten Gene mit allen diesen Signalwegen assoziiert sind. Zum anderen aber, kann dieses Ergebnis auch damit

zusammenhängen, dass metabolische Veränderungen auch bei der Polarisierung von Immunzellen eine Rolle spielen. Diese These wird unterstützt durch Daten die zeigen, dass die Progression von akuten zu chronisch entzündlichen Veränderungen durch eine inverse Beziehung zwischen inflammatorischer Antwort und metabolischen Signalwegen charakterisiert ist¹⁵. Es könnte aber auch durchaus sein, dass unser identifiziertes Genexpressionsprofil lediglich die unterschiedliche Zellzusammensetzung der Aortenwand zwischen Aneurysmahals und gesunder Kontrollaorta widerspiegelt, wie z.B. gekennzeichnet durch den Verlust von glatten Muskelzellen und einer Zunahme von Lymphozyten.

Eines der wesentlichen Resultate dieser Arbeit, ist das parallel zu den histologischen Veränderungen auch auf Transkriptionsebene bereits eine Aneurysma-typische Aktivierung von proinflammatorischen Genen, wie z.B. Lymphotoxin B, und einer Reihe von B-Zell-spezifischen Markern (u.a. CD19) sowie Chemokinen (z.B. CXCL13) stattfindet. Gerade CXCL13 ist ein Chemokin, welches die B-Zellen-gesteuerte Formation von tertiären lymphatischen Follikeln/Organen in entzündeten Geweben unterstützt¹⁶. Es ist bekannt, dass solche tertiären lymphatischen Strukturen insbesondere eine Selektion von autoreaktiven B-Lymphozyten fördert¹⁷. Einige Merkmale von Autoimmunerkrankungen, wie das Vorhandensein autoreaktiver Immunglobulinen an Matrixfasern der Adventitia, wurden bereits vor langer Zeit in humanen Aortenaneurysmagewebe nachgewiesen¹⁸.

Die von uns nachgewiesene Aktivierung dieser Mediatoren auf Genexpressionsebene in den Aneurysmahälsen, lässt darauf schließen, dass die Formation von ektopten, lymphatischen Follikeln ein bedeutender früher Mechanismus der Immunantwort in den makroskopisch noch normalen Aortensegmenten darstellt. Dies lässt auch vermuten, dass sich die immunologischen Mechanismen die in die Initiierung, Progression und Ruptur von AAA involviert sind unterscheiden. Unsere Ergebnisse unterstützen die These, dass gerade die B-Zell-gesteuerte, adaptive Immunantwort eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Aneurysma-Pathogenese spielt¹⁹. Die Dilatation folgt den inflammatorischen Veränderungen und die Signalwege, welche die Dilatation steuern, sind möglicherweise nicht zwingend mit Immun- bzw. Inflammationssignalwegen assoziiert.

Unsere Ergebnisse geben auch einen Anhalt dafür, warum trotz initial guter endovaskulärer Ausschaltung von AAA, es zum Auftreten von Typ Ia Endoleaks kommt. Perspektivisch könnten hier durch weiterentwickelte Stentsysteme mit einer medikamentösen Beschichtung, die mit den zugrundeliegenden Pathomechanismen interferieren, eine Verbesserung der Langzeitergebnisse für die endovaskuläre Therapie erzielt werden. Hierzu sind jedoch weitere Studien erforderlich.

2.3 Identifizierung von Unterschieden zwischen stabilem und rupturiertem abdominellen Aortenaneurysma

Kleine Aneurysmen sind klinisch meist asymptomatisch und ungefährlich. Die primäre Behandlungsindikation ist die Vermeidung einer Ruptur bei Aneurysmen ≥ 50 mm. Um einen genaueren Einblick in die pathophysiologischen Prozesse zu gewinnen, die zur Progression und Ruptur des infrarenalen Aortenaneurysmas führen, haben wir die Genexpression und Histologie verschiedener Stadien des Aneurysmas miteinander verglichen.

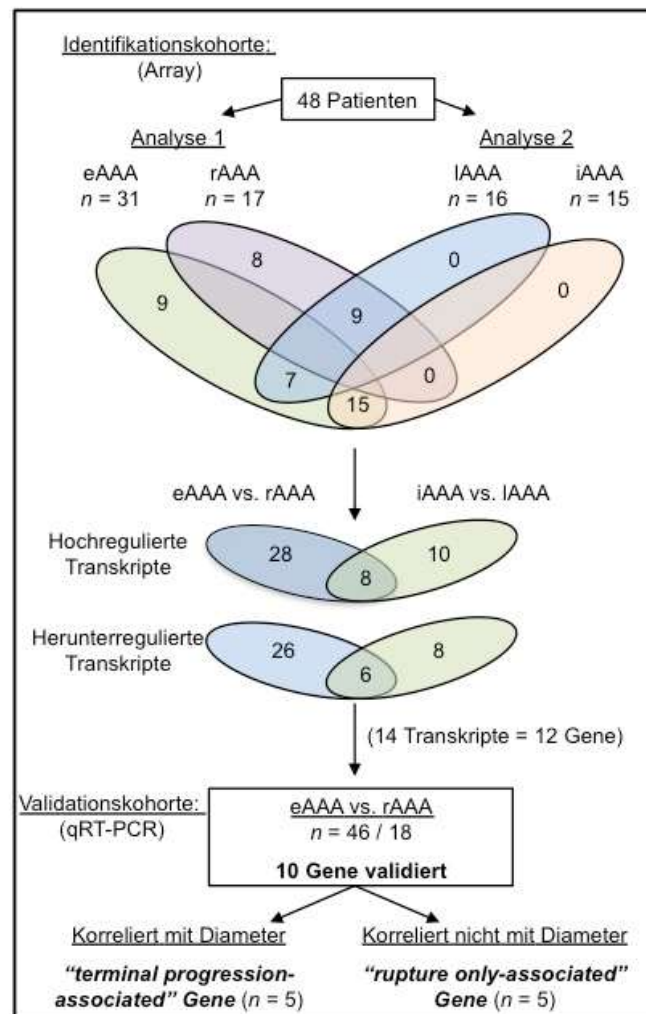


Abbildung 3: Studiendesign zur Identifikation von molekularen Markern der Aortenaneurysmaprogression. Die Identifikationskohorte wurde in verschiedenen Gruppen aufgeteilt (teilweise mit Überlappung) und die Genexpressionsprofile der Gruppen wurden mittels Microarray bestimmt. Im Anschluss wurden die Transkripte herausgesucht, welche sowohl in der Analyse für eAAA vs. rAAA als auch in der Analyse für iAAA vs. IAAA signifikant differentiell exprimiert waren. Diese wurden daraufhin in einer unabhängigen Validationskohorte mittels quantitativer RT-PCR auf ihre Signifikanz überprüft. Zusätzlich wurde auf eine signifikante Korrelation mit dem Aortendiameter geprüft. Dadurch konnten 2 Gensets (je 5 Gene) identifiziert werden. (aus: Gäbel et al. J Am Heart Assoc 2017)

Da aktuell der einzige verlässliche Parameter für die Rupturwahrscheinlichkeit der Durchmesser des Aneurysmas darstellt, wurde in einem komplexen Ansatz die Geneexpression von mittelmäßig-großen (= intermediate size; iAAA; ≤ 55 mm, n = 15), großen Aneurysmen (= large size; lAAA; > 70 mm, n = 16) bzw. stabilen (= electively treated; eAAA, n = 31) und rupturierten (= rAAA, n = 17) miteinander verglichen (Abbildung 3)²⁰.

2.3.1 Histologische Unterschiede

Bei der histologischen Untersuchung von verschiedenen Stadien des AAAs, zeigen sich besondere Merkmale insbesondere sind dies:

1. Zunahme an Vasa vasora bei rAAAs im Vergleich zu elektiv-versorgten (Abbildung 4).
2. Zunahme von Adipozyten - bzw. einer fettigen Degeneration - in der Adventitia im Vergleich zu atherosklerotisch-veränderten Kontrolllaorten (Abbildung 5).

Mittels Lichtmikroskopie wurden nach Ulex-Färbung die Gefäßlumen in der Gefäßwand von rAAA (n = 5) und eAAA (n = 5) markiert und die relative Gefäßdichte mithilfe der ImageJ Software (<https://imagej.net>) bestimmt. Die Analyse ergab eine signifikant erhöhte Mikrogefäßdichte a.e. bedingt durch eine erhöhte Neovaskularisation im Media-Adventia-Übergangsbereich von rAAA.

