

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

Untersuchung der Interaktion von Myeloperoxidase und Fibrillin-1 im Rahmen des Marfan-Syndroms

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Malte Julian Kochen
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 15. Januar 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. nat. M. Mollenhauer
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G. Sengle

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Dr. rer. nat. Martin Mollenhauer
Frau Priv.-Doz. Dr. Anna Klinke
Herr Dr. med. Dennis Mehrkens
Herr Priv.-Doz. Dr. Matti Adam
Herr Univ.-Prof. Dr. Stephan Baldus

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse der Massenspektrometrie wurden nach Probenvorbereitung durch mich ohne meine Mitarbeit durch die CECAD Proteomics Core Facility der Universität zu Köln ermittelt.

Die in dieser Arbeit dargestellte 2D10G9-Färbung erfolgte durch Christine Yu-Nung Chuang aus dem Michael J. Davies Labor des Dept. of Biomedical Sciences des Panum Instituts der Universität von Kopenhagen.

Der hier dargestellte MPO-ELISA wurde durch Christina Schroth durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 19.08.2025

Unterschrift:

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Mollenhauer und meiner Betreuerin Frau PD Dr. rer. nat. Anna Klinke bedanken, die mir bei der Durchführung meines Promotionsprojektes durch eine engagierte Betreuung, Bereitstellung aller notwendigen Materialien und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten und Arbeit jederzeit zur Seite standen. Weiterhin hervorzuheben ist Herr Dr. med. Dennis Mehrkens, der dieses Projekt konzeptualisiert und unterstützt hat.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. Stephan Baldus, der mit vielen konstruktiven Ratschlägen und Strukturierungshilfen mein Dissertationsprojekt in den richtigen Momenten in die richtigen Bahnen lenkte.

Außerdem möchte ich mich für die wunderbare Unterstützung, Aufmunterung, Expertise und Wertschätzung von Herrn Dr. med. Johannes Dohr, Herrn Simon Geißen, Frau Alina Sobhani, Herrn Dr. med. Nam Gyu Im und Herrn Dr. rer. nat. Kashish Manchanda bedanken. Ohne euch wären die Wartezeiten der Versuche mindestens doppelt so lang, die Mittagspausen trist und die Methodik meiner Versuche nur halb so gut gewesen.

Ebenfalls danke an Frau Christina Schroth, die mir mit hilfreichen Tipps und Ratschlägen in technischen und methodischen Belangen tatkräftig zur Seite stand.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Sengle, der das Dissertationsprojekt mit dem Bereitstellen von rekombinanten Proteinen und HEK293-Zellen unterstützte. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. phil. Michael Davies und Frau Dr. Christine Chuang für die Durchführung der 2D10G9-IHC-Färbung bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Ehefrau, Frau Dr. med. Elena Kochen, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, mir mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und jetzt vermutlich mehr über das Dissertationsthema weiß, als ihr lieb ist. Danke für das Zuhören, die Begleitung durch die Höhen und Tiefen des Projektes und den Rückhalt. Ohne Dich hätte ich das nicht geschafft.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Mit eurer liebevollen und herzlichen Art wart ihr mir immer ein Vorbild, habt mich motiviert und mich unterstützt, wo es möglich war.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 7 |
| 1. ZUSAMMENFASSUNG | 9 |
| 2. EINLEITUNG | 10 |
| 2.1. Das Marfan-Syndrom | 10 |
| 2.1.1. Phänotypische Ausprägungen | 11 |
| 2.2. Fibrillin-1 | 11 |
| 2.2.1. Aufbau und Funktion der Proteindomänen | 12 |
| 2.2.2. Heparin-Bindungsstellen | 14 |
| 2.3. Pathomechanismus des MFS | 15 |
| 2.4. Therapie des MFS | 16 |
| 2.4.1. Medikamentöse Therapieoptionen | 16 |
| 2.4.2. Chirurgische Therapieoptionen | 17 |
| 2.5. Rekombinante Proteine | 18 |
| 2.5.1. rF11 | 18 |
| 2.5.2. Cb EGF 9-15 | 19 |
| 2.6. Neutrophile Granulozyten | 19 |
| 2.7. Myeloperoxidase | 20 |
| 2.7.1. Katalytische Eigenschaften von MPO | 21 |
| 2.7.2. Der Halogenierungszyklus | 21 |
| 2.7.3. Der Peroxidasezyklus | 21 |
| 2.7.4. Proinflammatorische Eigenschaften | 22 |
| 2.8. Myeloperoxidase und Inflammation | 23 |
| 2.9. Klinische Relevanz | 24 |
| 2.10. Zielsetzung des Projekts | 24 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 3.1. Chemikalien | 26 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.2. | Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 3.3. | Kits | 28 |
| 3.4. | Geräte und Software | 28 |
| 3.5. | Mausmodelle | 28 |
| 3.6. | Zellkultur | 29 |
| 3.6.1. | HASMC | 29 |
| 3.6.2. | HEK293 | 30 |
| 3.7. | Immunhistologie | 31 |
| 3.7.1. | Immunfluoreszenz (IF) von HASMCs | 31 |
| 3.7.2. | IF von murinen Aorten | 33 |
| 3.7.3. | Immunhistochemie (IHC): AEC-Färbungen | 34 |
| 3.7.4. | Auswertung der immunhistologischen Färbungen | 35 |
| 3.8. | Verwendete Proteine | 35 |
| 3.8.1. | rF11 | 35 |
| 3.8.2. | Cb EGF 9-15 | 35 |
| 3.8.3. | Tropoelastin | 36 |
| 3.9. | Western Blot (WB) | 36 |
| 3.9.1. | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 36 |
| 3.9.2. | Blotting | 37 |
| 3.9.3. | Färbung der Gele | 38 |
| 3.9.4. | Probenvorbehandlung: Inaktivierung von MPO | 38 |
| 3.9.5. | Probenvorbehandlung: Synthese von HOCl | 39 |
| 3.9.6. | Probenvorbehandlung: Inkubation mit MPO und H ₂ O ₂ oder HOCl | 39 |
| 3.10. | Datenbankanalyse | 40 |
| 3.11. | Massenspektrometrie (MS) | 40 |
| 3.12. | Statistik | 41 |
| 4. | ERGEBNISSE | 42 |
| 4.1. | MPO IHC und IF der Aorta ascendens | 42 |
| 4.2. | 2D10G9 IHC der Aorta ascendens | 46 |
| 4.3. | ELISA von MPO in Aortenlysat | 46 |

| | | |
|---------|--|-----------|
| 4.4. | MPO/Fibrillin-1 IF Co-Färbung von HASMCs nach Inkubation mit MPO | 47 |
| 4.5. | Nitrotyrosin-3/Fibrillin-1 IF Co-Färbung von HASMCs nach Inkubation mit MPO | 48 |
| 4.6. | SDS-PAGE und WB von rekombinantem rF11 nach Inkubation mit MPO und H ₂ O ₂ | 49 |
| 4.7. | Gelelektrophorese von rekombinantem rF11 nach Inkubation mit HOCl | 52 |
| 4.8. | SDS-PAGE von rekombinantem WT bzw. MFS-mutiertem cb EGF 9-15 nach Inkubation mit MPO | 53 |
| 4.9. | SDS-PAGE und WB von rekombinantem Tropoelastin nach Inkubation mit MPO | 53 |
| 4.10. | Datenbankanalyse: MFS-Mutationen auf AA-Ebene | 54 |
| 4.10.1. | Charakterisierung von MFS-Missense-Mutationen betroffener Domänen | 55 |
| 4.10.2. | Charakterisierung von MFS-Missense-Mutationen betroffener AAs | 56 |
| 4.11. | MS von rekombinantem rF11 nach Inkubation mit MPO | 59 |
| 4.11.1. | Analyse detektierter Oxidationen | 59 |
| 5. | DISKUSSION | 65 |
| 5.1. | MPO ist in den TAA-Aortenwänden von MFS-Mäusen deutlich erhöht | 65 |
| 5.2. | MPO kolokalisiert <i>in vitro</i> nicht primär mit Fibrillin-1, sondern mit HASMC Nuklei | 66 |
| 5.3. | Das MPO/H ₂ O ₂ System induziert oxidativen Stress an Fibrillin-1 | 67 |
| 5.4. | Kein MPO/H ₂ O ₂ -bedingter Masseshift von Tropoelastin | 68 |
| 5.5. | Cystein-Mutationen als mit Abstand häufigste Ursache beim MFS, Methionin mit untergeordneter Rolle | 69 |
| 5.6. | MS mit höherer Detektionsrate an Peptiden nach Inkubation mit MPO/H ₂ O ₂ | 70 |
| 5.7. | MPO scheint über Heparinbindungsstellen an rF11 heranzutreten | 70 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 73 |
| 7. | ANHANG | 91 |
| 7.1. | Abbildungsverzeichnis | 91 |
| 7.2. | Tabellenverzeichnis | 92 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| •..... | Radikal |
| AA..... | Aminosäure |
| AAA..... | Bauchaortenaneurysma |
| ABAH..... | 4-Amino-benzhydrazid |
| ACE..... | Angiotensin Converting Enzyme |
| AEC..... | 3-Amino-9-Ethyl Carbazol |
| ASMCs..... | Aortale glatte Muskelzellen |
| AT1-Blocker..... | Angiotensin II Typ 1 Rezeptorblocker |
| BB..... | Betablocker |
| BCA..... | Bicinchoninsäure-Assay |
| BMP..... | Knochenmorphogenetisches Protein |
| Br..... | Bromid |
| BSA..... | Rinder Serumalbumin |
| cb EGF..... | Kalzium bindende Epidermal Growth Factor like |
| CCB..... | Kalzium-Kanal Blocker |
| Cl ⁻ | Chlorid |
| COPD..... | Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung |
| DAPI..... | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DB..... | Datenbank |
| DKO..... | Double Knockout; Kreuzung der Fbn1C1039G/+ und der MPO-/- Mauslinie |
| DMEM..... | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO..... | Dimethylsulfoxid |
| DTT..... | Dithiothreitol |
| EGF..... | Epidermal Growth Factor like |
| ESC..... | European Society of Cardiology |
| EZM..... | Extrazellulärmatrrix |
| FBS..... | Fetales Kälberserum |
| FUN..... | Fibrillin unique N-terminus |
| GAG..... | Glykosaminoglykan |
| H/HS..... | Heparin/Heparansulfat |
| HASMC..... | Humane Aortale Glatte Muskelzellen |
| HCASMC..... | Humane Koronare Aortale Glatte Muskelzellen |
| HCl..... | Salzsäure |
| hEGF..... | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor |
| hFGF-B..... | Humaner Fibroblastenwachstumsfaktor-B |
| HOBr..... | Hypobromige Säure |
| HOCl..... | Hypochlorige Säure |
| HS..... | Heparansulfat |
| Hyb..... | Hybrid |
| I ⁻ | Iodid |

| | |
|------------------------------|--|
| IF | Immunfluoreszenz |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL | Interleukin |
| KHK | Koronare Herzerkrankung |
| LLC | large latent Complex |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LTBP | Latent Transforming Growth Factor- β |
| MAGP1 | Mikrofibrillen assoziiertes Glykoprotein-1 |
| MFS | Marfan-Syndrom, Marfan-Syndrom |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| MPO | Myeloperoxidase |
| MPO ^{-/-} | MPO Defizienz |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Massenspektrometrie |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaOCl | Natriumhypochlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NET | Neutrophil Extracellular Trap |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NO ₂ ⁻ | Nitrit |
| ⁻ OSCN | Hypothiocyanat |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PMN | polymorphkernige neutrophile Granulozyten |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RSO | Relative Site Occupancy |
| SCN ⁻ | Thiocyanat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SOD | Superoxiddismutase |
| TAA | Thorakales Aortenaneurysma |
| TB | Transforming Growth Factor- β binding Protein like |
| TGF- β | Transforming Growth Factor- β |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TNF α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| Trp | Tryptophan |
| Tyr | Tyrosin |
| WB | Western Blot |
| WT-Mäuse | Wildtyp-Mäuse |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1. Zusammenfassung

Beim Marfan-Syndrom (MFS) handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Bindegewebsschwäche, verursacht durch Mutationen des FBN1-Gens, das für Fibrillin-1 codiert. Bis zu 90% der Erkrankten entwickeln im Verlauf ihres Lebens ein thorakales Aortenaneurysma (TAA), welches rasch dissezieren kann. Die genauen Pathomechanismen dieser TAAs sind noch nicht vollständig verstanden. Eine inflammatorische Komponente scheint an der Entstehung und Progression der TAAs beteiligt zu sein. Das granulozytäre Häm-Enzym Myeloperoxidase (MPO) konnte bereits mit der Entstehung von Bauchortenaneurysmen (AAA) in Verbindung gebracht werden. Über hochreagible toxische Sauerstoffmetabolite wie Hypochlorsäure (HOCl) ist MPO in der Lage, Strukturen seines direkten Umfeldes zu oxidieren und modifizieren. Die folgende Arbeit untersucht die direkte Interaktion von MPO mit Fibrillin-1 beim MFS.

Mittels ELISA konnte in MFS-Mäusen ein erhöhter MPO-Spiegel im Lysat der TAAs detektiert werden. In immunhistologischen Färbungen schien MPO in freier Form vorzuliegen. In einer Kollokalisations-Immunfluoreszenz (IF) MPO-inkubierter humaner aortaler glatter Muskelzellen (HASMC) konnte gezeigt werden, dass MPO vorrangig im Bereich der Nuklei der HASMCs lokalisiert war. Eine Nitrotyrosin (nTyr)-IF zur Detektion von MPO-induziertem oxidativem Stress zeigte eine deutliche Oxidation von Fibrillin-1 durch MPO. Mit Hilfe des rekombinanten Fibrillin-1 Fragmentes rF11 konnte im Western Blot (WB) gezeigt werden, dass eine Inkubation mit MPO/H₂O₂ zu einem signifikanten Massenshift von im Mittel 2,555 kDa führt. Eine Analyse von Missense-Mutationen von zwei großen MFS-Datenbanken zeigte, dass Cystein-Residuen für die strukturelle Integrität von Fibrillin-1 von entscheidender Bedeutung sind. In einer Untersuchung der geshifteten rF11 Banden mittels Massenspektrometrie (MS) konnten fünf oxidierte Cystein-Residuen identifiziert werden, deren Missense-Mutation nachweislich zu einem MFS führt. Somit konnte gezeigt werden, dass MPO Fibrillin-1 an vulnerablen Stellen oxidieren kann. Weitere WB-Versuche, analog zum rF11-WB, mit einem anderen Fibrillin-1 Fragment ohne Heparinbindungsstellen ergaben keinen Massenshift. MS-Analysen zeigten, dass MPO-bedingte Oxidationen signifikant näher an Heparinbindungsstellen lagen, als es statistisch zu erwarten gewesen wäre. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass sich beim MFS *in vivo* MPO in freier Form in den TAA-Aortenwänden befindet und in der Lage ist, Fibrillin-1 *in vitro* an vulnerablen Stellen zu oxidieren, wobei Hinweise bestehen, dass dies über Heparinbindungsstellen geschieht.

2. Einleitung

2.1. Das Marfan-Syndrom

Beim Marfan-Syndrom (MFS) handelt es sich um eine autosomal dominante Erkrankung des Bindegewebes mit einer Inzidenz von 1:5000 – 1:10.000. Demzufolge sind in Deutschland rechnerisch 8.000 – 16.000 Menschen betroffen. Die Erkrankung ist meist familiärer Genese (75% der Fälle), kann aber auch de novo auftreten (25%).¹

Namensgeber der Erkrankung ist der französische Kinderarzt Antoine Marfan, der das Syndrom 1896 erstmalig beschrieb und es als Dolichostenomelie bezeichnete.² Der Begriff „Marfan-Syndrom“ wurde im Jahre 1931 von dem Utrechter Ophthalmologen Henricus Weve geprägt, der den monogenetisch-hereditären Aspekt der Erkrankung aufdeckte.³

Erst 1991 wurde die genaue Ursache der Erkrankung endgültig geklärt.⁴ Dem strukturellen Defekt des Bindegewebes liegen meist Mutationen des FBN1-Gens zugrunde, welches für das Glykoprotein Fibrillin-1 kodiert. Dieses Protein trägt zusammen mit anderen Strukturproteinen unter anderem dazu bei, die Integrität vieler Körpergewebsarten zu erhalten. Typische klinische Manifestationsorte sind das kardiovaskuläre System, das skelettale System sowie das okuläre System. Derzeit beruht die Diagnosestellung auf der international anerkannten, 2010 revidierten Gent-Nosologie, die verschiedene Diagnosekriterien mit unterschiedlicher Gewichtung zusammenfasst.⁵

Kardiovaskulär manifestiert sich das Marfan-Syndrom vor allem durch Aneurysmen im Bereich der Wurzel der Aorta ascendens. Diese thorakalen Aortenaneurysmen (TAA) können spontan entstehen, rasch dilatieren und dissezieren. Letzteres stellt die Hauptursache der gesteigerten Mortalität von MFS-Patienten dar, deren Lebenserwartung unbehandelt zwischen 30 und 40 Jahren liegt.⁶ Da hier der Pathomechanismus nicht vollständig verstanden ist, existieren lediglich symptomorientierte Therapiekonzepte. Aus diesem Grund fokussiert sich derzeit eine Vielzahl wissenschaftlicher Projekte auf die Erforschung der Pathogenese der Erkrankung im kardiovaskulären Organsystem, so auch dieses Projekt.

Das gegenwärtige Therapiekonzept konzentriert sich in erster Linie auf die Prävention kardiovaskulärer Pathologien und setzt auf eine Senkung von Blutdruck, Herzfrequenz und -Kontraktionskraft zur Minderung der mechanischen Belastung der Aortenwand. Parallel dazu werden engmaschig bildgebende Kontrollen durchgeführt, da bei MFS-Patienten eine Dissektion häufig asymptomatisch verläuft. Im Falle einer progredienten Dilatation werden die Patienten frühzeitig kardiochirurgisch versorgt.

2.1.1. Phänotypische Ausprägungen

Momentan (2022) sind über 700 verschiedene FBN1-Mutationen identifiziert, die das Entstehen des MFS bedingen können.^{7,8} Phänotypische Ausprägungen sind aufgrund des heterogenen Feldes an Mutationen interindividuell sehr unterschiedlich. Die drei hauptsächlich betroffenen Organsysteme sind das skelettale, das okuläre sowie das kardiovaskuläre System. Weitere potenziell betroffene Organe sind die Haut, das zentrale Nervensystem (ZNS) sowie die Lunge.

Die skelettalen Manifestationen führen zu dem typischen marfanoiden Phänotyp im Sinne von Hochwuchs, Arachnodaktylie, Pectus excavatum oder -carinatum, Skoliose und vielen weiteren möglichen Symptomen der Bindegewebsschwäche. Im okulären System kommt es im Rahmen der Erkrankung häufig zu einer Luxatio- oder Subluxatio lentis sowie zur Myopie. Die gesteigerte Mortalität von MFS-Patienten ist zum großen Teil auf die Beteiligung des kardiovaskulären Systems zurückzuführen.

Der klassische MFS-Patient weist phänotypische Ausprägungen in allen drei Organsystemen auf. Im klinischen Alltag ist die Diagnosestellung aufgrund der variablen Expressivität schwierig, nicht selten weisen nur einzelne der beschriebenen Organsysteme Pathologien auf. Echokardiographische Pathologien konnten jedoch bei rund 90% der MFS-Patienten beobachtet werden.⁹

Kardiovaskuläres System

Zu den Pathologien im kardiovaskulären Organsystem werden in erster Linie Aneurysmen im Bereich der Aorta ascendens (76%), Aortenklappeninsuffizienzen (26%), Mitralklappenprolapse (62%) sowie Mitralklappeninsuffizienzen (29%) gezählt.^{9,10}

Im Rahmen der Erkrankung kommt es bei einer entsprechenden Beteiligung häufig zu schnell progredienten Aneurysmen der großen Arterien mit einem Wachstum von 0,5-1 mm pro Jahr.^{9,11} Besonders häufig ist die thorakale Aorta im Bereich der Aorta ascendenz, genauer der Aortenwurzel, betroffen. Warum beim MFS vorrangig die Aortenwurzel von Pathologien betroffen ist, ist bislang noch unklar. Diskutiert wird, dass der embryonale Ursprung der Aorta ascendenz aus der Neuralleiste eine wichtige Rolle spielt.¹² Im Verlauf der Erkrankung neigen diese Aortenaneurysmen zu plötzlichen, häufig asymptomatischen, spontanen und oft letalen Dissektionen und/oder Rupturen.

2.2. Fibrillin-1

Bei Fibrillin-1 handelt es sich um ein circa 350 kDa großes Glykoprotein, welches maßgeblich an der Instandhaltung der strukturellen Integrität der extrazellulären Matrix (EZM) verschiedenster Bindegewebe beteiligt ist. So steuert es bedeutend zur Elastizität von

beispielsweise Sehnen, Blutgefäßen oder der Lunge bei. Entdeckt wurde Fibrillin-1 im Jahre 1986 von Sakai et al., die das Protein als essenziellen Bestandteil von Mikrofibrillen identifizieren konnten.¹³ Diese bilden ein elastisches Netz im Bindegewebe und sorgen so für die nötige Dehnbarkeit der jeweiligen Struktur. Sie haben einen mittleren Durchmesser von 10-12 nm und setzen sich aus einem amorphen Kern aus Elastin sowie einer Fibrillin-1-Hülle zusammen, existieren jedoch auch als Elastin-freie Bündel. Im Rahmen der Synthese Elastin-haltiger Mikrofibrillen fungiert Fibrillin-1 als formgebendes Grundgerüst zur anschließenden Deposition von Elastin.¹⁴ Die Elongation von Fibrillin-1 erfolgt im Rahmen einer Multimerisierung durch Wechselwirkungen zwischen N- und C-Termini des Glykoproteins.^{15,16} Dass Mikrofibrillen neben der mechanischen Funktion eine homöostatische Funktion erfüllen, konnten innerhalb der letzten 20 Jahre eine Vielzahl von Publikationen aufzeigen. Nachgewiesen wurden unter anderem Interaktionen mit diversen Wachstumsfaktoren wie den Latent Transforming Growth Factor- β Binding Proteinen (LTBP)^{17,18} oder den Knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP)¹⁹, mit verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen aus der Gruppe der Integrine wie $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ oder $\alpha v\beta 6$ ²⁰⁻²², mit Proteasen aus der ADAMTS-Superfamilie²³⁻²⁶ sowie mit anderen Strukturproteinen der EZM. Zur letztgenannten Gruppe gehören neben einigen Vertretern der Fibuline¹⁷ unter anderem Fibronectin²⁷, Heparansulfat (HS)^{28,29} und das Mikrofibrillen assoziierte Glykoprotein-1 (MAGP1).²⁴

2.2.1. Aufbau und Funktion der Proteindomänen

Da in diesem Dissertationsprojekt die Auswirkung oxidativer Modifikationen auf die strukturelle Integrität von Fibrillin-1 beleuchtet werden soll, ist eine Betrachtung dessen funktionellen Aufbaus hilfreich. Fibrillin-1 besteht aus einer Vielzahl von Domänen, die in ihrer Struktur und Abfolge evolutionär hoch konserviert sind. Vergleicht man beispielsweise elektronenmikroskopische Aufnahmen von humanen Mikrofibrillen mit denen von Nesseltieren, welche entwicklungsbiologisch auf einer niedrigen Stufe stehen, zeigt sich eine hohe ultrastrukturelle Übereinstimmung.³⁰ Daher wird angenommen, dass die Integrität der Proteinstruktur essenziell für eine adäquate mechanische beziehungsweise homöostatische Funktionalität von Fibrillin-1 ist.

