

Aus dem Zentrum für Kardiologie – Kardiologie I
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kardiovaskulärer Risikofaktor Alter:
Histologische und immunhistochemische Untersuchungen der Gefäßwand und des
perivaskulären Fettgewebes der Arteria Carotis der Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Amina Rim Ben Hallou
aus Offenbach am Main

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 27.04.2021

Widmung

Ich widme diese Dissertationsschrift dankend meinen geliebten Eltern, die immer stolz auf mich waren, mir in jeder erdenklichen Lebenslage zur Seite gestanden haben und mir beigebracht haben, das Leben immer auf eleganteste Weise zu meistern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Bildverzeichnis	VI
1 Einleitung und Ziel der Dissertation	1
2 Literaturdiskussion	3
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Versuchstiere, Futtermittel und Haltungszubehör.....	17
3.1.2 Anästhesie und Lösungen für Gewebeentnahme und -fixierung Maus ..	18
3.1.3 Für Immun-/Histochemie verwendete Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen, Seren und Antikörper.....	19
3.1.4 Für Gewebeaufbereitung und Immun-/Histochemie verwendete Geräte	26
3.1.5 Verwendete Software	28
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 Legitimation der Versuchstierhaltung und der tierexperimentellen Untersuchungen.....	28
3.2.2 Gewebeentnahme	29
3.2.3 Einbettung der Gewebe und Herstellung von Paraffinschnitten	30
3.2.4 Auswahl von Gefäßschnitten für die immun-/histochemischen Untersuchungen.....	32
3.2.5 Überblick immun-/histochemischer Färbungen	35
3.2.6 Histochemische Färbungen und Analyse der Morphometrie.....	36
3.2.7 Immunhistochemische Färbungen	42
3.2.8 Fotografieren und Auswerten der histochemischen und immunhistochemischen Färbungen.....	48
3.2.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse	48

4	Ergebnisse	51
4.1	Einfluss von Alter auf Größe und Zelldichte der Gefäßwand	51
4.1.1	Morphometrische Quantifizierung der Media.....	52
4.1.2	Bestimmung der Zellkernzahl in der Media	53
4.2	Einfluss von Alter auf die Adventitia und das perivaskuläre Fettgewebe	54
4.2.1	Morphometrische Quantifizierung der Adventitia.....	54
4.2.2	Morphometrische Quantifizierung perivaskulärer Adipozyten.....	54
4.2.3	Morphometrische Quantifizierung viszeraler Adipozyten.....	55
4.3	Histochemische Analyse des Effekts von Alter auf die Expression zellulärer Marker in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe.....	56
4.3.1	Untersuchung der Expression von Perilipin in der Gefäßwand, im perivaskulären und im viszeralen Fettgewebe.....	56
4.3.2	Untersuchung der Expression von Sirtuin 1 in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe	58
4.3.3	Untersuchung der Expression von Prelamin A in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe	60
4.3.4	Untersuchung der Expression von Smooth muscle α -actin (SMA) in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe	61
4.3.5	Untersuchung der Gefäßwand und des perivaskulären und viszeralen Fettgewebes auf CSRP 2.....	63
4.3.6	Lösung der unspezifische Hintergrundfärbung bei immunhistochemischen Färbungen.....	65
5	Diskussion	66
6	Zusammenfassung.....	75
7	Literaturverzeichnis.....	77
8	Anhang	83
9	Danksagung	84

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC-Link	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Aqua dest	Einfach oder doppelt destilliertes Wasser (Millipore)
CDK 5	Cyclin-abhängige Kinase 5
CSRP 2	<i>Cysteine-rich protein 2</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DE	Deutschland
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FOXO1	Forkhead box protein O1
FRA	Frankreich
GB	Vereinigtes Königreich (engl. <i>Great Britain</i>)
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IL-6, IL-8	Interleukin-6, Interleukin-8
LKB1	Leberkinase B1
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NGS	Normales Ziegen Serum (engl. <i>Normal Goat Serum</i>)
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Normales Kaninchen Serum (engl. <i>Normal Rabbit Serum</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>

PDGFR β	Von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor-Rezeptor Beta (engl. <i>Platelet-derived growth factor receptor beta</i>)
PVASC	Perivaskuläre glatte Muskelzelle (engl. <i>perivascular adipose smooth muscle cell</i>)
PVAT	Perivaskuläres Fettgewebe (engl. <i>perivascular adipose tissue</i>)
PyRAT	<i>Python-based Relational Animal Tracking-System</i>
qPCR	<i>Real Time Quantitative PCR</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SIRT 1	Sirtuin-1
SMA	<i>Smooth muscle α-actin</i>
TARC	<i>Translational Animal Research Center</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. <i>United States of America</i>)
VAT	Viszerales Fettgewebe (engl. <i>visceral adipose tissue</i>)
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzelle (engl. <i>vascular smooth muscle cell</i>)
WAT	Weißes Fettgewebe (engl. <i>white adipose tissue</i>)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchstiere.....	17
Tabelle 2: Futter und Haltungszubehör	17
Tabelle 3: Medikamente bei Gewebeentnahme Maus	18
Tabelle 4: Gewebefixierung bei Gewebeentnahme.....	18
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien.....	19
Tabelle 6: Kits.....	21
Tabelle 7: Zubereitung von Färbe-Lösungen	22
Tabelle 8: Verdünnung der Normalseren für Immunhistochemie	25
Tabelle 9: Primärantikörper	25
Tabelle 10: Sekundärantikörper	26
Tabelle 11: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper	26
Tabelle 12: Geräte.....	27
Tabelle 13: Software	28
Tabelle 14: Protokoll Paraffineinbettung Gewebe	32
Tabelle 15: Adulte Mäuse (C57BL/6Jrj (WT) 16 Wochen alt).....	34
Tabelle 16: Mittel-alte Mäuse (C57BL/6Jrj (WT) 52 Wochen alt).....	34
Tabelle 17: Färbeprotokoll Verhoeff's-Elastica-Färbung mit einzelnen Arbeitschritten	37
Tabelle 18: Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung in einzelnen Arbeitschritten	38
Tabelle 19: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
Tabelle 20: Allgemeine Schrittabfolge immunhistochemischer Färbungen	46

Bildverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Formen zellulärer Seneszenz.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wandaufbaus einer Arterie.....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Veränderung der Gefäßwand und des PVAT	9
Abbildung 4: Neointimabildung eines Gefäßes mit Makrophagen-, Leukozyten- und Adipozytenakkumulation.	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Lipidtröpfchens	12
Abbildung 6: Aktivierung von Perilipin durch Phosphorylierung.....	12
Abbildung 7: Hormonsensitive Lipase bei Lipolyse.	13
Abbildung 8: Modulierung der SIRT 1 Aktivität durch die Cyclin-abhängige Kinase 5.	14
Abbildung 9: Schematische Darstellungen verschiedener atherosklerotischer Stadien.	15
Abbildung 10: Beispielhafte Abbildung eines Käfigs mit Gitterdeckel und Zubehör...	18
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Maus und der entsprechenden entnommenen Gewebe	30
Abbildung 12: Anfertigung von Serienschnitten.....	31
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Vorauswahl an Gewebeproben.....	33
Abbildung 14: Verhoeff's-Elastica-Färbung eines arteriellen Blutgefäßes und die jeweiligen Gefäßschichten	37
Abbildung 15: Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung eines Gefäßes und die dadurch angefärbten Komponenten	38
Abbildung 16: Visualisierung der ausgewerteten morphometrischen Parameter.	40
Abbildung 17: Mit HE-Färbung dargestellte Zellkerne in der Gefäßwand einer adulten Maus und einer mittel-alten Maus.....	41
Abbildung 18: Antigen-Antikörper-Reaktion mit Primärantikörper und Sekundärantikörper.	43
Abbildung 19: Beispielhafter Screenshot einer Datentabelle im Statistikprogramm GraphPad Prism 8.0.....	49
Abbildung 20: Ausschnitt eines beispielhaften Screenshots einer Analysetabelle im Programm GraphPad Prism 8.0.	50

Abbildung 21: Einfluss des Alters auf die Tunica Media und die, die Tunica Media umgebenden Strukturen der herznahen Gefäße.....	52
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Auswertung der Zellkernanzahl innerhalb der Media der herznahen Gefäße.....	53
Abbildung 23: Grafische Darstellungen morphometrischer Auswertungen der Adventitia.	54
Abbildung 24: Fläche einzelner Adipozyten in μm^2	55
Abbildung 25: Graphische Darstellung einer Auswertung der einzelnen Adipozytenfläche (μm^2) innerhalb des VAT.....	56
Abbildung 26: Immunhistochemische Anfärbung von Perilipin im PVAT und VAT....	57
Abbildung 27: SIRT1-positive Zellkerne.	58
Abbildung 28: Sirtuin-1 positive Zellen (innerhalb der Media).	59
Abbildung 29: Untersuchung von PVAT und VAT auf die Expression von Sirtuin-1..	59
Abbildung 30: Prelamin A in der Wand herznaher Gefäße und PVAT.	60
Abbildung 31: Prelamin A Immunopositive Fläche (%) innerhalb der Gefäßwand. ...	61
Abbildung 32: Karotisarterie der Maus mit Neointima.	62
Abbildung 33: SMA-positive Zellen (pro mm^2 media Fläche).	62
Abbildung 34: Graphische Darstellung der CSRP2 immunopositiven Fläche (%) innerhalb der Gefäßwand.....	64
Abbildung 35: Unspezifische Hintergrundfärbung gezeigt an Negativkontrollen der CSRP 2-Immunhistochemie.	65

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Alter ist ein wichtiger unveränderbarer kardiovaskulärer Risikofaktor. Die Koronare Herzkrankheit gilt als eine der Haupttodesursachen in Deutschland [1]. Laut einer Studie des Robert Koch-Instituts leiden fast 20% der 60-69 Jahre alten Männer und 11% der 60-69 Jahre alten Frauen sowie 31% der 70-79 Jahre alten Männer und 16% der 70-79 Jahre alten Frauen an einer Koronaren Herzkrankheit [1]. Zwar spielen modifizierbare Risikofaktoren wie Diabetes, ein bewegungsarmer Lebensstil, ein erhöhter Lipidspiegel im Blut und genetische Faktoren eine wichtige Rolle, jedoch stellt das Alter ein Hauptrisiko für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen dar [2]. Die Gründe und Theorien für die Zunahme kardiovaskulärer Erkrankungen im Alter sind vielfältig, aber noch nicht eindeutig geklärt [2]. Unbekannt ist auch, ob und wie Alter das perivaskuläre Fettgewebe (PVAT) beeinflusst.

Ziel der Dissertation war es, den Einfluss des biologischen Alters auf die Gefäßwand der Arteria Carotis und das dazugehörige PVAT anhand morphometrischer und immun-/histochemischer Untersuchungen zu evaluieren. Das heißt, es sollte herausgefunden werden, wie sich bestimmte morphometrische Parameter der herznahen arteriellen Gefäßwand und des PVAT im Alter verändern. Darüber hinaus sollte die Veränderung der Expression einer Auswahl wichtiger, bereits in der Literatur beschriebener Seneszenz-, Muskelzell- und Fettzellmarker innerhalb der Wand herznaher Gefäße und deren PVAT ermittelt werden.

Mögliche Gründe für die Veränderungen der Morphometrie der Gefäßwand herznaher Arterien mit deren PVAT und die Veränderungen der Expression bestimmter Seneszenz-, Muskelzell- und Fettzellmarker sollten ebenfalls ermittelt werden. Da vorangegangene Arbeiten zum Einfluss von verschiedenen Risikofaktoren auf das PVAT Viszerales Fettgewebe (VAT) als Vergleichsgewebe verwendet hatten [3], gingen wir bei unseren Untersuchungen ebenso vor. Dies hatte zudem das Ziel, morphometrische Unterschiede zwischen PVAT und VAT festzustellen und daraus eventuell auch auf funktionelle Unterschiede zwischen diesen beiden Fettgewebstypen zu schließen.

Die Untersuchungen wurden an murinem Gewebematerial von männlichen 16 Wochen alten („adulten“; engl. „*adult*“) und 52 Wochen alten („mittel-alten“; engl. „*middle-aged*“) C57BL/6Jrj Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

Dabei wurde zunächst anhand histochemischer Färbungen (VES-, VES-MTC- und H&E-Färbung, siehe 3.2.6 Histochemische Färbungen und Analyse der Morphometrie) ein besonderes Augenmerk auf die Morphometrie der Gefäßwand herznaher Arterien (Arteria carotis) und deren PVAT in den bereits angesprochenen zwei unterschiedlichen Altersstadien gelegt. Dies erfolgte, indem die Karotisarterien mit PVAT den entsprechenden Mäusen chirurgisch entnommen, histochemisch aufbereitet, immunhistochemisch angefärbt, morphometrisch ausgewertet und miteinander verglichen wurden. Zudem erfolgten gegebenenfalls statistische Auswertungen und graphische Darstellungen unserer Ergebnisse.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war es, wie bereits angesprochen, morphometrische Unterschiede zwischen den verschiedenen Fettgewebstypen (vor allem PVAT und VAT) zu ermitteln, als auch deren Veränderung im Alter zu vergleichen. Auch die Expression einer Auswahl an Seneszenz-, Glattmuskel- und Fettzellmarkern wurde an diesen Geweben teilweise untersucht, um Aufschluss über Änderungen ihrer Expression im Alter zu erhalten.

Zusammenfassend sollte die Arbeit einen ersten Einblick zum Einfluss von Alter auf die Wand herznaher Gefäße und deren PVAT geben, um mögliche Ansatzpunkte für den Ursprung des erhöhten kardiovaskulären Risikos im Alter zu erhalten.

2 Literaturdiskussion

Der Einfluss von Alter auf das kardiovaskuläre System ist in der Literatur nur unzureichend beschrieben. Sowohl die morphometrischen Veränderungen der Wand herznaher Gefäße im Alter, aber vor Allem die des entsprechenden PVAT sind in der Literatur nicht ausreichend dargelegt. Auch die Veränderung des Expressionsmusters typischer Seneszenz-, Glattmuskelzell- und Fettzellmarker innerhalb der arteriellen Gefäßwand und des PVAT im Alter sind bisher nur sporadisch ausgeführt.

In der folgenden Literaturdiskussion soll der aktuelle wissenschaftliche Stand der Literatur zu den in dieser Arbeit untersuchten Themen dargestellt werden. Dabei soll zunächst allgemein auf die Themen Alter und zelluläre Seneszenz eingegangen werden. Anschließend wird die in der Literatur beschriebene Morphologie der Gefäßwand dargestellt. Auch die Morphologie von PVAT (sowie dessen Einfluss auf die arterielle Gefäßwand) und VAT wird erläutert. Abschließend werden die in der Literatur beschriebenen Aufgaben und Funktionen der für diese Arbeit relevanten Seneszenz-, Glattmuskelzell- und Fettzellmarker sowie deren Expressionsveränderungen im Alter erläutert.

Alter als kardiovaskulärer Risikofaktor

In der Medizin wird unter **Alter** eine nicht reversible Verschlechterung physiologischer Abläufe des Organismus verstanden, welche das Überleben und die Fortpflanzung dieses Organismus beeinträchtigt [4].

Alter ist ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor, welcher die kardiovaskuläre Homöostase beeinflusst und zahlreiche Konsequenzen für das kardiovaskuläre System haben kann. Einige Umweltprozesse, vor Allem ein ungesunder Lebensstil (zum Beispiel in Form von Überernährung und Rauchen) können zu frühzeitigen funktionellen Beeinträchtigungen innerhalb des kardiovaskulären Systems führen (Insulinresistenz, heruntergesetzte mitochondriale Funktionalität, gestörte Endothelfunktion) und auf diese Weise zelluläre Alterungsprozesse beschleunigen oder verstärken [4, 5]. An den Blutgefäßen kommt es dabei zu bestimmten strukturellen und funktionellen Veränderungen, wobei bisher keine für Alter oder Seneszenz spezifischen Veränderungen beschrieben wurden. Auch eine veränderte

Gefäßmorphologie, in Form von Gefäßerweiterung und -verdickung bedingt durch vermehrte Kollageneinlagerungen und perivaskuläre Fibrose sowie eine myointimale Verdickung mit einer vermehrten arteriellen Steifigkeit, sind altersbedingte Folgeerscheinungen im kardiovaskulären System [6, 7]. Welche weiteren Konsequenzen Alter auf Blutgefäße jenseits dieser strukturellen Veränderungen haben kann, ist bisher allerdings nur unzureichend bekannt.

Zelluläre Seneszenz

Neben biologischen Alterungsprozessen wird eine **Zelluläre Seneszenz** beschrieben, die sich altersunabhängig entwickeln kann und eine wichtige Rolle bei der Alterung des Organismus auf zellulärer Ebene spielt. Dabei wird diese in „stressinduzierte vorzeitige Seneszenz“ und „replikative Seneszenz“ untergliedert [8].

Bei der stressinduzierten vorzeitigen Seneszenz kommt es aufgrund von intrazellulären und/oder extrazellulären genotoxischen Stressfaktoren zu DNS-Schäden des zellulären Genoms. Zu diesen genotoxischen Stressfaktoren gehören unter anderem oxidativer Stress (zum Beispiel in Form von Sauerstoffradikalbildung), ionisierende und ultraviolette Strahlung, chemische Schadstoffe (zum Beispiel Schwermetalle), mechanische und thermische Einflüsse, sowie Replikationsstress. Beim Replikationsstress handelt es sich um verschiedene Belastungen, denen das Genom ausgesetzt ist, vor Allem während der Zellteilung. Die oben aufgezählten genotoxischen Stressfaktoren können bei entsprechend hoher Intensität oder gestörten Reparaturmechanismen zu irreparablen Schäden der DNS der betroffenen Zelle führen. In diesem Fall spielen die Schlüsselregulatoren des Zellzyklus, p53 und p16, eine entscheidende Rolle. Während das Regulatorprotein p53 die Apoptose der betroffenen DNS-geschädigten Zelle initiiert, bewirkt das Regulatorprotein p16 eine dauerhafte Unterbindung des Zellzyklus, indem es den Übergang in die S-Phase verhindert. Infolgedessen geht die Zelle trotz weiterer Wachstumsfaktorstimulation in einen „seneszenten Zellzyklusstillstand“ über [8, 9].

Bei der replikativen Seneszenz hingegen kommt es durch eine wiederholte Replikation zu einer immer weiter voranschreitenden Verkürzung der Telomersequenzen des Genoms der Zelle. Dabei handelt es sich um die Verkürzung sich wiederholender DNS-Sequenzen am Ende eukaryotischer Chromosomen, die sogenannten Telomere.

Daraus resultierend kommt es zu replikativer Seneszenz und einer Dysfunktion der Mitochondrien in den betroffenen Organen und Gewebeteilen [10]. Wenn die Telomerlänge im Zuge zahlreicher Replikationsvorgänge vollends aufgebraucht ist, kann keine Replikation der betroffenen Zelle mehr erfolgen. Auch in diesem Fall geht die Zelle dann entweder in einen apoptotischen Zustand oder einen „seneszenten Zellzyklusstillstand“ über [8].

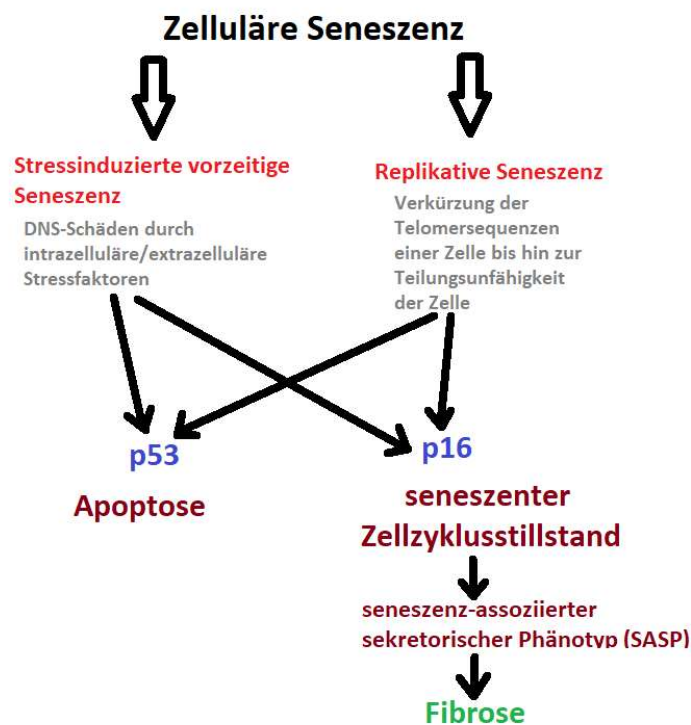


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Formen zellulärer Seneszenz. Eigene Darstellung, modifiziert nach Knoppert, et. al. „Cellular Senescence and the Kidney: Potential Therapeutic Targets and Tools“ [8]

Zelluläre Seneszenz begünstigt die Entstehung von Entzündung und Fibrose. Dabei nehmen die seneszenten Zellen einen „seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp“ (SASP) an, woraufhin sie vermehrt profibrotische und inflammatorische Faktoren synthetisieren. Diese Faktoren wirken sich dann ebenfalls auf benachbarte gesunde Zellen aus und können entsprechende Veränderungen in diesen Zellen und letztlich im gesamten Gewebe / Organismus auslösen [8].

Morphologie der Gefäßwand

Die arteriellen herznahen Gefäße und arteriellen Herzgefäße, welche eine vom Herzen wegleitende Strömungsrichtung haben, sind in der Literatur einheitlich mit einem

dreischichtigen Wandaufbau beschrieben. Dies gilt auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Arteria carotis.

Dabei wird die innere Wandauskleidung dieser Gefäße von der **Tunica intima** formiert, welche sich in das Gefäßendothel, eine *Lamina subendothelialis* (*Stratum subendotheliale*) und eine *Membrana/Lamina elastica interna* unterteilen lässt. Bei dem Gefäßendothel handelt es sich um eine Schicht längs angeordneter, flacher Zellen, welche durch *tight-* und *gap junctions* eng miteinander verbunden sind [11] und das Gefäßlumen auskleiden. Die Endothelzellschicht liegt einer Basalmembran auf [12]. Dieser Basalmembran schließt sich die *Lamina subendothelialis* an, bei der es sich um eine Schicht aus kollagenem und elastischem Bindegewebe mit geringem zellulärem Anteil handelt. Sie formiert eine selektive Diffusionsbarriere zwischen dem Gefäßlumen und den anderen Wandschichten. Auf die *Lamina subendothelialis* folgt die *Membrana elastica interna*, welche eine Trennschicht zwischen Tunica intima und Tunica media darstellt. Die *Membrana elastica interna* besteht aus einer Schicht elastischer Fasern. Je nach Altersstadium oder bei Erkrankung kann sie auch fragmentiert oder doppelt auftreten oder sogar teilweise fehlen. So besteht sie bei Neugeborenen aus einer einzigen Zellschicht und entwickelt sich mit zunehmendem Alter und in Abhängigkeit von der lokalen Hämodynamik zu einer mehrschichtigen zellreichen, subendothelialen Formation [12].

Die **Tunica media** besteht aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen (engl. *Vascular smooth muscle cells* (VSMCs)) und wird von einer Schicht zirkulär orientierter elastischer Fasern durchzogen, weist aber auch extrazelluläre Matrixproteine und Proteoglykane auf. Nach außen abgegrenzt wird die Tunica media durch eine dünne Elastinschicht, welche die *Membrana elastica externa* bildet und sie von der Tunica adventitia trennt [12, 13]. Die glatten Muskelzellen der Tunica media bilden kontraktile Proteine, vor allem Smooth Muscle α -Actin (SMA), welches auch als Marker für differenzierte glatte Muskelzellen Verwendung findet. Diese reagieren auf bestimmte Botenstoffe und Neurotransmitter und regulieren durch Kontraktion oder Relaxation den Gefäßdurchmesser und damit die Blutflussrate. Die glatten Muskelzellen der *Tunica media* haben normalerweise eine sehr niedrige Proliferationsrate und erfüllen ihre physiologische Funktion in einem kontraktiven Phänotyp. Nach Stimulation (z.B. durch eine Gefäßverletzung) oder andere Reize können sie allerdings in einen

proliferativen, entdifferenzierten Phänotyp übergehen und weisen dann eine vermehrte Migration und Proliferation auf [13].

Die äußerste Schicht des Gefäßes bildet die **Tunica adventitia**, bei der es sich um eine Schicht konturlos abgegrenzten Bindegewebes handelt, welches mit elastischen und kollagenen Fasern durchzogen ist. Des Weiteren wird die *Tunica adventitia* innerviert und durch *Vasa vasorum* mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt [11]. Während die *Tunica media* kaum Entzündungszellen aufweist, enthält die *Tunica adventitia* hingegen Immunzellen und dendritische Zellen, deren Zahl unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren zunehmen kann. Diese sezernieren chemotaktische Faktoren, wodurch sie weitere Entzündungszellen rekrutieren [12, 13]. Wie sich die Morphologie der einzelnen Schichten der arteriellen Gefäßwand im Alter verändert, ist nur wenig bekannt.