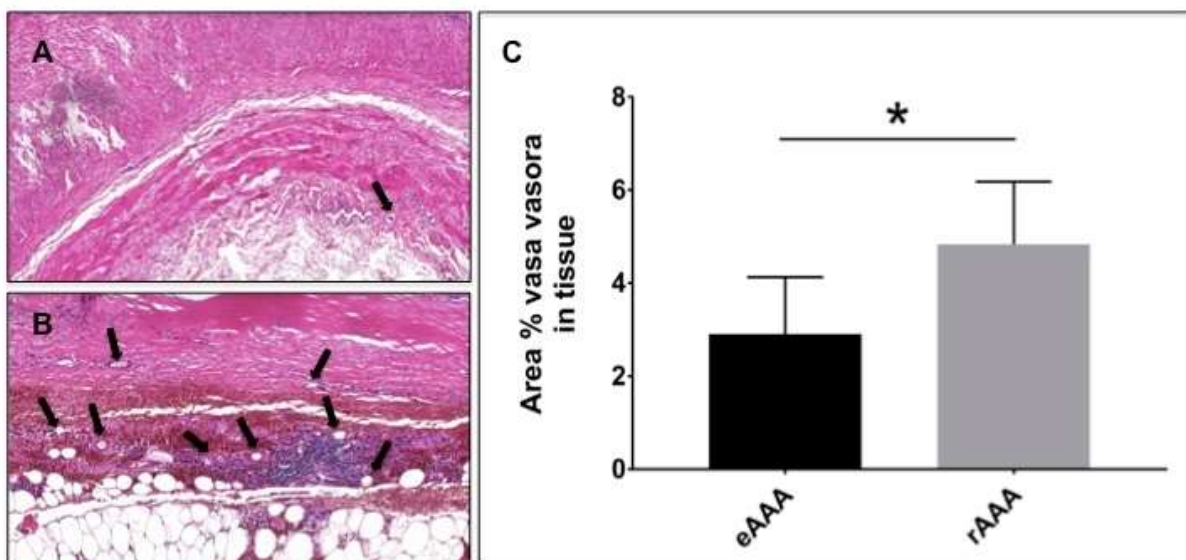


Abbildung 4: Histologisch untersucht wurde der prozentuale Unterschied von Vasa vasora in den aneurysmatischen Aortenwandproben (je n = 5) von eAAA (A) und rAAA (B). Die Pfeile indizieren die Vasa vasora im Media-Adventia-Übergangsbereich. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Mikrogefäßdichte in rAAA (C). * $p < 0,05$; Mann-Whitney U Test (aus: Gäbel et al. J Am Heart Assoc 2017)

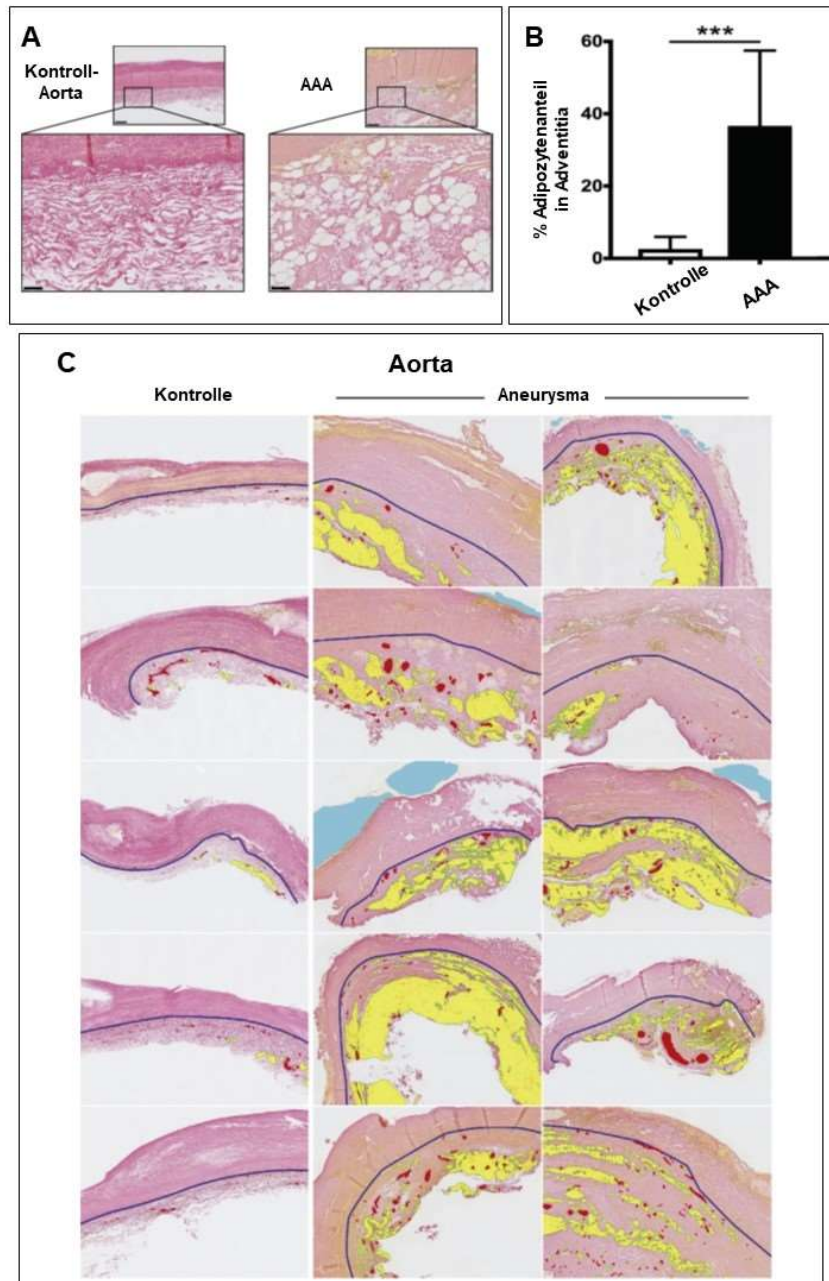


Abbildung 5: In der Sirius-red-Färbung wurde der prozentuale Unterschied von Adipozyten in aneurysmatischen Aortenwandproben ($n = 5$) im Vergleich zu atherosklerotisch-veränderter Kontrollaaorta (**A**) untersucht. Die Adipozyten waren fast ausschließlich in Adventitia nachweisbar. Es zeigte sich ein signifikantes Übermaß an Adipozyten in der Adventitia von AAA (**B**). Dies ließ sich besonders gut bei der genaueren Analyse der Adventitia darstellen (**C**). Die Adventitia ist definiert als die Zone unterhalb der blauen Linie. Die gelben Markierungen stellen die Adipozyten-Cluster dar und rot markiert sind die Lumina der vasa vasora. $***p < 0,001$; Mann-Whitney U Test (aus: Doderer et al. J Vasc Surg 2018)

Ebenfalls mittels Lichtmikroskopie wurde nach Sirius-Red-Färbung der prozentuale Unterschied des Adipozyten-Vorkommens in AAA gegenüber atherosklerotisch-veränderter Kontrollaaortenwand quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass ein Übermaß an Adipozyten in der Adventitia ein typisches

histologisches Merkmal von aneurysmatisch veränderter Aorta darstellt. Eine signifikante Korrelation von Adipozyten-Dichte in der Adventitia mit dem Aneurysma-Diameter konnten wir jedoch aufgrund der geringen Probenanzahl (n = 10) nicht nachweisen.

2.3.2 Unterschiede auf Ebene der Genexpression von stabilen und rupturierten infrarenalen Aortaaneurysmen

Durch unseren Versuchsansatz konnten wir eine Überlappung von 12 differentiell exprimierten Genen in der Analyse stabiler vs. rupturierter AAA und für mittelmäßig vs. große AAAs identifizieren (Abbildung 4). Von diesen konnten 10 in einer unabhängigen Kohorte (46 eAAA vs. 18 rAAA) mittels quantitativer RT-PCR validiert werden. Dazu zählten folgende hochregulierte Gene: *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9* (ADAMTS9), *angiopoietin-like 4* (ANGPTL4), *hypoxia-inducible lipid droplet associated protein* (HILPDA auch C7orf68), *lysyl-oxidase* (LOX), *sushi repeat protein X-linked 2* (SRPX2), *stanniocalcin-1* (STC1) und *glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2* (GFPT2). Herunterreguliert waren folgende Gene: *C-C chemokine ligand 4-like 1* (CCL4L1), *Fc fragment binding protein* (FCGBP), *Gal-3-sulfontransferase 4* (GAL3ST4). Für 5 dieser Gene (ANGPTL4, HILPDA, LOX, SRPX2, FCGBP) konnte zusätzlich eine signifikante Korrelation zum Aortendiameter nachgewiesen werden, so dass dieses Genset mit terminaler AAA Progression und Ruptur assoziiert ist. Daher haben wir diese Gene als „terminal progression-associated“ Gene bezeichnet. Für die anderen 5 Kandidatengene (ADAMTS9, STC1, GFPT2, GAL3ST4, CCL4L1) konnten wir keine Assoziation zum Aortendiameter nachweisen und wurden daher als „rupture only-associated“ Gene bezeichnet.