Funktionelle Untereinheiten eines Proteins werden als Domäne bezeichnet. Beim Fibrillin-1 sind quantitativ am stärksten die Epidermal Growth Factor like (EGF) Domänen vertreten, welche insgesamt 47-mal im Fibrillin-1 zu finden sind (vgl. Abbildung 1).^{31,32} Diese Domänen weisen 3 Disulfidbrücken auf und liegen häufig in doppelter Ausführung, also als Tandem Repeat, vor. Im humanen Fibrillin-1 sind von den 47 EGF-like Domänen 43 Kalzium-bindend (cb EGF).³³ Das Kalzium dient unter anderem dem Schutz vor proteolytischer Degradation, der Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins und gewährleistet Protein-

Protein-Interaktionen zwischen N- und C-Termini von Fibrillin-1, welche für den physiologischen Aufbau der Mikrofibrillen essenziell sind.³⁴⁻³⁶

Zu den weiteren funktionell bedeutsamen Domänen gehört der Fibrillin unique N-terminus (FUN), welcher zum einen für Stabilität sorgt, jedoch auch als Erkennungsstelle für das C-terminale Ende anderer Fibrillin-1 Monomere³⁷, sowie als Bindungsstelle für Heparansulfat im Rahmen der Synthese von Mikrofibrillen fungiert.^{28,29,38}

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) binding Protein like (TB) Domänen kommen insgesamt 7-mal im Protein vor und sind ansonsten, ausgenommen der LTBP-Proteinfamilie, im gesamten humanen Proteom nach derzeitigem Wissensstand (2022) nicht zu finden.³⁹ Sie dienen der Interaktion von Fibrillin-1 mit verschiedenen Proteinen. So interagiert zum Beispiel die TB4-Domäne mittels einer RGD-Sequenz mit den Integrinen $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \beta 3$ und $\alpha \beta 6$ und sorgt so für eine adäquate Zelladhäsion der Mikrofibrillen.²⁰⁻²² Mit Ausnahme von TB1 liegen im Fibrillin-1 die restlichen 6 TB-Domänen zwischen zwei cb EGF-Domänen (vgl. Abbildung 1). Insbesondere das Zusammenspiel mit der jeweilig nachfolgenden cb EGF-Domäne erhöht dessen Kalzium-Affinität beträchtlich. Dementsprechend hilft die TB-Domäne die Rigidität und Stabilität des Glykoproteins zu sichern.⁴⁰ Eine Sonderstellung bekleidet das TB6-cb EGF32 Domänenpaar, welches eine niedrige Kalzium-Affinität aufweist,⁴¹ daher *in vivo* nur gering kalziumgesättigt ist und vermutlich vielmehr die Flexibilität und Elastizität des Fibrillin-1 unterstützt.^{40,42}

Anders als es der Name vermuten lässt, sind die TB-Domänen der Fibrillin-Superfamilie nicht in der Lage TGF- β zu binden.⁴³ Dies geschieht vielmehr indirekt, unter anderem über eine Bindung von LTBP an die EGF4-Domäne von Fibrillin-1.¹⁷

Die zwei Hybrid (Hyb) Domänen des Glykoproteins scheinen nach genetischen und morphologischen Analysen aus der Fusion eines TB - cb EGF-Domänenpaars hervorgegangen zu sein.^{31,44} Hyb1 interagiert in Zusammenspiel mit benachbarten Domänen mit Vertretern der Fibuline sowie LTBP1 und -4.¹⁷ Fibuline bilden zusammen mit Fibrillin-1 und Tropoelastin einen ternären Komplex und fungieren so als Bindeglied zwischen den beiden Komponenten der Mikrofibrillen im Rahmen derer Synthese.⁴⁵ LTBPs binden TGF- β und formen mit diesem den sogenannten large latent Complex (LLC), in welchem TGF- β inaktiviert vorliegt.⁴⁶ Vor allem für LTBP4 konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Fibrillin-1 über die Hyb-1 Domäne essenziell für die adäquate Deposition von TGF- β in der EZM ist.¹⁷ Wie weiter unten erläutert spielen Veränderungen im TGF- β -Signalweg eine wichtige Rolle in der Pathogenese des MFS.⁴⁷ Für die Hyb-2 Domäne ist beispielsweise eine essenzielle stabilisierende Bedeutung von Fibrillin-1 beschrieben, deren mutationsbedingte Störung zum MFS führen kann.⁴⁸ Wie auch bei den TB-Domänen beschrieben, wird die Kalziumaffinität der cb EGF-Domänen im Zusammenspiel mit davorliegenden Hyb-Domänen potenziert.⁴⁴

Eine prolinreiche Region nahe des N-Terminus scheint durch ihre scharnierartige Struktur die dort notwendige Flexibilität zu sichern.⁴⁹

Im Rahmen der Proteinreifung wird Asprosin vom C-terminalen Ende von Fibrillin-1 abgespalten. Hierbei handelt es sich um ein erst 2016 entdecktes Hormon des Glukosestoffwechsels.⁵⁰

Hereditäre Defekte im Fibrillin-1 führen zu einer Vielzahl von Erkrankungen. Dazu zählt das MFS, aber auch das Stiff-Skin-Syndrom, das Weil-Marchesani-Syndrom, die akromikrische Dysplasie sowie das Shprintzen-Goldberg-Syndrom.

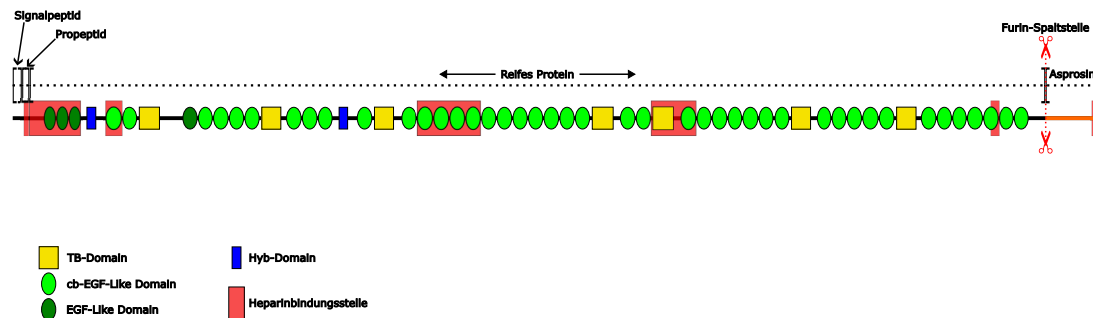


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der funktionellen Einheiten von Fibrillin-1.

2.2.2. Heparin-Bindungsstellen

Da über Heparin-Bindungsstellen gebundenes Heparin/HS (H/HS) einen wichtigen Bindungs- und Angriffspunkt der Myeloperoxidase (MPO) an EZM-Proteine darstellt, wird an dieser Stelle genauer auf diese eingegangen.⁵¹⁻⁵⁴

Bislang wurden 6 Heparin-Bindungsstellen von Fibrillin-1 identifiziert, von denen einige aktuell (2022) noch nicht genau lokalisiert werden können (siehe Abbildung 1).^{28,29,38,55} Die Interaktionen mit H/HS, die an diesen Bindungsstellen stattfinden, haben vielfältige, meist regulatorische Funktionen. Dabei liegt H/HS *in vivo* nicht frei vor, sondern gebunden in Form von Proteoglykanen der Zelloberfläche, wie beispielsweise Syndecan, oder der EZM, wie Perlecan oder Agrin.⁵⁶ Vor allem im Aufbau der Mikrofibrillen ist das Zusammenspiel von Fibrillin-1 und H/HS wichtig. Ansatzpunkte scheinen hierbei die Fibrillin-1 Deposition, das Zusammenspiel zwischen Fibrillin-1 und Tropoelastin oder MAGP-1 sowie die N- zu C-terminalen Multimerisierung zu sein. Ob die Bindung von H/HS an Fibrillin-1 die Deposition von Mikrofibrillen hemmt oder unterstützt, scheint von dem Stadium des Glykoproteins im Reifungsprozess abhängig zu sein. Nachgewiesen werden konnten eine supportive Funktion der Glykosaminoglykane (GAG) im frühen Stadium der Fibrillin-1-Reifung (Multimerisierung), sowie eine inhibitorische Wirkung auf die Fibrillin-1 Deposition in Mikrofibrillen.^{38,57}

2.3. Pathomechanismus des MFS

1991 konnten Dietz et. al. eine Mutation im FBN1-Gen, welches auf dem Chromosom 15q21.1 liegt, als Ursache für das MFS identifizieren.⁴ Dieses Gen kodiert in der Proteinbiosynthese für das mikrofibrilläre Protein Fibrillin-1. Durch die Mutation im FBN1 Gen entsteht ein dysfunktionales Protein. Dies führt in letzter Konsequenz zu einer strukturellen Schwäche des Bindegewebes, einhergehend mit einer Verminderung der Elastizität. Die genauen pathophysiologischen Vorgänge sind Gegenstand aktueller Forschung.

In der Aortenwand wird histologisch zwischen der lumenseitigen Tunica intima, der breiten Tunica media und der äußeren Tunica adventitia unterschieden. Hierbei beinhaltet die Tunica media die stabilisierenden elastischen Mikrofibrillen sowie aortale glatte Muskelzellen (ASMCs), die auch zur Gewebshomöostase beitragen. Hier durchziehen die Mikrofibrillen die gesamte EZM und sorgen damit für zusätzliche Stabilität,⁵⁸ und genau hier spielen sich die MFS-TAA typischen Pathologien ab.

In aortalen histologischen Präparaten von MFS-Patienten und -Mäusen zeigt sich am prominentesten eine verdickte, degenerierte Tunica media mit stark fragmentierten elastischen Fasern.⁵⁹ Auch eine verminderte Fibrillin-1 Ablagerung in der Aortenwand⁶⁰ sowie eine vermehrte Fragmentierung von Fibrillin-1 und Elastin sind gut dokumentiert.^{61,62} In Zellkulturversuchen zeigte sich mutiertes Fibrillin-1 im Vergleich zu Wildtyp-Fibrillin-1 anfälliger gegenüber proteolytischer Degradation.⁶³ Im Weiteren zu erwähnen sind eine Hochregulation von Matrixmetalloproteinase (MMP) 2 und -9⁶⁴ sowie eine vermehrte Apoptoserate von ASMCs.⁶⁵

Judge et. al. legten die Vermutung nahe, dass weniger das Vorhandensein von mutiertem Fibrillin-1 die Aortendilatation begünstigt, sondern vielmehr die fehlende Produktion an regulärem Protein. Diese These untermauerten sie mit drei Experimenten. Im ersten Schritt zeigten sie, dass eine transgene Expression von mutiertem Fibrillin-1 bei Wildtyp-Mäusen (WT-Mäuse) mit zwei regulären FBN1-Allelen zu keiner marfanoiden Aortenpathologie führte.⁶⁰ Anschließend verglichen sie FBN1-haploinsuffiziente Mäuse mit dem $Fbn1^{C1039G/+}$ Marfan-Mausmodell, und beobachteten vergleichbare Veränderungen der Aortenwände. Im letzten Schritt demonstrierten sie, dass eine transgene Expression von regulärem Fibrillin-1 bei $Fbn1^{C1039G/+}$ Mäusen den WT-Phänotyp wiederherstellen konnte.

Habashi et. al. konnten 2006 im $Fbn1^{C1039G/+}$ Marfan-Mausmodell aufzeigen, dass eine Hemmung des Zytokins TGF- β durch den Angiotensin II Typ 1 Rezeptorblocker (AT1-Blocker) Losartan nicht nur die Ausbildung von Aortenaneurysmen verhindert, sondern auch pathophysiologische Prozesse anderer Organsysteme invertieren kann.⁶⁶ In einer nachfolgenden zweiarmigen Doppelblind-Studie mit 604 Marfan-Probanden, die in einem Zeitraum von 3 Jahren die protektive Wirkung von AT1-Blockern mit der von β 2-Rezeptorblockern (BB) auf das Voranschreiten von Aortenaneurysmen verglich, konnte jedoch

kein Zusatznutzen von Losartan nachgewiesen werden.⁶⁷ Dennoch hat die Erkenntnis, dass im Pathomechanismus des MFS homöostatische Vorgänge eine maßgebliche Rolle spielen, das Interesse an der Marfan-Forschung intensiviert.

In letzter Zeit mehren sich Hinweise darauf, dass am Pathomechanismus der TAAs von Marfan-Patienten eine inflammatorische Komponente maßgeblich beteiligt ist. So wurde bei MFS-Patienten eine vermehrte Infiltration von CD68⁺ Makrophagen, CD3⁺ T-Zellen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in der Tunica media und -adventitia von Aortenproben beschrieben^{68,69} und ein vermehrter oxidativer Stress in Serum⁷⁰ und TAA-Homogenat⁷¹ gemessen. Eine Inhibition der Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), einem Marker für Inflammation und oxidativen Stress, verminderte im Bauchaortenaneurysmen-Mausmodell (AAA) die Aneurysmaentstehung und -progression signifikant.⁷² Auch andere antiinflammatorische Wirkstoffe konnten Progress und/oder die Entstehung von Aortenaneurysmen verlangsamen.⁷³⁻⁷⁵ In AAAs konnte im Mausmodell für PMN eine wichtige Rolle in der Entstehung der Aneurysmen nachgewiesen werden.⁷⁶ Der entsprechende Pathomechanismus war unabhängig von MMP 2 und -9, welche ebenfalls durch PMN sezerniert werden.⁷⁷

2.4. Therapie des MFS

Die vier Säulen der Marfan-Therapie bestehen aus einer Anpassung des Lebensstils, engmaschigen Kontrolluntersuchungen, einer medikamentösen antihypertensiven Therapie sowie einer frühzeitigen Evaluierung kardiochirurgischer Eingriffe. Bis zum heutigen Zeitpunkt (2022) sind sämtliche Therapieoptionen jedoch rein symptomatisch.

Die Lebensstilanpassungen konzentrieren sich in erster Linie auf die Senkung des Blutdrucks und der Vermeidung hoher Blutdruckspitzen. Im Rahmen der Früherkennung lebensbedrohlicher Komplikationen des Herz-Kreislaufsystems wird eine halbjährliche bis jährliche Kontrolle des Herzens und der großen Arterien durchgeführt. Dies kann sonographisch beziehungsweise echokardiographisch oder mittels Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen.

2.4.1. Medikamentöse Therapieoptionen

Trotz intensiver Forschung an medikamentösen Alternativen werden Marfan-Patienten momentan (2022) in erster Linie mit BB behandelt. Dieser Behandlungsansatz war zu seiner Einführung im Jahr 1971 durch Hapern et. al.⁷⁸ der erste medikamentöse Therapieansatz überhaupt. Die Grundidee ist, durch eine Senkung der Herzfrequenz, einer Verhinderung hoher belastungsassoziierter Blutdruckspitzen sowie einer generellen Blutdrucksenkung den mechanischen Stress auf die Aortenwand zu mindern.⁷⁹ Das Benefit einer solchen Therapie

wurde zuvor zwar im Tiermodell untermauert,⁸⁰ jedoch ist die klinische Studienlage bezüglich einer BB-Therapie bis heute (2022) sehr uneindeutig. Viele Studien konnten hierdurch zwar eine Verminderung der Aortendurchmesser nachweisen, jedoch keine Senkung der Mortalität. Zwei unabhängige Metaanalysen brachten gegensätzliche Ergebnisse zutage.^{81,82} Aufgrund der kontroversen Studienlage hat die European Society of Cardiology (ESC) im Jahr 2014 erstmalig keine Empfehlung hinsichtlich einer BB-Therapie mehr ausgesprochen.⁸³ In Anbetracht der außerdem nicht unerheblichen Nebenwirkungen einer solchen Therapie wird derzeit intensiv an alternativen Ansätzen geforscht.

In Kombination mit oder bei Unverträglichkeit von BB werden derzeit AT1-Blocker verschrieben. Auch hier ist die Studienlage nicht eindeutig, jedoch scheint diese Therapieoption im Vergleich zu der BB-Therapie gleichwertig zu sein.^{67,84} Weitere Therapiealternativen sind Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitoren und Kalziumkanalblocker (CCB). Die Studienlage bezüglich ACE-Inhibitoren ist momentan noch nicht hinreichend aussagekräftig, da großangelegte Studien fehlen, die Therapieoption scheint aber nach aktueller Datenlage (2022) der Betablockertherapie unterlegen zu sein.^{85,86} Bei den CCBs mehren sich Hinweise, dass diese den kardiovaskulären Phänotyp nicht lindern, sondern sogar aggravieren können.⁸⁷ Zusammengefasst existieren also einige medikamentöse Behandlungsansätze des MFS. Der therapeutische Nutzen dieser Therapien ist jedoch derzeit unzureichend durch Studien belegt oder durch solche in Frage gestellt. Es mangelt außerdem an spezifischen präventiven Therapieoptionen. Für eine strukturierte Analyse der Therapieoptionen wären großangelegte Studien mit entsprechendem Design notwendig, welche jedoch aufgrund der Seltenheit der Erkrankung schwer zu realisieren sind.

2.4.2. Chirurgische Therapieoptionen

Ab einem Aortendurchmesser von $\geq 50\text{mm}$, beziehungsweise $\geq 45\text{mm}$ beim Vorliegen von Risikofaktoren, ist eine elektive chirurgische Intervention indiziert.⁸³ Zu den Risikofaktoren gehören eine positive Familienanamnese bezüglich Aortendissektionen, eine stattgehabte Dissektion, eine Progression der Dilatation um mehr als 3 Millimeter pro Jahr, eine schwer kontrollierbare arterielle Hypertonie, eine geplante Schwangerschaft sowie eine progrediente Regurgitation über der Aortenklappe.⁸⁸

Bei den beiden am besten validierten chirurgischen Therapieoptionen, der Bentall- und der David-Operation, wird die gesamte Aortenwurzel durch eine Gefäßprothese ersetzt. Die Koronarien werden in beiden Verfahren reimplantiert. Maßgeblicher Unterschied ist, dass bei der David-Operation die Aortenklappen erhalten werden. Der Vorteil eines solchen Vorgehens beim Vorliegen von morphologisch und funktionell normalen Klappen ist, dass im Gegensatz zur Bentall-Operation, bei der künstliche Klappen implantiert werden, keine lebenslange Antikoagulation notwendig ist.⁸⁸

Zugleich stellt das Vorgehen nach David das aufwändigere Verfahren dar. Das Resultat ist dementsprechend stark von der Erfahrung des Operateurs abhängig. Das spiegelt sich auch in den Follow-up-Daten wider. In einer Metaanalyse von 11 Studien und 1385 Patienten lag die Wahrscheinlichkeit für ein thromboembolisches Ereignis bei der David-Operation bei 0,3% pro Jahr unter der Wahrscheinlichkeit bei Bentall-Operationen von 0,7% pro Jahr. Zugleich aber stellte sich die Reinterventionsrate bei der Methode nach David mit 1,3% pro Jahr im Vergleich zu 0,3% pro Jahr als signifikant höher dar.⁸⁹

Insgesamt ist die durchschnittliche Lebenserwartung von Marfan-Patienten durch die Entwicklung neuer Therapiestrategien, der Einführung engmaschiger Screenings und einer stärkeren Sensibilisierung der Fachwelt in den letzten 50 Jahren deutlich angestiegen. So lag die Lebenserwartung 1972 noch bei circa 66% der allgemeinen durchschnittlichen Lebenserwartung,⁹⁰ in einer Reevaluation, 1995, lag sie schon nahe am Durchschnitt.⁹¹

Eine kausal orientierte Therapie, die chirurgische Eingriffe überflüssig macht und die Gefahr lebensbedrohlicher Ereignisse senken würde, besteht bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch nicht.

2.5. Rekombinante Proteine

Rekombinante Proteine sind biotechnologisch hergestellte Proteine, die mit Hilfe von genetisch modifizierten Organismen hergestellt werden. Als Expressionssystem dienen pro- oder eukaryotische Zelllinien. Die Vektorübertragung des zu synthetisierenden Peptids erfolgt häufig mittels Transformation oder Transfektion. Je nach Verwendungsziel wird auf unterschiedliche Expressionssysteme zurückgegriffen. Typische Gebiete, in denen auf rekombinante Proteinexpression zurückgegriffen wird, sind beispielsweise die Produktion von Pharmazeutika, monoklonalen Antikörpern oder auch der Einsatz zu Forschungszwecken. Beispielsweise ermöglicht das häufig verwendete *E. coli* Bakterium keine physiologischen posttranslationalen Modifikationen, ein Einsatz zu Forschungszwecken ist in diesem Fall dementsprechend limitiert.

Die Vorteile des Einsatzes rekombinanter Proteine in der Forschung sind vielfältig. Sie ermöglichen die Analyse von Proteininteraktionen in steriler Umgebung, sind schnell, kostengünstig und machen aufwändige Aufreinigungsschritte mit potenziell ungewollten Proteinmodifikationen überflüssig. In diesem Projekt erfolgen viele Versuche mittels rekombinanten Fibrillin-1-Fragmenten. Diese sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden.⁹²⁻⁹⁴

2.5.1. rF11

Bei rF11 handelt es sich um das N-Terminale Ende von Fibrillin-1.¹⁶ Es umfasst Aminosäure (AA)-Residuum 19-1531 und hat eine molekulare Masse von 163,999 kDa. Es beinhaltet die

EGF-Domänen 1-4, die cb EGF-Domänen 1-22, die TB-Domänen 1-3, beide Hyb-Domänen sowie vier Heparinbindungsstellen (vgl. Abbildung 2). Insgesamt beinhaltet das Fragment 84 Disulfidbrücken.

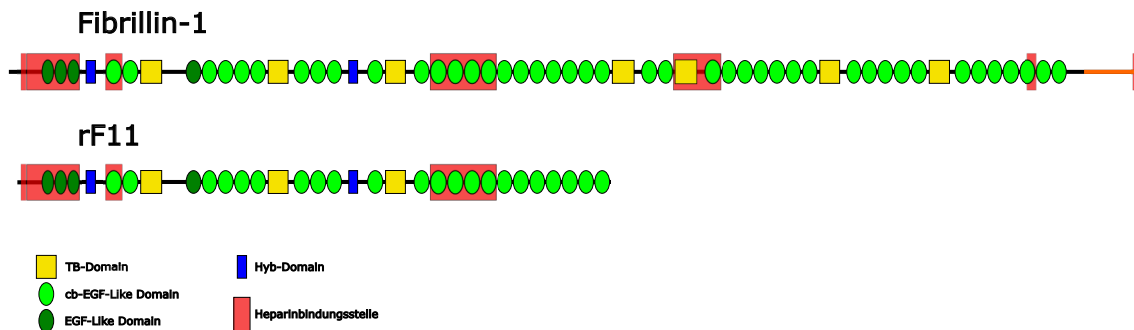


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen funktionellen Einheiten von rF11 und Vergleich mit Fibrillin-1.

2.5.2. Cb EGF 9-15

Bei cb EGF 9-15 handelt es sich um ein Fibrillin-1 Fragment von AA-Residuum 572 – 1069. Es hat eine molekulare Masse von ca. 53,941 kDa und beinhaltet die cb EGF-Domänen 9 – 15 (7), die TB-Domänen 2-3 (2) und die Hyb2-Domäne, jedoch keine Heparinbindungsstelle (vgl. Abbildung 3). Insgesamt beinhaltet das Fragment 25 Disulfidbrücken.