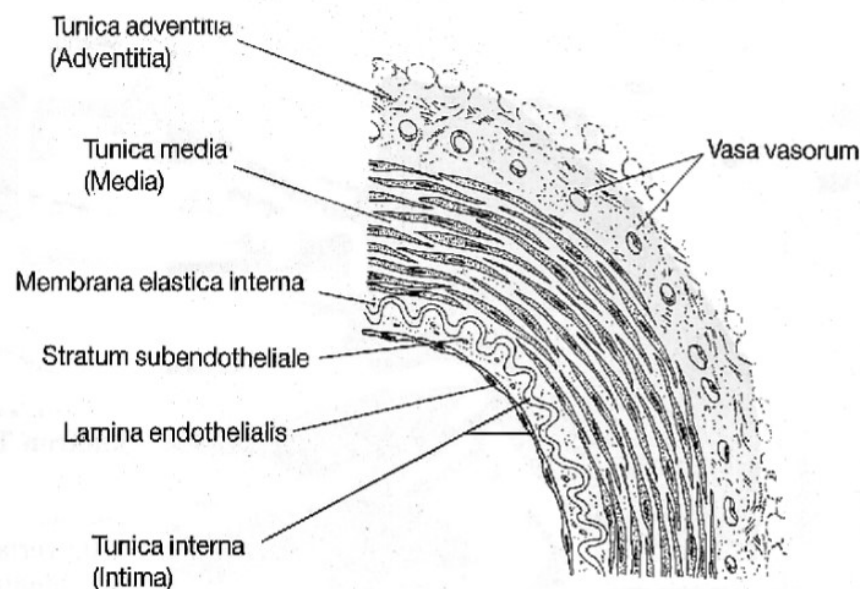


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wandaufbaus einer Arterie (aus Wolf, T., „Experimentelle histomorphometrische, histomorphologische und angiographische Untersuchungen zum Einfluss einer immunsuppressiven Koronarstentbeschichtung mit Tacrolimus im Schweinemodell.“ 2003)[12]

Morphologie des perivaskulären Fettgewebes (PVAT) und dessen Einfluss auf die Gefäßwand

Das **PVAT** (perivaskuläre Fettgewebe, engl. *perivascular adipose tissue*) wird in der Literatur als metabolisch aktiver, endokriner Gewebeteil der Gefäßwand aller großen Gefäße beschrieben. Dabei fungiert es nicht als Energiespeicher, sondern hat eine Stütz- und Schutzfunktion und synthetisiert Zytokine (sogenannte Adipokine), welche

das vaskuläre Gleichgewicht regulieren [14-16]. Unter physiologischen Bedingungen weist das PVAT überwiegend protektive Eigenschaften auf, diese können jedoch unter verschiedenen Einflussfaktoren verloren gehen und sogar einen schädlichen Einfluss auf die davon umgebene Gefäßwand haben, unter anderem auch aufgrund von Veränderungen des Expressionsmusters des PVAT [15, 17]. Infolge des veränderten Expressionsmusters des PVAT können vaskuläre Umbauprozesse in Gang gesetzt werden [15].

Die protektive Wirkung des PVAT gegen Intimahyperplasie und kardiovaskuläre Erkrankungen beruht auf einer höheren Expression anti-inflammatorischer Faktoren und einer niedrigeren Expression pro-inflammatorischer Mediatoren innerhalb des PVAT, welche ihre Wirkung lokal entfalten. Dabei spielt das Peptidhormon Adiponectin aufgrund seines vaskuloprotektiven Effekts eine wichtige Rolle, während das Adipokin Leptin systemisch und lokal vorwiegend negative Auswirkungen auf die Gefäßwand hat [16, 18]. Zudem wird in gesundem PVAT Prostacyclin exprimiert, welches eine verbessernde Wirkung auf die Endothelfunktion hat und die Entstehung von Atherosklerose unterbinden kann [15, 19].

Unter pathologischen Bedingungen (z.B. Fettleibigkeit [20], metabolische Krankheiten (z.B. Diabetes mellitus Typ II, Glukoseintoleranz), lokaler Entzündung, oxidativem Stress, Rauchen) verliert das PVAT seine protektive Wirkung, nimmt eine schädliche Wirkung an und trägt damit vermutlich zur Entstehung kardiovaskulärer Krankheitsbilder bei. Unter einem oder mehreren dieser äußeren Einflussfaktoren kommt es innerhalb der perivaskulären Adipozyten zu einem veränderten Expressionsmuster vasoaktiver Substanzen. Eine vermehrte Expression pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-8), Leptin sowie MCP-1 (Monozyten-Chemoattraktions-Protein 1) und eine herunterregulierte Expression anti-inflammatorischer Zytokine (Adiponectin, Prostacyclin, etc.) tritt ein und kann die Entstehung einer Intimahyperplasie und kardiovaskulärer Krankheitsbilder herbeiführen [15, 17, 19].

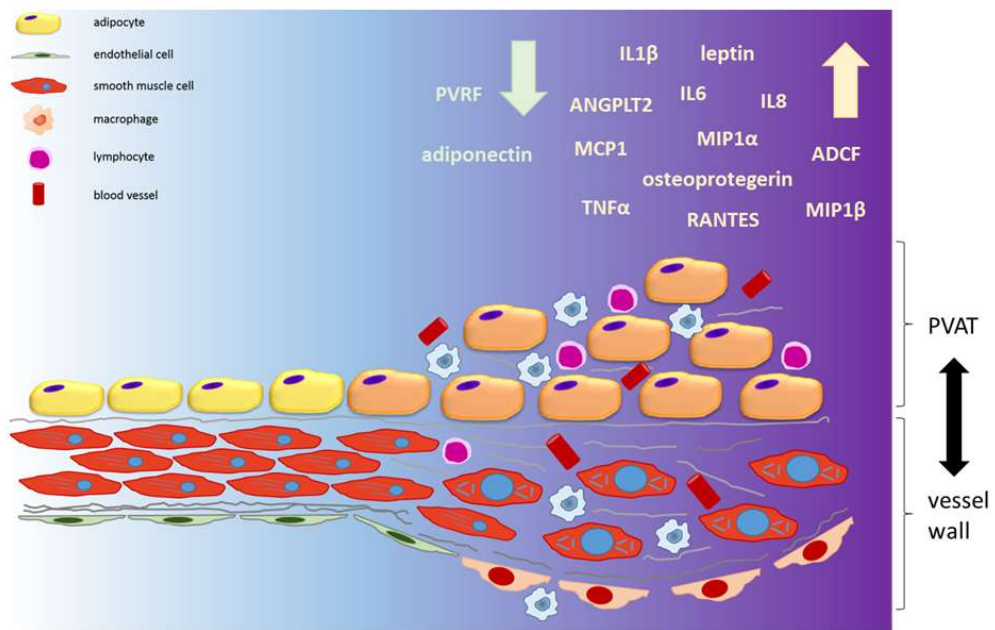
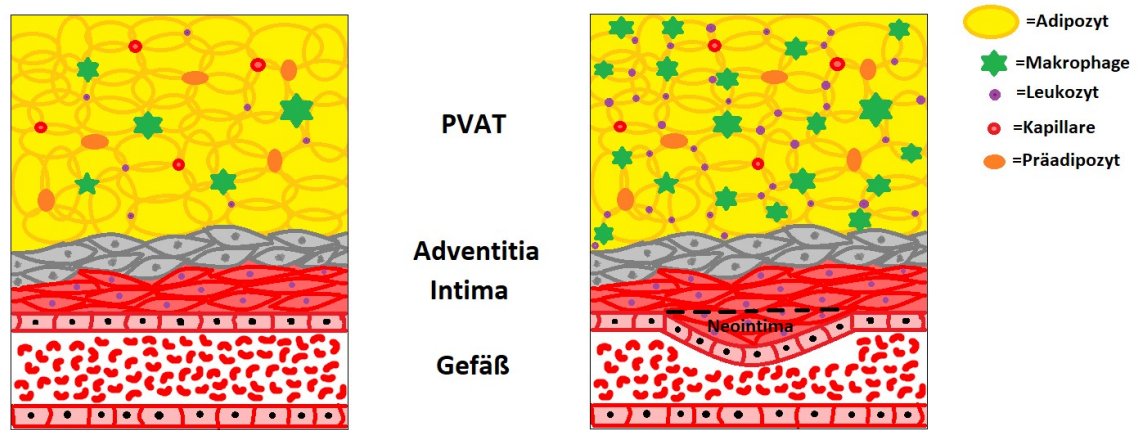


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Veränderung der Gefäßwand und des PVAT bei erhöhter Expression pro- und reduzierter Expression anti-inflammatorischer Faktoren innerhalb des PVAT, bedingt durch kardiovaskuläre Einflussfaktoren (z.B. Diabetes mellitus Typ 2, Übergewicht, etc.), wie im Text erläutert. Aus Schäfer et. al. „Perivascular adipose tissue: epiphenomenon or local risk factor?“ [15].

Infolgedessen geht das PVAT in einen pro-inflammatorischen Zustand über und es kommt zu einer vermehrten Infiltration mit Makrophagen und Leukozyten um das Gefäß herum. Dieser pro-inflammatorische Zustand fördert die Migration von glatten Muskelzellen und Myofibroblasten in die *Tunica intima* des betroffenen Gefäßes, woraufhin es zu einer Gefäßwandverdickung (im Sinne einer Atherosklerose oder auch Neointimabildung) kommen kann. Der proinflammatorische Zustand begünstigt wiederum die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und im weiteren Verlauf die Entstehung des Krankheitsbilds der Atherosklerose [19, 21].



Zustand physiologisch

Zustand pathologisch

(Makrophagen-, Leukozyten- und Adipozytenakkumulation → Neointimabildung)

Abbildung 4: Neointimabildung eines Gefäßes mit Makrophagen-, Leukozyten- und Adipozytenakkumulation. Eigene Darstellung, modifiziert nach Horimatsu, T. et. al. „Remote Effects of Transplanted Perivascular Adipose Tissue on Endothelial Function and Atherosclerosis“ [19].

Wie Studien gezeigt haben ist die Verschlechterung der Eigenschaften des PVAT teilweise nach Gewichtsverlust, kardiovaskulärer Medikation (Statine und Fibrate) und körperlicher Betätigung reversibel [15].

Im Alter sinkt kontinuierlich die Differenzierungsfähigkeit der PVASCs (perivaskuläre glatte Muskelzellen (engl. *perivascular adipose smooth muscle cells*)) [17]. Diese weniger differenzierten Zellen migrieren in die nahe gelegene Tunica intima der betreffenden von PVAT umgebenen Arterie und führen dort zu einer Neointimahyperplasie. PVAT kann folglich an der Entstehung von Gefäßerkrankungen beteiligt sein [22]. Auch ein im Alter erhöhter Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies in den funktionsgestörten Adipozyten des PVAT kann zur Endotheldysfunktion beitragen. Diese Faktoren sind folglich mitverantwortlich für die mit zunehmendem Alter auftretende „**arterielle Seneszenz**“, bei der es zu Neointimabildung, vaskulärer Fibrose und einem daraus folgenden Verlust der arteriellen Elastizität kommt [17, 23]. Inwiefern das PVAT zur vaskulären Dysfunktion im Rahmen des Alterungsprozesses beiträgt, ist allerdings in der Literatur bisher nur sehr unzureichend beschrieben.

Morphologie des viszeralen Fettgewebes (VAT) und Einfluss von Alter und anderen Faktoren

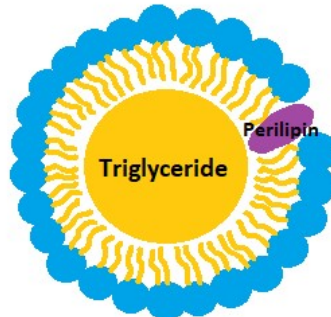
Das **VAT** (viszerales Fettgewebe, engl. *visceral adipose tissue*) ist in der Literatur als ein physiologischer Energiespeicher beschrieben, welcher vor Allem dann Energie in Form von Triacylglyceriden speichert, wenn das Individuum eine erhöhte genetische Prädisposition dazu aufweist oder die Speicherkapazität des subkutanen Fettgewebes ausgelastet ist [24]. Seine Hauptlokalisation liegt im Mesenterium und Omentum. Der Anteil des VAT an der Gesamtfettmasse des Körpers liegt bei Männern bei 10-20% und bei Frauen bei 5-8% [24]. Allerdings steigt der Fettanteil mit zunehmendem Alter [3], was zu den negativen Wirkungen von Alter im Gefäßsystem beitragen könnte. Eine erhöhte viszerale Fettgewebsablagerung kann auch ein Hinweis auf eine koronare Herzerkrankung sein, da bei der viszeralen Adipositas das Risiko einer KHK 1,4-fach erhöht ist [15]. Zwar gilt eine erhöhte viszerale Fettgewebsablagerung nicht als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor, allerdings ist sie ein Indikator für das Vorhandensein anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren [25].

VAT ist sehr gut innerviert und kapillarisiert. Venöses Blut aus dem VAT fließt direkt in die Portalvene der Leber ab, wo es ermöglicht, dass Adipokine oder Fettsäuren aus dem VAT direkt auf Hepatozyten wirken und hepatische Immunmechanismen (z.B. Produktion von Entzündungsmediatoren) auslösen können [24].

Unter bestimmten Einflussfaktoren kann es zu einer erhöhten Einlagerung von Triacylglyceriden in die Adipozyten des VAT kommen. Mögliche ätiologische Faktoren für diese Triacylglycerid-Akkumulation innerhalb der Adipozyten des VAT sind neben Überernährung und mangelnder Bewegung vor allem Alter, Geschlecht, Sexual- und Wachstumshormone, Endocannabinoid- sowie Hypothalamus-Hypophysen Nebennierenrinden-Systeme und Glucocorticoide [26]. Infolgedessen kommt es zu einer Expression proinflammatorischer Adipokine, oxidativem Stress und der Aktivierung des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Diese Einlagerung von Triacylglyceriden in die Adipozyten des VAT kann wiederum die Entstehung kardio-metabolischer Erkrankungen begünstigen. Dazu gehören unter anderem Diabetes mellitus Typ II und damit assoziierte chronische Entzündungen, Dyslipidämie, Bluthochdruck, Metabolisches Syndrom und linksventrikuläre Hypertrophie des Herzens [26]. Ob morphologische Veränderungen der viszeralen Adipozyten im Alter auftreten, ist in der Literatur kaum beschrieben.

Perilipin

Perilipin wird in der Literatur als ein in den Lipidtröpfchen umgebenden Monolayer (aus Phospholipiden) eingelagertes Protein beschrieben. Seine Hauptfunktion ist die Translokation der Hormonsensitiven Lipase aus dem Zytosol in das Lipidtröpfchen [27].



außen: Monolayer aus Phospholipiden
innen: Lipidtröpfchen

Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Lipidtröpfchens, welches von einem Monolayer aus Phospholipiden umgeben ist, in den Perilipin eingelagert ist. Eigene Darstellung, modifiziert nach Albus C., et. al. „Lexikon der Ernährung Lipolyse“ [27].

Dabei wird Perilipin zunächst durch die Proteinkinase A phosphoryliert und geht dabei in einen aktivierten Zustand über, in dem es ihm möglich ist, die Translokation der Hormonsensitiven Lipase aus dem Cytosol in das Lipidtröpfchen zu vermitteln [28].

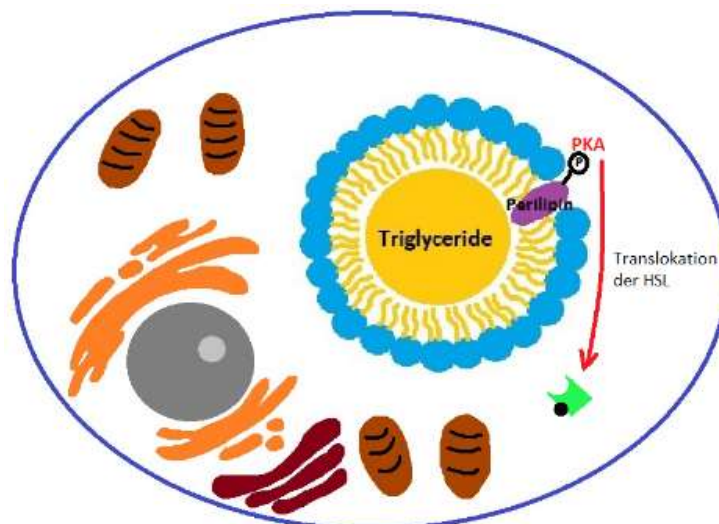


Abbildung 6: Aktivierung von Perilipin durch Phosphorylierung. Dargestellt ist ein Adipozyt, in dem Perilipin, welches durch die Phosphorylierung der Proteinkinase A in einen aktiven Zustand versetzt wurde, die Translokation der Hormonsensitiven Lipase aus dem Cytosol in das Lipidtröpfchen katalysiert. Eigene Darstellung, modifiziert nach Miyoshi, H. et. al. „Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated mechanisms“ [28].

Die Hormonsensitive Lipase katalysiert dann wiederum die Lipolyse im Lipidtröpfchen, wobei Triacylglyceride zu Mono-/Diglyceriden, freien Fettsäuren, Glycerin oder Cholesterin gespalten werden. Allgemein sind 50% der zellulären Hormonsensitiven Lipase im basalen Zustand Lipidtröpfchen-assoziert, während die andere Hälfte frei im Cytosol vorliegt [28].

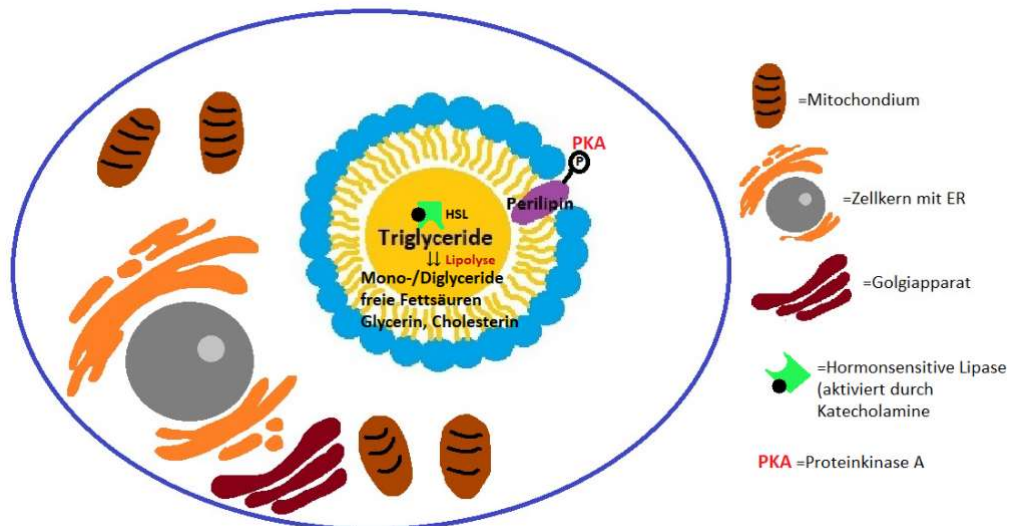


Abbildung 7: Hormonsensitive Lipase bei Lipolyse. Dargestellt ist die Hormonsensitive Lipase, welche im Lipidtröpfchen des Adipozyten die Lipolyse aus Triacylglyceriden in Mono-/Diglyceride, freie Fettsäuren, Glycerin und Cholesterin katalysiert. Eigene Darstellung, modifiziert nach Miyoshi, H. et. al. „Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated mechanisms“ [28].

Sirtuin-1 (SIRT 1)

SIRT 1 (Sirtuin-1) ist laut aktuellem Literaturstand eine NAD-abhängige Deacetylase und fungiert als Schlüsselenzym mit antiseneszenten und antiinflammatorischen Eigenschaften [29]. Es unterstützt die Endothelfunktion und fördert vasodilatatorische Gefäßreaktionen durch NAD-abhängige Deacetylierung von intrazellulären Proteinen (z.B. Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase, FOXO1, LKB 1, Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor). SIRT 1 hat somit einen protektiven und antiseneszenten Effekt am Gefäßendothel. Es wird in seneszenten Endothelzellen folglich weniger exprimiert. Die SIRT-1 Aktivität wird post-translational durch die Cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK 5) moduliert und durch Phosphorylierung inaktiviert [29, 30].

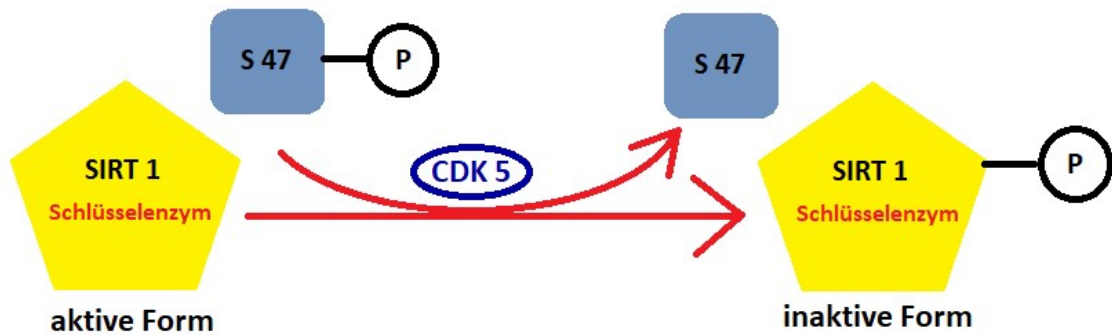


Abbildung 8: Modulation der SIRT 1 Aktivität durch die Cyclin-abhängige Kinase 5. Eigene Darstellung, modifiziert nach Bai, B. et. al. „Cyclin-dependent kinase 5-mediated hyperphosphorylation of sirtuin-1 contributes to the development of endothelial senescence and atherosclerosis“ [29].

Als Folge der Inaktivierung von SIRT 1 durch CDK 5 kommt es zu einer Unterbindung des antiseneszenten und antiinflammatorischen Effekts durch Kernretention und Protein-Komplex-Bildung von SIRT 1 [29, 30].

Prelamin A

In der aktuellen Literatur wird **Prelamin A** als ein Biomarker für seneszente und/oder erkrankte, degenerierte vaskuläre glatte Muskelzellen beschrieben. Unter physiologischen Bedingungen wird Prelamin A posttranslational durch Farnesylierung modifiziert und anschließend durch das Enzym FACE 1/ Zmpste 24 (Zinc Metallopeptidase STE24) gespalten, wobei die Farnesylgruppen entfernt werden und reifes Lamin entsteht, welches anschließend in die Kernhülle integriert werden kann.

Unter pathologischen Bedingungen wird die Expression des Enzyms FACE 1/ Zmpste 24 herunterreguliert und es kommt zu einer Akkumulation von Prelamin A in der Zelle. Das akkumulierte Prelamin A führt dann zur Unterbrechung von Mitosevorgängen und zu Mitosefehlern. Zudem kann es zu DNS-Schäden und genomischer Instabilität der Zelle kommen. Dadurch beschleunigt Prelamin A den Alterungsprozess vaskulärer glatter Muskelzellen und führt zu einer verfrühten Seneszenz [31].

Smooth muscle α -actin (SMA)

SMA (Smooth muscle α -actin) ist ein Marker für differenzierte, kontraktile, nicht proliferative glatte Muskelzellen [32]. Während die glatten Muskelzellen gesunder

Arterien viel SMA exprimieren, ist die Expression von SMA in den glatten Muskelzellen erkrankter oder verletzter Arterien reduziert. Diese weisen folglich ein entdifferenziertes Bild mit vermehrt migratorischen, proliferativen und reduzierten kontraktiven Eigenschaften auf. Die Entdifferenzierung glatter Muskelzellen ist Bestandteil des Krankheitsbilds Arteriosklerose, bei der es zu einer Intimahyperplasie aufgrund einer vermehrten Einwanderung von Zellen der Media und in fortgeschrittenen Stadien zum Zelluntergang und einer ausgedünnten Intima mit Lipidplaque kommt [32, 33]. Diese Plaque kann rupturieren und eine Thrombusbildung hervorrufen [32], wobei dieses Risiko in Plaques mit niedrigem Gehalt glatter Muskelzellen und damit geringerer Stabilität erhöht ist.

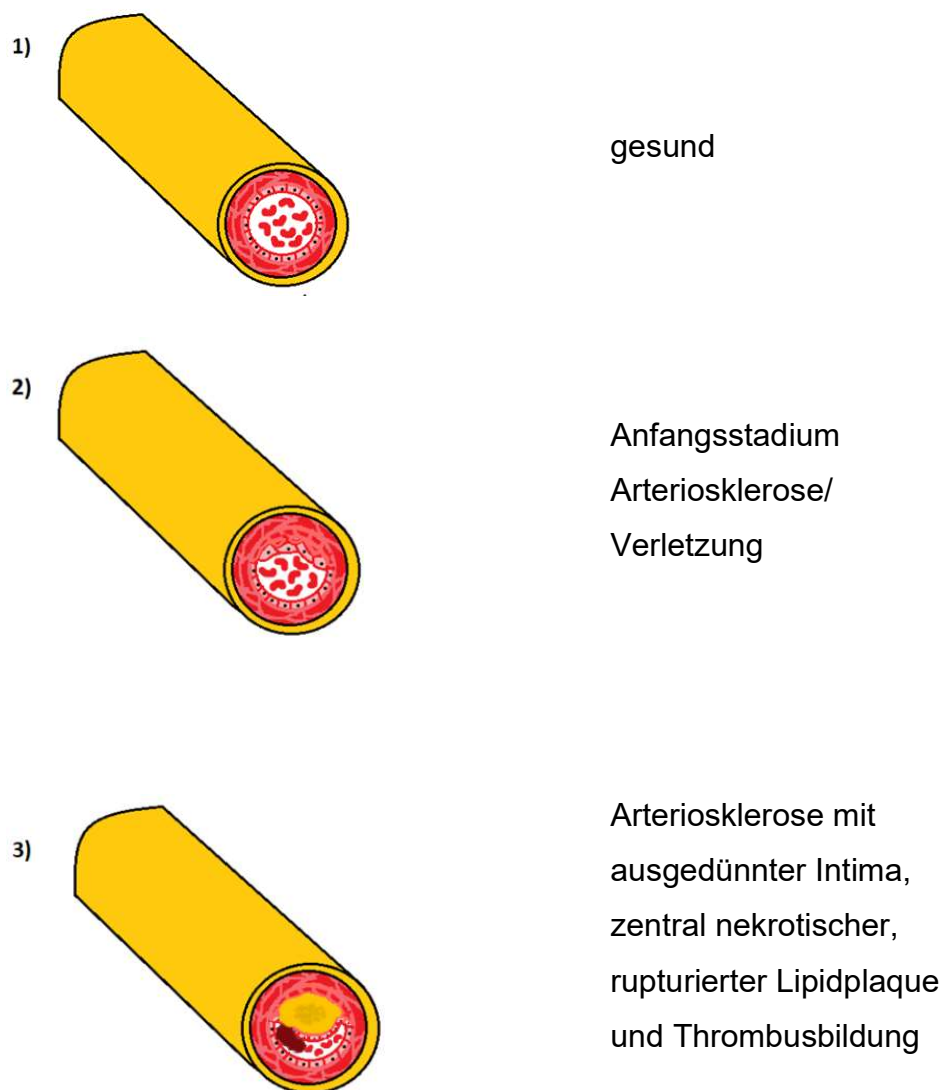


Abbildung 9: Schematische Darstellungen verschiedener atherosklerotischer Stadien. Darstellung eines gesunden Gefäßes (1), eines Gefäßes, welches sich im Anfangsstadium des arteriosklerotischen Krankheitsbilds befindet (2) und eines Gefäßes, bei dem eine ausgedünnte Intima, eine zentral nekrotische, rupturierte Lipidplaque und eine Thrombusbildung dargestellt ist (3). Eigene Darstellung, modifiziert nach Chen et. al. „Smooth Muscle-Alpha Actin

Cystein-rich-protein 2 (CSRP 2)

Cystein-rich-protein 2 (CSRP 2) ist ein Faktor, der in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen exprimiert wird. Seine Hauptfunktion ist die Unterbindung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in Gefäßen. CSRP 2 ist mit dem Zytoskelett assoziiert und interagiert mit dem Gerüstprotein „Phospho-p 130 cas“, welches für die Ausbildung von Pseudopodien (Lamellipodien) verantwortlich ist [34]. Glatte Muskelzellen, die einen hohen Anteil an CSRP 2 in sich tragen, haben eine geringere Tendenz zur Ausbildung von Pseudopodien (Lamellipodien), welche für die Zellmigration notwendig sind [34]. Man kann daher vermuten, dass CSRP 2 einen protektiven Effekt für die Blutgefäße vor Neointimabildung und Arteriosklerose hat. Wie sich Altern auf die Expression von CSRP 2 auswirkt, ist unbekannt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere, Futtermittel und Haltungszubehör

Im Folgenden sind die für unser Projekt verwendeten Versuchstiere, das Futtermittel und Haltungszubehör sowie Medikamente und Lösungen zur Durchführung der Gewebeentnahme und -fixierung aufgelistet.