Vom diagnostischen und therapeutischen Blickwinkel aus sind die Veränderungen, die einer Aortenruptur vorausgehen natürlich von größtem Interesse. Daher haben wir uns in der weiteren experimentellen Analyse auf die 5 „terminal progression-associated“ Gene konzentriert.

Um herauszufinden, ob diese ausgewählten Gene spezifische Marker für abdominelle Aortenaneurysmen sind, haben wir ihre Genexpression in Gewebe von degenerativen bzw. dissezierten thorakalen Aneurysmen, Poplitealarterienaneurysmen und atherosklerotisch-veränderten Karotiden sowie Femoralarterien bestimmt. Für ANGPTL4, HILPDA, LOX, und SRPX2, welche hochreguliert sind in großen und rupturierten AAA, die höchsten Expressionsspiegel konnten in AAA bestimmt werden. Aber, eine nur geringe Expression wurde in thorakalen und poplitealen

aneurysmatisch veränderten Gewebeproben detektiert. Ebenfalls nur geringe Expressionslevel konnten für diese Gene in den atherosklerotisch veränderten Gewebeproben nachgewiesen werden, so dass diese Genexpressionssignatur spezifisch für AAA ist und unabhängig von anderen dilatativen oder atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen. Für FCGBP wurden geringe Expressionsspiegel in AAA und hohe Spiegel in atherosklerotischen Plaques gemessen.

Um weiterhin zu bestimmen, welche Zellen in der aneurysmatischen Aortenwand für die gesteigerte Genexpression unserer Kandidatengene verantwortlich sind, haben wir die Genexpression in die Gefäßwand-infiltrierenden Blutzellen (periphere mononukleare Zellen, CD14-positive Monozyten, B-Zellen (CD19), CD3-, CD4-, CD8-positive T-Zellen und regulatorische T-Zellen) sowie vaskulären Zellen (Endothelzellen, Fibroblasten der Adventitia, Adipozyten, glatte Muskelzellen) bestimmt. ANGPTL4, HILPDA, LOX, und SRPX2 zeigten hohe Expressionsspiegel in Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Nur HILPDA zeigte hohe Expressionsspiegel in Blutzellen. Diese Analyse zeigte, dass die hochregulierten Kandidatengene vornehmlich in Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert werden und nicht in inflammatorischen Blutzellen, die die Gefäßwand infiltrieren. Das bedeutet, dass die terminale Schwächung der aneurysmatischen Aortenwand eher charakterisiert ist durch fibrotische Veränderungen der Aortenwand als durch inflammatorische Alterationen.

Die Literaturrecherche ergab, dass unsere „terminal progression-associated“ Gene physiologisch mit Angiogenese (ANGPTL4²¹, SRPX2²², LOX²³), Adipogenese (HILPDA²⁴, ANGPTL4²⁵, LOX²⁶), und Epithelialer-Mesenchymaler Transition (FCGBP²⁷, LOX²⁸, SRPX2²⁹) in Verbindung gebracht werden. In einer histologischen Untersuchung der Mikrogefäßdichte zwischen rupturierten und stabilen AAAs konnten wir eine signifikant erhöhte Dichte für rupturierte AAA nachweisen am ehesten bedingt durch eine erhöhte Neovaskularisation in der Media. In einer unabhängig publizierten Untersuchung haben wir uns dem Phänomen der Adipogenese gezielt angenähert³⁰. Wir haben histologisch herausgefunden, dass die vermehrte Ansammlung von Fettgewebe im Bereich der Adventitia einzigartig für die Gefäßpathologie des Aortenaneurysmas ist. So haben z.B. Poplitealarterienaneurysmata oder auch atherosklerotische Kontrollortaen nicht solche Veränderungen, insbesondere nicht in diesem Ausmaß. Das Vorhandensein dieser Adipozyten in Aortenaneurysmen könnte ein Resultat von passiven Prozessen sein, in denen destruierte Matrixstrukturen durch periaortales Fettgewebe aufgefüllt werden. Bei so einem Phänomen würde man jedoch vermuten, dass sich das periaortale Fettgewebe kontinuierlich in der gesamten Gefäßwand ausdehnt, was nicht der Fall ist. Vielmehr zeigen sich Fettzellen mit sehr großen Zellvolumina, die auf die Adventitia beschränkt sind und die durch

Matrixfasern in Clustern miteinander verbunden sind. Dies würde gegen einen einfachen passiven Ersatzmechanismus sprechen. Eine alternative Erklärung für das massive Auftreten von Adipozyten wäre ein Prozess den man bisher als fettige Degeneration beschrieben hat. Dieses Phänomen ist bekannt von chronisch degenerativen Veränderungen, wie z.B. bei der kritischen Beinischämie, bei Muskeldystrophien oder rezidivierend auftretenden Rotatorenmanschettenläsionen im Bereich der Schulter³¹⁻³³. Es wird vermutet, dass bei diesem Phänomen dysregulierte Reparaturmechanismen, die eine Transdifferentiation von mesenchymalen Zellen zu Adipozyten fördern, eine Rolle spielen³⁴. Der Prozess der Adipozyten-Transdifferentiation ist abhängig von der Verfügbarkeit von Transkriptionsfaktoren der C/EBP und KLF-Familie sowie dem Vorhandensein des nukleären Rezeptors PPAR- γ ³⁵. Wir konnten das Vorhandensein dieser Faktoren in mesenchymalen Zellen in der äußeren Media und Adventitia der Aneurysmawand nachweisen. Damit konnten wir bestätigen, dass die benötigte transkriptionelle Ausrüstung für die fettige Degeneration in den mesenchymalen Zellen der Aneurysmawand vorhanden ist und diese sich gleichzeitig in der Nähe zu den Adipozyten befindet.

Um die regulierenden molekularen Mechanismen dahinter zu identifizieren, haben wir eine Ingenuity Upstream Regulator Analyse anhand der differentiell exprimierten Gene von eAAA versus rAAA (n = 308) und iAAA versus lAAA (n = 246) durchgeführt. Hier konnte der HIF-1 α Signalweg als einer mit der höchsten Signifikanz aktiviert identifiziert werden. Dies bestätigte auch die weitere Exploration des Signalwegs in rAAA und die immunhistochemische Untersuchung von HIF-1 α in AAA zeigte klar lokalisierte Färbung in großnukleären Zellen um die Vasa vasora in der Media-Adventia-Grenzzone. Duale Positivität dieser Zellen in einer Kofärbung mit HIF-1 α und CD31 als auch Vimentin und CD31 lässt vermuten, dass HIF-1 α Aktivierung ist assoziiert mit Zellen die einer endothelialen-zu-mesenchymalen Transition (EndoMT) unterliegen und das im Endstadium der AAA Erkrankung EndoMT involviert ist.

2.3.3 Bedeutung der identifizierten Unterschiede

Es ist bekannt, dass das Aortenaneurysma eine starke, chronisch entzündliche Veränderung aufweist. In unseren vorangegangenen Studien haben wir diese Rolle mehrfach nachweisen können und wir konnten auch zeigen, dass sich in den verschiedenen Stadien des Aortenaneurysmas auch unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen abwechseln¹⁰. Dennoch ist unklar, inwieweit diese entzündlichen Veränderungen mit der Ruptur des Aortenaneurysmas einhergehen. Interessanterweise