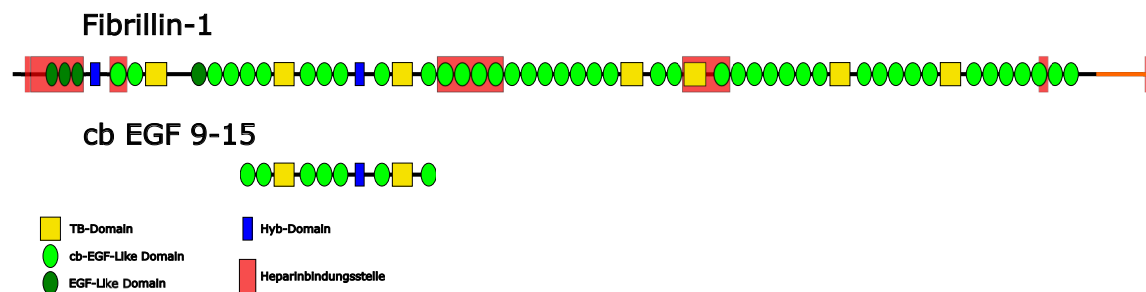


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen funktionellen Einheiten von cb EGF 9-15 und Vergleich mit Fibrillin-1.

2.6. Neutrophile Granulozyten

PMNs stellen mit einem Anteil von 60% die größte Subgruppe der Leukozyten dar. Sie sind ein wichtiger Bestandteil des unspezifischen Immunsystems und nehmen eine Schlüsselrolle in der zellulären Erstabwehr von körperfremden Pathogenen ein. Nach ihrer Reifung im Rahmen der Granulopoese im Knochenmark wird der Hauptteil der PMNs mobilisiert und gelangt in den Blutkreislauf. Dort zirkulieren sie für 8-10 Stunden um dann via Diapedese in das Interstitium einzuwandern, wo sie 2-3 Tage verweilen.⁹⁵ Die Immunantwort, ausgelöst entweder durch das Erkennen von körperfremden Pathogenen wie Lipopolysaccharide (LPS)

oder durch spezielle Stimuli, geschieht mittels Phagozytose, der Ausbildung von Neutrophil Extracellular Traps (NET) sowie durch die Degranulation mikrobizider Enzyme und Peptide.^{96,97} Zu den Stimuli der PMN-Aktivierung und -Rekrutierung zählen unter anderem Interleukin-8 (IL-8), IL-1 β , der aktivierte Komplementfaktor C5a, Leukotrien B₄, der Tumornekrose-Faktor- α (TNF α), sowie intravasale Scherkräfte.⁹⁸⁻¹⁰³

Einer der Hauptbestandteile der mikrobiziden Inhaltsstoffe der PMN-Granula ist MPO.¹⁰⁴

2.7. Myeloperoxidase

Bei MPO handelt es sich um ein circa 150 kDa schweres, stark kationisches, homodimeres Häm-Protein, das in PMN exprimiert wird. Die beiden monomeren Untereinheiten sind durch eine Disulfidbrücke verbunden und bestehen jeweils aus einer kleinen 15 kDa schweren Untereinheit und einer großen Untereinheit mit 60 kDa. An letzterer befindet sich ein kovalent gebundenes Häm-Molekül. Hauptsächlich ist MPO in azurophilen Granula von PMNs vorzufinden, wo das Enzym 2-5% des Trockengewichts der Zellen ausmacht.¹⁰⁴ In kleinerem Umfang wird MPO jedoch auch in Monozyten, einigen ortsständigen Gewebsmakrophagen wie Mikroglia und Kupffer-Zellen, sowie den Pyramidenzellen des Hippocampus exprimiert.¹⁰⁵⁻

¹⁰⁷

Lange wurde dem Enzym eine Schlüsselrolle im Rahmen des respiratorischen Bursts von PMNs zugeschrieben, wo es durch Bildung von ROS zur antimikrobiellen Abwehr beiträgt. Aufgrund von Beobachtungen, dass MPO-defiziente Patienten zwar ein erhöhtes Risiko für *Candida albicans* Infektionen aufweisen, jedoch keine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen zeigen, ist der Stellenwert des Enzyms in der antimikrobiellen Abwehr umstritten.¹⁰⁸ Forschungsergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die MPO-Defizienz bei diesem Patientenkollektiv unter anderem durch eine Hochregulation der phagozytären Aktivität und eine vermehrte Bildung von Hydroxidradikalen kompensiert wird.¹⁰⁹

Die Myeloperoxidase wurde erstmals 1941 vom schwedischen Mediziner Kjell Agner im Rahmen seiner Dissertationsarbeit beschrieben.¹¹⁰ Initial gab er dem Enzym aufgrund seiner grünen Farbe den Namen Verdoperoxidase. Nachdem aber anschließende Forschungsprojekte aufzeigten, dass die Expression der Peroxidase lediglich Zellen des myeloischen Systems vorbehalten ist, wurde der Name in MPO geändert.¹¹¹ Die eigentliche Funktion des Enzyms wurde 1968 durch S. J. Klebanoff beschrieben, der die Schlüsselrolle von MPO in der antimikrobiellen Aktivität von neutrophilen Granulozyten aufzeigte und die Reaktion von MPO mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und einem Halogenid erstmalig beschrieb.¹¹²

2.7.1. Katalytische Eigenschaften von MPO

Zur Entfaltung seiner katalytischen Aktivität benötigt MPO H_2O_2 sowie ein oxidierbares Substrat. Das benötigte H_2O_2 stammt meist aus der durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysierten Disproportionierung von Hyperoxid-Anionen. Diese wiederum entstehen durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff durch die Nikotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase.^{113,114} Als oxidierbare Substrate dienen unter anderem Halogenide wie Chlorid (Cl^-), Bromid (Br^-) oder Iodid (I^-), Pseudohalogenide wie Thiocyanat (SCN^-) sowie Stickstoffmonoxid (NO), Nitrit (NO_2^-), Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) oder Steroidhormone.^{115,116} Unter physiologischen Umständen dient in erster Linie Cl^- als Substrat, wobei SCN^- vor allem bei Rauchern oder unter Diät aufgrund eines erhöhten Plasmaspiegels ebenfalls ein häufiges Substrat darstellt.^{117,118}

Die durch das Enzym katalysierten Reaktionen umfassen den sogenannten Halogenisierungszyklus sowie den Peroxidasezyklus. In einem für beide Zyklen gemeinsamen ersten Schritt fungiert die MPO als Reduktionsmittel indem es 2 Elektronen an seinen Redoxpartner H_2O_2 abgibt und es zu H_2O reduziert. MPO selbst wird bei dieser Reaktion zu einem hochreagiblen Redox-Intermediat oxidiert, welches als Compound I bezeichnet wird. Die Verfügbarkeit an den jeweiligen Substraten bestimmt dann, ob der Halogenisierungs- oder der Peroxidasezyklus stattfindet.

2.7.2. Der Halogenisierungszyklus

Im Halogenisierungszyklus werden Halogenide oder Pseudohalogenide zu ihrer jeweiligen hypohalogenigen beziehungsweise hypopseudohalogenigen Säure oxidiert. Hier agiert Compound I als Oxidationsmittel und wird durch die 2 dabei übertragenen Elektronen zurück zur nativen Fe^{3+} -Form von MPO reduziert. So entsteht beispielsweise aus Cl^- hypochlorige Säure (HOCl), aus Br^- hypobromige Säure (HOBr) und aus SCN^- Hypothiocyanat ($^-\text{OSCN}$).¹¹⁹ Im Regelfall entsteht *in vivo* mit ca. 60% am häufigsten das kurzlebige HOCl.¹¹⁷ Bei diesem handelt es sich um ein extrem reaktives, potentes Oxidationsmittel und somit um einen wichtigen Bestandteil des respiratorischen Bursts.¹¹⁹

2.7.3. Der Peroxidasezyklus

Im Peroxidasezyklus kann eine Vielzahl von organischen oder anorganischen Substraten zu Radikalen oxidiert werden. Mögliche Substrate sind beispielsweise NO und NO_2^- , schwefelhaltige AAs wie Cystein und Methionin, aromatische AAs wie Tyr und Trp, Steroidhormone oder Ascorbate.

Ausgehend von Compound I erfolgen hier zwei aufeinanderfolgende Oxidationen, bei denen jeweils ein Elektron übertragen wird. So entsteht im ersten Schritt das Intermediärprodukt Compound II, welches dann in einer zweiten Redoxreaktion zur nativen Fe^{3+} -Form von MPO reduziert wird.

In jedem der beiden Reaktionsschritte entsteht aus dem jeweiligen Substrat durch die Übertragung eines Elektrons sein entsprechendes Radikal. Die große Vielfalt an potenziellen Substraten bewirkt ein ebenso breitgefächertes Feld an entstehenden Radikalen.

Das aus NO entstandene NO_2^- kann beispielsweise direkt mit umgebenden Proteinen reagieren oder seinerseits im Peroxidasezyklus zu einem Stickstoffdioxid-Radikal (NO_2^\bullet) oxidiert werden. NO_2^\bullet bedingt die Nitrosylierung von Proteinen in seiner direkten Umgebung.^{120,121} Ein relevantes Beispiel einer solchen Reaktion ist die Oxidation von Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin. Bei der direkten Oxidation von Tyrosylresten durch Compound I oder II entstehen Tyrosyl-Radikale. Diese führen häufig zu einer Quervernetzung von Proteinen. Bei der Quervernetzung zweier Tyrosin-Radikale entsteht Dityrosin.¹¹⁶ Sowohl 3-Nitrotyrosin als auch Dityrosin sind anerkannte Marker für oxidativen Stress.¹²²

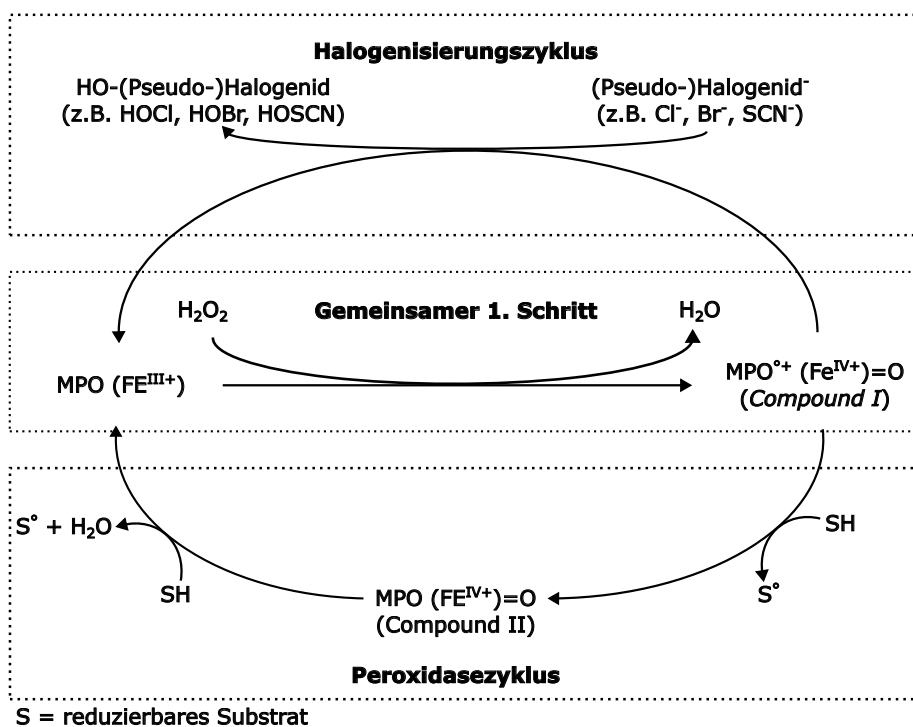


Abbildung 4: Schematische vereinfachte Zeichnung der durch MPO katalysierten Reaktionen.¹¹⁷⁻¹²¹

2.7.4. Proinflammatorische Eigenschaften

Neben den beschriebenen direkten katalytischen Eigenschaften kann die MPO auch indirekt über Signaltransduktion proinflammatorisch wirken. So wurde etwa nachgewiesen, dass über eine Bindung an CD11b/CD18-Integrinen weitere PMNs aktiviert werden können.¹²³ Auch der Nachweis, dass über die Bindung an CD11b/CD18-Integrinen die Apoptose von PMNs

herausgezögert werden kann, zeigt, dass MPO über diverse Mechanismen die Dauer inflammatorischer Prozesse intensivieren und prolongieren kann.¹²⁴ In mehreren Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass über die Bindung von MPO an Mannose-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen die Immunantwort ebenjener moduliert und potenziert werden kann.^{125,126} Auch die Aktivierung diverser MMPs durch MPO konnte beobachtet werden. So konnte etwa bei der MMP7 eine HOCl vermittelte Cystein-Oxidation im aktiven Zentrum nachgewiesen werden, die zu einer Aktivierung des Enzyms führt.¹²⁷

2.8. Myeloperoxidase und Inflammation

Wie im Abschnitt zum Pathomechanismus des MFS beschrieben, spielen Inflammation und oxidativer Stress eine tragende Rolle in der Aneurysmenentstehung und -progression.

Wie im vorherigen Abschnitt dargelegt, potenziert MPO die Oxidation von Strukturen in seiner direkten Umgebung. Neben der PMN-Diapedese kann MPO über endotheliale Transzytose in die Gefäßwand gelangen.⁵² Eine Bindung von MPO an Proteine der EZM über H/HS und eine daraus resultierende Oxidation dieser Proteine wurde vielfach beschrieben.⁵¹⁻⁵⁴ Die Chloridierung, Nitrosylierung, Quervernetzung und direkte Oxidation aromatischer Seitenketten kann zu einer veränderten Tertiärstruktur der Proteine führen.¹¹⁵ Diese oxidative Schädigung kann eine Vielzahl von Zellstrukturen und Proteinen betreffen. So wurde MPO vermittelter oxidativer Stress auf DNA-Ebene, bei intrazellulären Signalproteinen, Häm-Proteinen, Plasmaproteinen, Lipoproteinen sowie einer Vielzahl von Proteinen der EZM beschrieben.^{53,128-134} Auf Zellfunktionsebene äußert sich dies in Störungen der Zellkommunikation, des Zellwachstums, der Proteinbiosynthese und vieler weiterer Prozesse. Potenzielle Pathogene sollen so durch den daraus resultierenden Funktionsverlust beseitigt werden.

Besonders anfällig für Oxidationen sind aufgrund des reaktiven Schwefelzentrums die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein, Methionin, Homocystein und Taurin.^{135,136} Im Fall von Cystein ist MPO in der Lage oxidativ Disulfidbrücken aufzuspalten.¹³⁷

Da es sich um unspezifische Oxidationen im Wirkungsbereich der MPO handelt, können auch körpereigene Strukturen oxidativen Stress erfahren. Bei chronisch inflammatorischen Stimuli kann dies zur Entwicklung und Potenzierung von Pathologien führen. So konnte unter anderem eine Beteiligung von MPO an dem Pathomechanismus von Atherosklerose, koronarer Herzerkrankung (KHK), Vorhofflimmern, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), Mukoviszidose und Morbus Alzheimer nachgewiesen werden.^{105,138-145}

2.9. Klinische Relevanz

Inflammation und oxidativer Stress spielen in der Pathogenese von Aortenaneurysmen eine wichtige Rolle.¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ Auch in TAA von MFS-Patienten und -Mäusen konnte oxidativer Stress und Inflammation unter anderem in Form von ROS, Leukozyten-Infiltration, T-Lymphozyten und Makrophagen nachgewiesen werden.^{68,70,150} Dass antiinflammatorische Substanzen den Progress von Aortenaneurysmen verlangsamen oder modulieren können, unterstreicht die Relevanz inflammatorischer Prozesse bei deren Ätiopathogenese.⁷³⁻⁷⁵ Sowohl in TAA, in AAA als auch in zerebralen Aneurysmen wurden erhöhte MPO-Spiegel beschrieben, deren Höhe mit der Schwere der Pathologie zu korrelieren scheint.^{73,151-153} Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein erhöhter MPO-Spiegel im Patientenserum ein prädiktiver Marker für das Auftreten sowie ein prognostischer Marker für die Progredienz von AAA ist.^{154,155} Auch wurden erhöhte MPO-Spiegel in der Tunica intima und – media in Proben von Patienten mit AAA und TAA gemessen.¹⁵⁶ Im Gewebe von Patienten mit TAA konnte vermehrt nTyr nachgewiesen werden.¹⁵⁷ Ein Knockout von MPO konnte in zwei AAA-Mausmodellen die Entstehung von Aortenaneurysmen abschwächen, ebenso das Abfangen MPO-bedingter Oxidationen mittels Taurin.⁷³ Auch im Fbn1^{C1039G/+} MFS-Mausmodell konnten erhöhte MPO-Spiegel im Plasma festgestellt werden. Eine Kreuzung der Mauslinie mit MPO-defizienten Tieren (MPO^{-/-}; DKO) führte in ersten Versuchen zu einer signifikanten Abschwächung der TAA-Dilatation.¹⁵⁸ MPO scheint also bei der Ätiopathogenese von TAA im MFS-Mausmodell eine relevante Rolle zu spielen.

Fibrillin-1 ist ein cysteinreiches Protein mit insgesamt 155 Disulfidbrücken, ein Großteil davon (141) liegt in den 47 (cb) EGF Domänen.¹⁵⁹ Eine Häufung von Punktmutationen beim MFS, die eine der Disulfidbrücken dieser Domänen betreffen, unterstreicht die Bedeutung ihrer adäquaten Funktion.^{160,161} Extrazelluläre oxidative Zielstrukturen von MPO sind vor allem Cysteine und Methionine. Bei Erstgenannten konnte, wie bereits weiter oben erwähnt, eine MPO abhängige Aufspaltung von Disulfidbrücken nachgewiesen werden. Somit wäre es denkbar, dass eine zunehmende Funktionsstörung von Fibrillin-1, bedingt durch Cystein-Oxidationen, die MFS-TAA aggraviert.

2.10. Zielsetzung des Projekts

Dieses Projekt soll auf grundlagenwissenschaftlicher Ebene die Rolle des granulozytären Enzyms MPO in der Pathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen im Rahmen des Marfan-Syndroms darlegen. Hierbei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Befindet sich MPO in der Gefäßwand der Aorta ascendens von MFS-Mäusen?
2. Bindet MPO an Fibrillin-1?

3. Induziert MPO über diese Bindung Oxidationen am Fibrillin-1?
4. Verstärken MFS-verursachende Fibrillin-1 Mutationen MPO-bedingte Oxidationen?

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurden ausschließlich Chemikalien von hoher analytischer Reinheit verwendet.

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--------------------------|
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) | Sigma Aldrich |
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) | Sigma |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) | Sigma |
| Aceton | Chemsolute |
| Ammoniumpersulfat 10% | Sigma |
| Chicken Serum | Sigma |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma Aldrich |
| Eindeckmedium AEC-Färbung: Faramount Mounting Medium | Faramount |
| Eindeckmedium IF: Dako Fluorescence Mounting Medium | Sigma |
| Eisen-Haematoxylin A&B | Waldeck |
| Essigsäure | Roth |
| Ethanol 70% | Appllichem |
| Ethanol reinst 99,5% | Roth |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma |
| Formaldehyd (Methanolfrei) 16% | Thermo Scientific |
| Glycerol trinitrat 1% Lösung | Merck |
| Glycin | Appllichem |
| Goat-Serum | Sigma |
| Hank's Salzlösung (HBSS) | Thermo Fisher |
| Histofine Simple Stain Mouse Peroxidase | Nichirei Biosciences INC |
| Kalziumchlorid | Merck |
| Mausserum | Sigma |
| MPO | Planta Natural Products |
| Natriumacetat | Roth |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth |
| Natriumdeoxysulfat (SDS) 10% | Sigma |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth |
| Natriumhypochlorid (NaOCl) | Roth |

| | |
|--|--------------------|
| PAP Pen (Fettstift) | Sigma |
| Phosphag gepufferte Salzlösung (PBS)-Tabletten | Gibco |
| Polysorbat (TWEEN) 20 | Sigma |
| Proteaseinhibitor Cocktail Halt™ | Thermo Scientific |
| Rabbit Serum | Sigma |
| Rinder Serumalbumin (BSA) | Biomol |
| Salzsäure (HCL) 1M | Fluka |
| SDS 20% | Applichem |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth |
| Tris-Acrylamid | Sigma |
| Tris-Glycine SDS Sample Buffer | Life Technologies |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TrisBase) | Life Technologies |
| Triton X-100 | Sigma |
| Tropoelastin | Advanced BioMatrix |
| Trypsin | Roth |
| Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30% | Roth |

Tabelle 1: Chemikalienliste

3.2. Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Firma |
|--|-------------------|
| 15 ml Falconröhrchen | Sarstedt |
| 50 ml Falconröhrchen | Sarstedt |
| 96-Well Platte | Sarstedt |
| Deckgläser | Th. Geyer |
| Glasobjektträger | Th. Geyer |
| Lab-Tek™ ChamberSlides | Thermo Scientific |
| Nitrozellulosemembran | Thermo Scientific |
| Pipettenspitze 10-500µl | Sarstedt |
| Reagiergefäße 0,5ml – 2,5ml | Sarstedt |
| Serologische Pipette, wattiert, 1, 2, 5, 10, 25, 50ml | Sarstedt |
| T-25, T-75, T-175 Zellkulturflasche | Sarstedt |

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

3.3. Kits

| Produkt | Firma |
|--|----------------------|
| Coomassie Blue PageBlue™ | Life Technologies |
| MPO-ELISA, Mouse | HyCult Biotechnology |
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific |
| Pierce™ Silber-Färbekit | Thermo Scientific |
| SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrat: Luminol & Peroxidpuffer (ECL/Femto) | Thermo Scientific |

Tabelle 3: Kits

3.4. Geräte und Software

| Bezeichnung | Gerät | Firma |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Blotting System | PerfectBlue™ Twin S | PeqLab |
| IHC-Analysesoftware | BZ-II Viewer/Analyzer | Keyence |
| IHC-Analysesoftware | ImageJ | NIH |
| Mikroskop | BZ-9000 | Keyence |
| Photometer | Multiskan FC | Thermo Scientific |
| Schüttler | Titramax 1000 T | Heidolph |
| Sicherheitswerkbank | SterilGARD | Baker |
| Statistiksoftware | GraphPad PRISM | GraphPad Software Inc |
| Vektorgrafik- Programm | Inkscape | Inkscape-Projekt |
| Wasserbad | SUB Aqua 26 Plus | Grant |
| WB-Analysesoftware | Image Lab Software | Bio-Rad |
| Zellzähler | TC20™ Automated Cell Counter | Bio-Rad |
| Zentrifuge | 5810 R | Eppendorf |

Tabelle 4: verwendete Geräte und Software

3.5. Mausmodelle

Als MFS-Mausmodell wurde das heterozygote $Fbn1^{C1039G/+}$ Modell der Firma Jackson Laboratory verwendet. Bei diesem wurde ein Cystein in einer cb EGF-Domäne in Exon 25 durch ein Glycin ersetzt, welches zur Bildung einer der drei Disulfidbrücken der Domäne dient. Die Mutationsstelle wurde nach humanem Vorbild ausgewählt, eine C1039Y Mutation wurde bei MFS-Patienten nachgewiesen.¹⁶¹ In Zellkulturen konnte eine verminderte Deposition von Mikrofibrillen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu WT-Mäusen kommt es zu einer Fragmentierung der elastischen Fasern der Tunica media der Aortenwurzel, unter anderem

bedingt durch eine gesteigerte Aktivität von MMP-2 und -9. Bereits ab der zweiten Woche kommt es zu einer beginnenden Dilatation der Aortenwurzel, welche im Verlauf aggraviert. Die Lebenserwartung der heterozygoten Tiere ist nicht beeinträchtigt, homozygote Tiere versterben bereits in der Perinatalperiode.^{60,66}

Als MPO-Knockout-Mausmodell wurde das MPO^{tm1lus/J} Modell der Firma Jackson Laboratory mit dem Genotyp MPO^{-/-} verwendet. Bei dieser Mauslinie wird kein Genprodukt synthetisiert, weder auf mRNA- noch auf Proteinbasis. Im Vergleich zu WT-Mäusen besteht kein Unterschied im Differentialblutbild, insbesondere kein Unterschied in der Anzahl an Leukozyten, PMNs oder Monozyten. In letzteren beiden Zellreihen konnten in dem Mausmodell keine endogene Peroxidaseaktivität oder HOCl-Produktion nachgewiesen werden. Die Synthese von Superoxid ist jedoch nicht beeinträchtigt.¹⁶²

Zur Bestimmung des Einflusses von MPO beim MFS wurden die beiden vorbeschriebenen Mausmodelle erfolgreich gekreuzt. In Vorversuchen fiel die Aortenwurzeldilatation dieser Tiere signifikant geringer aus als bei den Fbn1^{C1039G/+} Mäusen.¹⁵⁸ Im Weiteren werden Tiere dieser Linie mit dem Genotyp Fbn1^{C1039G/+} MPO^{-/-} als Double-Knockout (DKO) bezeichnet.