Versuchstiere

Tabelle 1: Versuchstiere

Mauslinie	Quelle
C57BL/6JRj Wildtyp-Mäuse	JANVIER LABS (Saint-Berthevin, FRA)

Futter und Haltungszubehör

Tabelle 2: Futter und Haltungszubehör

Beschreibung	Quelle
Normales Nagetierfutter Ssniff® → Rohfett 3,4% (9 kJ% Fett)	Ssniff® Spezialdiäten GmbH (Soest, DE)
Käfig vom Typ 2 (mit Maßen von 265 x 205 x 140 mm und einer Laufbodenfläche von 360 cm ²) → Aufliegend ein Gitterdeckel mit integriertem Trennblech Typ 2/5023621 → Konventioneller Filterhaube vom Typ FIH 2-MB → Tränkflasche mit Tränkkappe → Maus-Tunnel (Länge: 100 mm, Durchmesser: 50 mm)	ZOONLAB GmbH (Castrop-Rauxel, DE)
Einstreumaterial	Standardmaterial der Versuchstiereinrichtung



Abbildung 10: Beispielhafte Abbildung eines Käfigs mit Gitterdeckel und Zubehör. Aus „Käfige, Gitterdeckel und Zubehör für Kleinnager“ [35].

3.1.2 Anästhesie und Lösungen für Gewebeentnahme und -fixierung Maus

Tabelle 3: Medikamente bei Gewebeentnahme Maus

Medikament	Firma
Isotone 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Ketamin 10%ige Injektionslösung (50 mg/ml)	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH (Ascheberg, DE)
Xylazin 2%ige Injektionslösung	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf, DE)

Tabelle 4: Gewebefixierung bei Gewebeentnahme

Gewebefixierung		
Zinkformalin-Gebrauchslösung	Zinkformalin Konzentrat	200 ml
	ddH ₂ O	800 ml

3.1.3 Für Immun-/Histochemie verwendete Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen, Seren und Antikörper

Aufgelistet sind nachfolgend die bei immun-/histochemischen Färbungen verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen, Seren und Antikörper.

Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma	Artikelnummer
Acid Fuchsin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	F-8129
Anilinblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	4002.1
<i>Antibody Diluent</i>	Abcam (Cambridge, GBR)	ab64211
Aqua dest	Merck KGaA (Darmstadt, DE)	PB0001EN00 10171754, 10171760
Citratpuffer 0,01 M; pH 6,0 (Citronensäure Monohydrat)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	C1909
EDTA	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)	A4892
Eisenchlorid 10%	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	236489
Entellan	Merck KGaA (Darmstadt, DE)	1.07961.0100
Eosin G-Lösung 0,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	X883.1
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	3738.4
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	T913.3
Ethanol 96%	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)	A2551
Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	K928.4

Formaldehyd 4%	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)	361387P
Gill's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	GHS332
Hämalaun sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	T865.2
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	3816.2
HCl-Lösung 20%	Applichem GmbH (Darmstadt, DE)	A3397
<i>ImmuMount</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	9990412
Jod	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	X864.1
Kaliumjodid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	6750.1
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	CP43.2
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	PO34.2
<i>Normal Goat Serum</i> (NGS)	Abcam (Cambridge, GBR)	ab156046
<i>Normal Rabbit Serum</i> (NRS)	Abcam (Cambridge, GBR)	ab166640
PBS 10X	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	70011-051
Phosphomolybdänsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	4440.3
Phosphotungstensäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	P6395
Pikrinsäure (gesättigt)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	P6744-1GA

Ponceau Biebrich-Scarlett	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	B6008
Roticlear	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	A538.5
Roti-Liquid Barrier	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	AN92.1
TRIS	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)	A4577
Triton-X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	3051.3
Van Gieson-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	3925.1
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	9681,4
Xylol >98%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)	9713.3

Färbe-Kits

Tabelle 6: Kits

Name	Firma	Artikelnummer
AEC Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories Inc, (Burlingame, CA, USA)	SK-4200
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories Inc, (Burlingame, CA, USA)	SK-4100
VectaStain ABC-Kit Elite	Vector Laboratories Inc, (Burlingame, CA, USA)	PK-6100

Zubereitung von Lösungen für Färbungen

Tabelle 7: Zubereitung von Farbe-Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	ml
Acid-Fuchsin 1%	Acid Fuchsin	1 g
	ddH ₂ O	100 ml
AEC-Kit	ddH ₂ O	5 ml
	Puffer Stock Lösung	2 Tropfen
	AEC Stock Lösung	3 Tropfen
	Hydrogen Peroxidase	2 Tropfen
Alkohol-Hämatoxylin-Lösung 10%	Hämatoxylin	10 g
	100% Ethanol	100 ml
Anilinblau-Lösung 2,5%	Anilinblau	2,5 g
	ddH ₂ O	100 ml
	100% Essigsäure	2 ml
Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin	1% Ponceau Biebrich-Scarlett	90 ml
	1% Acid Fuchsin	10 ml
	100% Essigsäure	1 ml
Bouin's Fixative	Pikrinsäure, gesättigt	750 ml
	37% Formaldehyd	25 ml
	100% Essigsäure	50 ml

Citratpuffer 0,01 M, pH 6,0	0,1 M Citratpuffer pH 6,0; 10x Stock	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
Citratpuffer 0,1 M, pH 6,0 10X Stock	Citronensäure Monohydrat	21,01 g
	ddH ₂ O	1000 ml
	pH-Wert auf 6,0 einstellen	
DAB-Chromogen	ddH ₂ O	5 ml
	Puffer Stock Lösung	2 Tropfen
	DAB Stock Lösung	4 Tropfen
Eisenchlorid-Lösung 2%	10% Eisenchlorid-Lösung	20 ml
	ddH ₂ O	80 ml
Eisenchlorid-Lösung 10%	Eisenchlorid	10 g
	ddH ₂ O	100 ml
Essigsäure 1%	Essigsäure	1 ml
	ddH ₂ O	99 ml
H ₂ O ₂ in Methanol 3%	30% H ₂ O ₂	50 ml
	Methanol	450 ml
Natriumthiosulfat-Lösung 5%	Natriumthiosulfat	5 g
	ddH ₂ O	100 ml
PBS 1X	10X PBS	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
Phospholybdic- Phosphotungstic-Lösung	Phosphomolybdänsäure	1,25 g

	Phosphotungstensäure	1,25 g
	ddH ₂ O	100 ml
Ponceau Biebrich-Scarlett 1%	Ponceau Biebrich-Scarlett	1 g
	ddH ₂ O	100 ml
TRIS 0,01 M / EDTA 0,001 M, pH 9,0 (gebrauchsfertig)	0,1 M TRIS / 0,01 M EDTA pH 9,0 10X Stock	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
TRIS 0,1 M / EDTA 0,01 M, pH 9,0 10X Stock	TRIS	12,1 g
	EDTA	3,72 g
	ddH ₂ O pH 9,0 auf einstellen	1000 ml
TritonX-100 0,05%	Triton-X-100	50 µl
	1X PBS	100 ml
VectaStain ABC-Kit Elite	1X PBS	5 ml
	Lösung A	2 Tropfen
	Lösung B	2 Tropfen
Verhoeff's Elastica Färbelösung	10% Alkohol-Hämatoxylin- Lösung	20 ml / 40 ml
	100% Ethanol	20 ml / 40 ml
	10% Eisenchlorid-Lösung	20 ml / 40 ml
	gut mischen, dann folgende Lösung hinzufügen:	

	Verhoeff's Iod Lösung	20 ml / 40 ml
Verhoeff's Iod-Lösung	Jod	2 g
	Kaliumjodid	4 g
	ddH ₂ O	100 ml

Verdünnung der Normalseren für Immunhistochemie

Tabelle 8: Verdünnung der Normalseren für Immunhistochemie

Lösung	Zusammensetzung	ml
10% Normal Goat Serum	100% Normal Goat Serum	500 µl
	1X PBS	4500 µl
5% Normal Goat Serum	10% Normal Goat Serum	1 ml
	ddH ₂ O	1 ml
10% Normal Rabbit Serum	100% Normal Rabbit Serum	500 µl
	1X PBS	4500 µl

Primärantikörper und Sekundärantikörper

Tabelle 9: Primärantikörper

Name	Firma	Artikelnummer
Goat polyklonaler anti-mouse/human CSRP 2	Novus Biologicals, (Littleton, CO, USA)	NB100-77341
Mouse monoklonaler anti-Maus/ Human SM α-Aktin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	A2547
Rabbit monoclonal anti-mouse / human Perilipin	Cell Signaling Technology Inc (Dallas, Texas, USA)	#9349S
Rabbit polyklonaler anti-Prelamin A	Abcam (Cambridge, GBR)	ab55431
Rabbit polyclonal anti-mouse / human SIRT 1	Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, Texas, USA)	Sc15404

Tabelle 10: Sekundärantikörper

Name	Firma	Artikelnummer
Biotin XX Goat Anti Mouse IgG	Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)	B2763
Biotin XX Goat Anti Rabbit IgG	Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)	B2770
Biotin XX Rabbit Anti Goat IgG	Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)	A10518

Tabelle 11: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Antikörper

Primär-AK mit Firma	Verdünnung	Permeabilisierung	Ag-Demaskierung	Blokkierung Sek.-AK	Verdünnungsmittel	Sek.-AK mit Firma	Chromogen
CSRP2 Novus biological, (NB100-77341)	1:80	0,05% Triton-X	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	NRS	1X PBS	Rabbit-anti-goat (Molecular Probes: A 10518)	AEC
Perilipin Cell Signaling Technologies (#9349S)	1:200	Nein	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	NGS	AB-Diluent	Goat-anti-rabbit (Molecular Probes: B2770)	AEC
Prelamin A Abcam (ab55431)	1:400	0,05% Triton-X	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	NGS	1X PBS	Goat-anti-rabbit (Molecular Probes: B2770)	AEC
SIRT 1 Proteintech (sc 15404)	1:50	Nein	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	NGS	1X PBS	Goat-anti-rabbit (Molecular Probes: B2770)	AEC
SMA Sigma-Aldrich (A2547)	1:500	Nein	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	NGS	1X PBS	Goat-anti-mouse (Molecular Probes: B2763)	AEC

3.1.4 Für Gewebeaufbereitung und Immun-/Histochemie verwendete Geräte

Nachfolgend sind die für Gewebefixierung, Aufbereitung- und Immun-/Histochemie verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 12: Geräte

Gerät	Firma
Abzug mc6	Waldner Laboreinrichtungen GmbH
Auflichtmikroskop AE31	Motic
Autoklav Webeco EA	Webeco
Centrifuge 5424 R	Eppendorf (Hamburg)
Easypet 3	Eppendorf (Hamburg)
Einbettautomat TP1020	Leica Microsystems (Wetzlar) Microsystems (Wetzlar)
Eismaschine	Scotsman
Eppendorf (Hamburg) μ Cuvette	Eppendorf (Hamburg)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Herasafe™ KSP biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Scientific – Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Heratherm Wärmeschrank 37°C	Thermo Scientific – Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Inkubator Galaxy 170 S	New Brunswick (an Eppendorf (Hamburg) company)
Kamera Auflichtmikroskop Moticam 5.0 MP	Motic
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Magnetrührer VS-C4	VWR (Darmstadt)
Mastercycler nexus gradient	Eppendorf (Hamburg)
MicroPublisher 5.0 RTV	Qimaging
Mikroskop BX51	Olympus (Hamburg)
Mikrowelle	Sharp
Minizentrifuge	Sprout
Objektivrevolver mit Polarisation	Olympus
Pipette Research Plus 0,5-10 μ l	Eppendorf (Hamburg)
Pipette Research Plus 100-1000 μ l	Eppendorf (Hamburg)
Pipette Research Plus 10-100 μ l	Eppendorf (Hamburg)
Polarisator Mikroskop	Olympus
Purelab Ultra	Elga
Timer	TFA Dostmann/Wertheim
Trockenschrank Dry-Line	VWR (Darmstadt)

U725-G Innova Ultra-Low
Temperature Freezer

New Brunswick (Eppendorf company -
Hamburg)

Vortex Genie 2

Scientific Industries

3.1.5 Verwendete Software

Nachfolgend ist die für das Fotografieren und Auswerten der immun-/histochemischen Schnitte verwendete Software aufgeführt.

Tabelle 13: Software

Software	Firma
GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software (La Jolla, Kalifornien, USA)
Image Pro PLUS 7.0	Media Cybernetics (Rockville, Maryland, USA)
Excel Microsoft 365	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
EndNote X7.8	Clarivate Analytics (Philadelphia, Pennsylvania, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Legitimation der Versuchstierhaltung und der tierexperimentellen Untersuchungen

Legitimation

Die Legitimation der Versuchstierhaltung und tierexperimentellen Untersuchungen erfolgte nach §1 der Landesverordnung über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechts (GVBl 2005, S. 146) durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (23 177-07/G13-081-1; 16/10/2013).

Versuchstierhaltung

Die Versuchstierhaltung und Versuchstierversorgung erfolgte in Typ 2-Käfigen der ZOONLAB GmbH [35] durch ausgebildete Tierpfleger und Tierpflegerinnen des *Translational Animal Research Center* (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität

Mainz gemäß validierter Hygiene- und Tierschutzrichtlinien des Landesuntersuchungsamts Rheinland-Pfalz. Diese Käfige wiesen eine Fläche von 360 cm² auf und waren mit einfachen Luftfiltern ausgestattet. Die Aufbewahrung der Käfige mit den Versuchstieren erfolgte in klimatisierten Räumen des TARC, wobei die Temperaturverhältnisse in diesen Räumen auf 20–24°C und die Luftfeuchtigkeitsverhältnisse auf 50–70% (durchschnittlich 55%) reguliert wurden.

Die Lichtverhältnisse wurden in diesen Räumen durch automatisierte Lichtanlagen eingerichtet. Dabei waren diese so eingestellt, dass sie einen regulierten Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden wiedergaben. Die Hellperiode dauerte von 6:00 - 18:00 Uhr und die Dunkelperiode von 18:00 - 6:00 Uhr.

Wasser in Trinkflaschen und Nahrung in tiergerechten Nahrungsbehältern standen den Versuchstieren zur freien Verfügung. Bei der Nahrung handelte es sich um normales Nagetierfutter mit einem Rohfettanteil von 3,4% (Ssniff® Normales Nagetierfutter; siehe 3.1.1 Futter- und Haltungzubehör).

3.2.2 Gewebeentnahme

Um mögliche östrogenzyklusabhängige Effekte auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Dabei handelte es sich um 8 Wochen bzw. 44 Wochen alte C57BL/6JRj Wild-Typ (WT) Mäuse, welche uns in diesem Alter direkt von JANVIER LABS übergeben wurden. Tiere beider Gruppen wurden nach Ankunft im TARC für 8 Wochen mit normalem Nagetierfutter mit einem Rohfettanteil von 3,4% (Normales Nagetierfutter Ssniff®; Ssniff®Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert, und zwar bis zu einem Alter von 16 Wochen (adulte Mäuse) bzw. 52 Wochen (mittel-alte Mäuse).

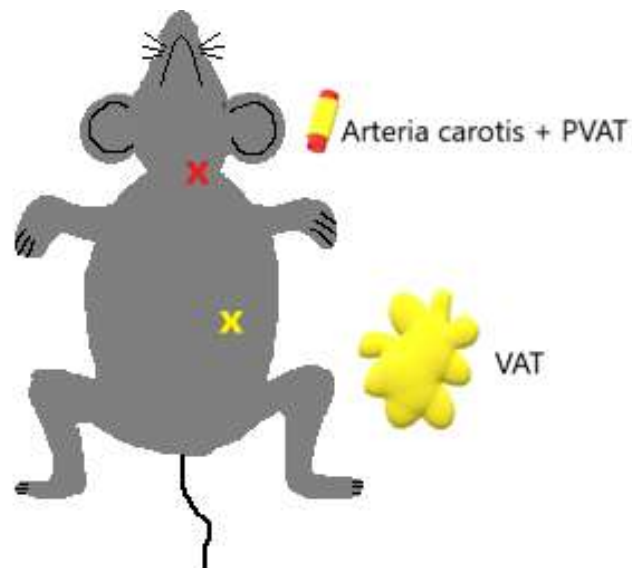


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Maus und der entsprechenden entnommenen Gewebe (Arteria carotis +PVAT, VAT). Eigene Darstellung.

Jede Maus wurde zur eindeutigen Identifizierung und Verbindung anhand einer Registriernummer im PyRAT (*Python-based Relational Animal Tracking-System*) registriert und dazu mit einer Ohrstanze versehen. Bei Erreichen des geplanten Alters (16 bzw. 52 Wochen) wurden die Mäuse unter tiefer Anästhesie durch Genickbruch getötet, sodass anschließend die entsprechenden Gewebe (Arteria carotis mit PVAT und VAT) am toten Tier entnommen werden konnten.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden den Versuchstieren jeweils beide Karotiden mit dem entsprechenden PVAT und VAT entnommen. Auch die Aorta mit entsprechendem PVAT, braunes (interskapuläres) und subkutanes Fettgewebe wurden entnommen, die an diesen Geweben durchgeführten Untersuchungen sind jedoch nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

3.2.3 Einbettung der Gewebe und Herstellung von Paraffinschnitten

Nachdem die Gewebe den Mäusen operativ entnommen wurden, wurden diese Gewebe jeweils in ein Gefäß 4%-iger Zinkformalinlösung (Zinc Formal - FIXX™; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Z2902-3,75L) zur Fixierung eingelegt und das Gefäß zur Zuordnung mit einer internen Maus-Nummer versehen. Diese Maus-Nummer wurde nachfolgend zur Dokumentation in einem Laborbuch mit Datum und Uhrzeit der Entnahme notiert. Die Fixierung in der 4% igen Zinkformalinlösung erfolgte für 24 Stunden, danach wurde das Gewebe bis zur Einbettung in 70% Ethanol gelagert

(bei 4°C). Anschließend erfolgte das Einsetzen der fixierten Gewebe in eine mit der entsprechenden Mausnummer versehene Einbettkassette. Dazu wurde das Gewebe zunächst 15 Minuten mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurde es bei einer Temperatur von 4°C in 70% Ethanol eingelegt und unmittelbar vor der Einbettung nochmal für 2-3 Stunden unter fließendem Wasser abgespült. Erst dann konnte die eigentliche Einbettung in die Einbettkassette erfolgen. Diese erfolgte in einem Einbettautomaten, wobei das Gewebe eine aufsteigende Ethanolreihe zur Entwässerung durchlief und dann in ein Xylol-Intermedium eingelegt wurde. Daraufhin wurden die Gewebe mit Hilfe einer Paraffinausgießstation (LEICA EG 1150 H) in der Einbettkassette zu einem Paraffinblock (Paraffin von Surgipath® Paraplast; Leica Biosystems) ausgegossen. Dabei war zu beachten, dass die Gefäße senkrecht stehend ausgegossen wurden, damit anschließend die Anfertigung von 5 μm dicken Serienschnitten mit einem Mikrotom (LEICA Microsystems, RM 2245) erfolgen konnte. Das Schneiden der Karotisarterien erfolgte an der Karotisbifurkation, beginnend vom distalen zum proximalen Ende.

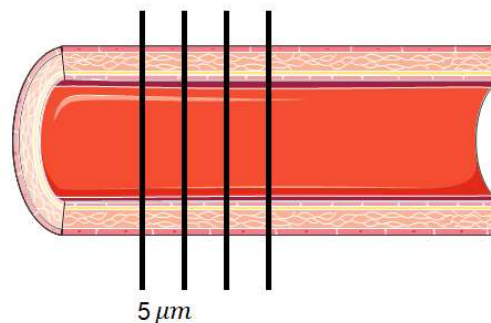


Abbildung 12: Anfertigung von Serienschnitten. Schematische Darstellung zur Anfertigung von 5 μm Serienschnitten mit einem Mikrotom LEICA Microsystems (RM 2245). Das Schneiden erfolgte an der Karotisbifurkation beginnend vom distalen zum proximalen Ende. Modifiziert nach smart SEVIER MEDICAL ART 2020 [36].

Auf jeden Objektträger (Superfrost Ultra, Thermo Fisher Scientific, J3800AMNZ) wurden jeweils 4-5 Serienschnitte appliziert. Dabei geschah das Auffangen der Serienschnitte in einem 20°C Kaltwasserbad und das anschließende Verteilen der Serienschnitte auf dem Objektträger in einem 45°C Warmwasserbad. Nach der Applikation der Schnitte auf die Objektträger wurden diese über Nacht in einen 60°C-Ofen zum Trocknen gestellt.

Nachfolgend ist das Protokoll zur Paraffineinbettung der Gewebe dargestellt.

Tabelle 14: Protokoll Paraffineinbettung Gewebe

Schritt	Lösung	Zeit
Fixierung	4%ige Zinkformalin-Lösung	1 d bis max. 7 d
Lagerung	70%iger Ethanol	max. 7 d
Abspülen	fließendes Leitungswasser	2-3 h
Dehydrieren	ddH ₂ O	0,5 h
	70% iger Ethanol	2 h
	80% iger Ethanol	2 h
	96% iger Ethanol	2 h
	96% iger Ethanol	2 h
	100% iger Ethanol	2 h
	100% iger Ethanol	2 h
Intermedium	Xylol	2 h
	Xylol	2 h
Einbettung (Einbettautomat)	Paraffin	2 h
	Paraffin	4 h
Ausgießen (Paraffinausgießstation)	Paraffin	-

Die Versuchstierhaltung, Gewebeentnahme, Paraffineinbettung sowie die Anfertigung von Serienschnitten und Applikation auf Objektträgern erfolgte durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die Gewebe folglich in Form von auf Objektträgern applizierten Serienschnitten, bereit für die immun-/histochemischen Färbungen, zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Auswahl von Gefäßschnitten für die immun-/histochemischen Untersuchungen

Nach erfolgter Behandlung und Präparierung des entnommenen Gewebes (siehe Kapitel 3.2.3 Einbettung der Gewebe und Herstellung von Paraffinschnitten) wurde bei den jeweiligen histochemischen und immunhistochemischen Färbungen individuell für jede Gruppe (adult und mittel-alt) eine festgelegte Anzahl an Gewebeproben ausgewählt. Alle Gewebe, die sich nach der Gewebeeinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten wegen der nachfolgend dargelegten Gründe als unbrauchbar

herausstellten, wurden aussortiert. Dabei wurde als Übersichtsfärbung eine Verhoeff's Elastica- und Verhoeff's Elastica Masson Trichrom-Färbung der Schnitte angefertigt (siehe Kapitel 3.2.6 Histochemische Färbungen und Analyse der Morphometrie), welche elastische Fasern sichtbar machen und anhand denen die unbrauchbaren Gefäße aussortiert werden konnten.

Gründe für das Aussortieren von Gefäßen

1. Gefäße, die nicht senkrecht eingebettet wurden und infolgedessen schräg angeschnitten waren, da diese für die vorgesehenen Auswertungen ungeeignet waren und die morphometrischen Analysen verfälscht hätten.
2. Gefäße, die sich verzerrt (komprimiert) darstellten, beispielsweise aufgrund von Stauchungen oder Kompressionen während des Einbettvorgangs.
3. Gefäße, die während der Entnahme oder während des weiteren Präparationsverlaufs zerrissen.

Mit einer Auswahl an für die Auswertungen geeigneten Gewebeproben wurden die Untersuchungen durchgeführt. Wie in der nachfolgenden Grafik dargestellt, wurden von insgesamt 47 Proben 6 als nicht auswertbar begutachtet und aussortiert. An den 41 verbliebenen Gewebeproben wurden die histologisch-morphometrischen und immunhistochemischen Färbungen sowie die darauffolgenden Auswertungen durchgeführt.

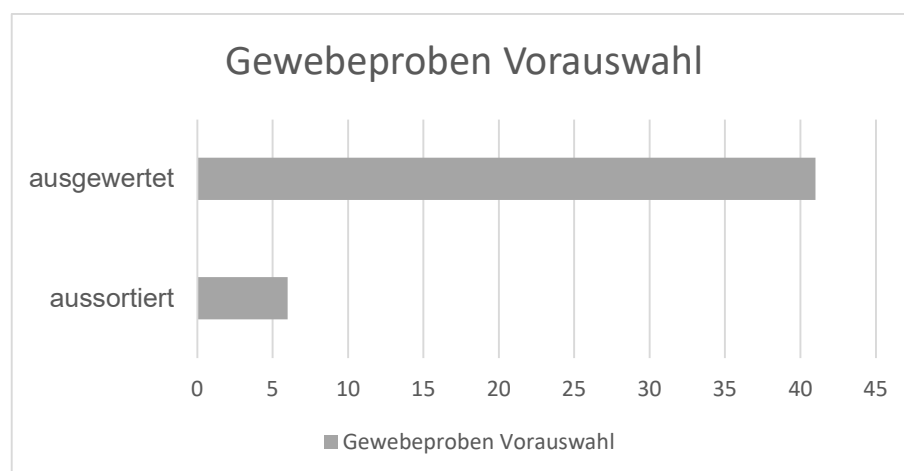


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Vorauswahl an Gewebeproben, die für die histologisch-morphometrischen Auswertungen verwendet bzw. aussortiert wurden, wie oben im Text erläutert. Eigene Darstellung.