konnte durch unseren nun angelegten Versuchsansatz lediglich ein einziges inflammatorisch-assoziiertes Gen mit signifikant-veränderter Genexpression (CCL4L1³⁶) identifiziert werden. Die in dieser Studie indentifizierten Gen-Sets zeigen Assoziationen zu Pathomechanismen wie Adipogenese, Angiogenese und epithelialer zu mesenchymaler Transition (EMT). Hinsichtlich der Adipogenese waren das die Gene HILPDA²⁴, ANGPTL4²⁵, LOX²⁶ und ADAMTS9³⁷. Unterstützt wird die Theorie, dass die Adipogenese möglicherweise bei der Progression des Aortenaneurysmas eine wesentliche Rolle spielt durch unsere histologischen Untersuchungen. Dort konnten wir die fettige Degeneration im Adventitiabereich nicht nur als eine einzigartige Eigenschaft für das Aortenaneurysma identifizieren, sondern auch nachweisen, dass die Quantität der Adipozyten mit dem Diameter zunimmt. Eine Quantifikation des Ausmaßes der fettigen Degeneration könnte in der Zukunft dazu beitragen, eine bessere Einschätzung des Rupturrisikos für Patienten mit großem Aortenaneurysma zu ermöglichen. Obwohl Magnetenresonanztomographen heute exzellent zwischen Fettgewebe und anderem Gewebe unterscheiden können, vermuten wir jedoch, dass die infrarenale abdominelle Aorta für hochauflösende Bildgebung noch nicht ausreichend gut zugänglich ist um diese entsprechend zu quantifizieren. Aber die fettige Degeneration im Rahmen der terminalen Aneurysmawandschwächung könnte natürlich auch ein neuer Angriffspunkt für medikamentöse Therapien darstellen, so könnten z.B. PPAR- γ Agonisten eingesetzt werden. Erste Studien konnten bereits zeigen, dass die PPAR- γ Aktivierung das Aortenaneurysmawachstum aufhalten und eine Ruptur verhindern kann^{38, 39}. Ebenfalls 5 Gene zeigten eine Assoziation zu dem Prozess der Angiogenese (ANGPTL4²¹, SRPX2²², LOX²³, STC1⁴⁰, ADAMTS9⁴¹). Die erhöhte Neovaskularisation, welche wir in der Media von großen und rupturierten Aortenaneurysmaproben nachweisen konnten, spricht dafür, dass die proangiogene Gen-Expressionssignatur funktionell ist. Ob die erhöhte Angiogenese der entscheidende Faktor ist der zur Ruptur führt (so könnten z.B. transverse Mikrogefäße die Aneurysmawand schwächen) oder, ob die Signatur sekundär bedingt ist - durch physikalische Veränderungen wie Hypoxie oder molekulare wie Inflammation - ist unklar und konnte in unserer Beobachtungsstudie nicht weiter untersucht werden. Dennoch unterstützen unsere Ergebnisse eine wichtige Rolle der Angiogenese bei der Aneurysmaprogression hin zur Ruptur und deuten damit auf ein weiteres mögliches Ziel für medikamentöse Therapieansätze hin. In einem Mausmodell konnten wir bereits für das proangiogene Chemokin CXCL8, welches in humanen Aortenaneurysmen überexprimiert ist, nachweisen, dass durch eine Antagonisierung des Rezeptors für CXCL8 (CXCR1/2) eine Aneurysmaprogression verhindert werden konnte⁴².

Beide Prozesse, die Angiogenese und die Adipogenese, werden durch das Regulatorprotein HIF-1 α gesteuert, so dass wir sagen können, HIF-1 α führt molekular und funktionell den Fingerabdruck der terminalen Aneurysmawandschwächung. HIF-1 α ist zentral involviert in die zelluläre Antwort auf Sauerstoffspannungen. Unter normalen Umständen wird HIF-1 α konstitutiv in geringen Spiegeln in Gewebe exprimiert und unter normaler Oxygenierung wird es durch Ubiquitination rasch aus dem Gewebe abgebaut⁴³. In der Aneurysmawand wird durch eine Kombination aus Faktoren wie intravaskulärer Thrombus, Aortenwandverdickung, massive Entzündungen ein hypoxisches Milieu kreiert. Dennoch sind große Aortenaneurysmen charakterisiert durch eine exzessive Neangiogenese wie zuvor beschrieben, mit erhöhter Mikrogefäßdichte. Diese sollte theoretischerweise die Hypoxie kompensieren. In der weiterführenden histologischen Aufarbeitung konnten wir eine diffuse HIF-1 α -Färbung in vielen Zellen der Aneurysmawand nachweisen. Eine bemerkenswerte Beobachtung war jedoch die erhöhte Färbung für HIF-1 α in der Nähe der tertiären Follikel im Media-Adventitia-Bereich. Bei Doppelfärbungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die HIF-1 α positiven Zellen ebenfalls für CD31 einem klassischen Endothelzellmarker positiv waren. CD31 ist auch als Oberflächenantigen auf Zellen nachweisbar, die einer endothelialen-mesenchymalen Transition (EndoMT) unterliegen⁴⁴. EndoMT ist ein Prozess in welchem Endothelzellen und endotheliale Zellen ihre Polarität verlieren. Sie lösen sich von den umgebenden Zellen und migrieren, um sich in mesenchymale Vorläuferzellen zu verändern⁴⁵. EndoMT ist verantwortlich für fibrotische Gewebsveränderungen. Im Gefäßsystem wird EndoMT als einer der wichtigsten Kontributoren für kardiale Fibrose nach einem Myokardinfarkt angesehen⁴⁶. Es ist beschrieben, dass HIF-1 α einen ähnlichen Prozess die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) steuert⁴⁷, fünf unserer identifizierten Kandidatengene können ebenfalls mit EMT assoziiert werden (FCGBP²⁷, LOX²⁸, SRPX2²⁹, STC1⁴⁸ und CCL4⁴⁹). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit, mit einem sehr konservativen Ansatz durch rigorose Korrektur für multiple Testung, zwei Gen-Sets identifiziert werden konnten, die sich theoretisch auf Mechanismen der Angiogenese, Adipogenese, HIF-1-Aktivierung und möglicherweise EndoMT zurückführen lassen. Dies sind alles Mechanismen, die eine Relevanz haben bei Gewebsveränderungen wie z.B. fibrotischem Gewebeumbau. Interessanterweise hatten die meisten unserer Gene keinen Bezug zu Inflammation oder Proteolyse. Diese Mechanismen spielen wahrscheinlich in den früheren Phasen der Aortenaneurysmaerkrankung eine wichtige Rolle, jedoch nicht so sehr im Endstadium. Dies kann durchaus auch erklären, warum antiinflammatorische bzw. –

proteolytische medikamentöse Therapieansätze beim Menschen bisher fehlgeschlagen sind⁵⁰. Unsere Ergebnisse können helfen neue Therapieansätze zu entwickeln, aber auch neue diagnostische Werkzeuge, um eine bessere Rupturrisikoabschätzung durchführen zu können. Zum einen wäre die schon vorbeschriebene MR-Diagnostik zur Quantifizierung von fettiger Degeneration im Adventitia-Bereich der Aneurysmawand. Weiterhin wurde kürzlich auch in einem Mausmodell die erhöhte Angiogenese durch den Einsatz eines neuen PET Tracers (⁶⁴Cu-markiertes Anti-CD105 Antikörper Fab-Fragment) visualisiert⁵¹.

2.4 Identifizierung von Unterschieden zwischen Tiermodellen und humanen Veränderungen beim abdominellen Aortenaneurysma

Um valide Untersuchungen präklinisch durchführen zu können, Bedarf es eines validen Modells in dem auch die von uns identifizierten Prozesse involviert sind. Für die Aneurysmaforschung werden aktuell vorwiegend 2 Mausmodelle eingesetzt. Zum einen das Elastase-Modell, wo männlichen, 10 Wochen alten C57BL/6 Mäusen porcine pankreatische Elastase (PPE) in die ausgeklemmte, infrarenale Aorta unter Druck installiert wird. Im Anschluss entwickeln die Tiere eine Aortendilatation durch die chemische Alteration - ähnlich einem humanen Aortenaneurysma. Jedoch bildet sich die dilatative Veränderung nach 2 Wochen langsam zurück und bei den Tieren kommt es nicht zum Auftreten einer Ruptur⁵². Ein weiteres Modell ist die Angiotensin II (AngII) induzierte Aneurysmaentstehung in männlichen ApoE knockout Mäusen (ApoE^{-/-}). In diesem Modell entwickeln die Tiere oft auch eine Dissektion und das Aneurysma ist meistens suprarenal lokalisiert, so dass es mittlerweile eher als ein Dissektionsmodell angesehen wird⁵³. Bei diesem Modell ist das Auftreten von Rupturen häufig und die dilatative Veränderung bildet sich nicht zurück.

Das entscheidende Problem stellt jedoch das Paradox zwischen präklinischem Erfolg von antiinflammatorischen bzw. antiproteolytischen Therapieansätzen im Tiermodell und der klinischen Realität dar⁵⁰. Neben den Eigenschaften, dass das PPE Modell nicht rupturiert und das AngII Modell disseziert, weist dieses auf eine translationale Lücke hin und stellt die Validität der Modelle in Frage.

Da genomweite Expressionsanalysen für das PPE Modell bisher gar nicht vorhanden waren und beide Modelle bisher bezüglich ihrer Genexpressionsveränderungen noch nie mit der Genexpression in humanen AAAs verglichen wurden, haben wir eine entsprechende Untersuchung initiiert. Ziel war es Übereinstimmungen und Unterschiede herauszuarbeiten, um die Vor- und Nachteile eines jeden Modells genauer zu identifizieren. In der Hoffnung, zukünftige medikamentöse Behandlungskonzepte am entsprechend geeignetsten Modell testen zu können.