3.6. Zellkultur

3.6.1. HASMC

Es wurden primäre humane aortale glatte Muskelzellen (HASMC) der Firma ATCC in den Passagen vier bis 10 mit dem entsprechenden Medium der Firma Lonza inklusive der vorgesehenen Supplemente verwendet (siehe Tabelle 5). Darüber hinaus wurde dem Zellkulturmedium Penicillin und Streptomycin beigefügt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erhitzt.

| Kategorie | Bezeichnung | Hersteller |
|-------------|--|------------|
| Zellen | Primary Aortic Smooth Muscle Cells; Normal, Human (HASMC) (ATCC® PCS-100-012™) | ATCC |
| Medium | SmBM™ Smooth Muscle Cell Growth Basal Medium | Lonza |
| Supplemente | Humanes Insulin | Lonza |

| | |
|---|---------------|
| Humaner Fibroblastenwachstumsfaktor- B (hFGF-B) | Lonza |
| Gentamicin/Amphotericin-B | Lonza |
| Fetales Kälberserum (FBS) | Lonza |
| Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF) | Lonza |
| Penicillin/Streptomycin | Sigma-Aldrich |

Tabelle 5: In der HASMC-Zellkultur verwendete Materialien

Zum Auftauen der Zellen wurden Zellen der Passage 7 im Wasserbad erwärmt und in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine zuvor für 30 Minuten zwecks Temperatur- und PH-Equilibration prä-inkubierte T75 Zellkulturflasche mit 15 ml Medium überführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch auf Vitalität und Konfluenz überprüft, sowie das Medium gewechselt.

Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte je nach Konfluenz, jedoch mindestens alle 2 Tage. Hierbei erfolgte die Applikation von 5 ml Medium pro 25 cm² kultivierter Oberfläche.

Bei einer Konfluenz von über 80% erfolgte die Passage der Zellen. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt, der Zellrasen in zwei Waschschrritten mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) von Mediumresten gereinigt und anschließend mittels 5 ml Trypsin-EDTA im Inkubator von der Kulturflasche gelöst. Nach mikroskopisch kontrollierter vollständiger Ablösung des Zellrasens erfolgte die Inaktivierung des Trypsins durch die Applikation von Zellkulturmedium. Die Zellsuspension wurde dann bei 150g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und dem Zellpellet die benötigte Menge an Medium hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig auf die neuen Flaschen verteilt.

Zum Zweck der immunhistochemischen Färbung wurden die HASMCs auf errechnete 33-prozentige Konfluenz in zweikammerige ChamberSlides gesät und mit 1,5 ml Medium für 5-7 Tage kultiviert. Das weitere Vorgehen ist im entsprechenden Abschnitt näher beschrieben.

3.6.2. HEK293

Es wurden humane embryonale Nierenzellen der Epstein-Barr-Virus-nukleäres-Antigen-1 Zelllinie (HEK293-EBNA) verwendet. Diese wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerhard Sengle zur Verfügung gestellt, nachdem sie zuvor mit entsprechender Plasmid-DNA transfiziert wurden, sodass die Zellen das rekombinante Fibrillin- 1 Fragment rF11 sezernieren.

Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit den in der Tabelle aufgeführten Supplementen verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Inkubator

bei 37°C und 5% CO₂. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erhitzt.

| Kategorie | Bezeichnung | Hersteller |
|-------------|--|------------|
| Zellen | Human Embryonic Kidney-Cells (HEK293-EBNA) | unbekannt |
| Medium | DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate | Gibco |
| Supplemente | FBS | Gibco |
| | Puromycin | Gibco |

Tabelle 6: In der HEK293-Zellkultur verwendete Materialien

Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte je nach Konfluenz, mindestens aber alle 3 Tage. Hierbei erfolgte die Applikation von 1 ml Medium pro 7,5 cm² kultivierter Oberfläche.

Die Passage der Zellen erfolgte analog zum Vorgehen bei den HASMCs jedoch wurden die Zellen bei 400g für 5 Minuten zentrifugiert und in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet.

Zwecks Optimierung der Menge an gewonnenem rF11 wurde der Zellzyklus der HEK293-Zellen G0-synchronisiert. Dies erfolgte mittels 48-stündiger Inkubation mit FBS-freiem Mangelmedium. Das weitere Vorgehen ist im entsprechenden Abschnitt näher beschrieben.

3.7. Immunhistologie

3.7.1. Immunfluoreszenz (IF) von HASMCs

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in den ChamberSlides zweifach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 2 oder 4 Stunden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 5% mit 3 µg MPO in 300 µl Zellkulturmedium pro Kammer inkubiert. Die Negativkontrolle erfolgte mit 3 µl H₂O in 300 µl Zellkulturmedium pro Kammer. Dann folgte eine Inkubation mit 40 µM H₂O₂ beziehungsweise H₂O über 20 Minuten. Im Anschluss wurden die HASMCs nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 500 µl 3,7-prozentigem Methanol-freiem Formaldehyd pro Kammer für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach 3 weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 200 µl 0,1-prozentiger Triton-X-100/PBS-Lösung pro Kammer für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern erfolgte eine Blockierung mit 200 µl einer Lösung aus 10% Serum der Sekundärantikörperspezies und 0,1% Triton-X-100 in PBS pro Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dann erfolgte die Inkubation mit den

Primärantikörpern in 200 µl der Blockierlösung über Nacht bei 4°C. Es wurden die in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgelisteten Primär- und Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung verwendet.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit den beiden fluoreszierenden Sekundärantikörpern in 300 µl Blockierlösung pro Kammer über eine Stunde inkubiert. Von diesem Arbeitsschritt an erfolgte die Färbung bei abgedunkelten Verhältnissen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS bei Dunkelheit erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in 300 µl PBS pro Kammer für 15 Minuten. Nach dreimaligem Waschen wurden die Kammerwände entfernt und Deckgläser mittels Eindeckmedium auf den Proben befestigt. Nach 30 Minuten Trocknungszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung bei 4°C.

| Zielstruktur | Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|------------------------|---|------------|-----------------------------|
| MPO | Rabbit anti MPO, pAB 475915 | 1:250 | Calbiochem |
| | Goat anti MPO heavy chain (M-17): sc-34161 | 1:50 | Santa Cruz |
| Fibrillin-1 | Rabbit anti Fibrillin-1, ab53076 | 1:1000 | Abcam |
| | Mouse anti Fibrillin-1, Clone 11c1.3, MA5-12770 | 1:100 | Thermo Scientific Fisher |
| Elastin | Mouse anti Elastin, Clone 10B8, mAB2503 | 1:50 | Chemicon |
| Nitrotyrosin | Rabbit anti-Nitrotyrosine, AB 06-284 | 1:300 | Upstate |
| 3-Chlorotyrosin | Rabbit anti-3-Chlorotyrosine, pAb | 1:50 | Hycult Biotech |

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper und Verdünnung

| Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|---|-------------------|-------------------|
| Chicken anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 594 | 1:100 | Invitrogen |
| Goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 | 1:100 | Invitrogen |
| Goat anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 | 1:100 | Invitrogen |
| Chicken anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 | 1:100 | Invitrogen |
| Chicken anti-goat IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 594 | 1:100 | Invitrogen |
| Chicken anti-goat IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 | 1:100 | Invitrogen |

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper und Verdünnung

3.7.2. IF von murinen Aorten

Es wurden Schnitte von 5 µm Dicke von kryokonservierten murinen Aorten immunhistologisch angefärbt. Sofern nicht anders angegeben erfolgten die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. In einem ersten Schritt wurden die bei einer Temperatur von -80°C gelagerten Schnitte bei Raumtemperatur für 5 Minuten aufgetaut. Die Präparate wurden dann mit einem Fettstift umrandet, sodass mittels einer hydrophoben Barriere materialsparend gearbeitet werden konnte. Die Fixierung erfolgte mit 3,7% Methanol-freiem Formaldehyd für 15 Minuten. Permeabilisiert wurde mit einer Lösung von 0,1% Triton X-100 in PBS für 20 Minuten. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurde eine Lösung aus 10% Serum der Sekundärantikörperspezies und 0,1% Triton-X-100 in PBS für eine Stunde appliziert. Für die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern wurden diese in Blockierlösung verdünnt. Die Primärantikörper wurden entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C appliziert. Es wurden die in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgelisteten Primär- und

Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung verwendet. Die Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 für eine Stunde inkubiert. Von diesem Arbeitsschritt an erfolgte die Färbung bei abgedunkelten Verhältnissen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS für 15 Minuten. Die Deckgläser wurden mittels Eindeckmedium fixiert. Nach 30 Minuten Trocknungszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung bei 4°C.

3.7.3. Immunhistochemie (IHC): AEC-Färbungen

Es wurden Schnitte von 5 µm Dicke von kryokonservierten murinen Aorten immunhistologisch angefärbt. Sofern nicht anders angegeben erfolgten die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. In einem ersten Schritt wurden die bei einer Temperatur von -80°C gelagerten Schnitte bei Raumtemperatur für 5 Minuten aufgetaut. Die Präparate wurden dann mit einem Fettstift umrandet, sodass mittels einer hydrophoben Barriere materialsparend gearbeitet werden konnte. Die Fixierung erfolgte mit 3,7% Methanol-freiem Formaldehyd für 15 Minuten. Zum Blocken endogener Peroxidasen wurden die Schnitte für 15 Minuten mit einer Lösung aus 0,075% Wasserstoffperoxid in PBS inkubiert. Der Blockierschritt und die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgten analog zum IF-Protokoll. Die Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern erfolgte über eine Stunde. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einer gebrauchsfertigen 3-Amino-9-Ethyl Carbazol (AEC) Lösung inkubiert. Hierbei wurde die Farbreaktion mikroskopisch beobachtet und bei ausreichender Färbung des Präparats durch zwei Waschschrte mit destilliertem Wasser gestoppt. Zwecks Vergleichbarkeit wurde die entsprechende Inkubationszeit in folgenden Färbungen beibehalten. Zur Färbung der Zellkerne wurde mit einer Hämatoxylin-Lösung nach Mayer gearbeitet, diese wurde für 2 Minuten appliziert. Anschließend wurden die Schnitte über 10 Minuten in laufendem Leitungswasser gebläut. Die Deckgläser wurden mittels Eindeckmedium fixiert.

| Färbung | Alter der Mäuse |
|------------|-----------------|
| MPO IHC/IF | 12 Wochen |
| 2D10G9 IHC | 6 Wochen |
| Ly6G IF | 6 und 12 Wochen |

Tabelle 9: Alter der Mäuse nach Färbung

3.7.4. Auswertung der immunhistologischen Färbungen

Die gefärbten Objektträger der AEC-Färbungen wurden in 1-, 10- und 20-facher Vergrößerung; die der IF in 20- und 40-facher Vergrößerung mittels Keyence BZ-9000 Mikroskop gescannt. Bei Färbungen der Aorta ascendens wurde dann mittels ImageJ-Analysesoftware die Tunica media definiert und anschließend das Signal pro Fläche in % gemessen. Bei den IF-Färbungen der Zellkultur wurde mittels BZ-II Viewer/Analyzer die Signalfäche in μm^2 quantifiziert und anschließend die Kolokalisationsfläche von jeweils 2 verschiedenen angefärbten Strukturen in μm^2 bestimmt. Dann erfolgte eine Bestimmung der prozentualen angefärbten Fläche (MPO bzw. nTyr) von Fibrillin-1.

3.8. Verwendete Proteine

3.8.1. rF11

Zur Synthese von rF11 dienten mit entsprechender Plasmid-DNA transfizierte, oben beschriebene HEK293-EBNA Zellen. Nach der Zellzyklussynchronisation über 48 Stunden mit Mangelmedium wurde dieses abpipettiert und bei 4°C mit 2000g für 20 Minuten zentrifugiert, sodass das rF11 enthaltende Medium von Zelldebris getrennt werden konnte. Im Anschluss wurde ein auf 4°C gekühlter Proteaseinhibitor appliziert, um eine unerwünschte Proteolyse zu verhindern. Das so gewonnene rF11 wurde dann bis zur weiteren Verarbeitung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die quantitative Erfassung des gewonnenen rF11 erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA). Es wurden 9 Standard-Dilutionen verwendet, diese sind im Folgenden mit den Buchstaben A-I bezeichnet. Zur Kalibrierung wurden dann jeweils 10 μl dieser Standards der Reihe nach in Doppelbestimmung in eine 96-Well Platte pipettiert. In die darauffolgenden Wells wurde 10 μl der zu messenden Proben in Doppelbestimmung pipettiert. Anschließend wurde die Reagenzlösung aus den Stammlösungen A und B in einem Verhältnis von 50:1 angesetzt und mit einer Mehrkanalpipette 200 μl der Lösung in jedes Well gegeben. Die 96-Well Platte wurde dann für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch gemessen.

3.8.2. Cb EGF 9-15

Aufgereinigte Proben des Fibrillin-1-Fragments cb EGF 9-15, sowohl in regulärer Primärstruktur als auch mit der C1039G-Mutation, wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerhard Sengle zur Verfügung gestellt.

3.8.3. Tropoelastin

Bei Versuchen mit Tropoelastin wurde kommerziell erworbenes rekombinantes Tropoelastin verwendet (vgl. Tabelle 1)

3.9. Western Blot (WB)

3.9.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Rahmen der Gelelektrophorese wurde je nach untersuchtem Protein mit unterschiedlichen Gelen gearbeitet. Für die Elektrophorese von rF11 (163,999 kDa) wurden 5% und 7,5% Trenngele verwendet, für Tropoelastin (72 kDa) und cb EGF 9-15 (53,941 kDa) wurde mit 10% Trenngel gearbeitet. Die Gele wurden am Vortag gegossen und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Proben wurden mit 4x Laemmli-Puffer working Solution in einem Verhältnis von Probe:Laemmli-Puffer 3:1 versetzt. Auf den Zusatz des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) wurde bewusst verzichtet, um eine Reduktion beispielsweise von Disulfidbrücken zu verhindern. Die Lösung wurde dann über 5 Minuten bei 95°C auf dem Wärmeschüttler erhitzt und anschließend mit Eis gekühlt. In dem Gelelektrophoresesystem wurde anschließend der Laufpuffer eingefüllt, der Gelkamm entfernt und die Proben aufgetragen. Die pro Tasche verwendete Probenmenge betrug 2,2 – 3,5 µg beim rF11 und 8 µg beim Tropoelastin. Bei den beiden cb EGF 9-15-Fragmenten wurde aufgrund von zuvor erfolgten Aufreinigungsschritten und limitierter Probenverfügbarkeit auf eine quantitative Proteinbestimmung verzichtet. In die erste Tasche von links wurde der Molekulargewichtsmarker eingefüllt. Der bei dem jeweiligen Versuch verwendete Marker ist der Tabelle 11 zu entnehmen. Das fertig beladene Gel wurde danach unter einer konstanten Spannung von 60V für 20 Minuten laufen gelassen, bis die blaue Lauffront etwa 1cm in das Trenngel gelaufen ist, die Spannung wurde dann auf 100V erhöht. Je nach Schwere des Proteins und Bisacrylamidkonzentration unterschied sich die Laufzeit der PAGE (vgl. Tabelle 10).

| Probenart | Laufzeit bei 5% | Laufzeit bei 7,5% | Laufzeit bei 10% |
|--------------|-----------------|-------------------|------------------|
| rF11 | 5 Stunden | 3 Stunden | |
| cb-EGF9-15 | | | 3,5 Stunden |
| Tropoelastin | | | 3 Stunden |

Tabelle 10: SDS-PAGE-Laufzeiten und verwendete Gele.

| Probenart | Verwendeter Marker |
|-----------|---|
| rF11 | Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder, Thermo Scientific™ |

cb-EGF9-15

PageRuler™ Prestained Protein Ladder,
Thermo Scientific™

Tropoelastin

PageRuler™ Prestained Protein Ladder,
Thermo Scientific™

Tabelle 11: Verwendeter WB-Marker je nach Probenart

In den ersten SDS-PAGE-Versuchsdurchläufen, bei denen selbst synthetisiertes rF11 verwendet wurde, wurde im Anschluss zwecks Validierung ein kompletter WB durchgeführt. Bei späteren Versuchen, bei Verwendung bereits im Vorfeld validierter Proben sowie bei kommerziell erworbenem rekombinantem Protein wurde nach einmaliger Validierung der SDS-PAGE folgender WB durchgeführt, sondern die Gele entweder mittels Coomassie-Blue- oder mittels Silberfärbung angefärbt. Die Färbekits sind Tabelle 3 zu entnehmen.

3.9.2. Blotting

Vorbereitend wurde zuerst der Blotpuffer hergestellt und bei 4°C gelagert. Außerdem wurde die Nitrozellulose-Folie auf die Größe des Gels von 7,5 x 9 cm, sowie 6 Filterpapiere zugeschnitten. Es wurde eine Schale mit Aqua dest sowie eine Schale mit Blotpuffer vorbereitet. Das fertige Polyacrylamidgel wurde dann vorsichtig von den Glasplatten gelöst, zwischen denen es sich befand, und in der Schale mit Aqua dest gelagert. Das Gel wurde in ein Blot-Sandwich gelegt und dieses im Blotpuffer platziert. Die im Gel befindlichen Proteine wurden in einem nächsten Schritt über 2 Stunden bei 200 mA in Tank-Blotting-Technik unter Kühlung auf die Nitrozellulose-Folie übertragen. Die Lokalisation des Markers wurde entsprechend markiert.

Die Nitrozellulose-Folie wurde für eine Stunde auf dem Schüttler in 5% Rinderserumalbumin (BSA) in TBS-T bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper in der entsprechenden Verdünnung in der Blockierlösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde dann mit dem passenden Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in der Blockierlösung für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nitrozellulose-Folie wurde nun mit ECL:Femto in einem Verhältnis von 4:1 über 5 Minuten inkubiert und anschließend entwickelt.

Falls im Anschluss eine weitere Färbung der Membran mit anderen Antikörpern durchgeführt werden sollte, wurden die Antikörper vorher mit Natriumhydroxid (NaOH) gewaschen und erneut blockiert.

| Zielstruktur | Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------|--|------------|-------------------|
| Fibrillin-1 | Mouse anti Fibrillin-1, Clone 11c1.3, MA5- 12770 | 1:100 | Thermo Scientific |
| Elastin | Mouse anti Elastin, Clone 10B8, mAB2503 | 1.50 | Chemicon |

Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper im WB

| Antikörper | Verdünnung | Hersteller |
|---|------------|------------|
| Goat anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 | 1:10000 | Invitrogen |

Tabelle 13: Verwendete Zweitantikörper im WB

3.9.3. Färbung der Gele

Die Commassie-Blue- sowie die Silberfärbung der Gele erfolgten mit einem kommerziellen Färbe-Kit (vgl. Tabelle 3). Die Durchführung der Färbungen hat sich am Protokoll des jeweiligen Herstellers orientiert und sind diesen zu entnehmen.

3.9.4. Probenvorbehandlung: Inaktivierung von MPO

Zur Inaktivierung der MPO wurde 4-Amino-benzhydrazid (ABAH) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen potenten irreversiblen Inhibitor der Peroxidaseaktivität von MPO. Es wurde 50µM ABAH in Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösung als Arbeitslösung verwendet. 30%iges H₂O₂ wurde vorbereitend in PBS um den Faktor 1:10.000 verdünnt. Zur Inaktivierung wurde die ABAH-Arbeitslösung um den Faktor 1:1000 in PBS verdünnt. Anschließend wurde 2,5µL dieser ABAH-Lösung, 4,33µL PBS, 14,17µL des verdünnten H₂O₂ als Inaktivierungslösung vorbereitet und 5µg MPO hinzugefügt. Die erfolgreiche Inaktivierung der Peroxidaseaktivität wurde dann mittels Applikation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), einem Peroxidasesubstrat welches die Peroxidaseaktivität von MPO durch einen hellblauen Farbumschlag anzeigt, bestätigt (vgl. Abbildung 5). Das so inaktivierte MPO wurde danach, falls nicht sofort verwendet, bei 4°C gelagert und innerhalb von 3 Tagen verbraucht.

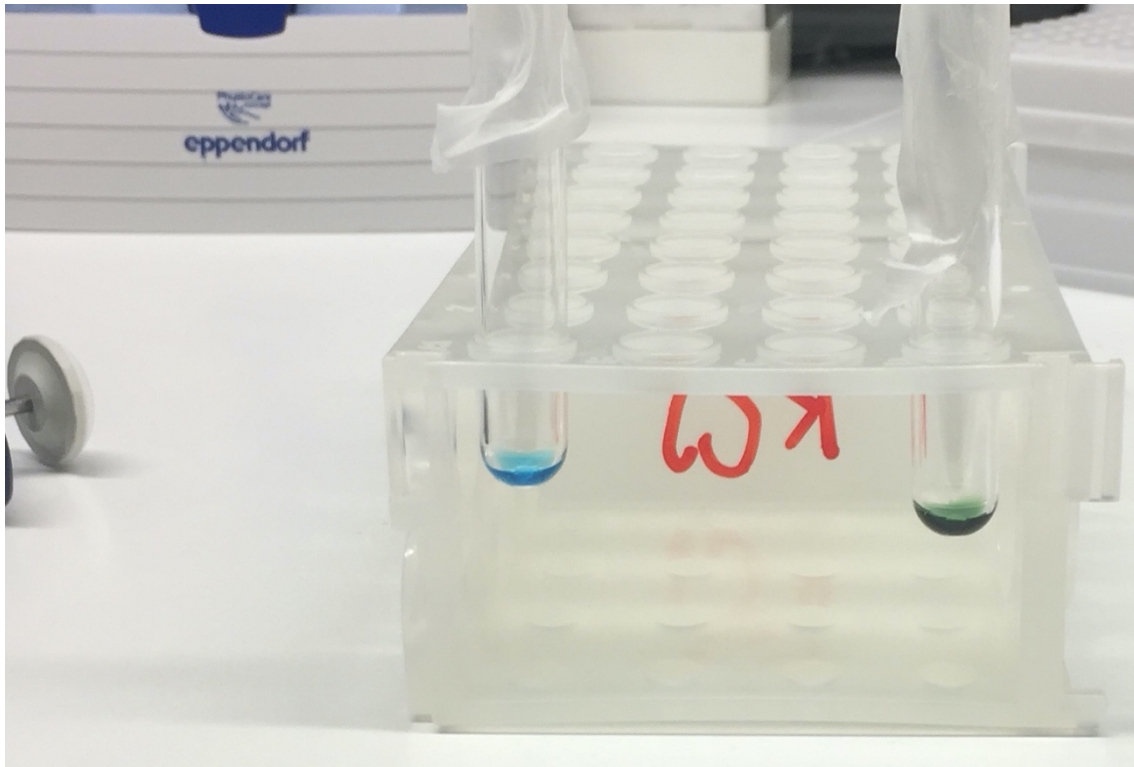


Abbildung 5: Kontrolle der erfolgreichen Inaktivierung der Peroxidaseaktivität von MPO. Linkes Reagenzglas: aktives MPO, es ist zu einem hellblauen Farbumschlag gekommen; rechtes Reagenzglas: mit ABAH-inaktiviertes MPO, die TMB-typische dunkelgrüne Farbe ist nicht umgeschlagen.