Nachfolgend ist diese Auswahl an Gewebeproben anhand der intern zugeordneten Mausnummern tabellarisch aufgeführt.

Adulte Mäuse (C57BL/6Jrj(WT) 16 Wochen alt):

Tabelle 15: Adulte Mäuse (C57BL/6Jrj (WT) 16 Wochen alt)

Maus-Nummer	Pyrat-Nr.	Alter bei Start der Spezialfüttergabe
Mz_ 556.15	KSC-2641	8 Wochen
Mz_ 557.15	KSC-2642	8 Wochen
Mz_ 558.15	KSC-2643	8 Wochen
Mz_ 559.15	KSC-2644	8 Wochen
Mz_ 560.15	KSC-2645	8 Wochen
Mz_ 561.15	KSC-2646	8 Wochen
Mz_ 562.15	KSC-2647	8 Wochen
Mz_ 563.15	KSC-2648	8 Wochen
Mz_ 564.15	KSC-2649	8 Wochen
Mz_ 304.16	KSC-3412	8 Wochen
Mz_ 305.16	KSC-3416	8 Wochen
Mz_ 306.16	KSC-3417	8 Wochen
Mz_ 310.16	KSC-3411	8 Wochen
Mz_ 311.16	KSC-3413	8 Wochen
Mz_ 312.16	KSC-3414	8 Wochen
Mz_ 316.16	KSC-3409	8 Wochen
Mz_ 325.16	KSC-3410	8 Wochen
Mz_ 328.16	KSC-3408	8 Wochen
Mz_ 329.16	KSC-3415	8 Wochen
Mz_ 114.17	KSC-4554	8 Wochen
Mz_ 115.17	KSC-4555	8 Wochen
Mz_ 118.17	KSC-4558	8 Wochen
Mz_ 119.17	KSC-4559	8 Wochen

Mittel-alte Mäuse (C57BL/6Jrj (WT) 52 Wochen alt):

Tabelle 16: Mittel-alte Mäuse (C57BL/6Jrj (WT) 52 Wochen alt)

Maus-Nummer	Pyrat-Nr.	Alter bei Start der Spezialfüttergabe
Mz_ 440.14	KSC-2232	44 Wochen
Mz_ 440.15	KSC-2233	44 Wochen
Mz_ 441.15	KSC-2234	44 Wochen
Mz_ 442.15	KSC-2235	44 Wochen
Mz_ 443.15	KSC-2236	44 Wochen
Mz_ 444.15	KSC-2237	44 Wochen
Mz_ 445.15	KSC-2238	44 Wochen
Mz_ 446.15	KSC-2241	44 Wochen
Mz_ 448.15	KSC-2243	44 Wochen

Mz_449.15	KSC-2244	44 Wochen
Mz_305.16	KSC-3416	44 Wochen
Mz_307.16	KSC-3400	44 Wochen
Mz_308.16	KSC-3402	44 Wochen
Mz_309.16	KSC-3404	44 Wochen
Mz_317.16	KSC-3405	44 Wochen
Mz_319.16	KSC-3399	44 Wochen
Mz_320.16	KSC-3406	44 Wochen
Mz_321.16	KSC-3407	44 Wochen
Mz_326.16	KSC-3398	44 Wochen
Mz_330.16	KSC-3401	44 Wochen
Mz_331.16	KSC-3403	44 Wochen
Mz_123.17	KSC-4543	44 Wochen
Mz_124.17	KSC-4544	44 Wochen
Mz_125.17	KSC-4545	44 Wochen
Mz_130.17	KSC-4550	44 Wochen

3.2.5 Überblick immun-/histochemischer Färbungen

Es wurden folgende Färbungen an den Geweben der oben aufgeführten Mäuse durchgeführt (in der genannten Reihenfolge):

Histochemische Färbungen zur Analyse der Morphometrie (siehe 3.2.6)

→Verhoeff's-Elastica-Färbung (VES)

→Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung (VES-MTC)

→Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Immunhistochemische Färbungen (siehe 0)

Seneszenzmarker

→Sirtuin 1 (SIRT 1)

→Prelamin A

Muskelzellmarker

→Smooth muscle α -actin (SMA)

Adipozytenmarker

→Perilipin

Marker mit spezifischer Funktion

→Cystein-rich protein 2 (CSRP 2)

3.2.6 Histochemische Färbungen und Analyse der Morphometrie

Verhoeff's Elastica-Färbung

Als Übersichtsfärbung bei der Auswahl der für die Auswertungen am besten geeigneten Gefäßschnitte und für die darauffolgenden morphometrischen Untersuchungen wurde die Verhoeff's Elastica-Färbung gewählt. Dabei handelt es sich um eine histologische Färbung, welche vor Allem die elastischen Fasern in dem angefärbten Gewebe schwarz darstellt. Dies erwies sich bei der morphometrischen Analyse der herznahen Gefäßwand als sehr nützlich, da auf diese Weise die einzelnen Wandschichten (Tunica intima, Tunica media) durch Schwarzfärbung der *Membrana elastica interna*, *Membrana elastica media* und *Membrana elastica externa* deutlich voneinander abgegrenzt und daraus einzelne Parameter ausgewertet werden konnten (siehe 3.2.6 Parameter der morphometrischen Auswertung der Verhoeff's-Elastica/ -Masson Trichrom-Färbung).

Bei der Verhoeff's-Elastica-Färbung erfolgte zunächst eine Entparaffinisierung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern. Anschließend durchliefen die Schnitte zur Rehydrierung eine absteigende Ethanolreihe. Dann erfolgte das eigentliche Färben der elastischen Fasern, indem die Schnitte in eine frisch angesetzte Verhoeff's Elastica-Färbelösung gelegt werden. Nach zwei Waschschrritten erfolgte zunächst eine Differenzierung in einer 2%igen Eisenchloridlösung und danach in einer 5%igen Natriumthiosulfat-Lösung. Bei diesem Schritt wurde unmittelbar unter mikroskopischer Aufsicht die Farbintensität der Schnitte beurteilt. Wurde diese als ausreichend angesehen, erfolgten erneut zwei Waschschrritte und dann eine Gegenfärbung mit einer Van-Gieson-Lösung. Nach diesem Schritt war die Schwarzfärbung elastischen Fasern zu erkennen. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder dehydriert und dann eingedeckt.

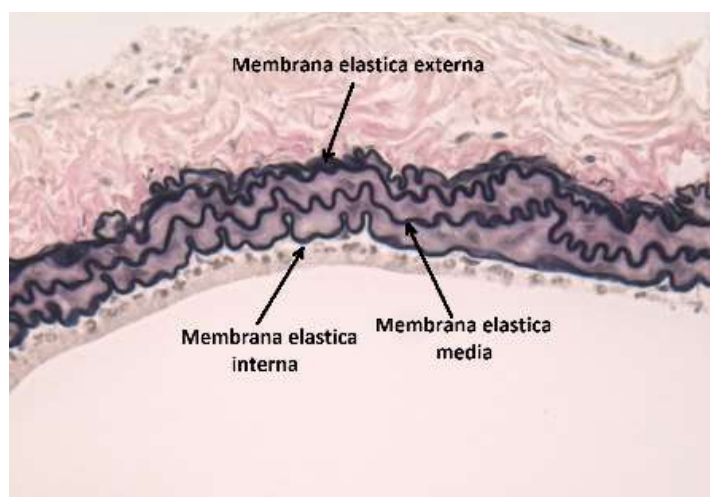


Abbildung 14: Verhoeff's-Elastica-Färbung eines arteriellen Blutgefäßes und die jeweiligen Gefäßschichten (Membrana elastica interna, Membrana elastica media, Membrana elastica externa). Eigene Darstellung, an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Färbeprotokoll Verhoeff's-Elastica-Färbung

Tabelle 17: Färbeprotokoll Verhoeff's-Elastica-Färbung mit einzelnen Arbeitsschritten

Schritt	Lösung	Zeit
Entparaffinisieren	Xylol	3 x 5 min
Rehydrieren	2 x 100%, 2 x 96%, 70% und 50% Ethanol (absteigende Alkoholreihe)	jeweils 2 min
Färben	Verhoeff's-Elastica-Färbelösung	15 min
Waschen	fließendes Leitungswasser	20 min
Spülen	ddH ₂ O	5 min
Differenzieren	2% Eisenchlorid-Lösung	2-3 min
Differenzieren	5% Natriumthiosulfat-Lösung (mikroskopisch kontrollieren)	1 min
Waschen	fließendes Leitungswasser	5 min
Spülen	ddH ₂ O	5 min
Gegenfärben	Van-Gieson-Lösung	1 min
Spülen	ddH ₂ O	5 min
Dehydrieren	2x 96%; 2x 100% EtOH (aufsteigende Alkoholreihe)	jeweils 2 min
Klären	Xylol	2 x 1 min
Eindecken	Eukitt	Über Nacht trocknen lassen

Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung

Die Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung ist eine Modifikation der Verhoeff's-Elastica-Färbung, bei der nicht nur die elastischen Fasern schwarz, sondern zusätzlich dazu Kollagenfasern blau, Muskelfasern rot und Fibrinfasern hellrot angefärbt werden.

Folglich bietet die Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom Färbung ein differenzierteres Bild der strukturellen Zusammensetzung der Gefäßwand, als die Verhoeff's-Elastica-Färbung. Hierbei basiert die Färbung folglich auf drei Farbstoffen, welche die jeweiligen einzelnen Komponenten anfärben. Nach Entparaffinisierung, Nachfixierung und zwei weiteren Zwischenschritten erfolgte zunächst die Schwarzfärbung der elastischen Fasern mit der Verhoeff's-Elastica-Farblösung. Diese musste direkt vor dem Färbevorgang frisch angesetzt werden. Anschließend erfolgte nach einigen Zwischenschritten die Rotfärbung der Muskelfasern und Fibrin mit einer Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin-Lösung. Nach einem Wasch- und einem Differenzierungsschritt erfolgte dann eine Gegenfärbung mit Anilinblau, welche die Kollagenfasern blau anfärbt. Die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen sind in Kapitel (3.1.3 Für Immun-/Histochemie verwendete Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen, Seren und Antikörper) beschrieben.



Abbildung 15: Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung eines Gefäßes und die dadurch angefärbten Komponenten (Membrana elastica interna, Membrana elastica media, Membrana elastica externa, Adventitia, Muskelfasern). Eigene Darstellung, an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Färbeprotokoll Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung

Tabelle 18: Verhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung in einzelnen Arbeitsschritten

Schritt	Lösung	Zeit
Entparaffinisieren	Xylol	3x 5 min
Rehydrieren	2 x 100%, 2 x 96%, 70% und 50% Ethanol (absteigende Alkoholreihe)	jeweils 2 min

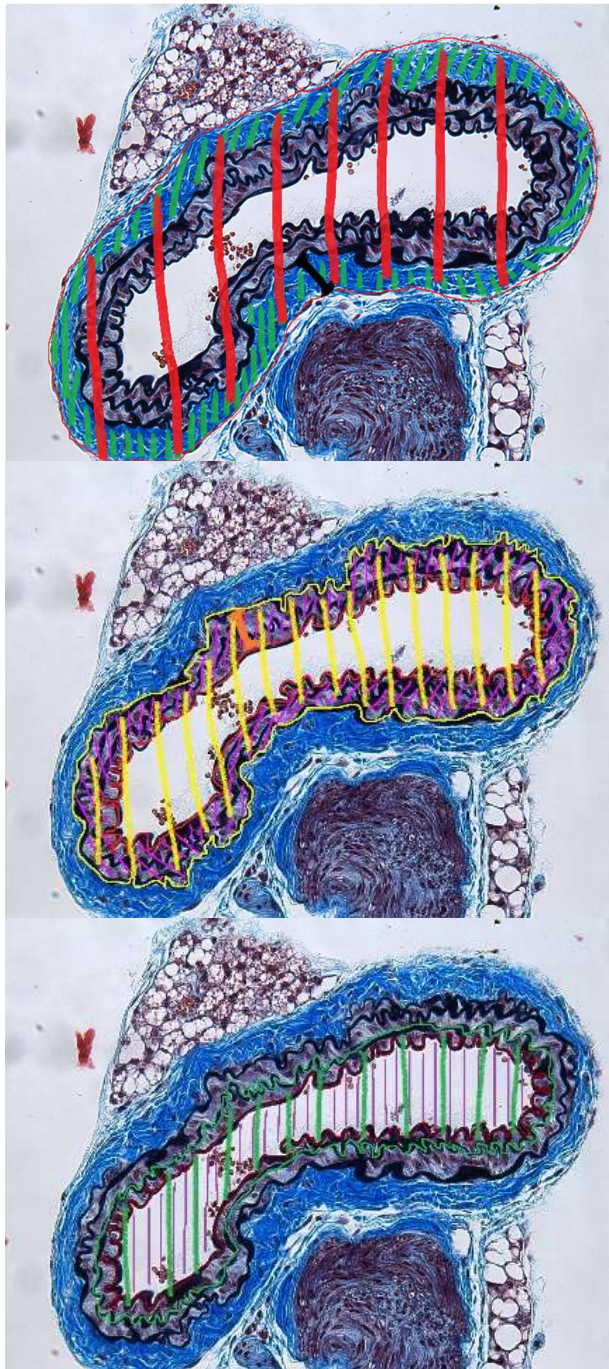
Waschen	ddH ₂ O	5 min
Nachfixieren	Bouin's Fixative	Bei RT über Nacht
Spülen	Fließendes Leitungswasser	Bis zur Klärung
Färben	Verhoeff's-Elastica-Färbelösung	15 min
Spülen	fließendes Leitungswasser	20 min
Waschen	ddH ₂ O	5 min
Differenzieren	2% Eisenchlorid-Lösung	2 min (2,5 min)
Differenzieren	5% Natriumthiosulfat-Lösung	5 min
Färben	Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin	2 min
Waschen	ddH ₂ O	Bis klar
Differenzieren	1,25% Phosphomolybdic-Phosphotungstic Lösung	12-15 min
Gegenfärben	2,5% Anilinblau Lösung (mikroskopische Kontrolle)	8-10 min
Waschen	ddH ₂ O	bis klar
Differenzieren	1% Essigsäure	1 min
Dehydrieren	2 x 96%; 2 x 100% EtOH (aufsteigende Alkoholreihe)	je 2 min
Klären	2 x Roticlear	2x 5 min
Eindecken	Entellan/Eukitt	Über Nacht trocknen lassen

Parameter der morphometrischen Auswertung der Verhoeff's-Elastica/-Masson-Trichrom-Färbung

Die Verhoeff's Elastica-Masson-Trichrom-Färbung war die Hauptfärbung, an der die morphometrischen Untersuchungen vorgenommen wurden. Nachdem die entsprechenden Gefäßschnitte an einem Mikroskop OLYMPUS BX51 mit Hilfe des Programms Image Pro PLUS 7.0. fotografiert und hinsichtlich gewisser nachfolgend dargestellter Parameter morphometrisch ausgemessen wurden, erfolgte anschließend

eine statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 8.0.

Es wurden folgende Parameter morphometrisch erhoben und innerhalb der zwei Altersstadien (adult und mittel-alt) jeweils miteinander verglichen.



Gesamtgefäßfläche

Fläche Adventitia

Dicke Adventitia

Externa EL Länge

Fläche Externa EL

Dicke Media

Fläche Media

Länge Media EL

Fläche Media EL

Fläche Interna EL

Länge Interna EL

Abbildung 16: Visualisierung der ausgewerteten morphometrischen Parameter. Eigene Darstellungen, an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Bestimmung der Zellkernanzahl

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine histologische Färbung, welche vor Allem mit dem Ziel der Anfärbung von Zellkernen angewendet wurde, um deren Anzahl innerhalb der Tunica media der Wand herznaher Gefäße bestimmen zu können. Neben den Zellkernen, die dunkelblau bis schwarz eingefärbt werden, werden Zytoplasma, Kollagen, Elastin und Erythrozyten rosa-rot eingefärbt. Die gefärbten Schnitte (die Färbung erfolgte durch Eva Schütz, Doktorandin der Arbeitsgruppe zu einem anderen Thema) wurden mit Hilfe des Programms Image Pro PLUS 7.0. an einem Mikroskop fotografiert, nachfolgend die Anzahl der Zellkerne innerhalb der Tunica media manuell ermittelt und die Ergebnisse mit dem Programm Graph Pad Prism 8.0. ausgewertet.

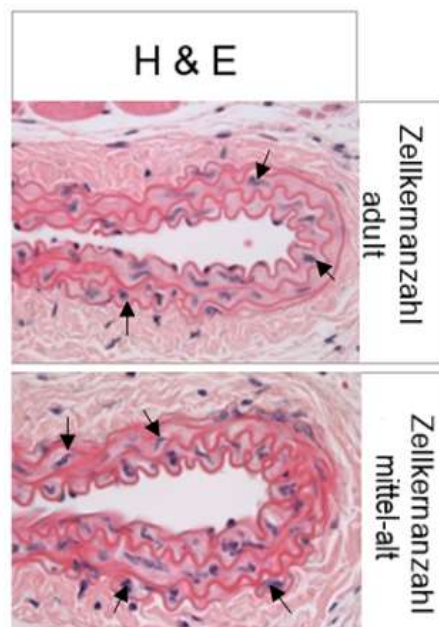


Abbildung 17: Mit HE-Färbung dargestellte Zellkerne in der Gefäßwand einer adulten Maus und einer mittel-alten Maus. Pfeile deuten auf einzelne Zellkerne. Aus Schütz et. al. „Age-Dependent and -Independent Effects of Perivascular Adipose Tissue and Its Paracrine Activities during Neointima Formation”. *IJMS*, 2019 [3]

Tabelle 19: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Schritt	Lösung	Zeit
Entparaffinisieren	Xylol	3x 5 min
Rehydrieren	2 x 100%, 2 x 96%, 70% und 50% Ethanol (absteigende Alkoholreihe)	jeweils 2 min
Waschen	ddH ₂ O	5 min

Kernfärbung	Hämalaun sauer nach Mayer	3-6 min
Spülen	0,1% HCl-Lösung	3 x kurz eintauchen
Spülen	fließendes Leitungswasser	15 min
Gegenfärben	Eosin G-Lösung 0,5%	1-5 min
Spülen	fließendes Leitungswasser	bis zur Klärung
Dehydrieren	2 x 96%; 2 x 100% EtOH (aufsteigende Alkoholreihe)	je 2 min
Klären	2 x Roticlear	2 x 5 min
Eindecken	Entellan	Über Nacht trocknen lassen

3.2.7 Immunhistochemische Färbungen

Allgemeines Prinzip der Immunhistochemie

Ziel der Immunhistochemischen Untersuchungen war die eindeutige Identifizierung eines speziellen Epitops (Antigens) mit einer möglichst hohen Spezifität und Sensitivität, um die Lokalisation des Epitops im Gewebe nachzuweisen. Dabei ging man nach standardisierten immunhistochemischen Protokollen vor, da entsprechende Abweichungen zu Verfälschungen der Ergebnisse führen konnten. Allgemein kam bei dieser Methode ein **Primärantikörper**, welcher gegen das in dem Gewebe gesuchte Epitop (Antigen), sowie ein **polyklonaler Sekundärantikörper**, welcher gegen das F_c-Fragment des Primärantikörpers gerichtet war, zum Einsatz. Es wurde also im Zuge der immunhistochemischen Färbungen folglich eine „doppelte Antikörper-Antigen-Reaktion“ initiiert [37].

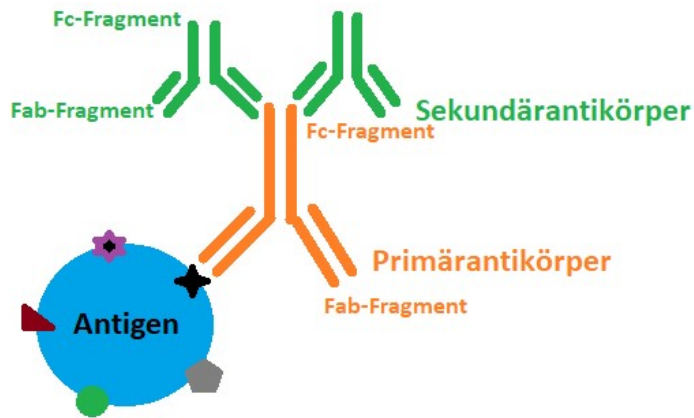


Abbildung 18: Antigen-Antikörper-Reaktion mit Primärantikörper und Sekundärantikörper. Eigene Darstellung, modifiziert nach Lang, G., "Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik." 2013 [37].

Bei den Antikörpern, welche bei den immunhistochemischen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, handelte es sich um Gamma-Immunglobuline (IgGs), welche eine Y-Form mit einem konstanten Anteil (F_c -Fragment) und einen variablen Anteil (F_{ab} -Fragment) aufweisen (siehe Abbildung 18). Das F_{ab} -Fragment des Primärantikörpers bindet dabei spezifisch an das Epitop, das F_{ab} -Fragment des Sekundärantikörpers bindet spezifisch an das F_c -Fragment des Primärantikörpers [37]. Nachdem dieser indirekte immunhistochemische Nachweis des Epitops durch den Sekundärantikörper erfolgt ist, muss diese Bindung noch sichtbar gemacht werden. Dies erfolgt auf dem Prinzip, dass der Sekundärantikörper biotinassoziert ist. Es ist bekannt, dass Biotin eine hohe Affinität zu Avidin hat [37]. Diese Tatsache macht man sich bei diesem Verfahren zunutze, da es infolgedessen durch die Zugabe eines „ABC-Kits“ (Avidin-Peroxidase Komplex) zur Bildung eines „Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes“ kommt. Nach Zugabe eines Peroxidase-Substrats (in unserem Fall entweder DAB: Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, oder AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazol), bindet die Peroxidase über Avidin an Biotin und katalysiert einen Farbumschlag, sodass die Epitope, die man nachweisen wollte, letztlich indirekt angefärbt werden.

Allgemeiner Ablauf der immunhistochemischen Färbungen

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in einer küvettenartigen Schaukel gesammelt, wobei maximal 20 Schnitte in eine Küvette passten. Dann durchliefen die Schnitte für je 3 Mal 5 Minuten eine Xylolreihe und wurden anschließend 2 Mal für 2 Minuten in

100% Ethanol getaucht. Diese beiden Schritte dienten der Entparaffinisierung der Schnitte. Anschließend erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid (in Methanol), damit es im weiteren Verlauf der immunhistochemischen Färbung nicht zu unspezifischen Bindungen und damit falsch positiven Ergebnissen kam. Die Hydrierung der Paraffinschnitte erfolgte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (je 2 Mal 96%, 70% und 50%) und einer anschließenden Wässerung in destilliertem Wasser. Je nach immunhistochemischer Färbung wurde eventuell eine Permeabilisierung des Gewebes mit Hilfe eines Triton-X-100-Puffers (0,05%ig oder 0,2%ig) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte in einem TRIS/EDTA-Puffer (0,01M/0,001M angesetzte Lösung mit einem eingestellten pH-Wert von 9,0) oder in einem Citrat-Puffer (0,01 M angesetzte Lösung mit einem pH-Wert von 6,0) bei 800 Watt für 15 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt, um durch molekulare Verkettungen maskierte Epitope zu demaskieren (engl. *heat-induced antigen retrieval*) und diese für die anschließende Bindung des Primärantikörpers vorzubereiten. Nachdem die Schnitte für weitere 20 Minuten in dem verwendeten Puffer ausgekühlt waren, erfolgte die Einzirkelung des Gewebes mit einem Fettstift (*ImmEdge™ Pen*). Damit sollte eine Umrandung der einzelnen Gewebeschnitte mit hydrophoben Eigenschaften erschaffen werden, da in den nächsten Schritten die entsprechenden Flüssigkeiten tröpfchenweise auf die einzelnen Gewebe pipettiert wurden und man damit die Flüssigkeiten an der gewünschten Stelle erhalten konnte. Im nächsten Schritt erfolgte eine 30-minütige Blockierung des Sekundärantikörpers mit Hilfe eines Normalserums (5%ig oder 10%ig), jeweils aus der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammte. Dies erfolgte, damit keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers an dem Gewebe stattfanden, die das Färbeergebnis verfälschen konnten und sonst falsch positive Signale erschaffen hätten. Die Lagerung der Schnitte während der jeweiligen Inkubationszeiten erfolgte in einer feuchten Kammer. Erst dann nahm man die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht vor, welcher je nach Antikörper in einer speziellen Konzentration auf die einzeln eingezirkelten Gewebeschnitte appliziert wurde. Als Verdünnungsmittel wurde dabei, je nach Protokoll, 1X PBS oder AB-Diluent verwendet.

Allgemein wurde bei jeder immunhistochemischen Färbung eine **Positivkontrolle** und auf jedem Objektträger eine **Negativkontrolle** mitgeführt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um ein Gewebe, auf dem das durch die Immunhistochemie gesuchte Antigen bekannterweise exprimiert wird. Diese bestätigte die Funktionsfähigkeit des

Primärantikörpers und der gesamten immunhistochemischen Reaktion. Als Negativkontrolle wurde der jeweils letzte Gewebeschnitt auf jedem Objektträger verwendet, wobei dort anstelle des Primärantikörpers nur Verdünnungsmittel appliziert wurde. Die Negativkontrolle wurde durchgeführt, um sicher nachzuweisen, dass die positiven Signale auf den jeweiligen Gewebeschnitten auch tatsächlich positive Signale auf die gesuchten Antigene mit Primärantikörperbindung sind und keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers an dem Gewebe.