2.4.1 Histologischer Vergleich der Mausmodelle mit humanen AAA

Wie bereits beschrieben handelt es sich beim AngII ApoE^{-/-} Modell um ein dissezierendes Aneurysma, was sich histologisch bestätigen lässt (Abbildung 6A). Daneben zeigen sich jedoch weitere Unterschiede zum PPE Modell, denn neben der Dissektion lassen sich in diesem Modell fibrotische Veränderungen in der Media und Adventitia nachweisen. So zeigen sich, ein Untergang der glatten

Muskelzellen (rot in der Movat Färbung) der durch eine Anreicherung von Kollagen (gelb) in der Matrix kompensiert wird. Weiterhin zeigen sich Zeichen der Neoangiogenese durch den Nachweis vermehrter Vasa vasora (Abbildung 6A, dicke Pfeile) im Media-Adventitia-Übergangsbereich.

Beim PPE Modell zeigt sich typischerweise eine ausgeprägte Elastolyse (Elastin, schwarz) in der Media durch die es zu Einblutungen zwischen den glatten Muskelzellen kommt (Abbildung 6B). Ebenfalls typisch sind massive entzündliche Infiltrationen in die intakte Adventitia als Zeichen der inflammatorischen Antwort auf die chemisch induzierte Gefäßläsion.

Zeichen einer fettigen Degeneration mit vermehrtem Adipozyten-Nachweis in der Adventitia vermissen wir in beiden Modellen.

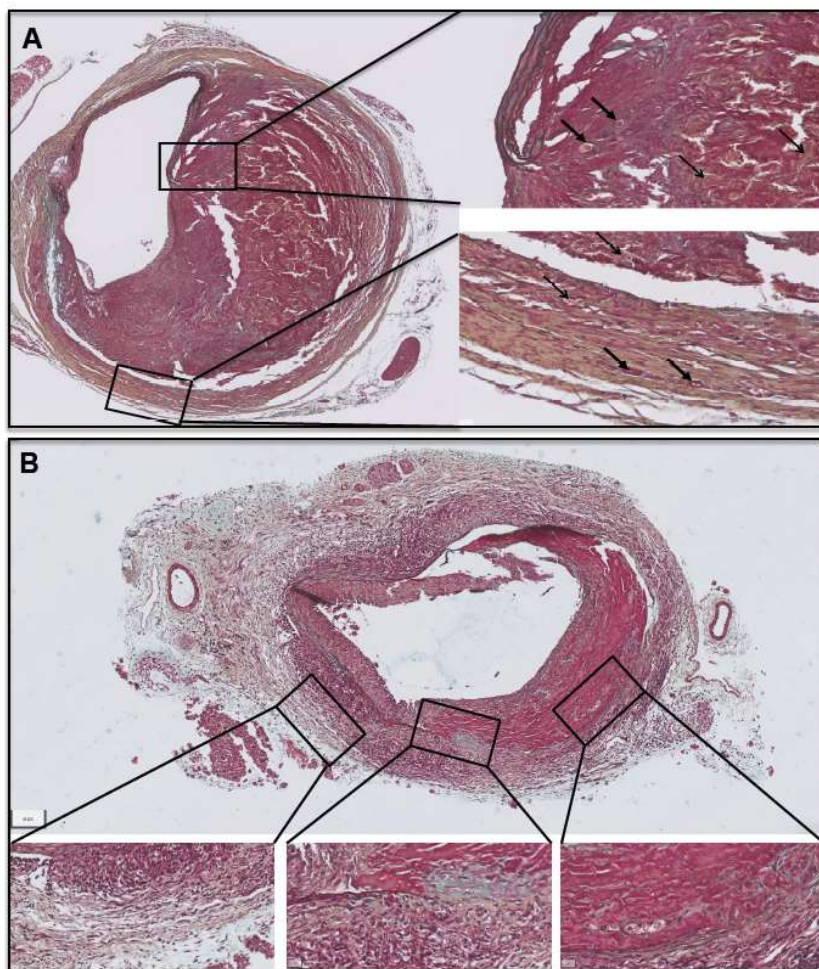


Abbildung 6: Histologische Unterschiede zwischen den beiden Mausmodellen anhand einer Movat-Färbung. Im AngII ApoE^{-/-} Modell (A) zeigt sich die Dissektion mit organisiertem Hämatom und frischen Einblutungen (dünne Pfeile) im Bereich des falschen Lumens (oberes Detailbild). Weiterhin zeigt sich eine Reduktion der glatten Muskelzellen (rot) sowie eine Zunahme von Kollagen (gelb) in der Matrix der Media (unteres Detailbild). Beim PPE Modell (B) imponiert die massive Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten in die Gefäßwand (Detailbild links). Zusätzlich lässt sich die Elastolyse in der Media nachweisen mit Proteoglykanablagerungen (blau, Detailbild mittig) und teils massiven Einblutung in die Media (Detailbild rechts).

2.4.2 Vergleich der Genexpression der Mausmodelle mit humanem infrarenalem Aortaaneurysma

Der Vergleich der Geneexpressionsprofile von humanen Aortenaneurysmawandgewebeproben mit gesunden Kontroll-Aortengewebe illustriert die Komplexität der Aneurysmaerkrankung mit einer Veränderung der Gene die Signalwege beeinflussen, die assoziiert sind mit Aspekten des angeborenen (innate) und adaptiven Immunsystems sowie inflammatorischen Signalwegen und mit Signalwegen, die assoziiert sind mit Zellorganisation und trafficking sowie Zellzyklus und Zelltod. Ein weiterer interessanter Aspekt in den humanen Aneurysmawandproben war eine manifeste metabolische Reprogrammierung mit einer relativen Herunterregulation von Genen, die in die oxidative Phosphorylierung involviert sind sowie einer Aktivierung von glykolytischen Signalwegen.

Die Evaluation der Genexpressionsprofile des Elastase-Modells zeigten eine eindeutige Genexpressionssignatur mit einer klaren genomischen Antwort am 7. Tag nach Elastase-Injektion und einer fast vollständigen Normalisierung des Genexpressionsmusters nach 14 Tagen. Daher wurden für die weiteren Analysen nur die Genexpressionsveränderungen am 7. Tag nach Elastase-Infusion berücksichtigt. Bei der Überprüfung der Transkripte zeigte sich eine Überlappung von 99 hochregulierten differentiell exprimierten Transkripten und 119 herunterregulierten.

Die quantitativen Genexpressionsveränderungen für das AngII ApoE^{-/-} Modell sind vergleichbar mit den Veränderungen des PPE Modells 7 Tage nach Elastase-Injektion. Es zeigte sich auch eine ähnlich große Überlappung zum humanen Aneurysma (79 hochregulierte und 100 herunterregulierte differentiell exprimierte Transkripte).

Da sich über die einzelnen Gene keine Schlussfolgerung über die dahinterliegenden pathophysiologischen Mechanismen treffen lässt, haben wir die Signalwege mittels einer Ingenuity pathway analysis exploriert. Dabei zeigten sich zwar anzahlmäßig vergleichbare Ergebnisse für beide Mausmodelle. Jedoch bei der genauen Analyse der aktivierten und deaktivierten Signalwege ließen sich doch beeindruckende Unterschiede darstellen (Abbildung 7).

Übereinstimmende differentiell regulierte Signalwege im AngII ApoE^{-/-} Modell und der klinischen Situation fanden sich vor allem für die metabolische Reprogrammierung und die Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Gegensätzlich gerichtete Signalwege konnten wir in diesem Modell für die Signalwege nachweisen, die assoziiert waren mit der eigenen (innate) Immunantwort und dem cell trafficking, so zum Beispiel für die Signalwege kategorisiert als „*Leukocyte Extravasation Signaling*“ und

„*Dendritic Cell Maturation*“, welche im AngII ApoE^{-/-} Modell aktiviert waren und beim humanen Aortenaneurysma supprimiert.

Das Genexpressionsprofil im PPE Modell am 7. Tag war größtenteils dominiert durch die Aktivierung von Signalwegen, welche mit der adaptiven Immunantwort assoziiert sind sowie mit der generellen inflammatorischen Response (IL-6 und 8). Die Richtung für die metabolische Antwort stand im klaren Kontrast zu den Ergebnissen der Signalweg-Analyse für die humanen Aortenaneurysmen und dem AngII ApoE^{-/-} Modell.