3.9.5. Probenvorbehandlung: Synthese von HOCl

Zur Synthese von HOCl wurde dessen Natriumsalz, Natriumhypochlorit (NaOCl) in 0,9% Natriumchlorid-Lösung (NaCl) verdünnt und anschließend mittels 37% Salzsäure (HCl) auf einen pH von 3 titriert. Direkt folgend wurde 5 M Natronlauge hinzugegeben. Die Molarität der so synthetisierten HOCl wurde photometrisch bei 292 nm ermittelt. Aufgrund der Reaktionsfreudigkeit der Säure wurde diese direkt nach Herstellung verwendet.

3.9.6. Probenvorbehandlung: Inkubation mit MPO und H₂O₂ oder HOCl

Die Proben wurden vor Durchführung der Gelelektrophorese für 30 Minuten bei 37°C auf Wärmeschüttler inkubiert. Die genauen Konditionen sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

| Bezeichnung | Inkubation mit: |
|---|--|
| Nativ belassene Probe | Aqua dest in PBS* |
| MPO und H₂O₂ | MPO (10 µg/ml) und H ₂ O ₂ (40 µM) in PBS* |
| Inaktiviertes MPO | Inaktiviertes MPO (10 µg/ml) in PBS |
| HOCl | HOCl (80 µM) |

Tabelle 14: Auflistung der verschiedenen Konditionen zur Probeninkubation für die SDS-PAGE/WB.

*Bei Versuchen mit Tropoelastin erfolgten die Versuche in 0,25%iger Eisessigsäure (pH 2,4) um eine Ausfällung zu verhindern.

3.10. Datenbankanalyse

Zur Analyse, Auswertung und Kartierung bekannter Strukturen von Fibrillin-1 erfolgte eine Analyse mittels der bioinformatischen Datenbank (DB) UniProtKB.¹⁵⁹ Ergänzt wurde die Proteinkartierung um die Lokalisation der Heparin-Bindungsstellen.²⁸ Zur Analyse der bekannten MFS-Mutationen erfolgte eine Analyse der DBs UniProtKB sowie UMD-FBN1.¹⁶³ In der UMD-FBN1 DB wurde nur Missense-Mutationen mit der Zusatzinformation „classical MFS“ in die Analyse eingeschlossen. In der UniProtKB DB erfolgte eine Analyse auf Grundlage der Daten von humanem Fibrillin-1, zu finden unter der DB-Nummer P35555. Mutationen, die ein klassisches MFS auslösen, waren hier entsprechend vorselektiert. Der funktionelle Aufbau von Fibrillin-1 wurde mittels Inkscape dargestellt.

3.11. Massenspektrometrie (MS)

Analysiert wurde das Fibrillin-1 Fragment rF11 nach 30-minütiger Inkubation mit entweder MPO und H₂O₂ oder Aqua dest. Dies erfolgte in jeweils 5 separaten Ansätzen. Dann erfolgte eine SDS-PAGE mit am Vortag gegossenen, 5%igen Gelen mit anschließender Coomassie-Blue-Färbung nach obenstehendem Protokoll. Da potenzielle Oxidationen detektiert werden sollten, erfolgten sämtliche Schritte unter nicht-reduzierenden Konditionen, insbesondere ohne den Zusatz von Reduktionsmitteln. Die spektrometrische Analyse erfolgte mittels Carbamidomethyl-Capping. Nach der Anfärbung der Proteinbande wurden die Fibrillin-1 Banden ausgeschnitten und jeweils in 2 Hälften geschnitten. Dann erfolgte eine entsprechende Aufbereitung der Proben nach den im Anhang zu findenden Protokollen der Proteomics Facility des CECAD Research Centers, Köln. Im Anschluss erfolgte eine bottom-up MS Analyse der entsprechenden Proben im Shotgun-Ansatz. Es erfolgte also vor der MS eine Proteolyse, die nun entstandenen Peptide wurden dann in einer Tandem-MS analysiert. Als DB wurde das humane Referenzproteom von UniProt verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Analyse mittels MaxQuant. Gesucht wurden die Begriffe „Cys-Carbamidomethyl“, „Cys-Oxidation“, „Cys-Dioxidation“, „Cys-Propionamide“, „Tyr-Chlorination“, „Tyr-Nitrosylation“ und „Met-Oxidation“. Die Sequenzabdeckung wurde für Fibrillin-1 mit dem Faktor 1,838 multipliziert, da rF11 nur einen Teil des Gesamtproteins abdeckt. Die Identifikation der Peptide erfolgte mittels Abgleich der Fibrillin-1 Proteinsequenz der UniProtKB DB. Da MPO über Heparinbindungsstellen an Proteine bindet und diese oxidiert, erfolgte eine Analyse der Entfernung gefundener Oxidationen zu den Heparinbindungsstellen von rF11.

Potenzielle MPO-bedingte Oxidationen wurden in den beiden oben genannten DBs mit bestehenden Missense-Mutationen abgeglichen. War eines der oxidierten AA-Residuen in einer der DBs von einer MFS-auslösenden Missense-Mutation betroffen, wurden in den entsprechenden Quellen des Eintrags weitere Informationen zu Symptomen, Alter und Geschlecht gesammelt.

https://proteomics.cecad-labs.uni-koeln.de/fileadmin/user_upload/Microsites/Proteomics_Lab/Protocols-Downloads/CECAD_in-gel-digest.pdf

https://proteomics.cecad-labs.uni-koeln.de/fileadmin/user_upload/Microsites/Proteomics_Lab/Protocols-Downloads/CECAD_SDB-RPS%2BStageTip%2Bpurification.pdf

Proteomics Facility

CECAD Research Center

Joseph-Stelzmann-Str. 26

50931 Cologne, Germany

3.12. Statistik

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels GraphPad PRISM ermittelt. Angewandt wurde je nach Versuchsaufbau der gepaarte T-Test, der T-Test für ungleiche Varianzen, die einfaktorielle ANOVA, der lineare Regressionstest, der Grubbs' Test und der Chi-Quadrat-Test. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant eingestuft und mittels Sternchen folgendermaßen markiert: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Wenn nicht anders angegeben wurden Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes graphisch dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. MPO IHC und IF der Aorta ascendens

Zur Untersuchung der Relevanz von MPO in der Entstehung von Aortenaneurysmen beim MFS wollten wir im ersten Schritt dessen Vorliegen in den Aortenwänden von MFS-Mäusen nachweisen. Es erfolgte eine AEC-Färbung sowie eine Immunfluoreszenz von MPO von Cryoschnitten der Aorta ascendens. Verwendet wurden Proben von WT-Mäusen, von MFS-Mäusen mit dem Genotyp $Fbn1^{C1039G/+}$, und von DKO-Mäusen mit dem Genotyp $Fbn1^{C1039G/+} MPO^{-/-}$. Da die hauptsächlichsten Pathologien von MFS-TAAs in der Tunica media zu finden sind und sich hier auch der deutlich größere Anteil an Fibrillin-1 befindet, wurde nur das MPO-Signal der Media von WT-, $Fbn1^{C1039G/+}$ - und DKO-Mäusen überprüft. Hierbei wurden als Negativkontrolle Aortenschnitte von WT-Mäusen verwendet, bei denen lediglich eine Zweitantikörperinkubation durchgeführt wurde. Als Positivkontrolle wurden Milzschnitte von 12 Wochen alten Mäusen, 3 Tage nach 20-minütiger LAD-Ligatur verwendet, da sich zu diesem Zeitpunkt viele PMN in der Milz befinden (vgl. Abbildung 6).

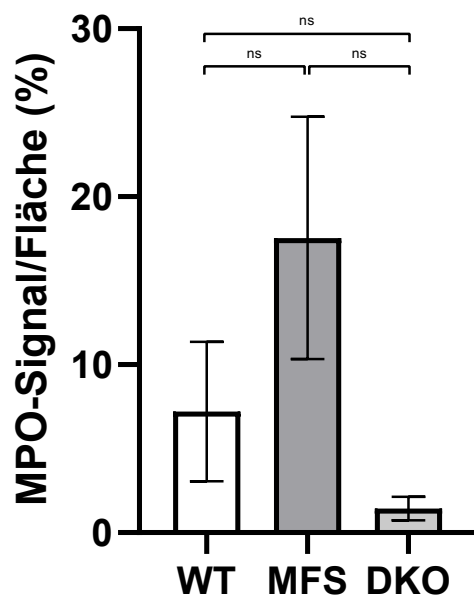
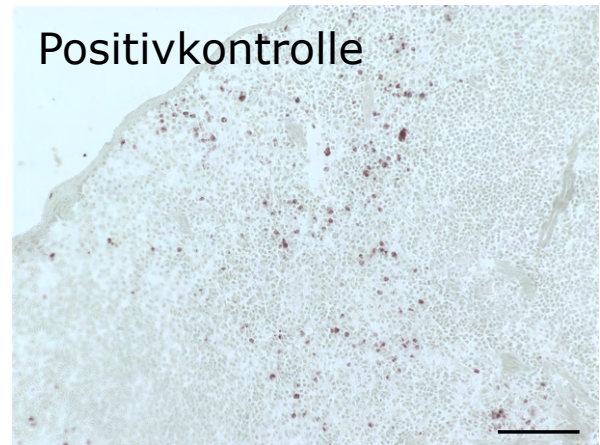
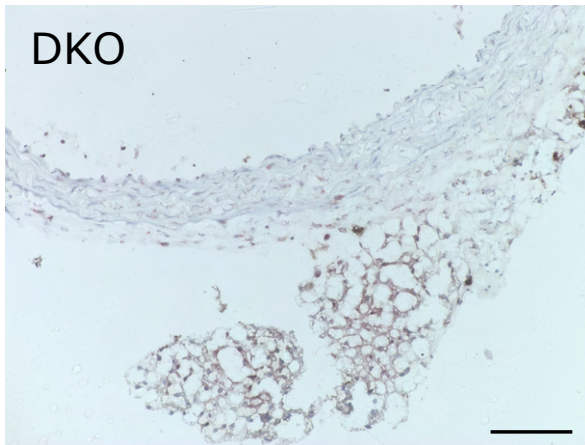
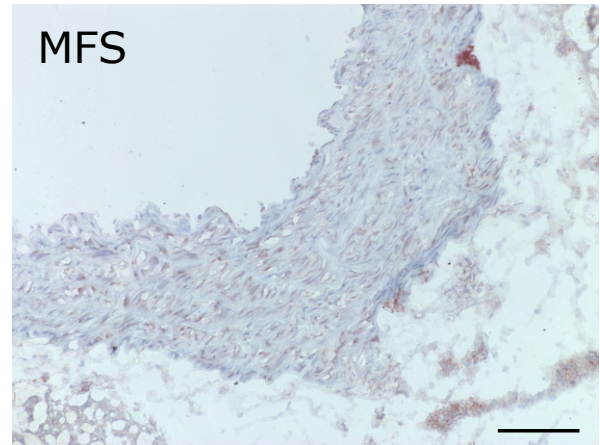
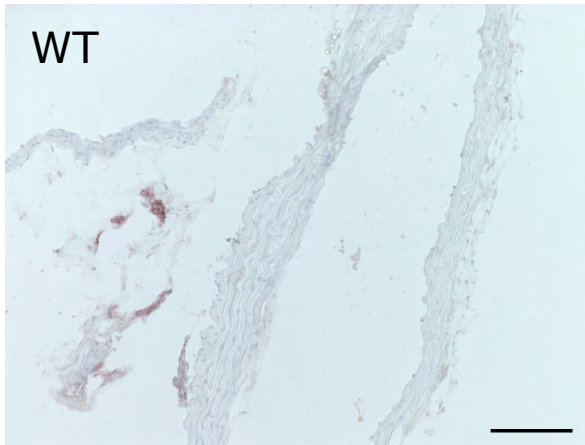


Abbildung 6: MPO AEC Färbung der Aorta ascendens in 20-facher Vergrößerung. Unspezifisches MPO-Signal in der AEC-Färbung der Aorta ascendens 12 Wochen alter Mäuse. Auch in den Aortenwänden von DKO-Mäusen wurde MPO-Signal detektiert. Unten im Bild: statistische Auswertung des detektierten MPO der Tunica media in Relation zu deren Gesamtfläche. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM (WT 7,21% ± 4,15%; MFS 17,54% ± 7,21%; DKO 1,43% ± 0,7%). Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant ($p=0,585$; n : WT=3, MFS=3, DKO=2) In der Subgruppenanalyse zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz (WT vs. MFS $p=0,739$; WT vs. DKO $p=0,931$; MFS vs. DKO $p=0,587$). Die Markierung ist 50 μ m lang.

Im Vergleich zu WT-Mäusen zeigte sich in MFS-Mäusen ein numerischer Trend zu vermehrtem MPO-Signal in der Tunica media (vgl. Abbildung 6), welches bei DKO-Mäusen erwartungsgemäß deutlich erniedrigt war. Interessanterweise zeigte sich in sämtlichen DKO-Schnitten, auch nach mehrfachen Modifikations- und Optimierungsansätzen, eine deutliche Signalanhebung, vor allem in der Adventitia sowie schwächer auch in der Tunica media. Reproduzierbar war dies mit zwei unterschiedlichen MPO-Antikörpern. Auch in der IF der Mausearten ergab sich ein ähnliches Bild (vgl. Abbildung 7).

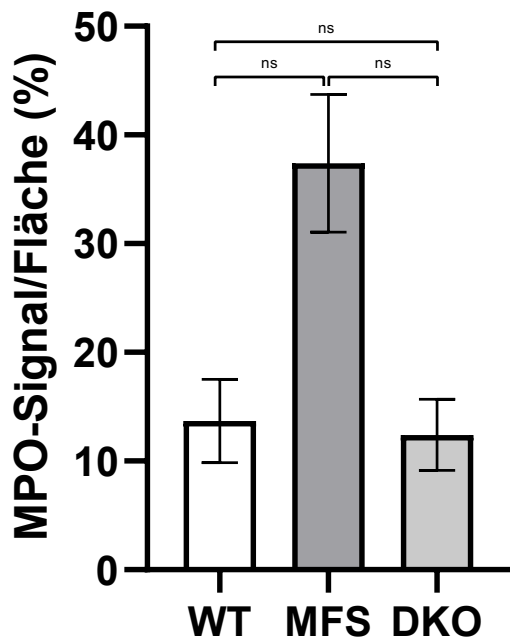
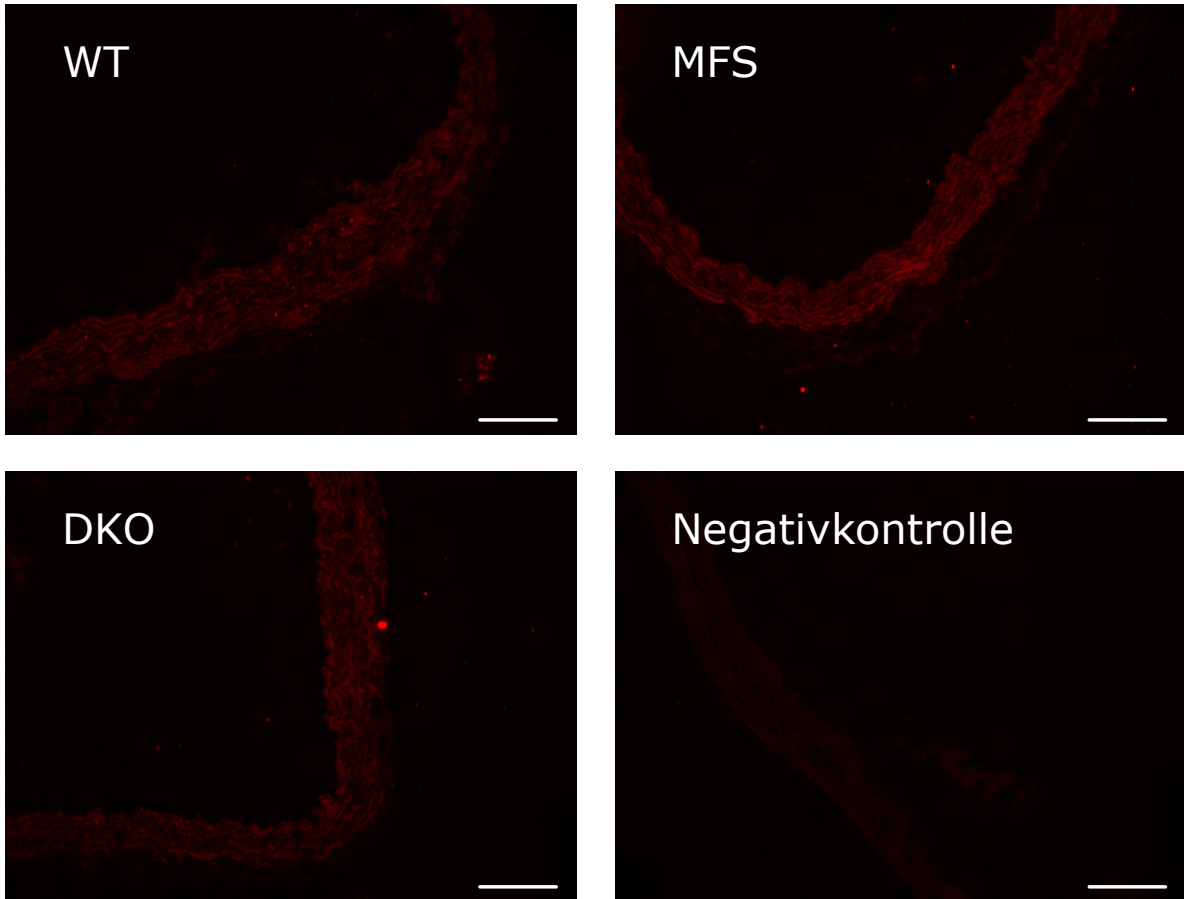


Abbildung 7: MPO IF Färbung der Aorta ascendens in 20-facher Vergrößerung. Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der AEC-Färbung. Unten im Bild: statistische Auswertung des detektierten MPO der Tunica media in Relation zu deren Gesamtfläche. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM (WT 13,69% ± 3%; MFS 37,39% ± 9,5%; DKO 12,42% ± 2,43%). Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant ($p=0,152$; n:

WT=2, MFS=2, DKO=2) In der Subgruppenanalyse zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz (WT vs. MFS $p=0,197$; WT vs. DKO $p=0,992$; MFS vs. DKO $p=0,177$). Die Markierung ist 50 μ m lang.

4.2. 2D10G9 IHC der Aorta ascendens

Da ein direkter Nachweis von MPO nicht signifikant bewiesen werden konnte, erfolgte eine 2D10G9-AEC Färbung von Paraffin-Schnitten der Aorta ascendens. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, welcher valide nicht näher charakterisierte, durch HOCl modifizierte Epitope detektiert.^{53,139,164} Die Färbung erfolgte durch das Mike Davies Labor, Kopenhagen. Hier zeigte sich sowohl im DKO als auch in der Negativkontrolle eine deutlich erhöhte Signalintensität.

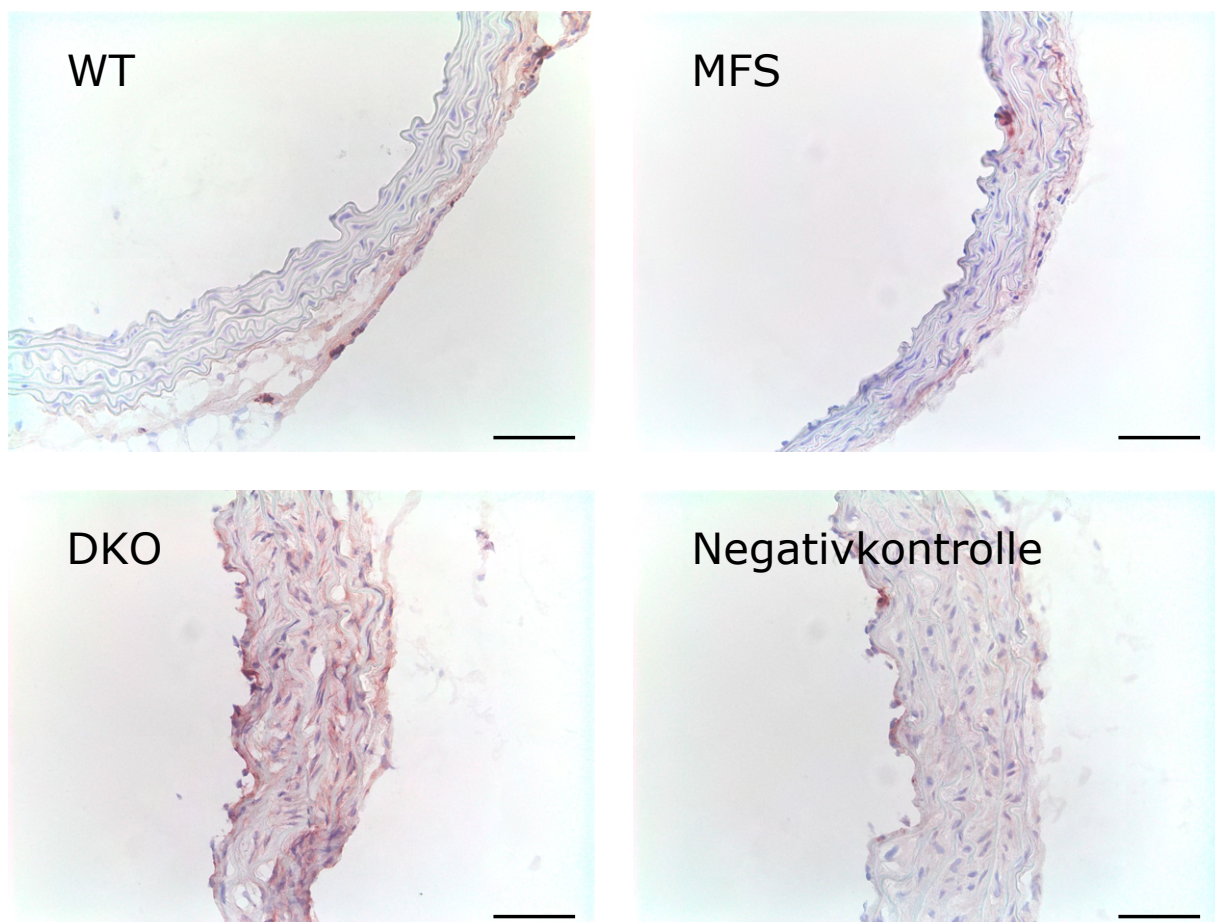


Abbildung 8: 2D10G9-AEC-Färbung der Aorta ascendens in 20-facher Vergrößerung. Die Färbung erfolgte durch das Mike Davies Labor, Kopenhagen. DKO teilweise mit ausgeprägtem Signal. Auch in der Negativkontrolle ist Signal zu sehen. Die Markierung ist 50 μ m lang.