Nachdem der Primärantikörper über Nacht inkubiert wurde, wurde dieser mit Hilfe von 1X PBS von den einzelnen Gewebeschnitten heruntergewaschen und danach eine 60-minütige Inkubation des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur vorgenommen. Der Sekundärantikörper wurde in einer 1:1000-fachen Verdünnung auf die Gewebeschnitte pipettiert. Anschließend wurde auch dieser Antikörper mit Hilfe von 1X PBS von den Objektträgern heruntergewaschen.

Danach wurde ein ABC-Kit (VectaStain ABC-Kit Elite, VectorLabs, PK-6100) für 30 Minuten auf die Gewebeschnitte appliziert. Dabei handelte es sich um einen Avidin-Peroxidase Komplex. Nach Zugabe eines AEC-Kits (3-Amino-9-Ethylcarbazol; (VectorLabs, SK-4200) oder eines DAB-Kits (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid); (VectorLabs, SK-4100), bei denen es sich um zunächst farblose Substrate der Peroxidase handelt, kam es zum gewünschten Farbumschlag. Die Substrate stellen also folglich Chromogene dar. Dadurch erfolgt der indirekte immunhistochemische Nachweis des Antigens durch den Sekundärantikörper. Der Farbumschlag wurde unter mikroskopischer Aufsicht kontrolliert. Je nach immunhistochemischer Färbung erfolgte nach maximal 30 Minuten das Abstoppen der Färbereaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser und darauffolgend eine Gegenfärbung mit Gill's Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, GHS332). Die Schnitte wurden dabei 3 Mal kurz in die Gill's Hämatoxylin-Lösung getaucht und anschließend bis zur kompletten Klärung unter fließendem Leitungswasser und dann in destilliertem Wasser gewaschen und gespült. Das Eindecken der Schnitte erfolgte unter Verwendung des AEC-Kits auf wässriger Basis mit *ImmuMount* (Thermo Fisher Scientific, 9990412) und Eindeckgläschen. Wurde hingegen DAB als Chromogen verwendet, so mussten die Schnitte nochmals zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe (2 Mal 2 Minuten 96% Ethanol, 2 Mal 2 Minuten 100% Ethanol und 2 Mal 5 Minuten Roticlear) durchlaufen und wurden dann mit Eukitt auf Xylolbasis mit Eindeckgläschen eingedeckt.

Im Folgenden sind die allgemeine Schrittabelle der immunhistochemischen Färbungen, sowie die spezifischen Färbebedingungen der verwendeten Antikörper tabellarisch aufgeführt.

Allgemeine Schrittabelle Immunhistochemischer Färbungen

Tabelle 20: Allgemeine Schrittabelle immunhistochemischer Färbungen

Schritt	Reagenz	Zeit
Erster Tag		
Entparaffinisieren	3 x Xylol	3 x 5 Minuten
Entparaffinisieren	2 x 100% EtOH	2 x 2 Minuten
Blockieren der endogenen Peroxidase des Gewebes	3% H ₂ O ₂ in Methanol	10 Minuten
Hydrieren in absteigender Ethanolreihe und destilliertem Wasser	2 x 96%, 70%, 50% Ethanol und dH ₂ O	jeweils 2 Minuten 5 Minuten
Evtl. Permeabilisierung des Gewebes	0,05% oder 0,2% Triton-X-Puffer	10 Minuten bei 37°C
Hitze-induzierte Antigendemaskierung	TRIS/EDTA-Puffer (0,01 M/0,001 M mit pH=9,0) oder Citrat-Puffer (0,01 M mit pH 6,0)	11 Minuten bei 800 Watt (Menge: 500 ml)
Abkühlen der Schnitte im Puffer	Schnitte im Puffer stehen lassen	mindestens 20 Minuten
Einzirkeln der Gewebe auf den Objektträgern	ImmEdge™ Pen	jeder einzelne Gewebeschnitt wird umkreist
Blockierung des zweiten Antikörpers in dem Gewebe	10% Normalserum in 1X PBS (Normalserum aus der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt)	30 Minuten

Inkubation des Gewebes mit dem Primärantikörper	Konzentration je nach Spezifität und Sensitivität bei jedem Antikörper anders 1:xxx in 1X PBS oder AB-Diluent	bei 4°C über Nacht
Zweiter Tag		
Abwaschen des Primärantikörpers	3 x in 1X PBS	3 x 5 Minuten
Inkubation des Gewebes mit dem Sekundärantikörper	Biotin-xx...-anti-...IgG 1:1000 in 1X PBS	60 Minuten bei Raumtemperatur
Abwaschen des Sekundärantikörpers	3 x in 1X PBS	3 x 5 Minuten
ABC Link zur Bildung des Biotin-Avidin-Peroxidase Komplexes	VectaStain ABC-Kit Elite	30 Minuten
Abwaschen des ABC-Link	3 x in 1X PBS	3 x 5 Minuten
Chromogen	AEC-Kit oder DAB-Kit frisch ansetzen	5 bis maximal 30 Minuten
Abwaschen des Chromogens	dH ₂ O	5 Minuten
Gegenfärbung	Gill's Hämatoxylin	kurz 3 Mal eintauchen
Waschen nach Gegenfärbung	fließendes Leitungswasser	bis zur vollständigen Aufklärung
Wässern	dH ₂ O	5 Minuten
Nur wenn DAB-Kit verwendet wurde (Dehydrierung der Gewebe in aufsteigender Ethanolreihe)	2 x 96%, 2 x 100% Ethanol, 2 x Roticlear	2 x 2 Minuten, 2 x 2 Minuten, 2 x 5 Minuten
Eindecken Bei Verwendung des AEC-Kits	ImmuMount	

3.2.8 Fotografieren und Auswerten der histochemischen und immunhistochemischen Färbungen

Nachdem die jeweiligen Färbungen abgeschlossen waren, wurden die Schnitte mit Hilfe eines Hellfeldmikroskops (OLYMPUS BX51) und der Software Image-Pro PLUS 7.0. fotografiert. Dabei wurden die Gewebe in mehreren Vergrößerungen (20-fach, 40-fach und 100-fach) im Hellfeld bei Durchlicht fotografiert.

Die morphometrischen Auswertungen erfolgten ebenfalls mit Hilfe der Software Image-Pro PLUS 7.0. in 20-facher und 40-facher Vergrößerung. Dabei wurden die Parameter ausgewertet, welche bereits im Kapitel (3.2.6 Parameter der morphometrischen Auswertung der Verhoeff´s-Elastica/-Masson-Trichrom-Färbung) aufgeführt wurden.

Die immunhistochemischen Auswertungen erfolgten genauso mit der Software Image-Pro PLUS 7.0. in 20- und 40-facher Vergrößerung. Diese immunhistochemischen Färbungen wurden auf Positivität der entsprechenden gesuchten Epitope/Antigene untersucht und teilweise entsprechende Auswertungen vorgenommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden dann gegebenenfalls mit den Ergebnissen der Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) anderer Mitarbeiter/-innen der Arbeitsgruppe verglichen und eventuelle Parallelen oder Diskrepanzen ermittelt.

3.2.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 8.0. Dabei handelt es sich um eine speziell für medizinisch-biologische Auswertungen entwickelte Statistiksoftware [38].

Nachfolgend soll am Beispiel morphometrischer Untersuchungen veranschaulicht werden, wie die statistische Auswertung unserer Ergebnisse mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 8.0. erfolgte.

Zunächst wurden die tabellarisch festgehaltenen Ergebnisse der entsprechend ausgewerteten Parameter in Form von Datentabellen (engl. "Data Tables") in das Programm eingepflegt, wie nachfolgend beispielhaft im Bild dargestellt.

	Group A	Group B	Group C
	adult	mittel-alt	Title
1	21162.770	43732.320	
2	22049.260	30075.200	
3	21642.710	27672.640	
4	20659.860	32932.800	
5	22835.460	33865.720	
6	21960.460	50512.760	
7	20918.930	28897.520	
8	21705.490	37335.880	
9	18077.840	26173.470	
10	20941.830	104560.500	
11	21617.880	42380.060	
12	12404.550	34934.570	
13	20126.340	27791.250	
14	23145.880	31917.890	

Abbildung 19: Beispielhafter Screenshot einer Datentabelle im Statistikprogramm GraphPad Prism 8.0. Dargestellt ist ein Ausschnitt eines beispielhaften Screenshots einer Datentabelle (engl. „Data Table“). Dabei wurden die Ergebnisse der zwei untersuchten Gruppen (Group A: adulte und Group B: mittel-alte Mäuse) tabellarisch in das Statistikprogramm GraphPad Prism 8.0. eingepflegt.

Anschließend wurden die in den Datentabellen aufgeführten Ergebnisdaten der jeweiligen Parameter in beiden Gruppen („adult“ und „mittel-alt“) mit Hilfe des Programms bestimmten statistischen Tests unterzogen und zwar je nach Vorliegen einer Normalverteilung entweder einem unverpaarten Student’s t-Test oder einem Mann-Whitney-Test und mit Hilfe einer Analyse-Tabelle auf Signifikanz überprüft ($P < 0,05$).

Unpaired t test		
1	Table Analyzed	Media-Fläche
2		
3	Column B	mittel-alt
4	vs.	vs.
5	Column A	adult
6		
7	Unpaired t test	
8	P value	0.0017
9	P value summary	**
10	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
11	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
12	t, df	t=3.492, df=26
13		
14	How big is the difference?	
15	Mean of column A	20661
16	Mean of column B	39484
17	Difference between means (B - A) ± SEM	18824 ± 5390
18	95% confidence interval	7745 to 29903
19	R squared (eta squared)	0.3193
20		
21	F test to compare variances	
22	F, DFn, Dfd	55.84, 13, 13
23	P value	<0.0001
24	P value summary	****
25	Significantly different (P < 0.05)?	Yes

Abbildung 20: Ausschnitt eines beispielhaften Screenshots einer Analysetabelle im Programm GraphPad Prism 8.0. Dargestellt ist ein Ausschnitt eines beispielhaften Screenshots einer Analyse-Tabelle der zunächst tabellarisch in das Statistikprogramm eingepflegten Ergebnisse, welche dem unverpaarten Student's t-Test unterzogen wurden.

Die Ergebnisse wurden anschließend zur Anschaulichkeit mit Hilfe des Programms grafisch dargestellt, wie im nachfolgenden Kapitel (4 Ergebnisse) zu sehen ist.

4 Ergebnisse

Ziel der Doktorarbeit war es, den Einfluss des biologischen Alters auf die Wand herznaher Gefäße und auf das PVAT mit Hilfe morphometrischer und immun-/histochemischer Untersuchungen zu evaluieren. Dabei sollten einerseits sich im Alter verändernde morphometrische Parameter der Gefäßwand der herznahen Arterien ermittelt werden, andererseits mögliche Veränderungen der Expression einer Auswahl bereits in der Literatur erwähnter Seneszenz-, Glattmuskelzell- und Fettzellmarker im Alter bestimmt werden.

Der Einfluss des Alters auf die Wand herznaher Gefäße und auf das sie umgebenden PVAT ist bisher noch nicht systematisch analysiert worden.

Unsere Untersuchungen erfolgten an Geweben von Mäusen in zwei Altersstufen (16 Wochen (adulte) und 52 Wochen (mittel-alte)). Untersucht wurden die Arteriae carotides, sowie das entsprechende PVAT. Die Ergebnisse im PVAT wurden mit denen im VAT verglichen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen aufgeführt.

4.1 Einfluss von Alter auf Größe und Zelldichte der Gefäßwand

Zunächst wurde der Einfluss von Alter auf die Dimensionen der Gefäßwand der Arteria carotis untersucht. Dazu wurden jeweils Gewebeschnitte von 14 adulten und 14 mittelalten Wildtyp Mäusen (C57BL/6JRj [WT]) mit Hilfe der Verhoeff's Elastica–Masson-Trichromfärbung angefärbt, an einem OLYMPUS BX51 Hellfeldmikroskop bei Durchlicht mit Hilfe des Programms Image Pro PLUS 7.0. fotografiert, danach die morphometrischen Parameter (siehe 3.2.6 Parameter der morphometrischen Auswertung der Verhoeff's Elastica/-Masson-Trichrom-Färbung) gemessen und anschließend die Ergebnisse zwischen beiden Altersgruppen verglichen. Da die Tunica intima bei der Maus aus einer einlagigen Zellschicht besteht (im Gegensatz zum Menschen) wurde diese Wandschicht nicht vermessen.

4.1.1 Morphometrische Quantifizierung der Media

Die Untersuchungen der Tunica media der Wand herznaher Gefäße zeigten, dass Alter einen deutlichen Effekt auf die Media der arteriellen Gefäßwand hat. Wir konnten feststellen, dass die Mediafläche und die Länge der *Membrana elastica media* bei den mittel-alten Mäusen im Vergleich zu den adulten Mäusen signifikant vergrößert waren. Auch einige der anderen ausgewerteten Parameter wiesen signifikante Veränderungen im Alter auf. So war dies bei den Auswertungen der Mediadicke, der totalen Gefäßfläche (innerhalb der Lamina elastica externa) und der Länge der Lamina elastica externa der Fall.

Aufgrund der insgesamt Größenzunahme der Gefäßfläche waren relative Parameter, wie die Mediafläche im Verhältnis zur Gesamtfläche der Gefäßwand und die Mediafläche im Verhältnis zur Membrana elastica externa nicht signifikant zwischen adulten und mittel-alten Mäusen verschieden.

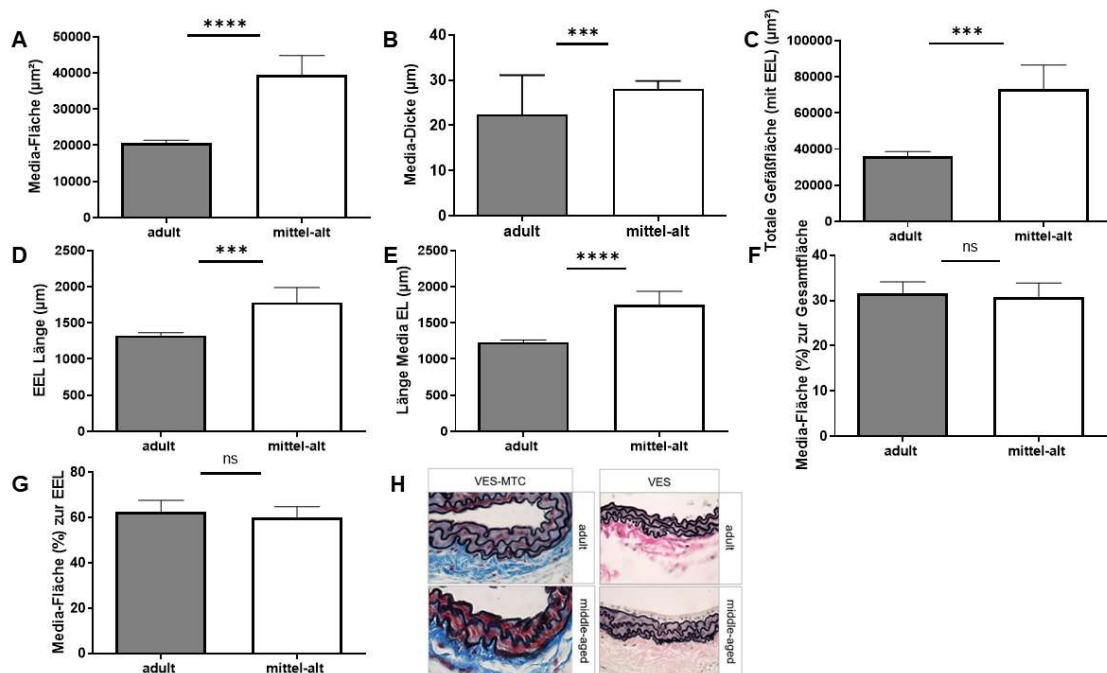


Abbildung 21: Einfluss des Alters auf die Tunica Media und die, die Tunica Media umgebenden Strukturen der herznahen Gefäße. Karotisarterien mit dem entsprechenden perivaskulären Fettgewebe wurden 16 Wochen alten „adulten“ Mäusen ($n=14$) und 52 Wochen alten „mittel-alten“ Mäusen ($n=14$) entnommen und zu Paraffin-Schnitten aufbereitet, histochemisch angefärbt und an einem Hellfeldmikroskop OLYMPUS BX51 bei Durchlicht fotografiert. Mit Hilfe des Programms Image Pro PLUS wurde die (A) Media-Fläche (μm^2), (B) Media-Dicke (μm), (C) totale Gefäßfläche (mit Membrana elastica externa) (μm^2), (D) Membrana elastica externa (EEL)-Länge (μm), (E) Membrana elastica media-Länge (μm), (F) Media-Fläche im Verhältnis zur totalen Gefäßfläche (%) und die (G) Media-Fläche im Verhältnis zur Membrana elastica externa (%), für jede Maus quantifiziert. Aus diesen Quantifizierungen wurde für jeden ausgewerteten morphometrischen Parameter innerhalb der jeweiligen Gruppe (adult und mittel-alt) ein Mittelwert gebildet und dieser zwischen den beiden Gruppen miteinander verglichen und mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM grafisch dargestellt (*** $p<0,001$, **** $p<0,0001$; ns=nicht-signifikant). Die repräsentativen Abbildungen in (H) zeigen die Zunahme der Media in mittel-alten Mäusen nach VES-MTC (links) und VES (rechts) Färbung. Eigene Darstellung, an Mikroskop OLYMPUS BX5 in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

4.1.2 Bestimmung der Zellkernzahl in der Media

Des Weiteren wurde die Anzahl der Zellkerne innerhalb der Gefäßwand adulter (n=11) und mittel-alter Mäuse (n=11) bestimmt. Für diese Auswertung wurden Zellkerne mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung blau-schwarz angefärbt, manuell ausgezählt und die Resultate anschließend statistisch ausgewertet. Hier fiel auf, dass die Zellkernanzahl der Gefäße der mittel-alten Mäuse innerhalb der Tunica media signifikant gegenüber der Anzahl der Zellkerne der Gefäße der adulten Mäuse erhöht war. Weiterführende Untersuchungen, unter anderem PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*)-Untersuchungen, welche im Rahmen der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, ließen uns jedoch feststellen, dass die relative Zellkerndichte innerhalb der Mediafläche aufgrund einer Volumenzunahme der Tunica media im Alter unverändert bleibt [3].

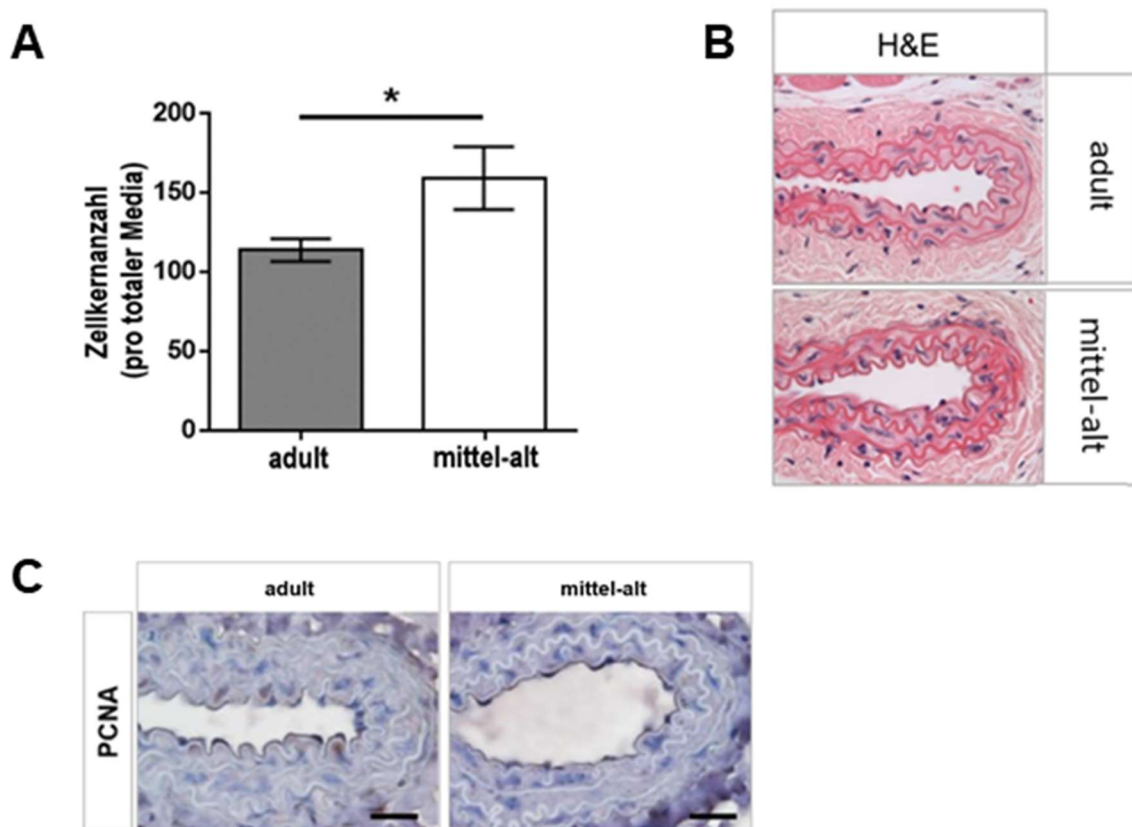


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Auswertung der Zellkernanzahl innerhalb der Media der herznahen Gefäße. Jeweils 11 adulten (16 Wochen alt) und 11 mittel-alten (52 Wochen alt) Mäusen wurden die Karotisarterien entnommen, zu histologischen Schnitten aufbereitet und mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin Färbung angefärbt (die immunhistochemische Färbung erfolgte durch Eva Schütz, ebenfalls Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe). Anschließend wurden die Schnitte an einem Hellfeldmikroskop OLYMPUS BX51 fotografiert. Mit Hilfe des Programms Image Pro PLUS wurden anschließend die Zellkerne der entsprechenden Gefäße manuell ausgezählt, und die Ergebnisse mit Hilfe des Programms GraphPad Prism ausgewertet und grafisch dargestellt. Aus Grafik (A) ist ersichtlich, dass die absolute Zellkernanzahl innerhalb der Mediafläche der mittel-alten Mäuse signifikant gegenüber der Zellkernanzahl der adulten Mäuse erhöht ist. Grafik (B) zeigt Beispiele herznaher Gefäße einer adulten und einer mittel-alten Maus. Es ist erkennbar, dass bei dem Gefäß der mittel-alten Maus deutlich mehr Zellkerne (bläulich-schwarz) vorhanden sind. Aus Schütz et. al. "Age-Dependent and -Independent Effects of Perivascular Adipose Tissue and Its Paracrine Activities during Neointima Formation." IJMS, 2019 [3]. Wie in Grafik

(C) zu sehen, wurden im Rahmen des Projekts zudem PCNA-Färbungen (engl. proliferating cell nuclear antigen) an Gefäßen adulter und mittel-alter Mäuse durchgeführt. Dabei konnte man einen Trend geringerer PCNA-positiver, proliferierender Zellen innerhalb der Media mittel-alter Gefäße, im Vergleich zur Media der Gefäße adulter Mäuse feststellen [3]. Zudem wurde festgestellt, dass die relative Zellkerndichte innerhalb der Media im Alter unverändert bleibt. Aus Schütz et. al. "Age-Dependent and -Independent Effects of Perivascular Adipose Tissue and Its Paracrine Activities during Neointima Formation." *IJMS*, 2019 [3].

4.2 Einfluss von Alter auf die Adventitia und das perivaskuläre Fettgewebe

4.2.1 Morphometrische Quantifizierung der Adventitia

Bei der morphometrischen Untersuchung der Adventitia konnten wir bezüglich der Adventitia-Fläche (Abbildung 23A) und der totalen Gefäßfläche (Gefäßwand einschließlich Adventitia; Abbildung 23B) eine signifikante Zunahme in mittel-alten Mäusen feststellen. Auch die Adventitia-Dicke (Abbildung 23C) zeigte eine signifikante Zunahme im Alter, wie in den nachfolgenden Grafiken dargestellt.

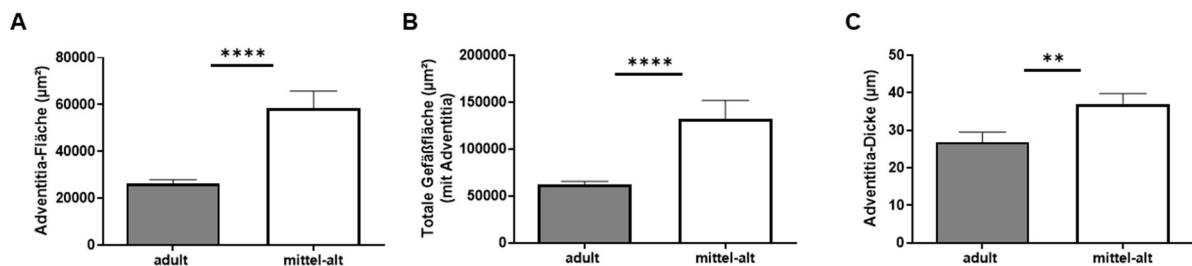


Abbildung 23: Grafische Darstellungen morphometrischer Auswertungen der Adventitia. (A) Adventitia-Fläche (µm²), (B) Totale Gefäßfläche (mit Adventitia) (µm²) und der (C) Adventitia-Dicke (µm) (***p < 0,001, ****p < 0,0001; ns = nicht-signifikant). Die Auswahl der Mäuse, die histochemische Aufbereitung sowie die morphometrische und statistische Auswertung erfolgten nach demselben Prinzip wie in Abbildung 21 beschrieben.

4.2.2 Morphometrische Quantifizierung perivaskulärer Adipozyten

Das PVAT ist Teil der Gefäßwand [15]. Wie dieses durch Alter beeinflusst wird, ist jedoch kaum bekannt.

Morphometrisch fiel bei unseren Untersuchungen bei der Betrachtung des PVAT auf, dass die im PVAT enthaltenen Adipozyten bei adulten Mäusen eine multilokuläre Struktur aufwiesen, während die Adipozyten im PVAT der mittel-alten Mäuse eher unilokulär erschienen. Eine morphometrisch-statistische Auswertung der Fläche einzelner Adipozyten des PVAT wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ebenfalls angefertigt und unterstützte zusätzlich unsere Feststellung, dass die Adipozytenfläche des PVAT der mittel-alten Mäuse die Adipozytenfläche des PVAT der adulten Mäuse signifikant überstieg [3].