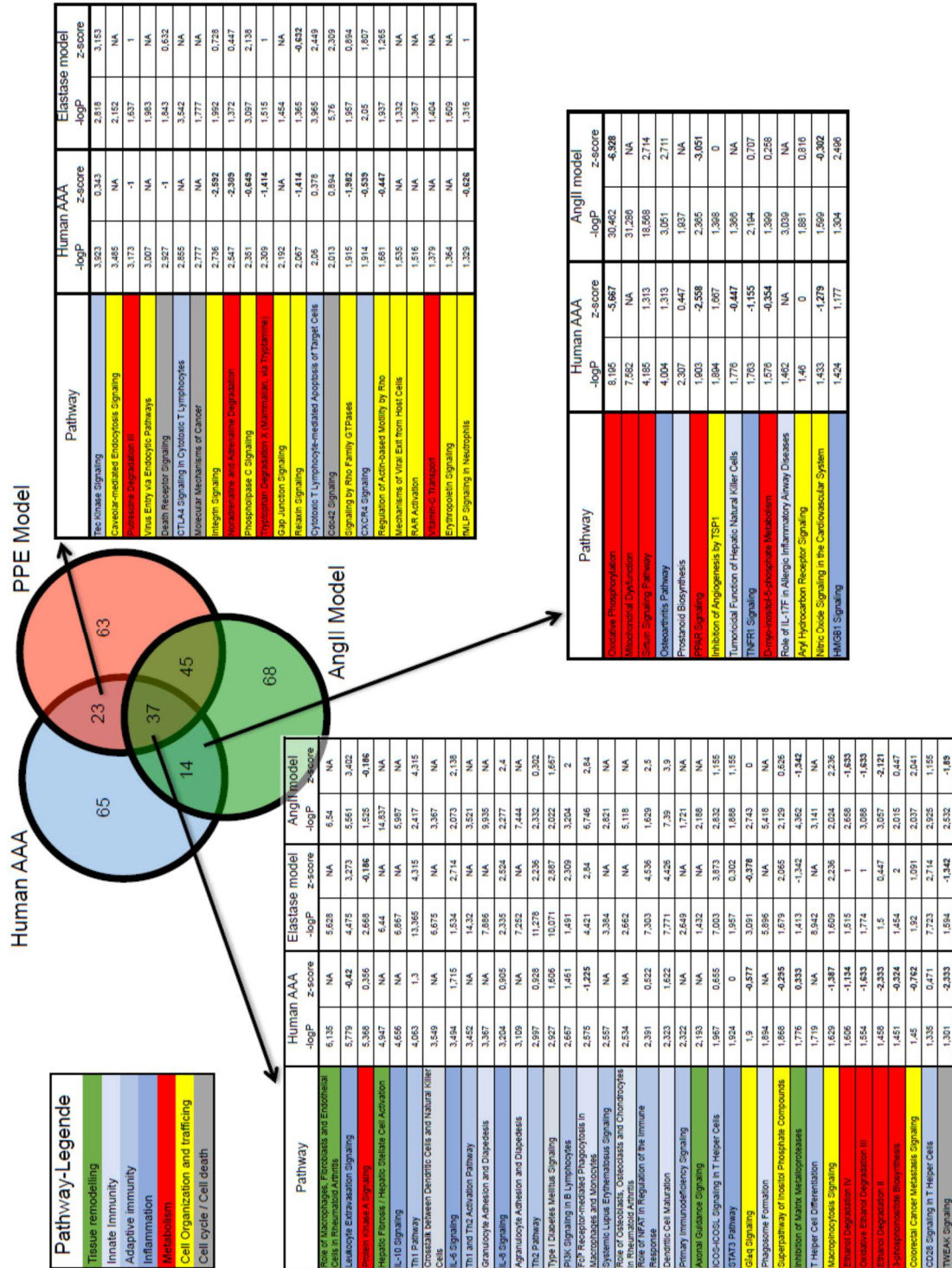


Abbildung 7. Überlappende signifikante aktivierte bzw. deaktivierte Signalwege für humane Aortenaneurysmen bzw. die Mausmodelle. Der z-score gibt die Richtung der Aktivierung an (>2 bzw. <-2 wird als signifikant bezeichnet). Die Zuordnung der Signalwege hinsichtlich ihrer Funktion ist farblich dargestellt. NA = keine Angabe

2.4.3 Bedeutung der identifizierten Unterschiede

Auf dem Boden unserer Genexpressionsanalysen für die beiden Maus-Modelle konnten wir nachweisen, dass die genomische Antwort der beiden Maus-Modelle sehr unterschiedlich ausfällt.

Im Elastase-Modell zeigt sich hauptsächlich das Bild einer akuten immunologisch-inflammatorischen Antwort („Initiation-Modell“), während im AngII ApoE^{-/-} Modell - vergleichbar zur humanen Situation - chronisch inflammatorische Prozesse reflektiert werden („Remodeling-Modell“).

Beide Modelle haben durchaus ihre Berechtigung. Anhand der von uns aufgezeigten Unterschiede auf Genexpressionsebene und auch der histologischen Ergebnisse erscheint das AngII ApoE^{-/-} Modell für die präklinische Analyse von medikamentösen Therapieansätzen zur Reduktion des chronischen Aneurysma-Wachstums als am besten geeignet.

Das Elastase-Modell kann genutzt werden, um bestimmte pathophysiologische Prozesse (bzw. den Einfluss bestimmter Mediatoren) zur Aufrechterhaltung (bzw. Progression) des Aneurysmawachstums über einen Zeitpunkt von 1-2 Woche hinaus genauer zu analysieren.

3. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt wesentliche neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie des Aortenaneurysmas, zum einen stellt die Arbeit ganz klar dar, dass es sich beim abdominellen Aortenaneurysma um eine eigenständige Entität handelt. Diese ist unabhängig von pathophysiologischen Prozessen, die den atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen unterliegen. Sie unterscheidet sich aber auch von anderen dilatativen Gefäßveränderungen, wie dem Poplitealarterienaneurysma durch Pathomechanismen, die wir eben nur beim Aortenaneurysma finden, wie z.B. der fettigen Degeneration im Media-Adventitia-Übergangsbereich bei großen Aneurysmen.

Es ist ebenfalls hervorzuheben, dass es sich bei dem abdominellen Aortenaneurysma um eine Erkrankung handelt, die nicht linear verläuft, d.h. das Wachstum des Aneurysmas ist abhängig von vielen unterschiedlichen Faktoren und gliedert sich in unterschiedliche Phasen der Erkrankung. Die Faktoren die zur Initiierung des Aortenaneurysmas führen, bleiben weiterhin unerkannt. Hier werden nach wie vor exogene und endogene Inflammationsstimuli diskutiert^{5 54}. Es kommt zur Immunantwort in deren Rahmen sich dann tertiäre lymphatische Follikel im Adventitia/Media-Bereich der Aortenwand ansiedeln. Durch die dort lokalisierten Lymphozyten kommt es zu den beschriebenen entzündlichen Veränderungen, wahrscheinlich steuern auch diese Lymphozyten den Abbau der Matrixstrukturen in Media und Adventitia. In späteren Phasen der Erkrankung bis hin zur terminalen Aortenschwächung und Ruptur übernehmen dann aber andere durch das Regulaturprotein HIF-1 α gesteuerte Prozesse eine entscheidende Rolle wie Angiogenese, Adipogenese, aber auch die Transition von endothelialen Zellen in mesenchymale Vorläuferzellen. Möglicherweise sind dies (fehlgeleitete) Reparaturmechanismen. Im Endstadium scheint - nach den aktuellen Ergebnissen - die Inflammation keine entscheidende regulierende Rolle mehr zu spielen, so dass sich sagen lässt, die inflammatorischen Veränderungen gehen den dilatativen Veränderungen der Aortenwand voraus. Hierin liegt möglicherweise auch die Ursache, dass bisherige präklinisch vielversprechende, antiinflammatorische medikamentöse Therapieansätze bei dem Versuch der Stabilisierung von humanen Aortenaneurysmen (< 5 cm) gescheitert sind^{55 50 56}.

Eine weitere wichtige Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die typischen entzündlichen Veränderungen wie die Ausbildung von tertiären lymphatischen Follikeln im Bereich der Media/Adventitia bereits auch in dem vermeintlich gesunden Aneurysmahals von Patienten mit Aortenaneurysmen vorzufinden sind. Dies ist eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Endoleckagen des Typ Ia nach endovaskulärer Versorgung von infrarenalen Aortenaneurysmen, da die

typischen histologischen Gefäßwandveränderungen eben nicht nur auf die sacciform oder fusiform dilatierten Regionen der Aorta beschränkt sind.

Die Arbeit weist eine Vielzahl von möglichen neuen Angriffspunkten für die medikamentöse Intervention zur Vermeidung von Aortenaneurysmarupturen auf, wie z.B. den Einsatz von CTLA4-Analogika bzw. Medikamente die gezielt gegen die Adipogenese bzw. Angiogenese gerichtet sind. Hier konnte der Habilitand bereits mit seiner Arbeitsgruppe erste tierexperimentelle Ergebnisse vorlegen, wo ein CXCR1/2-Antagonist appliziert wurde. CXCR1/2 ist der Rezeptor für das proangiogene Chemokin CXCL8. Durch Applikation des Antagonisten konnte die Aneurysmaprogression im Mausmodell komplett verhindert werden⁴².