4.3. ELISA von MPO in Aortenlysat

Da ein immunhistochemischer Nachweis von MPO vermutlich antikörperbedingt nicht gelang, erfolgte ein ELISA von LySAT der Aorta ascendens vorgespülter Mausearten durch Christina Schroth. Hier konnte gezeigt werden, dass der MPO-Spiegel in den Aortenwänden der MFS-

Mäuse mit im Mittel 79,22 ng/ml signifikant erhöht war, im Vergleich zu den WT-Mäusen, wo er bei 51,96 ng/ml lag. Wie erwartet wurde bei den DKO-Mäusen lediglich ein minimales MPO-Signal detektiert, welches als Hintergrundrauschen interpretiert wurde (5,66 ng/ml). Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

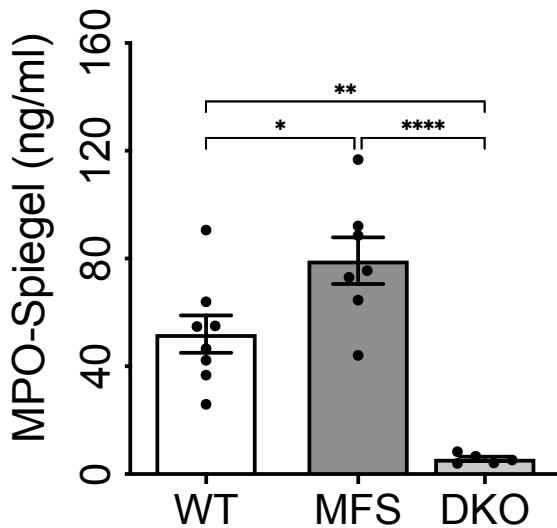


Abbildung 9: MPO-ELISA von Aortenlysat der Aorta ascendens.

MFS-Mäuse (n=7, Mittelwert=79,22 ng/ml \pm 22,95 ng/ml) wiesen deutlich erhöhte MPO-Spiegel im Vergleich zu den WT-Mäusen (n=8, Mittelwert=51,96 ng/ml \pm 19,59 ng/ml) auf. DKO mit marginalem MPO-Signal (n=5, Mittelwert=5,66 ng/ml \pm 1,8 ng/ml). Die Differenzen waren wie im Folgenden aufgelistet statistisch signifikant: WT vs. MFS: *p=0,029; MFS vs. DKO: ****p=<0,0001; WT vs. DKO: **p=0,001.

4.4. MPO/Fibrillin-1 IF Co-Färbung von HASMCs nach Inkubation mit MPO

Da aufgrund der gegensätzlichen Ladung eine Bindung von MPO (kationisch) an Fibrillin-1 (anionisch) möglich ist und für MPO auch eine Bindung an EZM-Proteine über Heparinbindungsstellen nachgewiesen wurde, schauten wir uns im nächsten Schritt an, ob dies *in vitro* der Fall ist. Hierfür wurden HASMCs über die Konfluenz hinaus kultiviert, sodass ausreichend EZM exprimiert wurde. Anschließend erfolgte nach Inkubation mit MPO und H₂O₂ eine IF Co-Färbung von MPO und Fibrillin-1. In erster Linie imponierte eine nukleäre Anreicherung von MPO in den Kernen nach Inkubation. Im Mittel waren 92,36% (n=6; SD \pm 4,883%; SEM \pm 1,973%) des detektierten DAPI-Signals mit MPO-Signal kolokalisiert (vgl. Abbildung 10). Eine Kolokalisation von MPO-Signal mit Fibrillin-1 Signal war nicht zu beobachten.

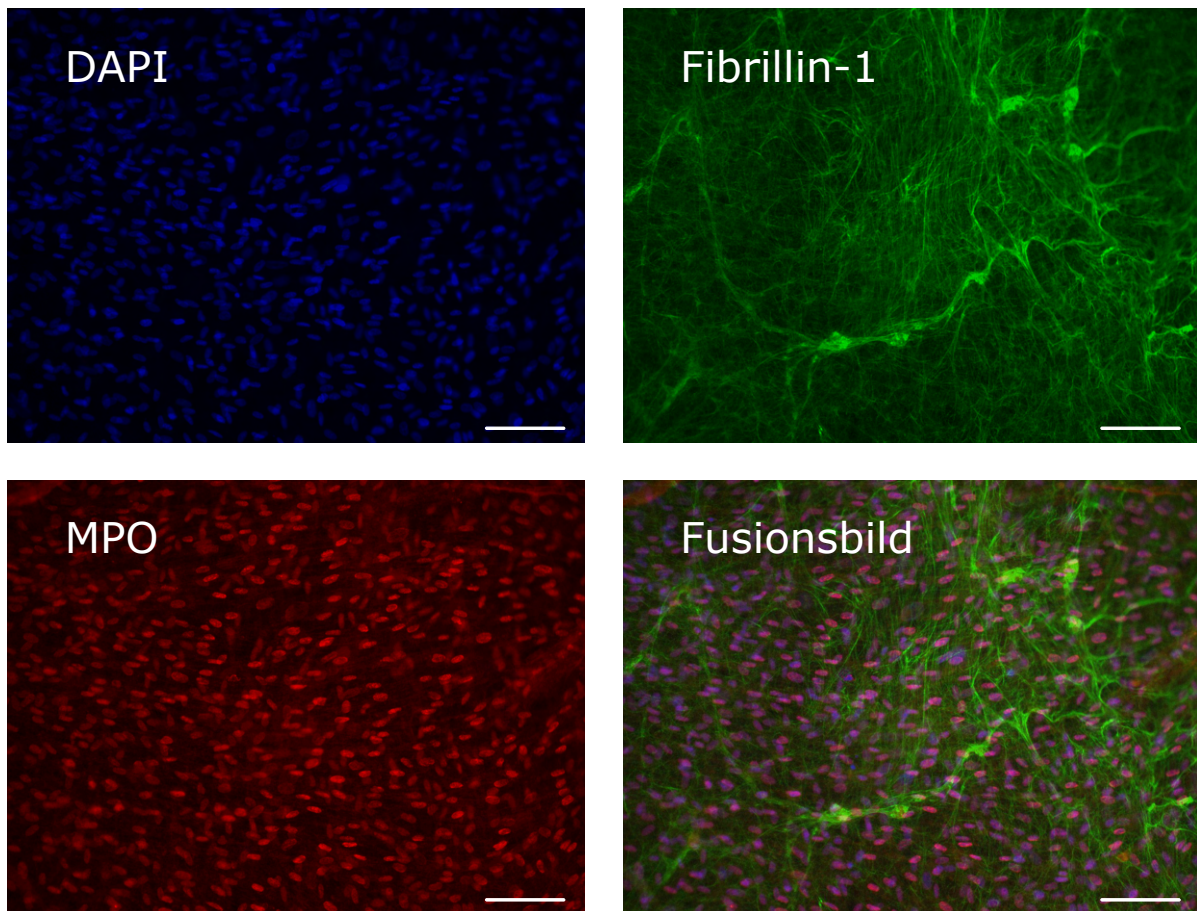


Abbildung 10: MPO- und Fibrillin-1 IF Kofärbung konfluenter HASMCs in 20-facher Vergrößerung. Zu sehen ist primär eine Kolo-kalisation von MPO und den Nuklei von HASMCs nach 4 Stunden Inkubation mittels MPO und H₂O₂. 92,36% des DAPI-Signals waren mit MPO-Signal kolo-kalisiert (n=6; SEM ± 1,973%) Eine Kolo-kalisation von Fibrillin-1-Signal mit MPO-Signal ist nicht zu beobachten. Die Markierung ist 50µm lang.

4.5. Nitrotyrosin-3/Fibrillin-1 IF Co-Färbung von HASMCs nach Inkubation mit MPO

Mittels des Nachweises von nTyr sollte im nächsten Schritt dann gezeigt werden, dass MPO nicht nur eine räumliche Nähe zu Fibrillin-1 zeigt, sondern auch in der Lage ist, dieses zu oxidieren. Nach identischer Vorbehandlung der Proben erfolgte eine IF Co-Färbung von Fibrillin-1 und nTyr. Hier war eine deutliche Nitrotyrosinierung von Fbn1 im Fusionsbild in Orange bis Gelb durch MPO zu sehen. Im Mittel waren 36,49% des Fibrillin-1 Signals mit nTyr-Signal kolo-kalisiert (n=8; SD ± 15,45%; SEM ± 5,461%). Eine nukleäre Kolo-kalisation mit nTyr zeigte sich nicht (vgl. Abbildung 11; Mittelwert=14,84%; n=8; SD ± 6,25%; SEM ± 2,1%).

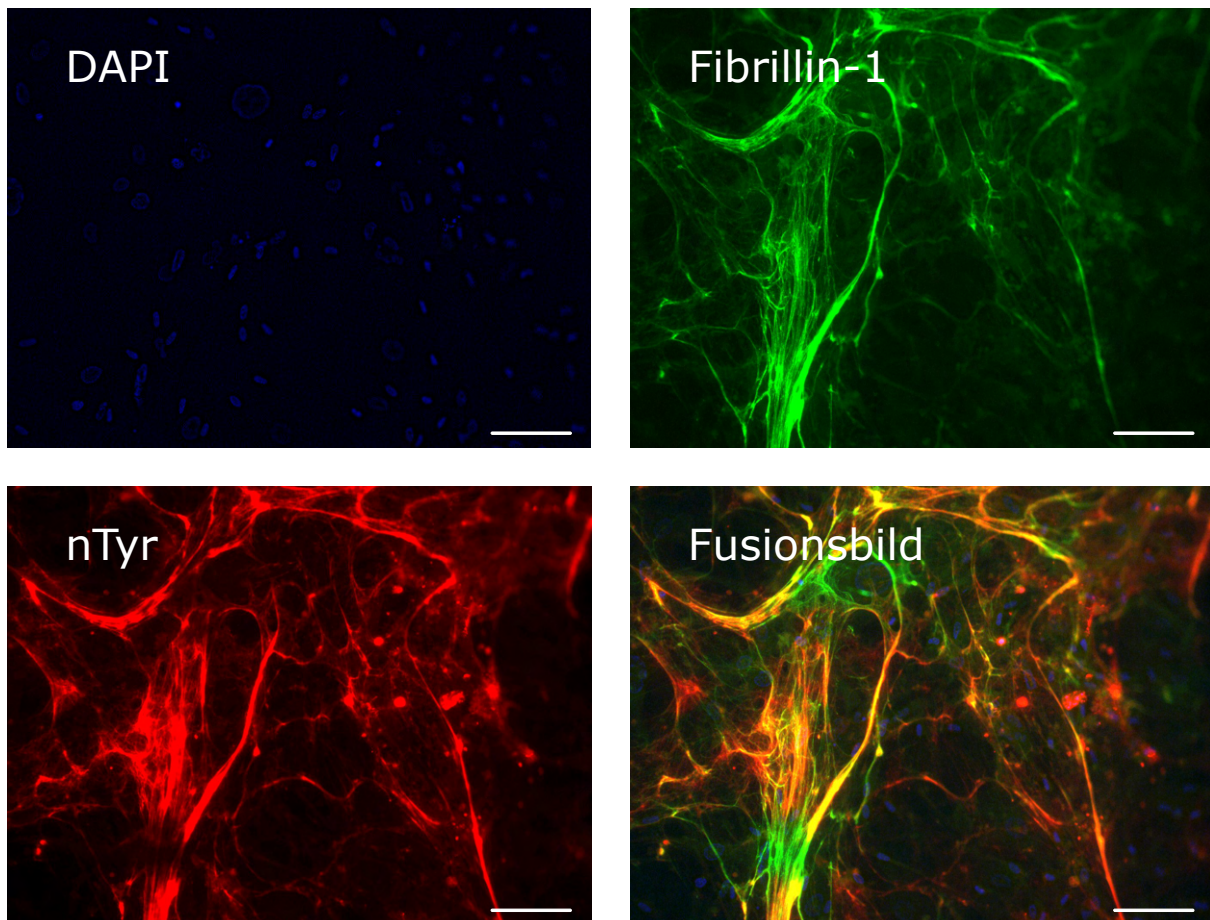


Abbildung 11: nTyr- und Fibrillin-1 IF Kofärbung konfluente HASMCs in 40-facher Vergrößerung. Zu sehen ist eine Kolokalisation von nTyr und Fibrillin-1 nach 4 Stunden Inkubation mittels MPO und H_2O_2 . 36,49% des Fibrillin-1 Signals waren mit nTyr-Signal kolokalisiert ($n=8$; SEM $\pm 5,461\%$). Dies entspricht einer Nitrotyrosinierung von Fibrillin-1 durch MPO. Eine Kolokalisation der HASMC-Nuklei und nTyr zeigt sich nicht. Die Markierung ist 25 μ m lang.

4.6. SDS-PAGE und WB von rekombinatem rF11 nach Inkubation mit MPO und H_2O_2

Da im Vorversuch eine deutliche, MPO-bedingte Nitrotyrosinierung nachgewiesen werden konnte, sollte das Ausmaß an Oxidationen quantifiziert werden. Da eine Oxidation in der Regel eine Massenzunahme des Proteins bewirkt, erfolgte eine Massenbestimmung mittels SDS-PAGE und WB nach Inkubation von Fibrillin-1 mit MPO und H_2O_2 (vgl. Abbildung 12). Verwendet wurde das durch transfizierte HEK 293 Zellen sezernierte, rekombinante Fibrillin-1 Fragment rF11. Nach mehrmaliger Validierung des Vorhandenseins von rF11 mittels WB erfolgten der Einfachheit halber SDS-PAGE Färbungen in Coomassie Blau oder Silberfärbung (vgl. Abbildung 13, Letztere hier nicht dargestellt).

Tatsächlich zeigte sich nach entsprechender Vorinkubation ein signifikanter Massenshift von rF11, der im Mittel 2,555 kDa (SEM $\pm 1,16$ kDa, $**p=0,003$, $n=6$) betrug (vgl. Abbildung 12 - Abbildung 13). Dies deutet auf oxidative Modifikationen von rF11 durch das MPO- H_2O_2 -

System hin. Eine Darstellung des Massenshifts in höherer Auflösung war technisch nicht realisierbar. Nach Inkubation mit in seiner Peroxidaseaktivität inaktivierten MPO zeigte sich der Masseshift von rF11 nicht (nicht dargestellt).

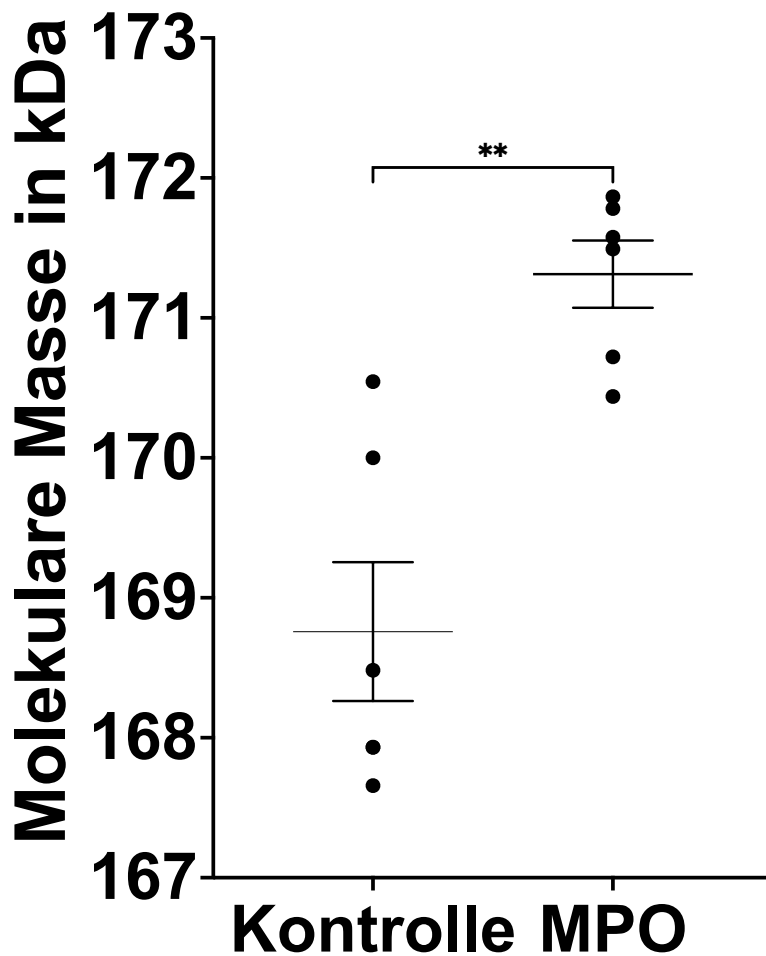
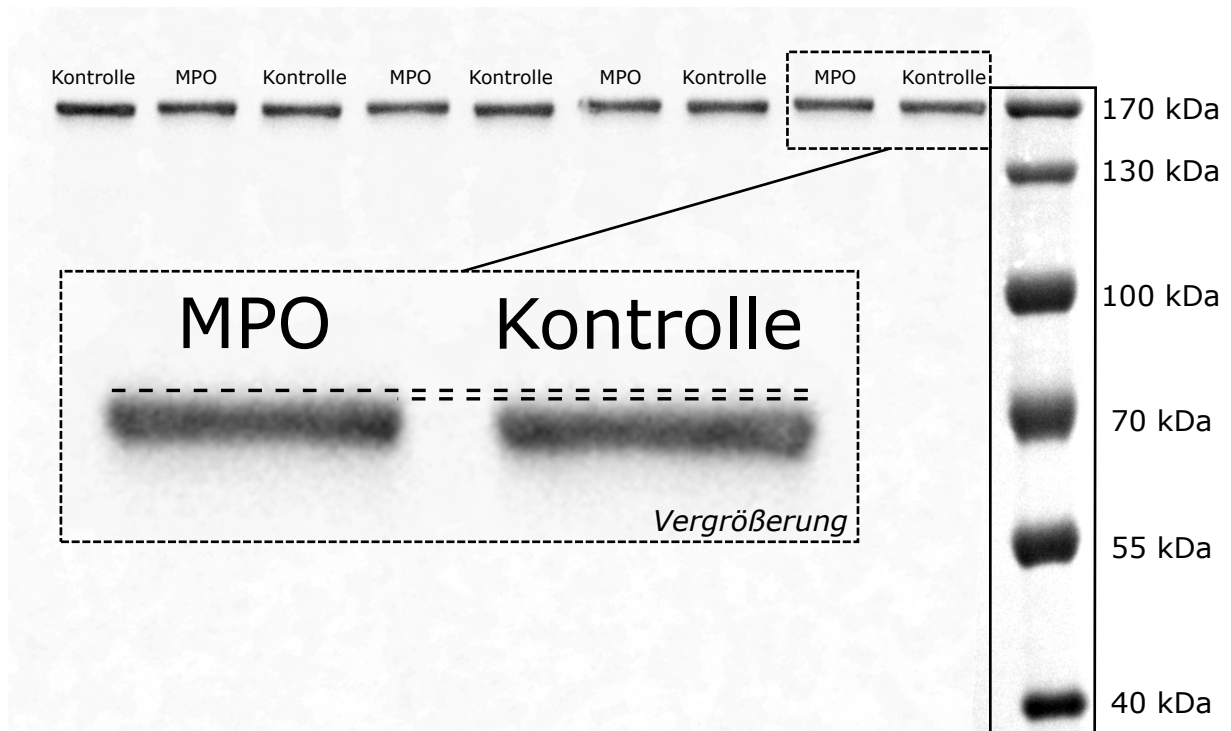


Abbildung 12: WB von rF11 auf Fibrillin-1 nach Inkubation mit MPO und H₂O₂ (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle). Oberes Bild mit Western Blot und Vergrößerung zur Veranschaulichung des Masseshifts. Zu sehen ist ein Masseshift von rF11 nach Inkubation mit MPO und H₂O₂. Unten im Bild statistische Auswertung des Masseshifts, Mittelwert des Shifts 2,555 kDa (SEM ± 1,16 kDa, **p=0,003, n=6).

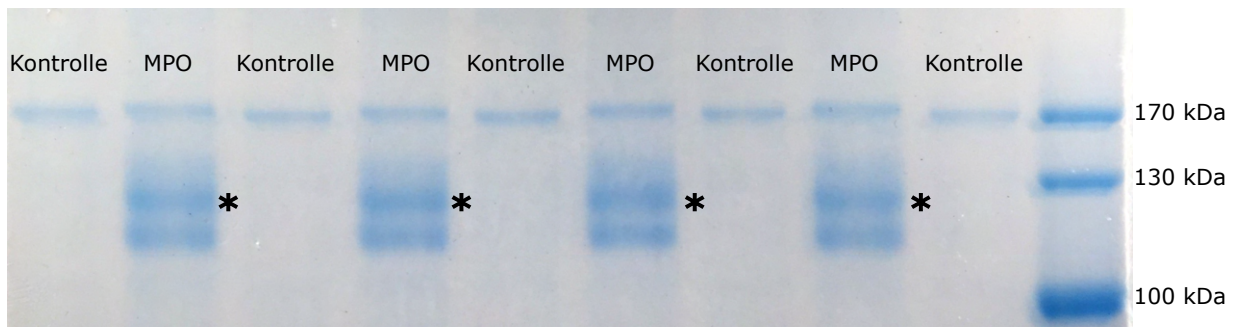


Abbildung 13: Coomassie-Blau Färbung einer SDS-PAGE von rF11 nach Inkubation mit MPO und H₂O₂ (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle).

Bei den mit * markierten Doppelbanden handelt es sich um die beiden Untereinheiten von MPO.

4.7. Gelelektrophorese von rekombinantem rF11 nach Inkubation mit HOCl

Im nächsten Schritt sollte aufgezeigt werden, dass HOCl in der Lage ist, rF11 zu oxidieren und zu fragmentieren. Um dies möglichst isoliert nachzuweisen, wurde rF11 über 30 Minuten mit 80 μ M HOCl *in vitro* inkubiert. Dann erfolgte eine SDS-PAGE mit anschließender Anfärbung der Gele.

In der Coomassie-Blau-Färbung kam es, wie in Abbildung 14 zu sehen, zu einem Verschwinden der rF11 Bande bei 169 kDa. In der sensitiveren Silberfärbung desselben Gels zeigte sich in den HOCl inkubierten Proben eine deutliche Denaturierung von rF11.

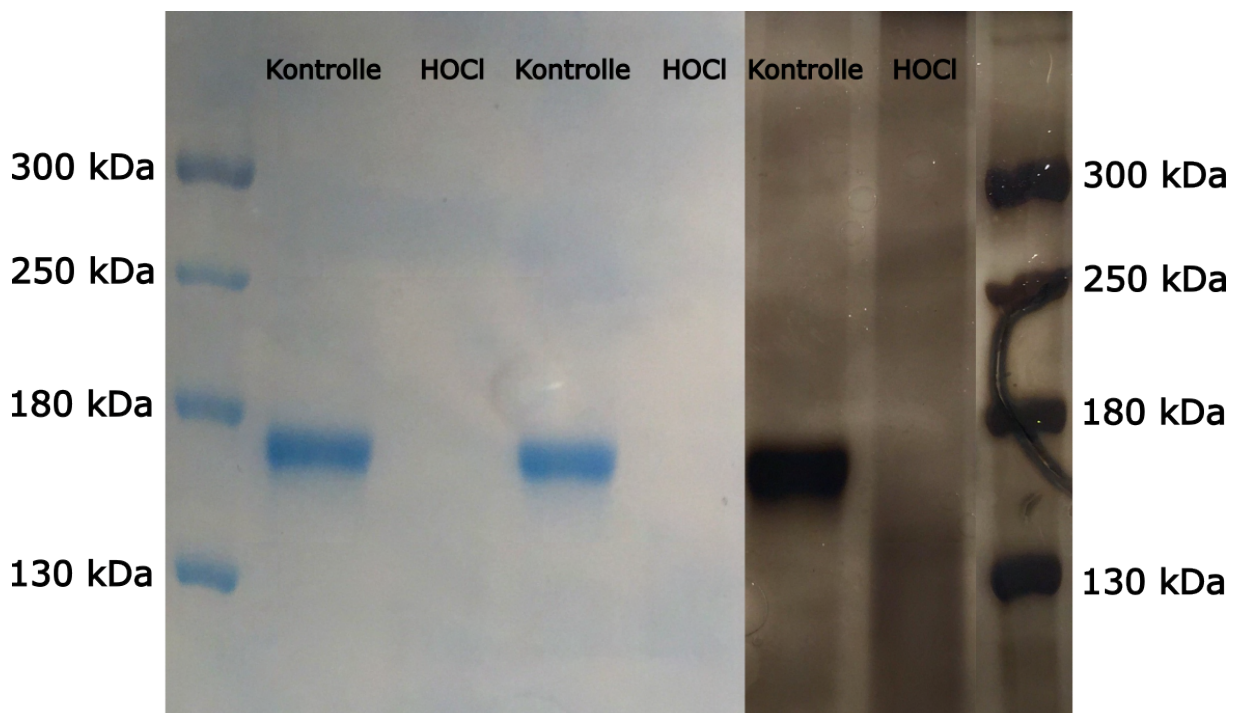


Abbildung 14: SDS-PAGE von rF11 nach 30-minütiger Inkubation mit HOCl (HOCl) oder Aqua dest (Kontrolle). Der linke Bildabschnitt zeigt das Verschwinden der rF11 Bande nach Inkubation mit HOCl in der Coomassie-Blau Färbung. Rechts die sensitivere Silberfärbung desselben Gels mit einem diffusen Signal über die gesamte Laufstrecke.