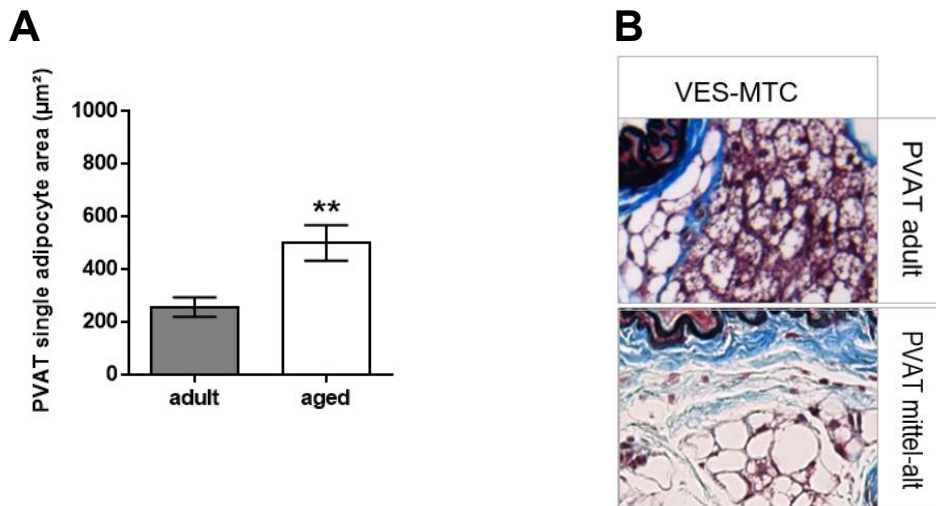


Abbildung 24: Fläche einzelner Adipozyten in μm^2 (A) Färbung und Auswertung zum Graph erfolgte durch Eva Schütz, ebenfalls Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe. Karotisarterien mit ihrem PVAT sowie VAT wurden adulten (engl. adult) (16 Wochen alt) und mittel-alten (hier engl. aged) (52 Wochen alt) Mäusen entnommen, histochemisch aufbereitet und der VES-MTC-Färbung unterzogen. Die Grafik zeigt deutlich, dass die einzelne Adipozytenfläche innerhalb des PVAT mittel-alter Mäuse deutlich gegenüber der Adipozytenfläche adulter Mäuse erhöht ist. (B) Visuell vergleichende Darstellung des PVAT einer adulten Maus, welches sich histochemisch multilokulär darstellt, mit dem PVAT einer mittel-alten Maus, welches sich unilokulär darstellt. Eigene Darstellung, Ausschnitte von histochemisch angefärbten Schnitten, welche an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

4.2.3 Morphometrische Quantifizierung viszeraler Adipozyten

Um die Untersuchung der Befunde zum Einfluss des Alters auf das PVAT auszuweiten, führten wir weitere Analysen am ebenfalls entnommenen VAT der untersuchten Mäuse durch, welche uns vermuten ließen, dass die Adipozyten der mittel-alten-Mäuse deutlich größer waren als die Adipozyten der adulten Mäuse. Um diese Beobachtung statistisch zu unterstützen, erfolgte im Rahmen des Projekts eine statistische Auswertung der einzelnen Adipozytenfläche des VAT, welche unsere Vermutungen zur einzelnen Adipozytenfläche bei adulten und mittel-alten Mäusen unterstützte und ebenfalls eine signifikante Größenzunahme zeigte (durchschnittliches Körpergewicht (g) berechnet aus jeweils 20 Mäusen. Adulte Mäuse: $32,0 \pm 0,98$, mittel-alte Mäuse: $36,7 \pm 0,83$) [3].

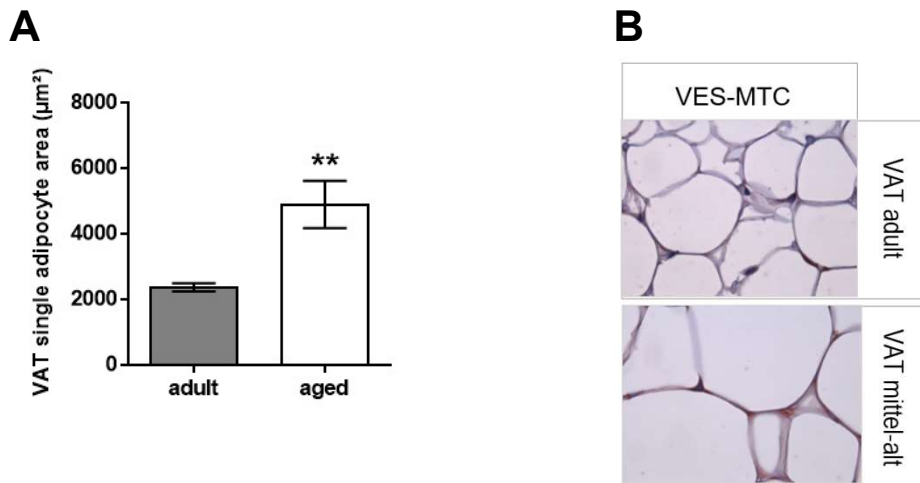


Abbildung 25: Graphische Darstellung einer Auswertung der einzelnen Adipozytenfläche (μm^2) innerhalb des VAT. (A) Graphische Darstellung einer Auswertung der einzelnen Adipozytenfläche (μm^2) innerhalb des VAT adulter und mittel-alter Mäuse (Färbung und Auswertung zum Graph erfolgte durch Eva Schütz, Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe). (B) Vergleich von VAT einer adulten (engl. adult) Maus mit dem VAT einer mittel-alten (hier engl. aged) Maus. Es ist deutlich sichtbar, dass das VAT der mittel-alten Maus deutlich größere Adipozyten aufweist. Eigene Darstellung, Ausschnitte von histochemisch angefärbten Schnitten, welche an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

4.3 Histochemische Analyse des Effekts von Alter auf die Expression zellulärer Marker in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe

4.3.1 Untersuchung der Expression von Perilipin in der Gefäßwand, im perivaskulären und im viszeralen Fettgewebe

Um die oben dargestellten Feststellungen zusätzlich zu untermauern, begannen wir zunächst mit der Untersuchung der Expression von Perilipin innerhalb der Gefäßwand, des PVAT und VAT.

Perilipin ist ein in den Lipidtropfen umgebenden Monolayer eingelagertes Protein [27]. Seine Hauptfunktion ist die Translokation der Hormonsensitiven Lipase aus dem Cytosol in das Lipidtröpfchen, welche die Lipolyse im Lipidtröpfchen katalysiert [28]. Aufgrund seiner nahezu ausschließlichen Expression in Fettzellen, wurde es in der vorliegenden Arbeit als spezifischer Marker für Adipozyten verwendet.

Um nachzuweisen, dass es sich beim PVAT auch tatsächlich um Fettgewebe handelt, da dieses häufig als Teil der Gefäßwand beschrieben wird, dessen morphometrische und funktionelle Veränderungen im Alter jedoch nur unzureichend beschrieben sind, begannen wir zunächst mit der Untersuchung des PVAT auf Perilipin. Dazu wurden Karotisarterien von Mäusen der zwei Altersstadien (adult (16 Wochen alt) und mittel-alt (52 Wochen alt)) inklusive des entsprechenden PVAT mit dem Antikörper „rabbit

monoclonal anti-mouse/ human Perilipin“ angefärbt, fotografiert und vergleichend beurteilt. Als Positivkontrolle wurde VAT verwendet.

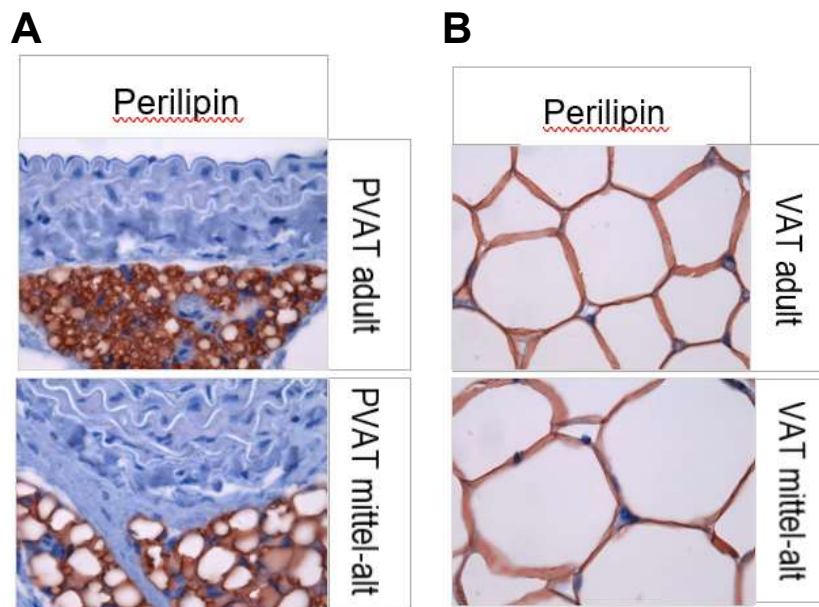


Abbildung 26: Immunhistochemische Anfärbung von Perilipin im PVAT und VAT. Dargestellt sind Gewebeschnitte vom (A) PVAT und (B) VAT adulter und mittel-alter Mäuse, welche einer immunhistochemischen Färbung mit Perilipin unterzogen und anschließend an einem Mikroskop OLYMPUS BX51 und mit Hilfe des Programms Image PRO PLUS in 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Perilipin konnte immunhistochemisch sowohl im PVAT als auch im VAT eindeutig nachgewiesen werden. Innerhalb der Gefäßwand konnte immunhistochemisch kein Perilipin nachgewiesen werden, was seine Verwendung als spezifischen Adipozytenmarker bestätigt.

Perilipin konnte immunhistochemisch auch im PVAT eindeutig nachgewiesen werden. Dementsprechend konnten wir für uns bestätigen, dass es sich beim PVAT um Fettgewebe handelt. Da es bei diesen Untersuchungen lediglich um die Identifikation des perivaskulären Zelltyps ging, wurden die Färbungen nicht weiter quantitativ analysiert. Wie erwartet war in anderen Teilen der Gefäßwand immunhistochemisch kein Perilipin nachweisbar.

4.3.2 Untersuchung der Expression von Sirtuin 1 in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe

Untersuchung der Gefäßwand auf Sirtuin 1 (SIRT 1)

Für unsere Untersuchungen war zudem interessant, ob sich in der Gefäßwand adulter und mittel-alter Mäuse die Expression zellulärer Marker für Seneszenz immunhistochemisch nachweisen lässt. Um einen Ansatz für eine Antwort auf diese Fragestellung zu finden, wurde die Gefäßwand zunächst immunhistochemisch auf Sirtuin-1 (SIRT 1), ein Schlüsselenzym mit antiseneszenten und antiinflammatorischen Eigenschaften [29], überprüft.

Dazu wurden Gefäßschnitte von adulten (16 Wochen alten) und mittel-alten (52 Wochen alten) Mäusen immunhistochemisch mit dem Antikörper „rabbit polyclonal anti-mouse/human SIRT 1“ gefärbt und mikroskopisch untersucht.

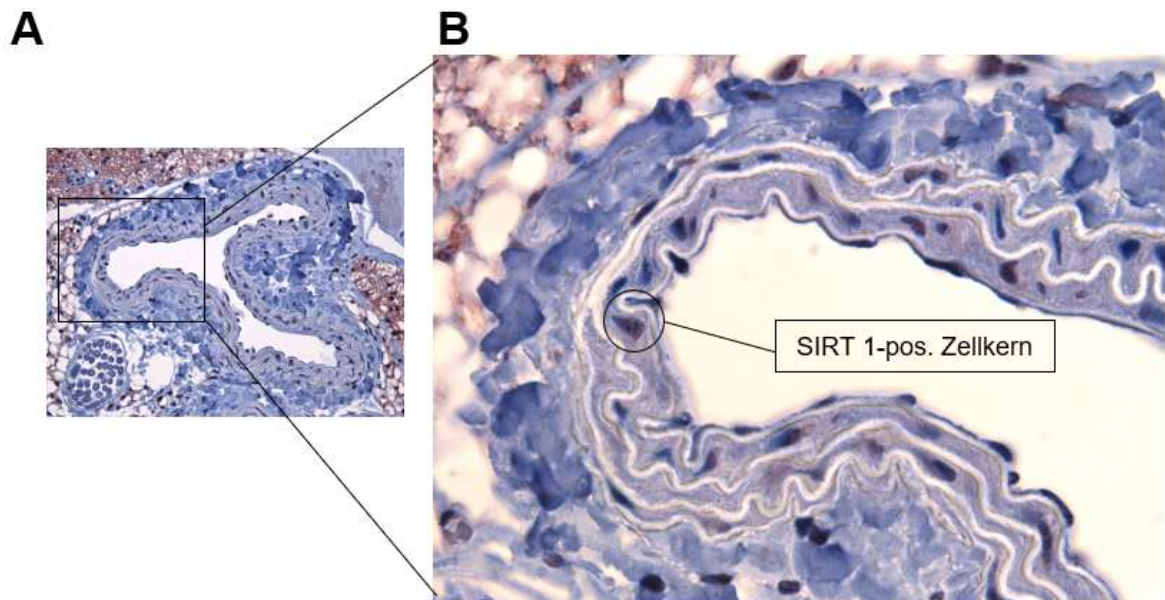


Abbildung 27: SIRT1-positive Zellkerne. Dargestellt ist ein Gefäßschnitt, welcher einer immunhistochemischen Färbung mit Sirtuin-1 unterzogen und an einem Mikroskop BX51 in 40-facher Vergrößerung aufgenommen wurde (A). Im vergrößerten Ausschnitt rechts sieht man eingekreist einen Sirtuin-1-positiven Zellkern (B).

Dabei wurde eine ähnliche Anzahl Sirtuin-1 positiver Zellkerne innerhalb der Media der Gefäße adulter und mittel-alter Mäuse festgestellt.

Die quantitative Auswertung dieser Ergebnisse ist in der nachfolgenden Grafik zusammengefasst.

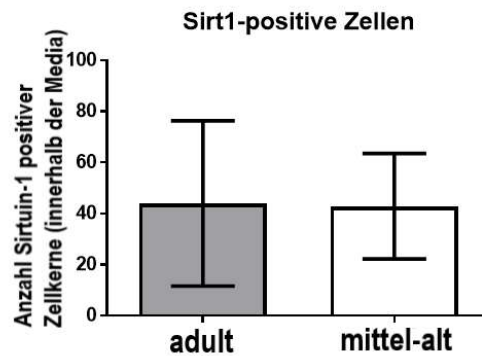


Abbildung 28: Sirtuin-1 positive Zellen (innerhalb der Media). Karotisarterien 16 Wochen alter (adulte) (n=10) und 52 Wochen alter (mittel-alter) Mäuse (n=10) wurden entnommen, histochemisch aufbereitet und immunhistochemisch auf die Expression von Sirtuin-1 untersucht. Gezeigt ist eine grafische Darstellung der Sirtuin-1 positiven Zellkerne in der Gefäßwand (Media) adulter und mittel-alter Mäuse, welche zeigt, dass die Sirtuin-1 Positivität bei adulten und mittel-alten Mäusen in ähnlichem Maße ausgeprägt war.

Untersuchung des perivaskulären und viszeralen Fettgewebes auf Sirtuin-1 (SIRT 1)

Um unsere Untersuchungen auszuweiten, wurden auch das PVAT und das VAT immunhistochemisch auf die Expression von Sirtuin-1 untersucht. Dabei konnte im PVAT eine Sirtuin-1 Positivität festgestellt werden, während beim Sirtuin-1 gefärbten VAT weder beim adulten noch beim mittel-alten VAT Sirtuin-1 positive Zellen histochemisch feststellbar waren.

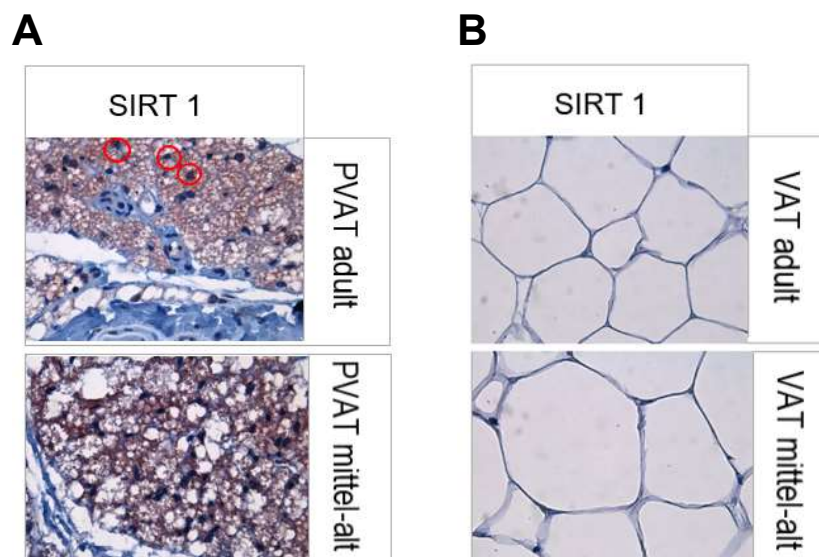


Abbildung 29: Untersuchung von PVAT und VAT auf die Expression von Sirtuin-1. (A) Dargestellt ist PVAT, welches einer immunhistochemischen Färbung mit Sirtuin-1 unterzogen wurde. Oben: PVAT einer adulten Maus, rot eingekreist sind Sirtuin-1 positive Zellen. Unten: PVAT einer mittel-alten Maus. (B) Dargestellt ist VAT, welches einer immunhistochemischen Färbung mit Sirtuin-1 unterzogen wurde. Weder im adulten (oben) noch im mittel-alten VAT (unten) sind Sirtuin-1 positive Zellen zu erkennen. Eigene Darstellungen, Ausschnitte von histochemisch angefärbten Schnitten, welche an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

Diese qualitativen Beobachtungen zur SIRT 1 Proteinexpression auf Gewebeebene wurden mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) von Mitgliedern der Arbeitsgruppe weiter untersucht. Die qPCR ergab im PVAT eine höhere SIRT 1 mRNA-Expression im Gewebe mittel-alter Mäuse im Vergleich zu adulten Tieren, im VAT war eine Sirtuin-1 Expression zwar ebenfalls nachweisbar, jedoch signifikant niedriger als im Vergleich zum PVAT mittel-alter Tiere [3].

4.3.3 Untersuchung der Expression von Prelamin A in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe

Prelamin A ist ein Biomarker für seneszente und/oder degenerierte vaskuläre glatte Muskelzellen [31]. Um im Rahmen des Projekts zu untersuchen, ob und inwieweit Prelamin A in der Gefäßwand und im PVAT exprimiert wird, wurden immunhistochemisch die entsprechenden Gewebe (Karotisarterien mit PVAT) mit dem Antikörper „Rabbit polyclonaler Anti-Prelamin A“ angefärbt und begutachtet.

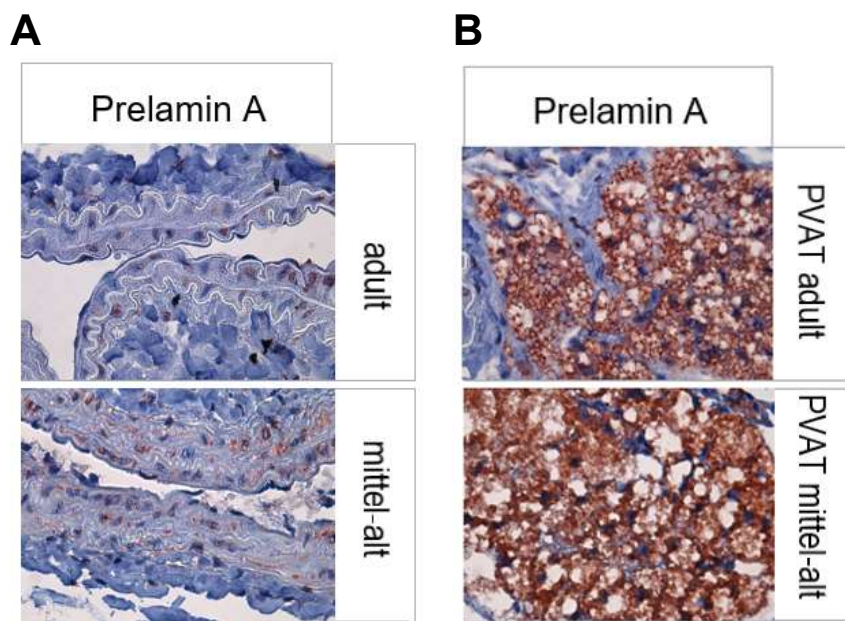


Abbildung 30: Prelamin A in der Wand herznaher Gefäße und PVAT. Dargestellt sind histologisch aufbereitete Gefäßschnitte von herznahen Gefäßen und deren PVAT, welche einer immunhistochemischen Färbung mit Prelamin A unterzogen wurden. Diese wurden dann an einem Mikroskop OLYMPUS BX51 mit Hilfe des Programms Image PRO PLUS abfotografiert Sowohl in der Wand herznaher Gefäße (A), als auch in deren PVAT (B) sieht man eine deutliche Immunpositivität von Prelamin A. Eigene Darstellungen, Ausschnitte von histochemisch angefärbten Schnitten, welche an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

Rein qualitativ war nicht eindeutig ersichtlich, ob die Prelamin A-Expression in der Gefäßwand adulter oder mittel-alter Mäuse stärker ausgeprägt war. Dementsprechend nahmen wir eine statistische Auswertung zur Prelamin A Immunopositiven Fläche (%) vor, die allerdings eine Abnahme der Prelamin A-Expression innerhalb der Wand herznaher Gefäße mittel-alter Mäuse ergab.

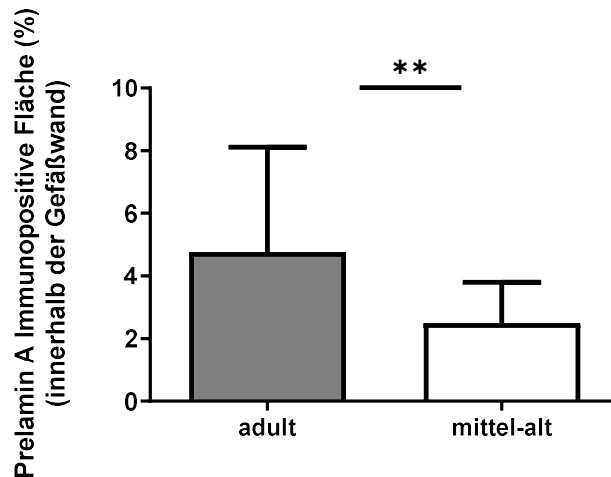


Abbildung 31: Prelamin A Immunopositive Fläche (%) innerhalb der Gefäßwand. Jeweils 13 adulten und mittel-alten Mäusen ($n=13$) wurden die Karotisarterien entnommen, histochemisch aufbereitet, als Paraffinschnitte auf Objektträgern appliziert und immunhistochemisch einer Prelamin A-Färbung unterzogen. Anschließend wurden sie an einem Mikroskop BX51 abfotografiert, immunhistochemisch mit Hilfe des Programms Image Pro PLUS ausgewertet und mit Hilfe des Programms GraphPad Prism statistisch quantifiziert. Dabei war ein Trend der erhöhten Prelamin A Immunopositiven Fläche innerhalb der Gefäßwand adulter Mäuse zu beobachten.

4.3.4 Untersuchung der Expression von Smooth muscle α -actin (SMA) in der Gefäßwand und im perivaskulären Fettgewebe

Alter geht häufig auch mit einer vermehrten Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen einher. Eine sehr wichtige Rolle spielt dabei das Krankheitsbild der Atherosklerose, bei dem es über verschiedene Krankheitsstadien, die auch die Entdifferenzierung, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen beinhalten, zum Größenwachstum der Plaques und einer Einengung des Gefäßlumens kommt [32]. Erwähnenswert sind dabei glatte Muskelzellen, welche durch verschiedene innere oder äußere Einflüsse entdifferenzieren und vermehrt migrative und proliferative Eigenschaften annehmen. Sie wandern in Richtung Intima und formieren gemeinsam mit anderen Faktoren eine sogenannte Neointima [32].

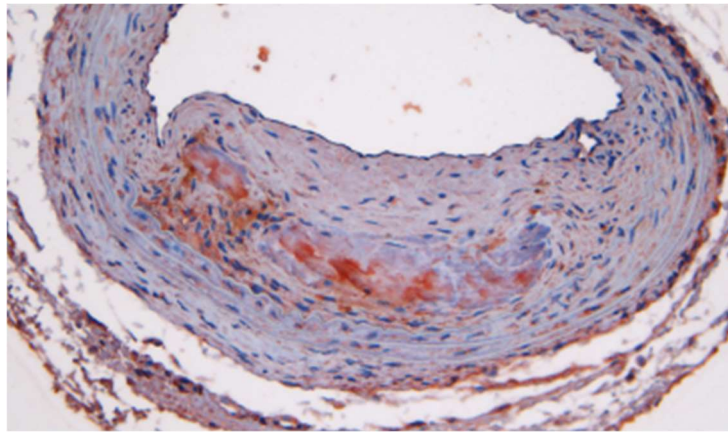


Abbildung 32: Karotisarterie der Maus mit Neointima. Abgebildet ist der Querschnitt einer murinen Karotisarterie mit ausgeprägter Neointima, welche einer immunhistochemischen Färbung mit SMA unterzogen wurde. Eigene Darstellung, Ausschnitt von immunhistochemisch angefärbtem Schnitt, welcher an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 40-facher Vergrößerung aufgenommen wurde.

Smooth muscle α -actin (SMA) ist ein Marker für differenzierte, kontraktile, nicht proliferative glatte Muskelzellen.

Bei unseren Untersuchungen testeten wir die Gefäße adulter und mittel-alter Mäuse auf SMA und stellten fest, dass in den Gefäßen mittel-alter Mäuse signifikant weniger SMA exprimiert wurde als in den Gefäßen adulter Mäuse.