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte allerdings ebenfalls aufgezeigt werden, dass es bedeutende Unterschiede zwischen Mausmodellen und der humanen Situation gibt. In einer strukturierten Aufarbeitung der Genexpressionsprofile der zwei gängigsten Aneurysmamodelle an der Maus konnte im Vergleich zu den Genexpressionsprofilen von humanen Aortenaneurysmen gezeigt werden, dass das PPE-Mausmodell eher ein Initiierungsmodell darstellt, während das AngII ApoE^{-/-}-Mausmodell die chronischen Veränderungen auf der Genexpressions- und teilweise auch auf histologischer Ebene besser widerspiegelt. So zeigte sich, dass lediglich in diesem vermeintlichen Dissektionsmodell die metabolischen Signalkaskaden inaktiviert waren. Über die Rolle dieser metabolischen Signalkaskaden ist aktuell nur wenig bekannt. Diese scheinen jedoch von deutlich höherem Interesse zu sein als wir bisher vermutet haben. Möglicherweise liegt auch darin die Begründung, warum Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 vor dem Auftreten von behandlungspflichtigen infrarenalen Aortenaneurysmen geschützt sind^{55, 57}. Hier werden in naher Zukunft weitere präklinische⁵⁸ und klinische Studien (NCT03507413, NCT01670903) über die Rolle von Medikamenten wie z.B. Metformin Aufschluss geben.

Zusätzlich können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit möglicherweise dazu beitragen in Zukunft eine bessere Risikostratifizierung (neben dem Maximaldiameter) bei Patienten mit AAA zu ermöglichen. So können eventuell bestimmte Aspekte der Aneurysmaprogression auch durch eine gezielte Diagnostik – z.B. Quantifizierung des periaortalen Fettgewebes mittels CT⁵⁹ oder Neovaskularisation mittels PET-CT⁵¹ - dazu beitragen Risikopatienten für ein Rupturereignis frühzeitig zu erkennen und eine Therapie einzuleiten.

4. Literatur

1. Hinterseher I, Kuffner H, Koch R, Gabel G, Saeger HD and Smelser D. Comparison of survival rates for abdominal aortic aneurysm treatment methods. *World J Surg.* 2012;36:917-22.
2. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Jr., Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS, Joint Council of the American Association for Vascular S and Society for Vascular S. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg.* 2003;37:1106-17.
3. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, van Herwaarden JA, Holt PJ, van Keulen JW, Rantner B, Schlosser FJ, Setacci F, Ricco JB and European Society for Vascular S. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;41 Suppl 1:S1-S58.
4. Egorova NN, Vouyouka AG, McKinsey JF, Faries PL, Kent KC, Moskowitz AJ and Gelijns A. Effect of gender on long-term survival after abdominal aortic aneurysm repair based on results from the Medicare national database. *J Vasc Surg.* 2011;54:1-12 e6; discussion 11-2.
5. Hinterseher I, Gabel G, Corvinus F, Luck C, Saeger HD, Bergert H, Tromp G and Kuivaniemi H. Presence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato antibodies in the serum of patients with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:781-9.
6. Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai K, Shimamura K, Daimon T, Kawahara Y, Kuratani T and Sawa Y. Tissue- and plasma-specific MicroRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e000745.
7. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syvanne M, Scholte op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F, European Association for Cardiovascular P, Rehabilitation and Guidelines ESCCfP. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J.* 2012;33:1635-701.
8. Thompson SG, Brown LC, Sweeting MJ, Bown MJ, Kim LG, Glover MJ, Buxton MJ and Powell JT. Systematic review and meta-analysis of the growth and rupture rates of small abdominal aortic aneurysms: implications for surveillance intervals and their cost-effectiveness. *Health Technol Assess.* 2013;17:1-118.
9. van Dijk RA, Duiniveld AJ, Schaapherder AF, Mulder-Stapel A, Hamming JF, Kuiper J, de Boer OJ, van der Wal AC, Kolodgie FD, Virmani R and Lindeman JH. A change in inflammatory footprint precedes plaque instability: a systematic evaluation of cellular aspects of the adaptive immune response in human atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2015;4.
10. Biro E, Gabel G, Moran CS, Schreurs C, Lindeman JH, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Holdt LM, Hinterseher I, Pilarsky C and Golledge J. Differential gene expression in human abdominal aortic aneurysm and aortic occlusive disease. *Oncotarget.* 2015;6:12984-96.

11. Bluestone JA. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol.* 1997;158:1989-93.
12. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittmore AD, Knox J and Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1999;99:96-104.
13. Schiff M. Co-stimulation Therapy in Rheumatoid Arthritis: Today and Tomorrow. *Curr Treatm Opt Rheumatol.* 2015;1:334-349.
14. Biro E, Moran CS, Rush CM, Gabel G, Schreurs C, Lindeman JH, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Holdt LM, Hinterseher I, Pilarsky C and Golledge J. Differential gene expression in the proximal neck of human abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2014;233:211-8.
15. Takahashi N, de Jager VC, Gluck A, Letzkus M, Hartmann N, Staedtler F, Ribeiro-Dias F, Heuvelmans-Jacobs M, van den Berg WB and Joosten LA. The molecular signature of oxidative metabolism and the mode of macrophage activation determine the shift from acute to chronic disease in experimental arthritis: critical role of interleukin-12p40. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3471-84.
16. Grabner R, Lotzer K, Dopping S, Hildner M, Radke D, Beer M, Spanbroek R, Lippert B, Reardon CA, Getz GS, Fu YX, Hehlgans T, Mebius RE, van der Wall M, Kruspe D, Englert C, Lovas A, Hu D, Randolph GJ, Weih F and Habenicht AJ. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med.* 2009;206:233-48.
17. Kendall PL, Yu G, Woodward EJ and Thomas JW. Tertiary lymphoid structures in the pancreas promote selection of B lymphocytes in autoimmune diabetes. *J Immunol.* 2007;178:5643-51.
18. Gregory AK, Yin NX, Capella J, Xia S, Newman KM and Tilson MD. Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg.* 1996;131:85-8.
19. Kuivaniemi H, Platsoucas CD and Tilson MD, 3rd. Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation.* 2008;117:242-52.
20. Gabel G, Northoff BH, Weinzierl I, Ludwig S, Hinterseher I, Wilfert W, Teupser D, Doderer SA, Bergert H, Schonleben F, Lindeman JHN and Holdt LM. Molecular Fingerprint for Terminal Abdominal Aortic Aneurysm Disease. *J Am Heart Assoc.* 2017;6.
21. Chong HC, Chan JS, Goh CQ, Gounko NV, Luo B, Wang X, Foo S, Wong MT, Choong C, Kersten S and Tan NS. Angiopoietin-like 4 stimulates STAT3-mediated iNOS expression and enhances angiogenesis to accelerate wound healing in diabetic mice. *Mol Ther.* 2014;22:1593-604.
22. Miljkovic-Licina M, Hammel P, Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Szepietowski P and Imhof BA. Sushi repeat protein X-linked 2, a novel mediator of angiogenesis. *FASEB J.* 2009;23:4105-16.
23. Osawa T, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Kitayama K, Kawamoto T, Yamamoto K, Maishi N, Kondoh M, Onodera Y, Fujie M, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M and Hida K. Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer.* 2013;109:2237-47.

24. Jiang C, Sun J, Dai Y, Cao P, Zhang L, Peng S, Zhou Y, Li G, Tang J and Xiang J. HIF-1A and C/EBPs transcriptionally regulate adipogenic differentiation of bone marrow-derived MSCs in hypoxia. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:21.
25. Yin C, Xiao Y, Zhang W, Xu E, Liu W, Yi X and Chang M. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in adipocyte differentiation. *J Biosci.* 2014;39:415-23.
26. Chen SZ, Xu X, Ning LF, Jiang WY, Xing C, Tang QQ and Huang HY. miR-27 impairs the adipogenic lineage commitment via targeting lysyl oxidase. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23:2445-53.
27. Xiong L, Wen Y, Miao X and Yang Z. NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res.* 2014;355:365-74.
28. Boufraquech M, Zhang L, Nilubol N, Sadowski SM, Kotian S, Quezado M and Kebebew E. Lysyl Oxidase (LOX) Transcriptionally Regulates SNAI2 Expression and TIMP4 Secretion in Human Cancers. *Clin Cancer Res.* 2016;22:4491-504.
29. Tang H, Zhao J, Zhang L, Zhao J, Zhuang Y and Liang P. SRPX2 Enhances the Epithelial-Mesenchymal Transition and Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36:1067-76.
30. Doderer SA, Gabel G, Kokje VBC, Northoff BH, Holdt LM, Hamming JF and Lindeman JHN. Adventitial adipogenic degeneration is an unidentified contributor to aortic wall weakening in the abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2018;67:1891-1900 e4.
31. Kang JR and Gupta R. Mechanisms of fatty degeneration in massive rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012;21:175-80.
32. Rodeheffer MS. Tipping the scale: muscle versus fat. *Nat Cell Biol.* 2010;12:102-4.
33. Weiss DJ, Casale GP, Koutakis P, Nella AA, Swanson SA, Zhu Z, Miserlis D, Johanning JM and Pipinos, II. Oxidative damage and myofiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. *J Transl Med.* 2013;11:230.
34. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, Rudnicki MA and Rossi FM. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* 2010;12:153-63.
35. Cristancho AG and Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:722-34.
36. Suviolahti E, Ge S, Nast CC, Mirocha J, Karasyov A, White M, Jordan SC and Toyoda M. Genes associated with antibody-dependent cell activation are overexpressed in renal biopsies from patients with antibody-mediated rejection. *Transpl Immunol.* 2015;32:9-17.
37. Regassa A and Kim WK. Transcriptome analysis of hen preadipocytes treated with an adipogenic cocktail (DMIOA) with or without 20(S)-hydroxylcholesterol. *BMC Genomics.* 2015;16:91.
38. Motoki T, Kurobe H, Hirata Y, Nakayama T, Kinoshita H, Rocco KA, Sogabe H, Hori T, Sata M and Kitagawa T. PPAR-gamma agonist attenuates inflammation in aortic aneurysm patients. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;63:565-71.