4.8. SDS-PAGE von rekombinantem WT bzw. MFS-mutiertem cb EGF 9-15 nach Inkubation mit MPO

Da eine Oxidation von Fibrillin-1 durch MPO nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob das Protein durch das Vorliegen einer MFS-Mutation vulnerabler gegenüber oxidativen Modifikationen durch MPO ist. Dies erfolgte mittels des kleineren, rekombinanten Fibrillin-1-Fragments cb EGF 9-15, welches uns in WT- und C1039G-mutierter Form durch Prof. Dr. Gerhard Sengle freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Analog zu rF11 erfolgte eine SDS-PAGE beider Formen von cb EGF 9-15 mit Anfärbung der Gele nach Inkubation mit MPO und H₂O₂.

Wie in Abbildung 15 zu sehen entstand hier keine Veränderung der Proteinmasse.

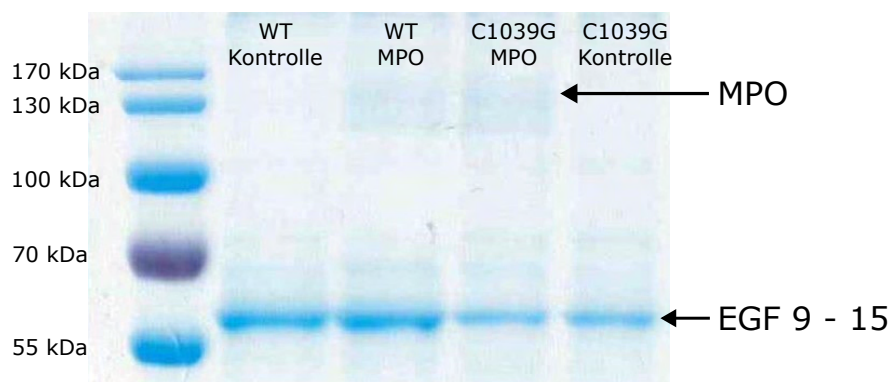


Abbildung 15: Coomassie-Blau Färbung einer SDS-PAGE von C1039G- oder WT cb EGF 9-15 nach Inkubation mit MPO und H₂O₂ (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle). Ein Masseshift konnte nicht detektiert werden.

4.9. SDS-PAGE und WB von rekombinantem Tropoelastin nach Inkubation mit MPO

In den Aortenwänden von MFS-Patienten kann typischerweise eine mit dem Ausmaß der Aortenaneurysmen zunehmende Elastin-Fragmentierung beobachtet werden.¹⁶⁵ Um zu untersuchen, inwiefern Elastin als Angriffsstelle für oxidative Modifikationen durch MPO dient, erfolgte eine SDS-PAGE und WB-Untersuchung von rekombinantem Tropoelastin nach Vorbehandlung analog zu den Vorversuchen in den Abschnitten 4.6 und 4.8.

Nachgewiesen wurde im Western Blot eine starke Bande bei circa 65 kDa, bei welchem es sich um das Tropoelastin-Monomer handelt (vgl. Abbildung 16 linkes Bild). Jedoch wurden, unabhängig von einer Inkubation mit MPO, auch Banden bei circa 127 kDa und 255 kDa detektiert. Da unter nicht-reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde, handelt es sich hierbei am ehesten um Polymere des Tropoelastins. Ein Masseshift des Tropoelastin-Monomers nach Inkubation mit MPO konnte nicht beobachtet werden. Auffällig war eine Bandenverschiebung des Tropoelastin-Dimers, welches nach Inkubation mit MPO 1,67 kDa leichter zu sein schien. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wird in einer

Coomassie-Blue-Färbung einer SDS-PAGE im rechten Teil der Abbildung 16 veranschaulicht. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen liegt MPO in der Gelelektrophorese als ca. 130 kDa schweres Dimer vor und läuft somit nahezu parallel zum Tropoelastin-Dimer (127 kDa).

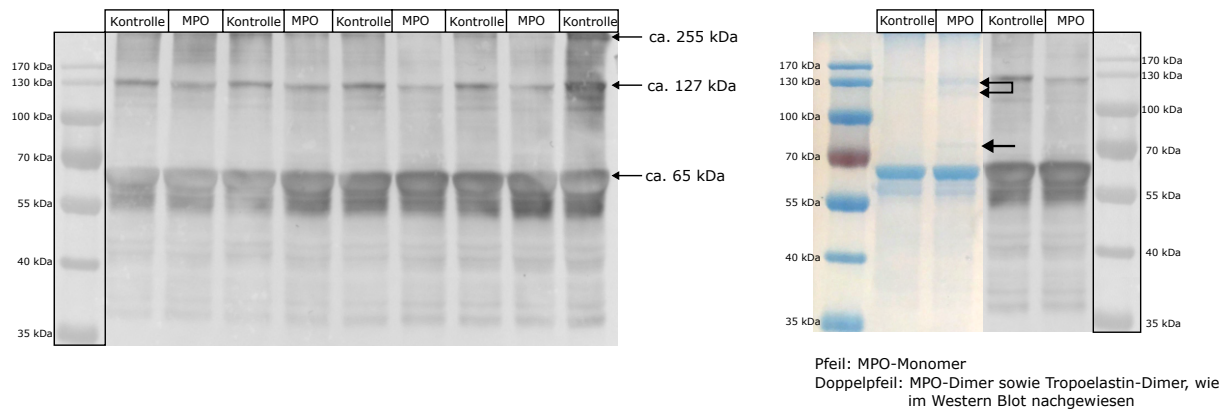


Abbildung 16: WB (linkes Bild) und Vergleich mit der Coomassie-Blau Färbung (rechtes Bild) des rekombinanten Tropoelastins nach Inkubation mit MPO und H_2O_2 (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle). Linkes Bild: Zu sehen sind mehrere Banden, mit einem Vielfachen des Molekulargewichtes des Tropoelastin-Monomers. Vermutlich handelt es sich hier Polymere, da unter nicht-reduzierenden Konditionen gearbeitet wurde. Ein Masseshift durch die Inkubation entsteht beim Tropoelastin-Monomer nicht. Rechtes Bild: Vergleich des WB mit der Coomassie-Blau Färbung von Tropoelastin nach Inkubation mit MPO und H_2O_2 (MPO) oder Aqua dest. (Kontrolle). Mit Pfeilen markiert ist die dimere- (Doppelpfeil) sowie die monomere (Pfeil) Form von MPO, wobei die dimere Form sehr nahe zusammen mit dem Tropoelastin-Dimer läuft.

4.10. Datenbankanalyse: MFS-Mutationen auf AA-Ebene

Im nächsten Schritt erfolgte eine Datenbankanalyse von MFS-auslösenden Fibrillin-1 Mutationen auf AA-Ebene. Grund dafür war eine im Weiteren geplante MS von rF11 nach Inkubation mit MPO, um die in WB und IF beobachteten Oxidationen zu identifizieren und lokalisieren. Ziel der Datenbankanalyse war es, AA-Residuen zu identifizieren, deren Austausch (mittels Missense-Punktmutation) besonders häufig zu einem MFS führen. Diese AAs könnten folglich besonders wichtig für die strukturelle/funktionelle Integrität von Fibrillin-1 sein. Der Grundgedanke ist, dass auch eine Oxidation ebenjener AA-Residuen einen MFS-Phänotyp aggravieren könnten. Auf diese AA-Residuen sollte sich dann in der darauffolgenden MS fokussiert werden.

Aus einer Voranalysearbeit bekannter MFS-DBs wurden zwei qualitativ hochwertige DBs ausgewählt, UMD-FBN1 sowie UniProtKB.⁷ Diese hatten eine hohe Sensitivität bezüglich des Vorliegens eines MFS. Die UMD-FBN1 ist die weitaus größere der beiden gut kuratierten DBs, jedoch ist seit 2014 keine Aktualisierung mehr erfolgt. Somit erfolgte eine zusätzliche Evaluation der wesentlich kleineren UniProtKB, welche fortlaufend aktualisiert wird.

Gesucht wurden isoliert MFS-auslösende Missense-Punktmutationen, analysiert wurden die ausgetauschte AA sowie die Domäne, in der sich diese befindet. Andere MFS-Mutationen wie Haploinsuffizienz-auslösende Mutationen, Nonsense-Punktmutationen, Deletionen und

Duplikationen flossen nicht mit in die Analyse ein. Grund dafür war, dass bei diesen Mutationen nicht einzelne AA-Residuen verändert sind, sondern größere Teile von Fibrillin-1 als Ganzes. Eine Analyse von durch die Mutationen ausgetauschten AAs wäre in diesem Fall nicht sinnvoll möglich.

Die Analyse der DB UniProtKB ergab insgesamt 362 Mutationen von Fibrillin-1 bei denen die Kriterien für ein MFS zutreffen. Hierunter 37 Frameshift-Mutationen, welche von der Analyse ausgeschlossen wurden. Die UMD-FBN1 DB beinhaltet 749 Mutationen. Ausgeschlossen wurden 174 Frameshift-Mutationen. Im Folgenden werden der Übersicht halber die zusammengeführten Daten beider DBs angegeben.

4.10.1. Charakterisierung von MFS-Missense-Mutationen betroffener Domänen

In einem ersten Schritt erfolgte die Überprüfung und Identifikation von durch die Punktmutation betroffener funktioneller Strukturen von Fibrillin-1. Ziel der Analyse war es, besonders vulnerable Domänen zu identifizieren, deren Funktionsverlust häufiger als bei anderen Domänen zu einem MFS-Phänotyp führt. Gesucht wurde nach cb EGF-Domänen, EGF-Domänen, TB-Domänen und Hyb-Domänen. Mit Abstand die am häufigsten durch Missense-Mutationen betroffene Domänenart waren die cb EGF-Domänen (73,56% aller Missense-Mutationen), gefolgt von TB-Domänen (11,58%) und dem restlichen Protein (6,06%). Die genaue prozentuale Verteilung ist Abbildung 17 zu entnehmen.

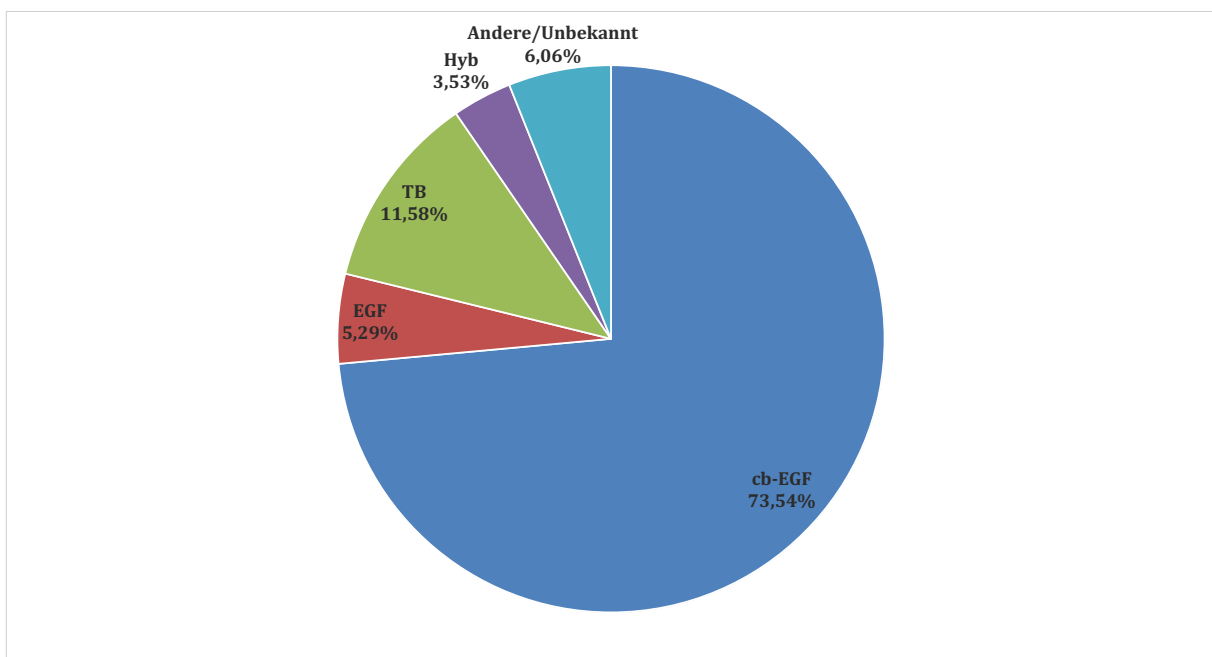


Abbildung 17: Statistische Verteilung der MFS-auslösenden Missense-Punktmutationen von Fibrillin-1 nach betroffener Domäne.

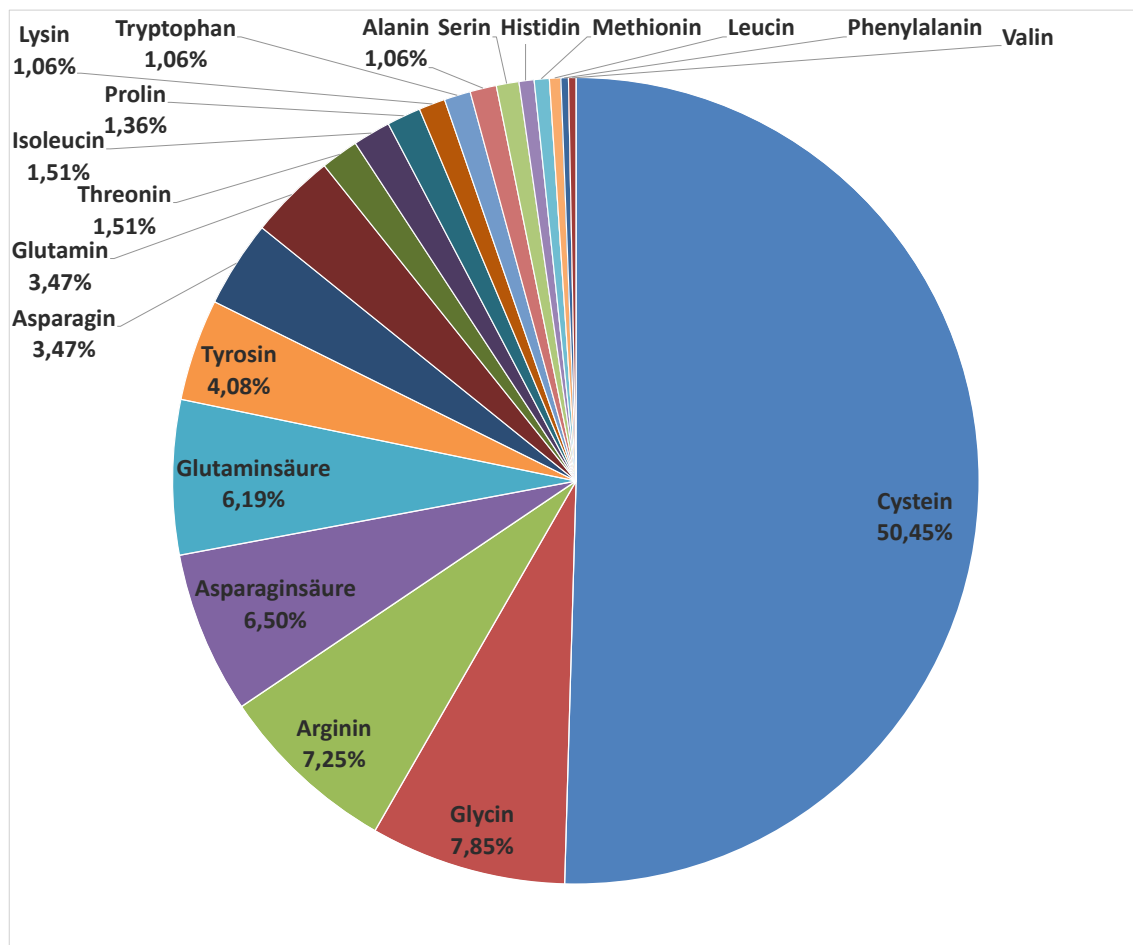


Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der in beiden DBs dokumentierten MFS-Missense-Mutationen nach AA. Prozentwerte unter 1% wurden der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Serin 0,91%, Histidin 0,6%, Methionin 0,6%, Leucin 0,45%, Phenylalanin 0,3%, Valin 0,3%.

Da die verschiedenen AAs mit einer unterschiedlichen Häufigkeit im Fibrillin-1 vorkommen, wurden die in Abbildung 19 dargestellte Verteilung dokumentierter MFS-Missense-Mutationen hierauf genormt. Dazu wurde der ermittelte Verteilungs-Prozentwert der Missense-Mutationen, welche eine AA betreffen (siehe Abbildung 19), durch die prozentuale Häufigkeit derselben AA im Fibrillin-1 dividiert (siehe Abbildung 21). Der hieraus resultierende faktorielle Wert wurde dann als Prozentzahl angegeben.

$$\left(\frac{\text{Anteil der Mutationen der spezifischen AA an der Gesamtheit der Mutationen (\%)}}{\text{Anteil der AA im Fibrillin-1 (\%)}} \times 100\% \right).$$

Interessanterweise waren Missense-Mutationen, die zum Verlust eines Cysteins führen, mit einem Anteil von 50,45% aller gefundenen Missense-Mutationen in Bezug auf dessen prozentuale Häufigkeit im Fibrillin (12,61%) deutlich überrepräsentiert (4x häufiger). Ebenfalls überrepräsentiert waren Tryptophan (2,34x häufiger) und Arginin (1,59x häufiger). Unterrepräsentiert waren unter anderem Valin (0,08x), Leucin (0,09x) und Phenylalanin (0,1x). Interessanterweise war auch Methionin mit 0,33x unterrepräsentiert. Sämtliche Werte sind

Abbildung 20 zu entnehmen. In Abbildung 21 ist die Verteilung aller Aminosäuren im Fibrillin-1 visualisiert.

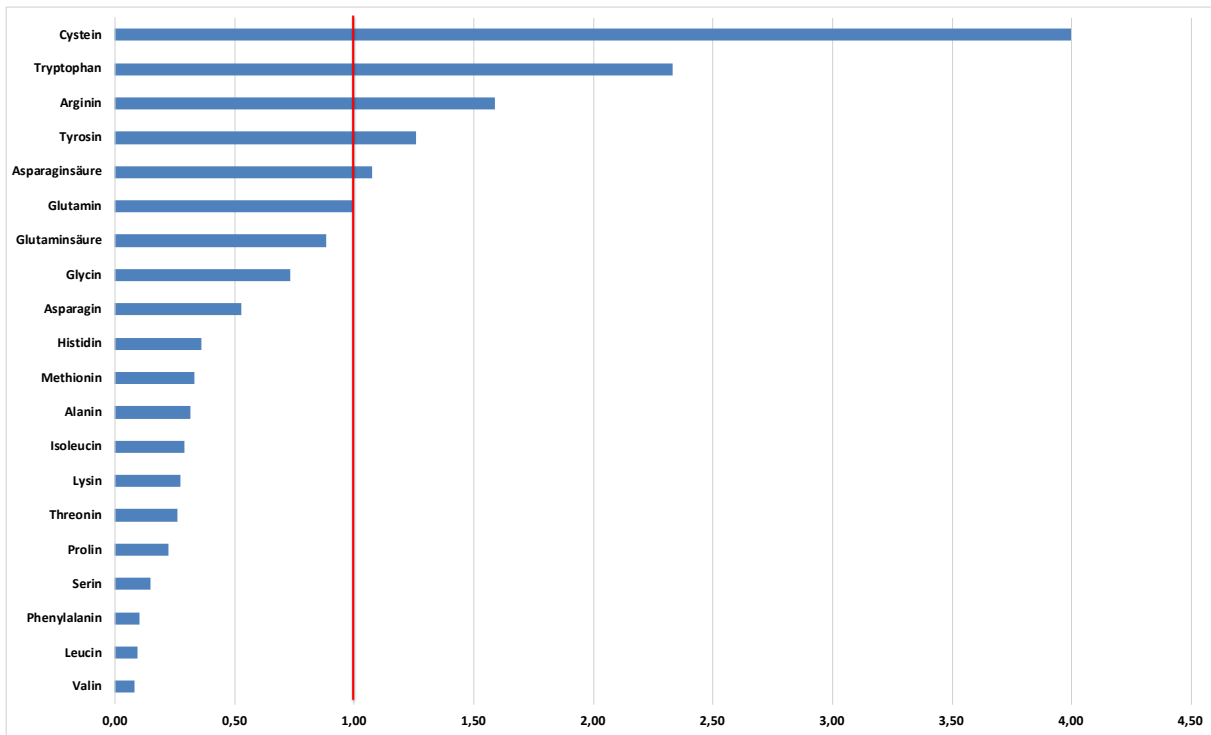


Abbildung 20: Faktor von MFS-Missense-Mutationen betroffener AAs bezogen auf deren Häufigkeit im WT-Protein. Die 1x Linie ist aus Übersichtsgründen farblich rot hervorgehoben. Vor allem Cystein (4x) aber auch Tryptophan (2,34x) sind deutlich überrepräsentiert. Methionin ist mit 0,33x unterrepräsentiert.

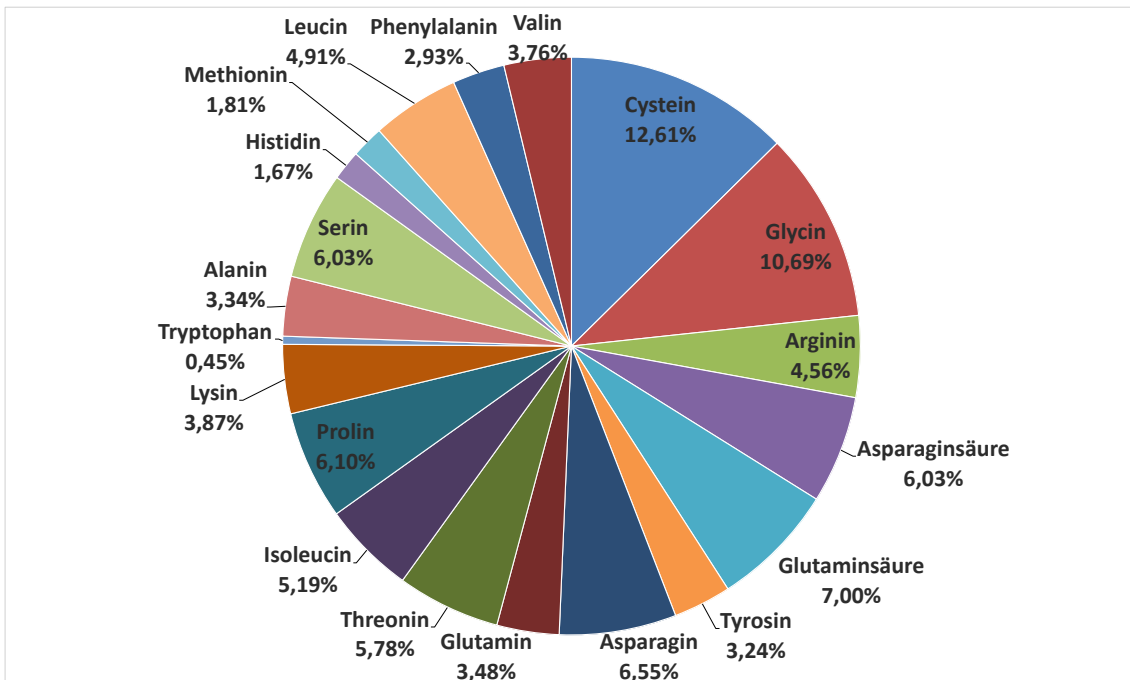


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung aller AAs im WT Fibrillin-1.