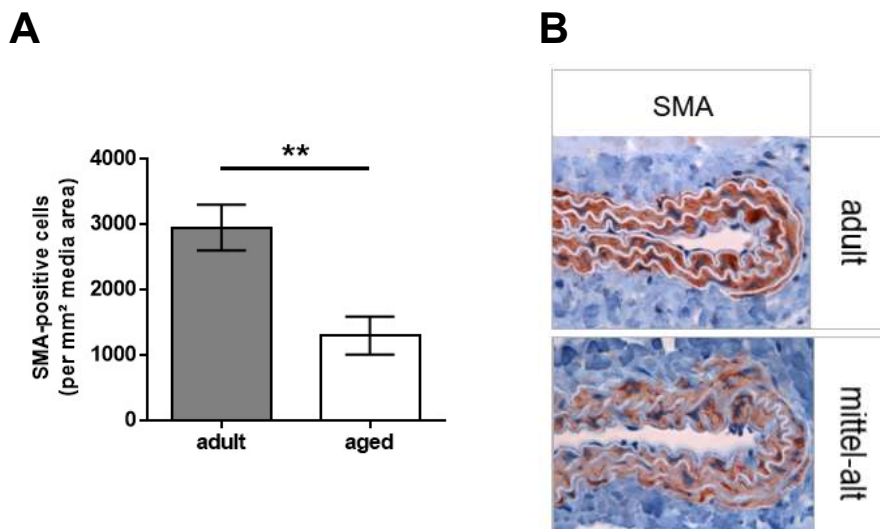


Abbildung 33: SMA-positive Zellen (pro mm² media Fläche). Karotisarterien von adulten 16 Wochen alten adulten (engl. adult) (n=12) und mittel-alten (hier engl. aged) 52 Wochen alten (n=12) Mäusen wurden histochemisch aufbereitet und Paraffinschnitte angefertigt, welche einer immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen Smooth muscle α -actin (SMA) unterzogen wurden. Diese wurden infolgedessen an einem Mikroskop OLYMPUS BX51 mit Hilfe des Programms Image Pro PLUS fotografiert und ausgewertet. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism angefertigt. (A) Dabei konnte festgestellt werden, dass die Gefäße adulter Mäuse signifikant mehr SMA exprimierten als die Gefäße mittel-alter Mäuse. (B) Desweiteren ist

die höhere SMA-Positivität der Gefäße adulter Mäuse im Vergleich zur deutlich niedrigeren SMA-Positivität mittel-alter Mäuse ebenfalls bildlich dargestellt. Eigene Darstellung, Ausschnitte von histochemisch angefärbten Schnitten, welche an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

4.3.5 Untersuchung der Gefäßwand und des perivaskulären und viszeralen Fettgewebes auf CSRP 2

Im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe (nicht Teil der vorliegenden Arbeit) zu Unterschieden in der Genexpression zwischen PVAT und VAT adulter und mittel-alter Mäuse, wurde durch die qPCR festgestellt, dass bestimmte Faktoren in den Karotisarterien und/oder im perivaskulären und/oder viszeralen Fettgewebe im Alter zu- oder abnehmen [3]. Diese Feststellungen sollten nun teilweise auch immunhistochemisch untersucht und validiert werden.

Cystein-rich-protein 2 (CSRP 2) ist ein Faktor, der in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen vorkommt und dessen Hauptfunktion die Unterbindung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand [34].

Im Rahmen des Projekts wurde mittels qPCR die mRNA Expression von CSRP 2 an den untersuchten Geweben durchgeführt, wobei festgestellt wurde, dass CSRP2 in den Gefäßen adulter Mäuse höher exprimiert wurde als in Gefäßen mittel-alter Mäuse (unpublizierte Ergebnisse). Auch eine qPCR von PVAT und VAT zu CSRP 2 wurde im Zuge des Projekts durchgeführt, wobei bei diesen beiden Geweben eine erhöhte mRNA Expression im Gewebe mittel-alter Mäuse im Vergleich zum Gewebe adulter Mäuse festgestellt werden konnte (unpublizierte Ergebnisse).

Um diese Befunde histologisch zu bestätigen und die in der Literatur beschriebene Funktion von CSRP 2 histologisch zu verifizieren, führten wir folglich immunhistochemische Färbungen an den entsprechenden Geweben durch. Rein visuell fiel ein deutlich stärkeres CSRP2 Signal in der Gefäßwand und im PVAT im Vergleich zum VAT auf, wobei kein offensichtlicher Unterschied zwischen adulten Mäusen im Vergleich zu den mittel-alten Mäusen feststellbar war. Eine statistische Auswertung zur CSRP 2-immunopositiven Fläche innerhalb der Gefäßwand bestätigte unsere visuellen Vermutungen. Es war ein nicht-signifikanter Trend einer erniedrigten CSRP 2-Expression in der Gefäßwand mittel-alter Mäuse zu verzeichnen.

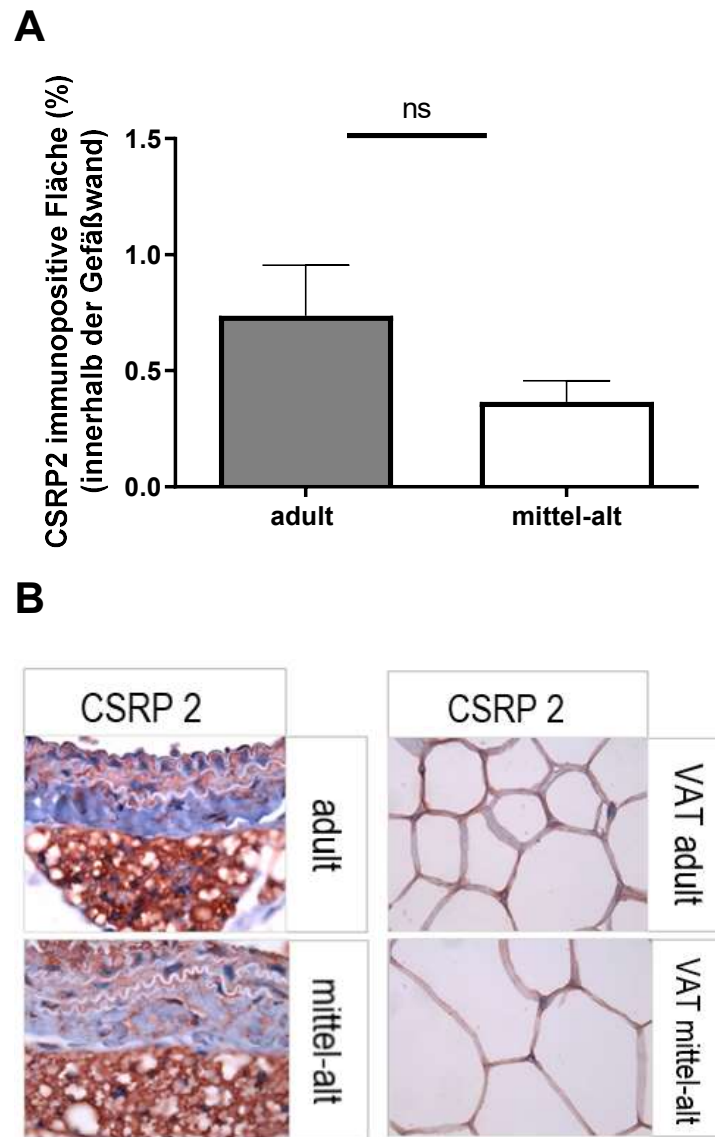


Abbildung 34: Graphische Darstellung der CSRP2 immunopositiven Fläche (%) innerhalb der Gefäßwand. (A) Dargestellt ist ein Graph zur Veranschaulichung der Auswertung der immunopositiven Fläche (%) innerhalb der Gefäßwand herznaher Gefäße adulter und mittel-alter Mäuse. Hierzu wurden Karotisarterien histochemisch aufbereitet, einer immunhistochemischen Färbung mit CSRP2 unterzogen und an einem Mikroskop OLYMPUS BX51 mit Hilfe der Software ImagePro PLUS 7 abfotografiert. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism erfolgte dann die statistische Auswertung und die graphische Darstellung. Dabei war ein non-signifikanter Trend der höheren CSRP2-positiven Fläche (%) innerhalb der Wand herznaher Gefäße adulter Mäuse im Vergleich zu den mittel-alten Mäusen feststellbar. (B) CSRP2 Immunhistochemische Färbung der Gefäßwand mit PVAT (links) und des VAT (rechts). Dabei stellten sich alle untersuchten Gewebe (Gefäßwand, PVAT und VAT) bei den adulten Mäusen im Vergleich zu den mittel-alten Mäusen immunhistochemisch CSRP 2-positiver dar. Eigene Darstellungen, Ausschnitte von immunhistochemisch angefärbten Schnitten, welche an Mikroskop OLYMPUS BX51 in 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

4.3.6 Lösung der unspezifische Hintergrundfärbung bei immunhistochemischen Färbungen

Durch die Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen fiel im Laufe der Färbungsprozesse auf, dass sich die immunhistochemischen Färbungen vor Allem im PVAT häufig unspezifisch darstellten, das heißt, dass falsch positive Signale im PVAT der Negativkontrollen der entsprechenden Schnitte zu finden waren. Letztlich stellte sich nach mehreren Untersuchungsschritten heraus, dass die Blockierung der endogenen Peroxidase allein nicht zur Unterbindung falsch positiver Signale im PVAT ausreichte. Daraufhin wurde ein weiteres Blocking-Reagenz zur Reduktion des vermehrt im PVAT vorkommenden endogenen Biotins in das Färbeprotokoll mit aufgenommen, welches das Problem der unspezifischen Hintergrundfärbung im PVAT der untersuchten Gewebe löste. Das spezifische Signal, insbesondere für CSRP 2, war jedoch stets deutlich stärker ausgeprägt und von der unspezifischen Anfärbung zu unterscheiden.

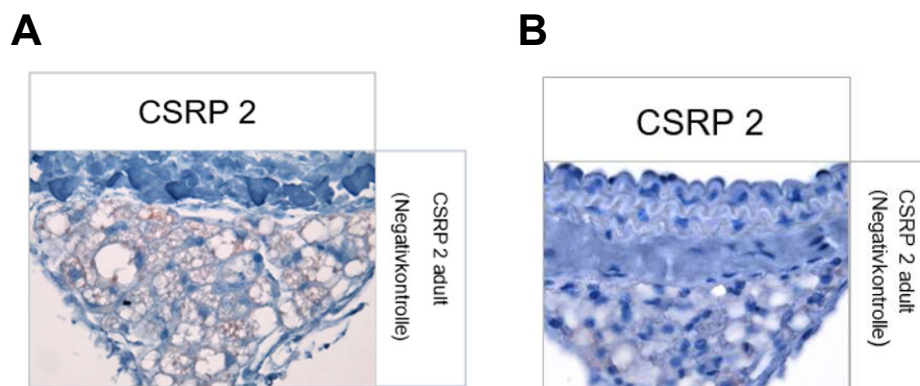


Abbildung 35: Unspezifische Hintergrundfärbung gezeigt an Negativkontrollen der CSRP 2-Immunhistochemie. Dargestellt sind zwei Bilder mit Negativkontrollen zweier Färbedurchgänge mit CSRP 2. Das linke Bild zeigt eine Negativkontrolle mit falsch positiven immunhistochemischen Signalen im PVAT (bräunlicher Schatten) (A). Das rechte Bild zeigt ebenfalls eine Negativkontrolle, bei deren Färbung allerdings ein weiterer Inkubationsschritt mit einem weiteren Blocking-Reagenz für Biotin vorgenommen wurde. Es ist deutlich zu sehen, dass keine falsch positiven Signale im PVAT mehr sichtbar waren (B).

5 Diskussion

Alter ist ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor, welcher maßgeblich zur Entstehung von Atherosklerose beiträgt [5]. Trotz der Tatsache, dass sich kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter häufiger manifestieren, sind die Gründe dafür vielschichtig und auf molekularer Ebene ist noch wenig dazu bekannt. Grundlage der häufigsten kardiovaskulären Krankheits- und Todesursachen, wie Schlaganfall, Myokardinfarkt oder chronische Herzinsuffizienz, ist die Atherosklerose [39, 40]. Diese tritt an allen größeren Gefäßen auf und nimmt mit zunehmendem Alter in ihrem Ausmaß zu. Mehrere Arbeitsgruppen nahmen die Intima-Media-Dicke der Halsschlagader (Karotisarterie, Arteria carotis) als Maß für die klinisch auftretende Atherosklerose, welche in Kombination mit weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren (Bluthochdruck, Dyslipidämie, Diabetes mellitus, Übergewicht) für das Auftreten lebensbedrohlicher gesundheitlicher Folgen (Schlaganfall, Myokardinfarkt) verantwortlich sein kann [5, 41, 42], weshalb wir in unseren Untersuchungen zur Wand herznaher Gefäße hauptsächlich Halsschlagadern (Karotisarterien) untersuchten.

In der Literatur sind bereits Studien beschrieben, welche zeigen konnten, dass die Wand herznaher Gefäße sich im Alter sowohl histo-morphologisch als auch hinsichtlich der mRNA-Expression bestimmter Faktoren verändert [3, 43]. Auch wir untersuchten die histo-morphologischen Auswirkungen von Alter auf die Gefäßwand der herznahen Arterien (Karotisarterien) und verwendeten zum Ausschluss zusätzlicher Einflussfaktoren (wie Lebensstil, Umweltfaktoren) ein Tiermodell, die Maus. In diesem Tiermodell wurde das durchschnittliche Lebensalter der Maus von circa 2 Jahren auf das durchschnittliche Lebensalter des Menschen von circa 80 Jahren übertragen. Zusätzlich zu den bereits publizierten Arbeiten zu Veränderungen der Gefäßwand interessierten uns in dieser Arbeit vor allem die histo-morphologischen Auswirkungen des Alters auf das PVAT. Da vorangegangene Arbeiten zum Einfluss von Risikofaktoren (z.B. Übergewicht) auf das PVAT viszerales Fettgewebe desselben Tieres als Vergleichsgewebe verwendet hatten [3], gingen wir in der vorliegenden Arbeit ebenso vor. Auch die Veränderung der mRNA-Expression und Sekretion bestimmter Faktoren im Alter innerhalb dieser Gewebe war für unsere Arbeitsgruppe von Interesse, weshalb im Rahmen des Projekts von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe weitergehende Untersuchungen durchgeführt wurden [3].

Im Zuge der morphometrischen Analysen der Gefäßwand stellten wir fest, dass im Alter (mittel-alte Mäuse: 52 Wochen alt) mehrere untersuchte morphometrische

Parameter der Gefäßwand (der Arteria carotis) signifikant im Vergleich zu jüngeren Tieren (adulte Mäuse: 16 Wochen alt) erhöht waren. Auch in anderen Studien wurden mit unseren Ergebnissen teilweise übereinstimmende Resultate dargelegt. Eine Arbeitsgruppe führte Untersuchungen an der Aorta von Ratten in zwei verschiedenen Altersstadien durch (junge: 2-3 Monate alt, alte: 18-24 Monate alt) und stellte dabei eine deutliche Aortenverdickung bei den älteren untersuchten Tieren fest [44]. Andere Autoren, die Untersuchungen an den Aorten von Kaninchen vornahmen, fanden heraus, dass die Aorta bestimmte altersbedingte, strukturelle Veränderungen erfährt, bei denen es sich um eine Zunahme der Dicke, des Volumens, des Gefäßdurchmessers, der Länge sowie einer intimalen Verdickung der Aorta handelt. Dabei wurden insgesamt die Aorten von 30 Kaninchen in drei Altersgruppen untersucht. Eine junge Gruppe von 3 Monate alten Tieren, eine mittel-alte Gruppe von 2-3 Jahre alten Tieren und eine alte Gruppe von 5-6 Jahre alten Tieren [7]. Wir haben bei unseren Untersuchungen der Wand herznaher Gefäße ein besonderes Augenmerk auf die *Tunica media* von Karotisarterien gelegt, wobei sich unsere signifikanten Ergebnisse der Vergrößerung der Media-Fläche im Alter, der zunehmenden Länge der *Membrana elastica media* im Alter, der erhöhten Adventitia-Fläche und der gesamten Gefäßfläche (mit Adventitia) im Alter gut in den aktuellen Literaturstand einfügen lassen. Zwar ist zum Einfluss des Alters speziell auf Karotisarterien bis auf die Intima-Media-Verdickung [5, 41, 42] in der aktuellen Literatur eher weniger beschrieben und die im Voraus erwähnten Arbeitsgruppen untersuchten ausschließlich nicht-murines Aortengewebe, allerdings stimmt die Tendenz der Vergrößerung und Verdickung der bereits angesprochenen vaskulären Strukturen im Alter mit unseren Untersuchungen im Allgemeinen überein.

Dabei sollte jedoch der Aspekt beleuchtet werden, dass die im Voraus erwähnten Arbeitsgruppen Untersuchungen an Aortengewebe vornahmen, also einem Blutgefäß, welches in-vivo anderen hämodynamischen Bedingungen ausgesetzt ist, als die von uns untersuchte Karotisarterie. Dementsprechend können zwar Parallelen zwischen den in der Literatur dargelegten und unseren Untersuchungen erkannt werden, bei deren Betrachtung dieser Aspekt allerdings berücksichtigt werden sollte. Hier wären Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen mit Untersuchungen an Karotisarterien für einen direkten Vergleich interessant gewesen, die jedoch nicht vorlagen.

Des Weiteren zielten unsere Untersuchungen der Wand herznaher Gefäße an murinem Gewebe auf eine Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf den menschlichen

Organismus ab. Zwar stimmt das murine Genom zu ungefähr 99% mit dem menschlichen Genom überein [45], allerdings muss klar zwischen der Lebensspanne der Maus und des Menschen unterschieden werden. Die maximale Lebensdauer einer Maus beträgt zwischen 24 und 36 Monaten [46]. Unsere Untersuchungen der älteren („mittel-alten“) Tiere wurden an 12 Monate alten Mäusen durchgeführt. Übertragen auf die allgemeine Lebensdauer des Menschen hätten wir es hierbei mit 30-40 Jahre alten Menschen zu tun. Ein menschliches Lebensjahr entspricht etwa 9 Lebenstagen einer Maus [45]. Die in unserer Studie als „adult“ bezeichneten Mäuse (4 Monate alt) entsprechen bezüglich der allgemeinen menschlichen Lebensdauer dementsprechend 9-13 Jahre alten Individuen. Auch dieser Aspekt sollte bei der Betrachtung unseren Untersuchungen berücksichtigt werden. Allerdings lassen sich Altersstufen in Mensch und Maus auch nicht 1:1 übertragen, sondern es können bestimmte Lebensphasen unterschieden werden [45]. Allgemein sollte zudem erwähnt werden, dass die im Voraus aufgeführten Arbeitsgruppen ihre Untersuchungen an unterschiedlichen Spezies durchführten und daher auch entsprechende Speziesunterschiede bezüglich der Veränderungen der herznahen Gefäße im Alter möglich sind. Die Ergebnisse sollten daher unter Berücksichtigung all dieser Aspekte betrachtet und miteinander verglichen werden.

Die signifikante Veränderung der Media-Parameter der untersuchten herznahen Gefäße im Alter weckte des Weiteren unser Interesse an der Veränderung der Zellularität in dieser Wandschicht, weshalb wir dazu ebenfalls morphometrische Auswertungen an der Gefäßwand der murinen Arteria carotis vornahmen. Unsere Untersuchungen ergaben eine höhere absolute Zellkernanzahl innerhalb der Mediafläche der herznahen Gefäße mittel-alter Mäuse im Vergleich zu adulten Tieren, wobei die relative Zellkerndichte innerhalb der Mediafläche im Alter unverändert bleibt [3]. In der Arbeitsgruppe wurde in weiterführenden Untersuchungen mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse des Proliferationsmarkers PCNA dann auch direkt die Zahl proliferierender Zellen in der Media dargestellt [3]. Der Vergleich der PCNA-positiven Zellen Analyse der Wand herznaher Gefäße adulter Mäuse mit mittel-alten Mäusen ließ uns keinen Unterschied feststellen, was darauf hindeutete, dass die Zellen innerhalb dieser Gefäße nicht vermehrt proliferierten, sondern die Gefäße im Alter insgesamt dicker wurden [3]. Auch andere Arbeitsgruppen führten Untersuchungen zum Einfluss von Alter auf die Zellularität der Gefäßwand durch. Die bereits im Voraus erwähnte Arbeitsgruppe, welche Auswertungen an der Aorta von Kaninchen vornahm, konnte eine verringerte relative Zellularität (Zellen/mm²) der

Tunica media und eine Zunahme von Kollagenfasern innerhalb der Aorta im Alter verzeichnen [7]. Auch die Arbeitsgruppe, welche Untersuchungen an der Aorta von Ratten vornahm, konnte eine geringere Anzahl von arteriellen glatten Muskelzellen im Alter feststellen [44]. Eine weitere Arbeitsgruppe stellte fest, dass eine erhöhte Anzahl an glatten Muskelzellen innerhalb eines herznahen Gefäßes mitbestimmend für die normale Physiologie und das Auftreten einer frühzeitigen Gefäßalterung ist [47]. Die in der Literatur von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Ergebnisse der geringeren Zellularität im Alter stimmen daher nur teilweise mit unseren vorgefundenen Ergebnissen überein. Möglicherweise waren die von uns untersuchten mittel-alten Tiere noch nicht alt genug oder es gibt Unterschiede zwischen Spezies hinsichtlich dieses Parameters.

Von Interesse waren insbesondere auch die altersbedingten morphometrischen Veränderungen von PVAT (im Vergleich zu VAT), da der Einfluss von Alter auf diesen Teil der Gefäßwand in der Literatur bisher kaum beschrieben ist. Um unsere Untersuchungen auszuweiten führten wir folglich morphometrische Analysen an PVAT und VAT durch. Dabei fanden wir heraus, dass sich sowohl beim PVAT der mittel-alten Mäuse die Adipozyten eher unilokulär darstellten und dem Aussehen von VAT annäherten, während die Adipozyten der adulten Mäuse eher eine multi-lokuläre Struktur aufwiesen. Bereits mehrere Arbeitsgruppen legten in der Literatur in ihren Untersuchungen nahe, dass PVAT je nach Lokalisation phänotypisch und funktionell Braunem Fettgewebe (BAT) ähnlich ist [48]. Phänotypisch stellt es sich dabei in Form von multi-lokulären Adipozyten mit rundem Kern dar. Funktionell weist PVAT unter physiologischen Bedingungen die günstigen Eigenschaften des braunen Fettgewebes auf und es wird vermutet, dass es durch Abgabe von Energie maßgeblich zur intravaskulären Aufrechterhaltung der Temperatur beiträgt. Bei ernährungsbedingter Adipositas, im Alter oder bei anderen äußeren Reizfaktoren kann das PVAT seine BAT-ähnlichen funktionellen und phänotypischen Eigenschaften verlieren und einen VAT-ähnlichen Phänotyp annehmen [49]. Es liegt daher nahe zu vermuten, dass sich mit zunehmendem Alter immer mehr Triacylglyceride in die Adipozyten der Fettgewebe einlagern, möglicherweise auch aufgrund einer Abnahme der Perilipinaktivität im Alter. Interessant wäre in diesem Fall auch eine morphometrische Analyse und statistische Auswertung der Perilipin-positiven Adipozytenfläche des PVAT und VAT innerhalb des adulten und mittel-alten Gewebes zum Vergleich gewesen. Obwohl wir die Expression von Perilipin im PVAT und VAT adulter und

mittel-alter Tiere untersuchten, waren diese immunhistochemischen Untersuchungen rein qualitativ. Eine quantitative Auswertung des Immunsignals mit Hilfe einer anderen Methodik zur Bestimmung der Proteinexpression (wie z.B. Western Blot oder ELISA) fand nicht statt. Andere Arbeitsgruppen fanden passend zu unseren Annahmen heraus, dass vor allem subkutanes Fettgewebe mit zunehmendem Alter seine Funktion verliert, unter anderem aufgrund mitochondrialer Dysfunktion, womit auch ein Verlust der Einlagerungskapazitäten dieser Gewebe für Triacylglyceride einhergeht. Infolgedessen kommt es zu einem erhöhten systemischen Spiegel freier Fettsäuren und daraufhin zur Verlagerung der Triacylglyceridspeicherung ins VAT [50, 51]. Bezüglich der Veränderungen der perivaskulären Adipozyten im Alter ist in der Literatur kaum etwas bekannt. Die Auswertung der Adipozytenfläche des VAT wurde im Rahmen des Projekts durch Eva Schütz, Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe zum Vergleich zwischen adulten und mittel-alten Tieren durchgeführt und zeigte eine deutlich höhere Adipozytenfläche im VAT der mittel-alten Mäuse, was sich mit unseren Feststellungen im PVAT deckte. Auch eine morphometrische Untersuchung der Gesamtfläche des PVAT wäre für unsere Untersuchungen aufschlussreich gewesen. Diese stellte sich allerdings als problematisch heraus, da das PVAT der untersuchten Schnitte häufig nur teilweise vorhanden war, was eine aussagekräftige Auswertung der Gesamtfläche des PVAT bei den meisten Gewebeschnitten sehr schwierig bis unmöglich machte.

Bei den morphometrischen Analysen der Gefäßwand und des PVAT und VAT sollte man bedenken, dass es sich um fixierte Gefäßquerschnitte handelt, die letztlich nur eine zweidimensionale Abbildung der Gefäßwand an einem bestimmten Punkt darstellen und daher die Ergebnisse der ausgewerteten Parameter von den in-vivo Bedingungen und hämodynamischen Einflüssen abweichen könnten. Allerdings stellte sich diese Methode der morphometrischen Auswertung für uns als sehr nützlich heraus, um die Gewebe adulter und mittel-alter Mäuse zu vergleichen. Somit konnten wir auch auf zweidimensionaler Ebene altersbedingte Unterschiede innerhalb der Gefäßwand, des PVAT und VAT feststellen.

In der Literatur wurde festgestellt (unter anderem von der Arbeitsgruppe beschrieben) dass sich die mRNA-Expression bestimmter Faktoren im Alter innerhalb der Gefäßwand und des PVAT verändert [3, 15, 43, 52]. Wir haben uns infolgedessen eine Auswahl der für unser Projekt relevantesten Faktoren zusammengestellt und die betreffenden Gewebe (Karotisarterien, PVAT) immunhistochemisch auf die

entsprechenden Faktoren untersucht. Dabei interessierte uns auch die Expression dieser Faktoren im VAT, weshalb wir dieses Gewebe teilweise mituntersuchten.