39. Tai HC, Tsai PJ, Chen JY, Lai CH, Wang KC, Teng SH, Lin SC, Chang AY, Jiang MJ, Li YH, Wu HL, Maeda N and Tsai YS. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Level Contributes to Structural Integrity and Component Production of Elastic Fibers in the Aorta. *Hypertension*. 2016;67:1298-308.
40. Law AY and Wong CK. Stanniocalcin-1 and -2 promote angiogenic sprouting in HUVECs via VEGF/VEGFR2 and angiopoietin signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;374:73-81.
41. Koo BH, Coe DM, Dixon LJ, Somerville RP, Nelson CM, Wang LW, Young ME, Lindner DJ and Apte SS. ADAMTS9 is a cell-autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells. *Am J Pathol*. 2010;176:1494-504.
42. Kokje VBC, Gabel G, Dalman RL, Koole D, Northoff BH, Holdt LM, Hamming JF and Lindeman JHN. CXCL8 hyper-signaling in the aortic abdominal aneurysm. *Cytokine*. 2018;108:96-104.
43. Masoud GN and Li W. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5:378-89.
44. Welch-Reardon KM, Wu N and Hughes CC. A role for partial endothelial-mesenchymal transitions in angiogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:303-8.
45. Hu B and Phan SH. Myofibroblasts. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25:71-7.
46. Xu X, Tan X, Tampe B, Sanchez E, Zeisberg M and Zeisberg EM. Snail Is a Direct Target of Hypoxia-inducible Factor 1alpha (HIF1alpha) in Hypoxia-induced Endothelial to Mesenchymal Transition of Human Coronary Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2015;290:16653-64.
47. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M and Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117:3810-20.
48. Ma X, Gu L, Li H, Gao Y, Li X, Shen D, Gong H, Li S, Niu S, Zhang Y, Fan Y, Huang Q, Lyu X and Zhang X. Hypoxia-induced overexpression of stanniocalcin-1 is associated with the metastasis of early stage clear cell renal cell carcinoma. *J Transl Med*. 2015;13:56.
49. Shrestha N, Chand L, Han MK, Lee SO, Kim CY and Jeong YJ. Glutamine inhibits CCl4 induced liver fibrosis in mice and TGF-beta1 mediated epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatocytes. *Food Chem Toxicol*. 2016;93:129-37.
50. Lindeman JH and Matsumura JS. Pharmacologic Management of Aneurysms. *Circ Res*. 2019;124:631-646.
51. Shi S, Orbay H, Yang Y, Graves SA, Nayak TR, Hong H, Hernandez R, Luo H, Goel S, Theuer CP, Nickles RJ and Cai W. PET Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm with 64Cu-Labeled Anti-CD105 Antibody Fab Fragment. *J Nucl Med*. 2015;56:927-32.
52. Kokje VBC, Gabel G, Koole D, Northoff BH, Holdt LM, Hamming JF and Lindeman JHN. IL-6: A Janus-like factor in abdominal aortic aneurysm disease. *Atherosclerosis*. 2016;251:139-146.
53. Trachet B, Aslanidou L, Piersigilli A, Fraga-Silva RA, Sordet-Dessimoz J, Villanueva-Perez P, Stampanoni MFM, Stergiopoulos N and Segers P. Angiotensin II infusion into ApoE-/- mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm? *Cardiovasc Res*. 2017;113:1230-1242.

54. Pahl MC, Derr K, Gabel G, Hinterseher I, Elmore JR, Schworer CM, Peeler TC, Franklin DP, Gray JL, Carey DJ, Tromp G and Kuivaniemi H. MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Med Genomics*. 2012;5:25.
55. Meijer CA, Stijnen T, Wasser MN, Hamming JF, van Bockel JH, Lindeman JH and Pharmaceutical Aneurysm Stabilisation Trial Study G. Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2013;159:815-23.
56. Golledge J, Moxon JV, Singh TP, Bown MJ, Mani K and Wanhainen A. Lack of an effective drug therapy for abdominal aortic aneurysm. *J Intern Med*. 2019.
57. Patel K, Zafar MA, Ziganshin BA and Elefteriades JA. Diabetes Mellitus: Is It Protective against Aneurysm? A Narrative Review. *Cardiology*. 2018;141:107-122.
58. Golledge J, Morris DR, Pinchbeck J, Rowbotham S, Jenkins J, Bourke M, Bourke B, Norman PE, Jones R and Moxon JV. Editor's Choice - Metformin Prescription is Associated with a Reduction in the Combined Incidence of Surgical Repair and Rupture Related Mortality in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019;57:94-101.
59. Dias-Neto M, Meekel JP, van Schaik TG, Hoozemans J, Sousa-Nunes F, Henriques-Coelho T, Lely RJ, Wisselink W, Blankensteijn JD and Yeung KK. High Density of Periaortic Adipose Tissue in Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2018;56:663-671.

5. Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsleistung

1) **CXCL8 hyper-signaling in the aortic abdominal aneurysm**

Kokje VBC, **Gäbel G**, Dalman RL, Koole D, Northoff BH, Holdt LM, Hamming JF, Lindeman JHN

Cytokine. 2018 24;108:96-104. *IF: 3,488*

2) **A molecular fingerprint for terminal abdominal aortic aneurysm disease**

Gäbel G, Northoff BH, Weinzierl I, Ludwig S, Hinterseher I, Wilfert W, Teupser D, Doderer SA, Bergert B, Schönleben F, Lindeman JHN, Holdt LM

J Am Heart Assoc. 2017; 6. *IF: 5,116*

3) **Adventitial adipogenic degeneration is an unidentified contributor to aortic wall weakening in the abdominal aortic aneurysm**

Doderer SA, **Gäbel G**, Kokje VBC, Northoff BH, Holdt LM, Hamming JF, Lindeman JHN

J Vasc Surg. 2018; 67:1891-1900 e4. *IF: 3,536*

4) **IL-6: A Janus-like factor in abdominal aortic aneurysm disease**

Kokje VB, **Gäbel G**, Koole D, Northoff BH, Holdt LM, Hamming JF, Lindeman JH

Atherosclerosis. 2016; 251:139-46. *IF: 3,942*

5) **Differential gene expression in human abdominal aortic aneurysm and aortic occlusive disease**

Gäbel G*, Biroş E*, Moran CS, Schreurs C, Lindeman JHN, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Holdt LM, Hinterseher I, Pilarsky C, Golledge J

Oncotarget. 2015; 6(15):12984-96 *IF: 6,63 (*contributed equally)*

6) **Differential gene expression in the proximal neck of human abdominal aortic aneurysm**

Biroş E, Moran CS, Rush CM, **Gäbel G**, Schreurs C, Lindeman JHN, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Holdt LM, Hinterseher I, Pilarsky C, Golledge J

Atherosclerosis. 2014; 233(1):211-18 *IF: 3,706*

7) **Presence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* Antibodies in the Serum of Patients with Abdominal Aortic Aneurysms**

Gäbel G*, Hinterseher I*, Corvinus F, Lück C, Saeger HD, Bergert H, Tromp G, Kuivaniemi H
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(5):781-9. *IF: 2,631(*contributed equally)*

8) **MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms**

Pahl MC, Derr K, **Gäbel G**, Hinterseher I, Elmore JR, Schworer CM, Peeler TC, Franklin DP, Gray JL, Carey DJ, Tromp G, Kuivaniemi H.
BMC Med Genomics. 2012; 5(1):25. *IF: 3,69*

9) **Comparison of survival rates for abdominal aortic aneurysm treatment methods**

Hinterseher I, Kuffner H, Koch R, **Gäbel G**, Saeger HD and Smelser D
World J Surg. 2012; 36:917-22. *IF: 2,768*