Bei den Untersuchungen der Gefäßwand und des PVAT zu Prelamin A konnten wir rein qualitativ keine eindeutige Aussage bezüglich der Expression von Prelamin A innerhalb der Gefäßwand und des PVAT bei adulten und mittel-alten Mäusen treffen. Eine quantitative Analyse der Prelamin A immunopositiven Fläche innerhalb der arteriellen Gefäßwand adulter und mittel-alter Mäuse ergab überraschenderweise eine Abnahme des Prelamin A Immunsignals innerhalb der Gefäßwand adulter Mäuse im Vergleich zu mittel-alten Tieren. Dies deckt sich nicht mit der bereits in der Literatur beschriebenen Tatsache, dass Prelamin A ein Biomarker für seneszente und/ oder erkrankte, degenerierte vaskuläre glatte Muskelzellen sein könnte [31]. Um genaueren Aufschluss über die Expressionslevel innerhalb der Gefäßwand adulter und mittel-alter Mäuse zu gewinnen, wären weitere Analysen zur mRNA und Proteinexpression von Prelamin A innerhalb der Wand der Arteria carotis möglicherweise aufschlussreich gewesen, welche im Rahmen des Projekts jedoch nicht vorgenommen wurden.

Des Weiteren wurde die Gefäßwand adulter und mittel-alter Mäuse auf die Expression von SMA untersucht. Rein visuell-morphometrisch konnte bereits eine deutliche Tendenz der Reduktion bei den Gefäßen mittel-alter Mäuse festgestellt werden, eine statistische Auswertung bestätigte die signifikant reduzierten Ergebnisse der mittel-alten Mäuse im Vergleich zu den adulten Mäusen. In der Literatur ist SMA als Marker für differenzierte, kontraktile, nicht proliferative glatte Muskelzellen beschrieben [32]. Dieser kommt vor Allem in den Gefäßen jüngerer Individuen vor, weshalb die von uns ermittelten und die bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zusammenpassten.

Bei der Untersuchung der Expression von Perilipin in der Gefäßwand, im PVAT und im VAT konnten wir für unsere Untersuchungen bestätigen, dass es sich beim PVAT auch tatsächlich um Fettgewebe handelt, welches entsprechende endokrine und parakrine Eigenschaften aufweist, was in der Literatur bereits mehrfach aufgeführt wurde [15, 17, 49]. Innerhalb der Gefäßwand selbst war keine Perilipin-Expression feststellbar. Zusätzlich zu diesem qualitativen Nachweis hätten wir für weiterführende Untersuchungen noch eine immunhistochemische und statistische Auswertung vornehmen können, um unsere Vermutung der erhöhten Perilipin-Expression im PVAT und VAT adulter Mäuse im Vergleich zu mittel-alten Mäusen statistisch zu verifizieren. Aufgrund der Stärke des Immunsignals war dies immunhistochemisch jedoch nicht

aussichtsreich und hätte alternative Methoden der Proteinquantifikation erfordert, für welche uns jedoch kein Material zur Verfügung stand.

Des Weiteren untersuchten wir die bereits erwähnten Gewebe (Gefäßwand, PVAT und VAT) auf Sirtuin-1 und nahmen bei der Untersuchung der Gefäßwand eine immunhistochemische und statistische Auswertung vor. Dabei fanden wir immunhistochemisch ein ähnliches Ausmaß der Expression von Sirtuin-1 bei den Gefäßen adulter und mittel-alter Mäuse, während in der Literatur häufig eine erniedrigte Sirtuin-1 Expression in den Gefäßen älterer Individuen festgestellt wurde [29, 30]. Zwar konnten wir bei Betrachtung des immunhistochemisch angefärbten PVAT vermuten, dass im PVAT adulter Mäuse mehr Sirtuin-1 auffindbar sein könnte, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Im Rahmen des Projekts wurde durch andere Projektmitarbeiter eine qPCR des PVAT mit Sirtuin-1 vorgenommen, welche eine höhere Sirtuin-1 Expression im PVAT mittel-alter Mäuse im Vergleich zum PVAT und VAT adulter Mäuse erbrachte. Die Gründe für diese Diskrepanzen sind unklar und könnten mit der Art des untersuchten Gewebes und der Analysemethodik (Protein oder mRNA, Immunhistochemie) zusammenhängen. Dies müsste durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Bei den Untersuchungen der Gefäßwand und des PVAT auf CSRP 2 stellten wir zur Bestätigung von PCR Ergebnissen, die in der Arbeitsgruppe zuvor durchgeführt wurden, fest, dass sich rein immunhistochemisch die Gefäßwand und das PVAT sowohl bei den adulten als auch bei den mittel-alten Mäusen stärker positiv im Vergleich zum VAT beider Mausgruppen darstellte, auch unter Berücksichtigung des falsch-positiven Signals aufgrund unspezifischer Bindung an das im PVAT vermehrt vorkommende endogene Biotin. Auch hier wichen die Ergebnisse zwischen der immunhistochemischen Beurteilung und der qPCR dahingehend voneinander ab, dass die CSRP 2 Expression im PVAT und VAT der mittel-alten Mäuse erhöht war. Diese Unterschiede auf mRNA-Ebene wurden erwartungsgemäß rein visuell nicht erfasst. Vor dem Hintergrund, dass CSRP 2 ein in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen vorkommender Faktor ist, dessen Funktion die Unterbindung der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen von Gefäßen ist [34], würde dies die Ergebnisse der im Rahmen des Projekts vorgenommenen qPCR mit einer erniedrigten Expression von CSRP 2 in den mittel-alten Gefäßen untermauern, da mit zunehmendem Alter die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen zunimmt [47, 53]. Auch eine von uns aufgestellte Hypothese, dass CSRP 2 über das PVAT einen protektiven Effekt auf die

Gefäße gegen Neointimaformation und Atherosklerose haben könnte und das PVAT ein funktionelles Gewebe mit einer muskulären Komponente sein könnte, passt mit unseren ermittelten Ergebnissen zusammen. Eine andere Arbeitsgruppe hingegen führte Untersuchungen zur Rolle von CSRP 2 an zwei Gruppen von Mäusen durch. Bei einer Gruppe handelte es sich um transgene Mäuse, bei denen die CSRP 2-Expression während der Gefäßentwicklung und im adulten Alter überexprimiert wurde. Bei der anderen Gruppe wurden Kreuzungen aus transgenen und atherosklerosegefährdeten Mäusen, welche zusätzlich einer atherogenen Diät unterzogen wurden, untersucht. Es wurden dabei Hinweise darauf gefunden, dass CSRP 2 zur Stabilisierung der atherosklerotischen Plaque und zur phänotypischen Veränderung vaskulärer glatter Muskelzellen von einem ruhenden zu einem proliferativ-wandernden Phänotyp beitragen könnte [33]. Der Aspekt Alter und PVAT wurde in keiner von beiden Arbeiten untersucht.

In der Literatur ist des Weiteren vielfältig beschrieben, dass das PVAT aktiv an der Pathogenese von Gefäßerkrankungen und Funktionsstörungen der Gefäßwand beteiligt sein könnte, wobei der Aspekt Alter dabei bisher eher kaum untersucht wurde [17, 54, 55]. Eine andere Arbeitsgruppe führte Untersuchungen an periaortalem Fettgewebe durch und konnte dabei feststellen, dass das PVAT das darunterliegende Gefäß vor vaskulärer Dysfunktion schützen kann [56]. Andere Arbeitsgruppen wiederum ermittelten in ihren Untersuchungen, dass das PVAT unter physiologischen Bedingungen protektiv gegen atherosklerotische Veränderungen wirkt und unter pathologischen Bedingungen zu Gefäßdysfunktionen und lokalen

Entzündungen führen kann [57]. Auch unsere Ergebnisse lassen sich gut in den aktuellen Literaturstand einfügen. Unsere Untersuchungen führten uns zu der Feststellung, dass das PVAT ein endokrines und parakrines Gewebe ist, welches unter physiologischen und pathologischen Bedingungen bestimmte Faktoren synthetisiert. Unter physiologischen Bedingungen synthetisiert es protektive Faktoren, wie im oben aufgeführten Beispiel CSRP 2, unter pathologischen Bedingungen atherosklerose- und entzündungsfördernde Faktoren. Mit zunehmendem Alter geht die Expression protektiver Faktoren mehr und mehr verloren und damit auch der mit diesen einhergehende protektive Effekt. Wie bereits im Voraus erwähnt, haben wir bei unseren morphometrischen Untersuchungen des PVAT zwei verschiedene Phänotypen des PVAT feststellen können, bei dem es BAT-ähnliche und WAT-ähnliche phänotypische und funktionelle Eigenschaften aufwies und sich

dementsprechend entweder multi- oder unilokulär darstellte. Folglich passen unsere morphometrischen Untersuchungen und unsere immunhistochemischen Untersuchungen zu CSRP2 ebenfalls zusammen.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen mit CSRP 2 färbten wir humanes PVAT und VAT an und verglichen die immunhistochemische CSRP 2-Expression in diesen beiden Fettgewebstypen miteinander, wobei wir feststellen konnten, dass die CSRP 2-Expression im humanen PVAT höher als im VAT war (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde konnten innerhalb der Arbeitsgruppe auch mittels einer qPCR bestätigt werden. Auch diese Befunde könnten folglich eine Bestätigung für die bereits angesprochene Hypothese darstellen, dass das PVAT unter physiologischen Bedingungen einen protektiven Effekt auf die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen hat und das CSRP 2 dabei eine Rolle spielen könnte.

Bei den Ergebnissen der morphometrischen Analysen und Beurteilungen der aufgeführten Faktoren ist anzumerken, dass die Auswahl der immunpositiven Farbe subjektiv durch die auswertende Person erfolgte, was bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. Zudem waren bei den immunhistochemischen Färbungen einige Fehlerquellen, die gegebenenfalls falsch immunpositive Signale verursachen könnten, möglich. So hatten wir zunächst das Problem der Unspezifität bei einigen immunhistochemischen Färbungen, das heißt, dass falsch positive Signale im PVAT der Negativkontrollen der entsprechenden Schnitte zu finden waren. Nach mehreren Untersuchungen und der Einführung eines zusätzlichen Blockierungsschritts gegen endogenes Biotin in die Färbeprotokolle konnten wir letztlich das Problem lösen.

Letztendlich konnten wir einige Parallelen, allerdings auch ein paar Abweichungen vom aktuellen Literaturstand finden, was vor Allem bei den Untersuchungen an Prelamin A und Sirtuin-1 der Fall war. Weiterführende Untersuchungen und andere Analyseverfahren sind notwendig um herauszuarbeiten, ob die in dieser Arbeit herausgestellten histochemisch-morphometrischen und immunhistochemischen Veränderungen im Alter ursächlich für den Einfluss von Alter auf die Wand herznaher Gefäße und das PVAT sein könnten.

6 Zusammenfassung

In der Medizin wird Alter als eine nicht reversible Verschlechterung physiologischer Abläufe des Organismus verstanden, welche das Überleben und die Fortpflanzung dieses Organismus beeinträchtigt. Alter ist ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre (und andere) Erkrankungen, allerdings sind die Mechanismen vielfältig und noch unvollständig verstanden [4].

Ziel der Dissertation war es, den Einfluss des biologischen Alters auf die Gefäßwand der herznahen Arterien und das PVAT der Maus anhand morphometrischer und (immun-)histochemischer Untersuchungen zu evaluieren. Dazu wurden morphometrische Untersuchungen an histochemisch aufbereiteten Gefäß- und Fettgewebsschnitten von adulten (16 Wochen-alt) und mittel-alten (52 Wochen-alt) C57BL/6 Wildtypmäusen durchgeführt, welche zuvor einer VES oder VES-MTC-Färbung unterzogen worden waren. Dabei konnten wir feststellen, dass die Fläche der *Tunica media* und die Länge der *Membrana elastica media*, die Adventitiafläche und die totale Gefäßfläche (einschließlich Adventitia) bei den Gefäßen der mittel-alten Mäuse im Vergleich zu den Gefäßen der adulten Mäuse signifikant vergrößert waren. Ähnliche Befunde waren bereits zuvor von anderen Arbeitsgruppen berichtet worden und treten auch beim alten Menschen auf. Auch die Auswertung der Mediadicke, der totalen Gefäßfläche (innerhalb der *Lamina elastica externa*, also ohne die Adventitia), der Länge der *Membrana elastica externa* und der Adventitiadicke wiesen eine signifikante Erhöhung bei den Gefäßen der mittel-alten Mäuse im Vergleich zu den Gefäßen der adulten Mäuse auf. Bei den Auswertungen der Zellularität innerhalb der Media stellten wir eine erhöhte absolute Zellzahl in den Gefäßen der mittel-alten Mäuse fest, allerdings war die Zelldichte (also die Zellzahl pro mm²) aufgrund der Flächenzunahme der Media nicht gegenüber den adulten Mäusen verändert. Passend dazu fanden wir eine reduzierte Expression von SMA innerhalb der Media herznaher Gefäße, was auf eine Entdifferenzierung glatter Muskelzellen der Gefäßwand mit zunehmendem Alter hindeutet. Marker für zelluläre Seneszenz, wie SIRT1, waren in ähnlichem Umfang in der Tunica media adulter und mittel-alter Mäuse exprimiert, Marker für seneszente Muskelzellen wie Prelamin A waren in der Gefäßwand adulter Mäuse höher exprimiert. Bei den morphometrischen Untersuchungen der Fläche einzelner Adipozyten des PVAT im Vergleich zum VAT fanden wir Hinweise darauf,

dass PVAT im Alter seine BAT-ähnlichen funktionellen und phänotypischen Eigenschaften verliert und einen WAT-ähnlichen Phänotyp annimmt. Morphometrisch konnten wir dies anhand von im Alter sich unilokulär darstellenden Adipozyten innerhalb des PVAT feststellen. Passend dazu fanden wir immunhistochemisch Hinweise auf eine im Alter sinkende Perilipinexpression innerhalb des PVAT, was mit einer mit zunehmendem Alter steigenden Einlagerung von Triacylglyceriden in Adipozyten des PVAT erklärt werden könnte. Der immunhistochemische Nachweis von Perilipin im PVAT ließ uns zudem sicher bestimmen, dass es sich bei diesem Gewebe auch tatsächlich um Fettgewebe handelt. In der Literatur wurde der Einfluss von Alter auf die Expression verschiedener Mediatoren und Marker innerhalb des PVAT bisher kaum untersucht [15]. Als möglichen Faktor mit einer spezifischen Funktion untersuchten wir die Gewebe auf CSRP 2. Dabei stellten wir immunhistochemisch fest, dass in den Gefäßen und im PVAT alters-unabhängig eine höhere CSRP 2-Expression zu finden war, deren Bedeutung noch geklärt werden muss.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere morphometrischen Untersuchungen zur Veränderung der Wand herznaher Gefäße und des PVAT im Alter signifikante Veränderungen in Größe und zellulärer Zusammensetzung nachweisen konnten und die bereits in der Literatur beschriebenen Daten weiter ergänzen, insbesondere hinsichtlich des Effekts des kardiovaskulären Risikofaktors Alter auf das PVAT. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese morphologischen und funktionellen Veränderungen eine kausale Bedeutung haben oder möglicherweise modifizierbar sind, um die Auswirkungen von Alter auf die Gefäßwand in Zukunft abmildern zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. *Herz-Kreislauf-Erkrankungen*. 2013 [cited 2020 26.01.2020]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/HKK/HKK_node.html.
2. Lakatta, E.G. and D. Levy, *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease*. *Circulation*, 2003. **107**(1): p. 139-46.
3. Eva Schütz 1, Rajinikanth Gogiraju 1,†, Maria Pavlaki 2, Ioannis Drosos 1, George S. Georgiadis 3, Christos Argyriou 3, Amina Rim Ben Hallou 1 , Fotios Konstantinou 4, Dimitrios Mikroulis 4, Rebecca Schüler 5, Magdalena L. Bochenek 1,5, Sogol Gachkar 1, Katja Buschmann 6, Mareike Lankeit 5, Susanne H. Karbach 1,5 , Thomas Münzel 1 , Dimitrios Tziakas 2, Stavros Konstantinides 2,5 and Katrin Schäfer 1,* , *Age-Dependent and -Independent Effects of Perivascular Adipose Tissue and Its Paracrine Activities during Neointima Formation*. *IJMS*, 2019.
4. Dodig, S., I. Cepelak, and I. Pavic, *Hallmarks of senescence and aging*. *Biochem Med (Zagreb)*, 2019. **29**(3): p. 030501.
5. Ren, L., et al., *Impact of Cardiovascular Risk Factors on Carotid Intima-Media Thickness and Degree of Severity: A Cross-Sectional Study*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0144182.
6. Costantino, S., F. Paneni, and F. Cosentino, *Ageing, metabolism and cardiovascular disease*. *J Physiol*, 2016. **594**(8): p. 2061-73.
7. Orlandi, A., et al., *Age-related modifications of aorta and coronaries in the rabbit: a morphological and morphometrical assessment*. *Arch Gerontol Geriatr*, 1993. **17**(1): p. 37-53.
8. Knoppert, S.N., et al., *Cellular Senescence and the Kidney: Potential Therapeutic Targets and Tools*. *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 770.
9. Fridlyanskaya, I., L. Alekseenko, and N. Nikolsky, *Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review*. *Exp Gerontol*, 2015. **72**: p. 124-8.

10. Zhu, Y., et al., *Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction*. Biogerontology, 2019. **20**(1): p. 1-16.
11. Harrer, E., *Kalzifizierung arteriosklerotischer Läsionen histologische und rasterelektronenmikroskopische Befunde* 2001: p. 114.
12. Wolf, T., *Experimentelle histomorphometrische, histomorphologische und angiographische Untersuchungen zum Einfluss einer immunsuppressiven Koronarstentbeschichtung mit Tacrolimus im Schweinmodell*. 2003.
13. Milutinovic, A., D. Suput, and R. Zorc-Pleskovic, *Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review*. Bosn J Basic Med Sci, 2019.
14. Saxton, S.N., et al., *Mechanistic Links Between Obesity, Diabetes, and Blood Pressure: Role of Perivascular Adipose Tissue*. Physiol Rev, 2019. **99**(4): p. 1701-1763.
15. K Schäfer, I.D.a.S.K., *REVIEW Perivascular adipose tissue: epiphenomenon or local risk factor?* 2017.
16. Aghamohammadzadeh, R., et al., *Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(3): p. 670-82.
17. Pan, X.X., et al., *Perivascular adipose tissue-derived stromal cells contribute to vascular remodeling during aging*. Aging Cell, 2019. **18**(4): p. e12969.
18. Katrin Schäfer, M.H., Colin Goeschen, Claudia Dellas, Marianne Pynn, David J. Loskutoff, and Stavros Konstantinides, *Leptin Promotes Vascular Remodeling and Neointimal Growth in Mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2004.
19. Horimatsu, T., et al., *Remote Effects of Transplanted Perivascular Adipose Tissue on Endothelial Function and Atherosclerosis*. Cardiovasc Drugs Ther, 2018. **32**(5): p. 503-510.
20. Apovian, C.M., et al., *Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(9): p. 1654-9.

21. Chatterjee, T.K., et al., *Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding*. *Circ Res*, 2009. **104**(4): p. 541-9.
22. Barandier, C., J.P. Montani, and Z. Yang, *Mature adipocytes and perivascular adipose tissue stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(5): p. H1807-13.
23. Hariri, R.J., et al., *Aging and arteriosclerosis. I. Development of myointimal hyperplasia after endothelial injury*. *J Exp Med*, 1986. **164**(4): p. 1171-8.
24. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. *Obes Rev*, 2010. **11**(1): p. 11-8.
25. Shimamoto, Y., et al., *Is visceral fat really a coronary risk factor? A multi-detector computed tomography study*. *Int Heart J*, 2013. **54**(5): p. 273-8.
26. Gonzalez, E., et al., *Body composition analysis and adipocytokine concentrations in haemodialysis patients: abdominal fat gain as an additional cardiovascular risk factor*. *Nefrologia*, 2017. **37**(2): p. 138-148.
27. Albus, C., Dr., , U. Alexy, Dr.,, and A. Anastassiades. *Lexikon der Ernährung: Lipolyse*. 2001 [cited 2020 27.01.2020]; Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/ernaehrung/lipolyse/5387>.
28. Miyoshi, H., et al., *Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(23): p. 15837-44.
29. Bai, B., et al., *Cyclin-dependent kinase 5-mediated hyperphosphorylation of sirtuin-1 contributes to the development of endothelial senescence and atherosclerosis*. *Circulation*, 2012. **126**(6): p. 729-40.
30. Lee, S.H., et al., *Sirtuin signaling in cellular senescence and aging*. *BMB Rep*, 2019. **52**(1): p. 24-34.
31. Ragnauth, C.D., et al., *Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging*. *Circulation*, 2010. **121**(20): p. 2200-10.
32. Chen, L., et al., *Smooth Muscle-Alpha Actin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Inhibiting Rac1 Activity*. *PLoS One*, 2016. **11**(5): p. e0155726.

33. Chen, C.H., et al., *Modulation of cysteine-rich protein 2 expression in vascular injury and atherosclerosis*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(11): p. 7033-41.
34. Chen, C.H., et al., *Cysteine-rich protein 2 alters p130Cas localization and inhibits vascular smooth muscle cell migration*. Cardiovasc Res, 2013. **100**(3): p. 461-71.
35. *Käfige, Gitterdeckel und Zubehör für Kleinnager*. 2017 [cited 2020 28.01.2020]; Available from: https://www.zoonlab.de/downloads/1_Zubehoer_8S_DE.pdf.
36. *smart SERVIER MEDICAL ART*. 2020. [cited 15.11.2020] Available from: <https://smart.servier.com/page/3/?s=arteries>
37. Lang, G., *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2013, Wien: SpringerWienNewYork. 444.
38. *GraphPad PRISM*. Wikipedia: [cited 2020 08.09.2020]; Available from: https://de.wikipedia.org/wiki/GraphPad_PRISM.
39. Sztajzel, R., *Ultrasonographic assessment of the morphological characteristics of the carotid plaque*. Swiss Med Wkly, 2005. **135**(43-44): p. 635-43.
40. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. Science, 2013. **339**(6116): p. 161-6.
41. Lorenz, M.W., et al., *Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS)*. Stroke, 2006. **37**(1): p. 87-92.
42. Georgios Tsivgoulis, M., Konstantinos Vemmos, MD, Christos Papamichael, MD, Konstantinos Spengos, MD, Efstathios Manios, MD, Kimon Stamatelopoulos, MD, Demetrios Vassilopoulos, MD, PhD, and Nikolaos Zakopoulos, MD, *Common Carotid Artery Intima-Media Thickness and the Risk of Stroke Recurrence*. Stroke, 2006.
43. Tesouro, M., et al., *Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification*. J Intern Med, 2017. **281**(5): p. 471-482.
44. Chajara, A., et al., *Effect of aging on neointima formation and hyaluronan, hyaluronidase and hyaluronectin production in injured rat aorta*. Atherosclerosis, 1998. **138**(1): p. 53-64.

45. Dutta, S. and P. Sengupta, *Men and mice: Relating their ages*. Life Sci, 2016. **152**: p. 244-8.
46. Azzu, V. and T.G. Valencak, *Energy Metabolism and Ageing in the Mouse: A Mini-Review*. Gerontology, 2017. **63**(4): p. 327-336.
47. Lacolley, P., et al., *Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease*. Physiol Rev, 2017. **97**(4): p. 1555-1617.
48. Padilla, J., et al., *Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013. **304**(7): p. R543-52.
49. Hildebrand, S., J. Stumer, and A. Pfeifer, *PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 70.
50. Pararasa, C., C.J. Bailey, and H.R. Griffiths, *Ageing, adipose tissue, fatty acids and inflammation*. Biogerontology, 2015. **16**(2): p. 235-48.
51. Boengler, K., et al., *Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2017. **8**(3): p. 349-369.
52. Buffa, S., et al., *Biomarkers for vascular ageing in aorta tissues and blood samples*. Exp Gerontol, 2019. **128**: p. 110741.
53. Monk, B.A. and S.J. George, *The Effect of Ageing on Vascular Smooth Muscle Cell Behaviour--A Mini-Review*. Gerontology, 2015. **61**(5): p. 416-26.
54. Queiroz, M. and C.M. Sena, *Perivascular adipose tissue in age-related vascular disease*. Ageing Res Rev, 2020. **59**: p. 101040.
55. Mancio, J., E.K. Oikonomou, and C. Antoniades, *Perivascular adipose tissue and coronary atherosclerosis*. Heart, 2018. **104**(20): p. 1654-1662.
56. Gonzaga, N.A., et al., *Perivascular adipose tissue protects against the vascular dysfunction induced by acute ethanol intake: Role of hydrogen peroxide*. Vascul Pharmacol, 2018. **111**: p. 44-53.
57. Qi, X.Y., et al., *Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword*. Cardiovasc Diabetol, 2018. **17**(1): p. 134.

Die Ergebnisse der Arbeit wurden wie folgt publiziert:

Schütz E*, Gogiraju R*, Pavlaki M, Drosos I, Georgiadis GS, Argyriou C, **Ben Hallou AR**, Konstantinou F, Mikroulis D, Schüler R, Bochenek ML, Buschmann K, Lankeit M, Karbach S, Münzel T, Tziakas D, Konstantinides S, Schäfer K. Age-dependent and - independent effects of perivascular adipose tissue and its paracrine activities during neointima formation. *Int J Mol Sci* 2019 Dec 31;21(1). pii: E282. doi: 10.3390/ijms21010282.

* *geteilte Erstautorenschaft*

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen großen Dank an all die Menschen aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich ... für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit. Auch bei ... und ... , ebenfalls Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, möchte ich mich an dieser Stelle für die labortechnische Einführung und die Programmunterweisungen zum Programm Image Pro PLUS 7.0 ganz herzlich bedanken. Ebenfalls der gesamten weiteren Arbeitsgruppe gilt mein herzlicher Dank.

Für die Durchsicht möchte ich meiner lieben Schwester ... und meinem Schwager ... meinen besonderen Dank aussprechen.

Meinen Eltern ... und ..., Geschwistern ... und ... und all meinen Freunden danke ich von ganzem Herzen für Ihre Geduld und ermutigenden Zusprüche während der Arbeit an meiner Dissertation.