4.11. MS von rekombinantem rF11 nach Inkubation mit MPO

4.11.1. Analyse detektierter Oxidationen

Zur Analyse des im WB und SDS-PAGE gefundenen MPO-bedingten Masseshifts erfolgte eine Tandem MS der SDS-PAGE Banden. Es wurde eine markierungsfreie bottom-up Analyse (Label-Free Shotgun Proteomics) durchgeführt. Da unter nicht-reduzierenden Verhältnissen gearbeitet wurde, war die Sequenzabdeckung entsprechend geringer als üblich (14,33% Sequenzabdeckung für MPO in den entsprechend inkubierten Proben, 7,58% für rF11). Dies ist dadurch zu erklären, dass ohne Applikation von Reduktionsmitteln wie DTT die Disulfidbrücken von rF11 nicht aufgespalten werden, entsprechende Peptide mit intakten Disulfidbrücken werden in der Proteolyse nicht richtig fragmentiert und in der MS oft nicht erkannt.¹⁶⁶

In 17 Proben wurden in der MS insgesamt 62 unterschiedliche Peptide, welche Fibrillin-1 zuzuordnen waren 256-mal detektiert. Im Mittel konnten in einer Probe $15,06 \pm 10,03$ rF11-Peptide identifiziert werden. Eine Suche nach modifizierten Peptiden ergab 37 verschiedene Peptide, insgesamt 123-mal, mit insgesamt 57 verschiedenen Oxidationen (1 bis 4 Oxidationen pro Peptid). Diese 57 Oxidationen teilten sich auf in 44 Cystein-Carbamidomethylierungen, 11 Methionin-Oxidationen sowie 2 Cystein-Oxidationen.

In den mit MPO und H₂O₂ inkubierten Proben (n=5) fanden sich insgesamt 89 oxidierte Peptide mit 114 Oxidationen. In den mit Aqua dest inkubierten Proben (Kontrollgruppe, n=5) erbrachte die Analyse insgesamt 34 oxidierte Peptide mit 49 Oxidationen. In den MPO und H₂O₂ inkubierten Proben zeigte sich ein numerischer Trend hin zu mehr oxidierten Peptiden ($p=0,115$) und Oxidationen ($p=0,225$) als in der Kontrollgruppe. Insgesamt konnten also in den mit MPO-inkubierten Proben deutlich mehr Peptide, modifiziert und unmodifiziert, detektiert werden. Nähere Informationen zur Verteilung sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

| | | Gesamt | MPO (n=5) | Kontrolle (n=5) | p-Wert (ungepaarter t-Test) |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------------------|
| Peptide | Anzahl | 62 | 59 | 42 | |
| | Gesamtzahl (MW + SD) | 256 (13,85 ± 6,15) | 182 (18,2 ± 5,31) | 74 (9,5 ± 6,02) | *p = 0,042 |
| Oxidierete Peptide | Anzahl | 37 | 35 | 26 | |
| | Gesamtzahl (MW + SD) | 123 (6,3 ± 3,68) | 89 (8,9 ± 4,64) | 34 (3,7 ± 4,82) | p = 0,115 |
| Unmodifizierte Peptide | Anzahl | 25 | 24 | 15 | |
| | Gesamtzahl (MW + SD) | 133 (7,55 ± 2,48) | 93 (9,3 ± 1,2) | 40 (5,8 ± 3,42) | p = 0,063 |
| Oxidationen | Anzahl | 57 | 52 | 41 | |
| | Gesamtzahl (MW + SD) | 163 (8,3 ± 4,38) | 114 (11,4 ± 7,28) | 49 (5,2 ± 7,62) | p = 0,225 |
| Cystein-Carbamidomethylierungen | Anzahl | 44 | 42 | 32 | |
| | Gesamtzahl (MW + SD) | 127 (6,5 ± 3,39) | 89 (8,9 ± 6,15) | 38 (4,1 ± 5,68) | p = 0,236 |
| Methionin-Oxidationen | Anzahl | 11 | 8 | 9 | |
| | Gesamtzahl (MW + SD) | 33 (1,65 ± 0,78) | 22 (2,2 ± 1,3) | 11 (1,1 ± 1,95) | p = 0,325 |
| Cystein-Oxidationen | Anzahl | 2 | 2 | 0 | |
| | Gesamtzahl (MW + SD) | 3 (0,15 ± 0,21) | 3 (0,3 ± 0,27) | 0 (-) | *p = 0,04 |
| Sequenzabdeckung rF11 (Fibrillin-1) | MW + SD | 7,58% ± 3,1% | 9,27% ± 3,34% | 5,39% ± 3,65% | p = 0,083 |
| Sequenzabdeckung MPO | MW + SD | - | 14,33% ± 3,63% | - | - |

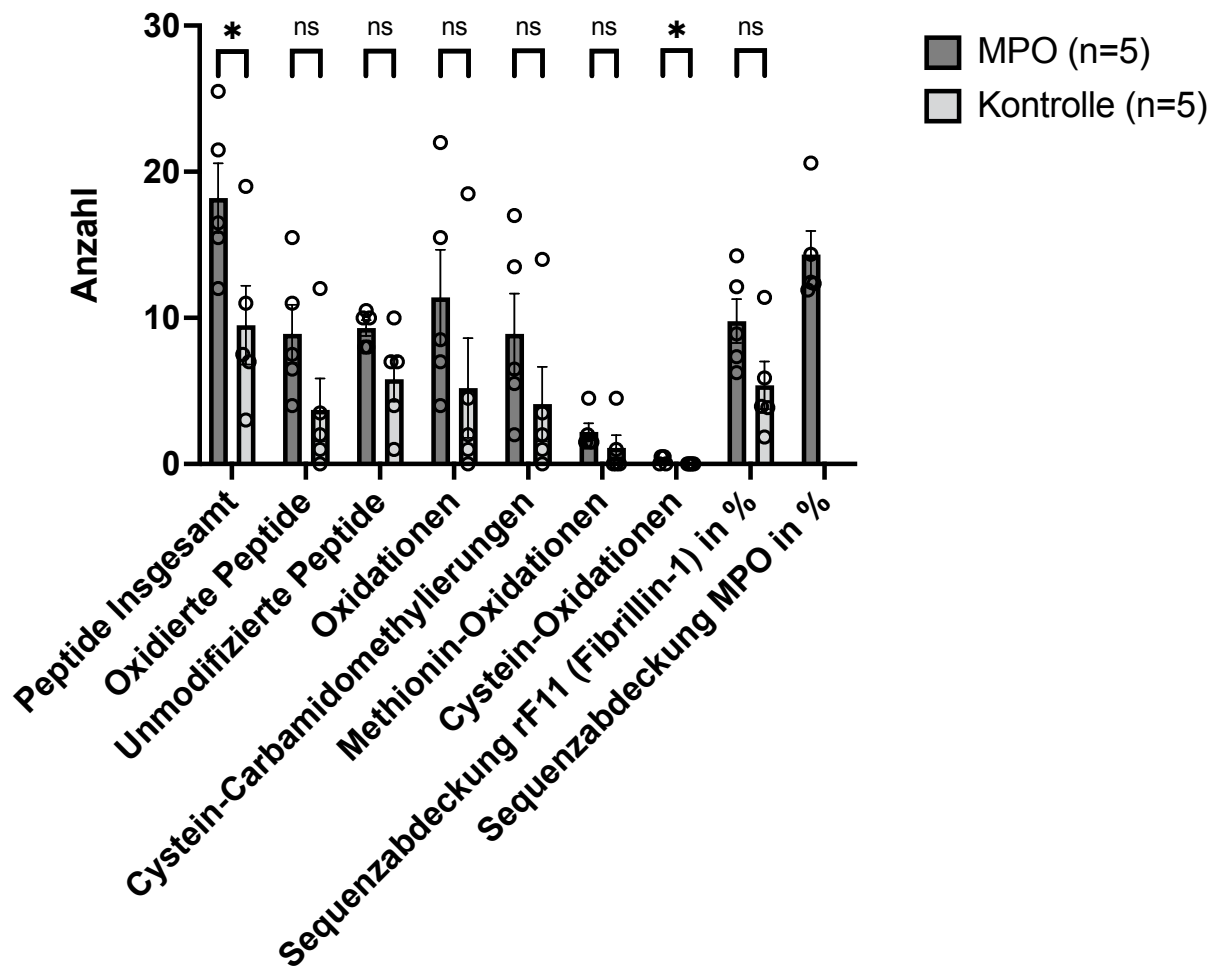


Tabelle 15: Übersichtstabelle gefundener Peptide und Oxidationen in der MS von rF11 und graphische Darstellung der statistischen Auswertung.

| | # | Aminosäuresequenz- Nummer | Aminosäure | Art der Oxidation | Anzahl gefundener Oxidationen (MPO vs. Nativ) | Struktur | MFS Mutation bekannt? |
|------------------|----|------------------------------|------------|-----------------------|---|-----------|-----------------------------|
| nur MPO | 1 | 209 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1,5:0* | Hyb 1 | Ja |
| | 2 | 210 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1,5:0* | Hyb 1 | Nein |
| | 3 | 315 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:0 | cb EGF 2 | Nein |
| | 4 | 460 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:0 | EGF 4 | Ja |
| | 5 | 935 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:0 | cb EGF 10 | Nein |
| | 6 | 935/937 | Cystein | Oxidation | 1:0 | cb EGF 10 | Nein |
| | 7 | 937 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:0 | cb EGF 10 | Nein |
| | 8 | 941 | Methionin | Oxidation | 2:0 | cb EGF 10 | Nein |
| | 9 | 1081 | Cystein | Carbamidomethylierung | 4:0 | cb EGF 12 | Nein |
| | 10 | 1171 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:0 | cb EGF 14 | Ja |
| | 11 | 1180 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:0 | cb EGF 14 | Ja |
| | 12 | 1182 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:0 | cb EGF 14 | Ja |
| | 13 | 1339 | Cystein | Oxidation | 2:0 | cb EGF 20 | Ja |
| Nur Kontrolle | 1 | 1097 | Cystein | Carbamidomethylierung | 0:1 | cb EGF 12 | Nein |
| | 2 | 1106 | Methionin | Oxidation | 0:1 | cb EGF 12 | Nein |
| | 3 | 1107 | Methionin | Oxidation | 0:1 | cb EGF 12 | Nein |
| | 4 | 1108 | Methionin | Oxidation | 0:1 | cb EGF 12 | Nein |
| | 5 | 1129 | Cystein | Carbamidomethylierung | 0:1 | cb EGF 15 | Ja |
| Beide Gruppen | 1 | 59 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:2 | - | Nein |
| | 2 | 119 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:1 | EGF 2 | Ja |
| | 3 | 345 | Cystein | Carbamidomethylierung | 4:1 | TB 1 | Ja |
| | 4 | 488 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:1 | EGF 4 | Ja |
| | 5 | 494 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:1 | cb EGF 3 | Nein |
| | 6 | 534 | Cystein | Carbamidomethylierung | 4:2 | cb EGF 4 | Ja |
| | 7 | 570 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 4 | Ja |
| | 8 | 573 | Methionin | Oxidation | 1:1 | cb EGF 5 | Nein |
| | 9 | 576 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 5 | Ja |
| | 10 | 652 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:2 | cb EGF 6 | Ja |
| | 11 | 657 | Methionin | Oxidation | 6:2 | - | Ja |
| | 12 | 748 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 7 | Ja |
| | 13 | 750 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 7 | Ja |
| | 14 | 845 | Cystein | Carbamidomethylierung | 5:3 | cb EGF 9 | Nein |
| | 15 | 853 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:1 | - | Ja |
| | 16 | 926 | Cystein | Carbamidomethylierung | 5:2 | cb EGF 10 | Ja |
| | 17 | 958 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:1 | TB 3 | Nein |
| | 18 | 967 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:2 | TB 3 | Nein |
| | 19 | 1008 | Cystein | Carbamidomethylierung | 4:1 | TB 3 | Ja |
| | 20 | 1034 | Methionin | Oxidation | 11:4 | cb EGF 11 | Nein |
| | 21 | 1039 | Cystein | Carbamidomethylierung | 4:2 | cb EGF 11 | Ja |
| | 22 | 1086 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:1 | cb EGF 12 | Ja |
| | 23 | 1095 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:1 | cb EGF 12 | Nein |
| | 24 | 1320 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 17 | Ja |
| | 25 | 1326 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 18 | Ja |
| | 26 | 1333 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 18 | Ja |
| | 27 | 1339 | Cystein | Carbamidomethylierung | 3:1 | cb EGF 18 | Ja |
| | 28 | 1429 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:1 | cb EGF 20 | Ja |
| | 29 | 1431 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:1 | cb EGF 20 | Ja |
| | 30 | 1433 | Methionin | Oxidation | 2:1 | cb EGF 20 | Nein |
| | 31 | 1470 | Cystein | Carbamidomethylierung | 2:1 | cb EGF 21 | Ja |
| | 32 | 1472 | Cystein | Carbamidomethylierung | 1:1 | cb EGF 21 | Nein |

Tabelle 16: Auflistung der in der MS gefundenen rF11-Oxidationen. Eingeteilt wurden in Oxidationen, die nur nach Inkubation mit MPO und H₂O₂ gefunden wurden („nur MPO“), die nur nach Inkubation mit Aqua dest. gefunden wurden („nur Kontrolle“) und die in beiden Gruppen gefunden wurden

(„beide Gruppen“). Mit einem * markierte Oxidationen waren in der MS nicht klar einer bestimmten AA zuzuordnen und sind daher anteilig angegeben.

Im nächsten Schritt sollten MPO-bedingte Oxidationen von methodenbedingten Oxidationen abgegrenzt werden. Hierzu erfolgte eine Analyse der Entfernung der gefundenen Cysteinioxidationen zur nächsten Heparinbindungsstelle von rF11. Diese wurde dann mit der mittleren Entfernung aller Cysteine in rF11 zur nächsten Heparinbindungsstelle (also der statistischen Erwartung) verglichen.

Der Grundgedanke ist folgender: Wie bereits weiter oben beschrieben kann MPO über Heparinbindungsstellen, beziehungsweise daran gebundenes H/HS, an diverse EZM-Proteine binden und diese dann oxidieren.⁵¹⁻⁵⁴ In den oben beschriebenen WB-Versuchen konnten wir zeigen, dass die Inkubation mit MPO und H₂O₂ einen Masseshift beim rekombinanten Fibrillin-1 Fragment rF11 verursacht, nicht aber bei EGF 9-15. Während ersteres über 4 Heparinbindungsstellen verfügt, liegen im letzteren Proteinfragment keine solche Bindungsstellen. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass MPO über diese Heparinbindungsstellen an rF11 herantritt und dieses dann oxidiert. Dementsprechend müssten die MPO-bedingten Oxidationen näher an diesen Heparinbindungsstellen liegen.

Die Referenzentfernung, also die mittlere Entfernung aller Cysteine in rF11 zur nächsten Heparinbindungsstelle, betrug 128,95 AAs. Interessanterweise lagen die Cystein-Oxidationen in der MPO-Gruppe signifikant näher an der nächsten Heparinbindungsstelle, als es statistisch zu erwarten gewesen wäre (63,75 AAs, n=12, p=0,0066), während der mittlere Abstand von Oxidationen, welche in beiden Gruppen gefunden wurden (im Folgenden „gemischte Gruppe“ genannt), nicht signifikant höher als die Referenzentfernung war (157,27 AAs, n=28, p=0,2136). Auch im Vergleich zur gemischten Gruppe war die mittlere Entfernung bei der MPO-Gruppe signifikant kürzer (p=0,0021). Weitere Informationen sind Abbildung 23 zu entnehmen.

Bei nur zwei gefundenen Cysteinioxidationen war eine entsprechende statistische Analyse von deren Entfernung zur nächsten Heparinbindungsstelle nicht durchführbar.

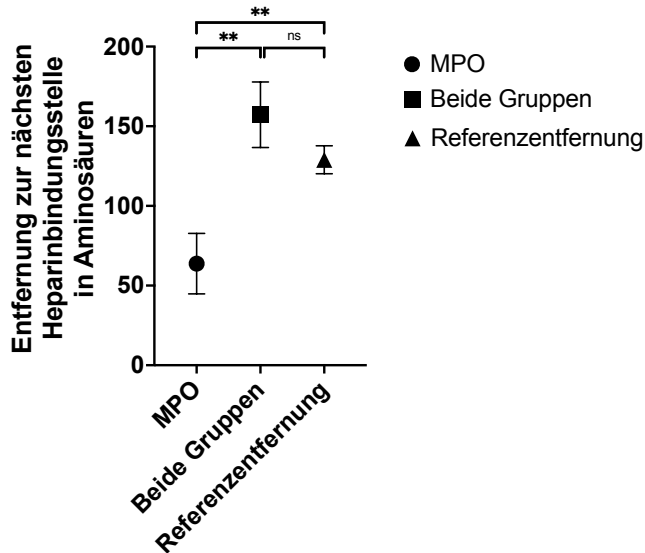
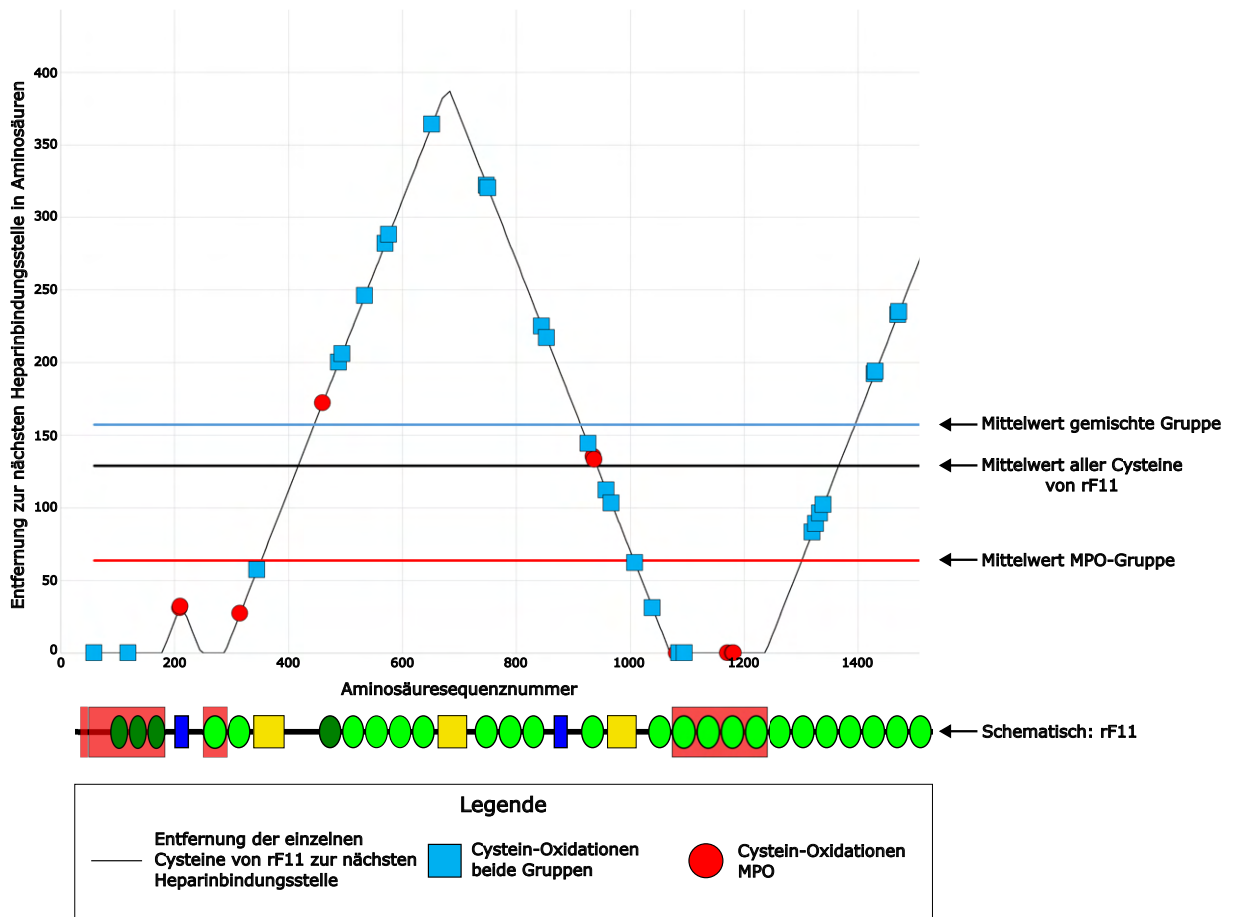


Abbildung 23: Vergleich der mittleren Entfernung der Cystein-Oxidationen zur nächsten Heparinbindungsstelle von MPO-inkubierten Proben versus in beiden Gruppen zu findende Oxidationen.

Referenz ist die durchschnittliche Entfernung der Cysteine von rF11 zur nächsten Heparinbindungsstelle. Unten im Bild: graphische Darstellung der statistischen Auswertung. MPO (n=12), Beide Gruppen (n=28), Referenzentfernung (n=199). Die Unterschiede der mittleren Entfernung zur nächsten Heparinbindungsstelle waren: MPO vs. Beide Gruppen $93,50 \pm 27,98$ AAs SEM ($p=0,0021$); MPO vs. Referenzentfernung $65,20 \pm 20,91$ AAs SEM ($p=0,0066$) sowie Beide Gruppen vs. Referenzentfernung $28,30 \pm 22,36$ AAs SEM ($p=0,2136$).

5. Diskussion

Dass Inflammation und MPO bei Aortenaneurysmen eine wichtige Rolle spielen, ist sehr wahrscheinlich.^{68,70,73,146-157} In Vorversuchen mit dem MFS-Modell wurde festgestellt, dass TAAs bei MFS-Mäusen mit MPO-Mangel weniger stark ausgeprägt waren als bei MFS-Mäusen mit normalen MPO-Spiegeln.¹⁵⁸ In diesem Dissertationsprojekt sollte die Möglichkeit einer direkten Interaktion zwischen MPO und dem beim MFS mutierten Fibrillin-1 beleuchtet werden. Speziell sollte 1. der Nachweis von MPO in der Gefäßwand von TAAs erfolgen, 2. eine potenzielle Bindung von MPO an Fibrillin-1 nachgewiesen werden, 3. das Potenzial von MPO, Fibrillin-1 zu oxidieren, nachgewiesen werden und 4. der Frage nach einer erhöhten Vulnerabilität von MFS-mutiertem Fibrillin-1 gegenüber MPO bedingten Oxidationen nachgegangen werden.

5.1. MPO ist in den TAA-Aortenwänden von MFS-Mäusen deutlich erhöht

In diesem Projekt zeigte sich Immunhistochemisch mittels IHC und IF im Trend, dass der MPO-Spiegel in der Tunica media von TAA-Aortenwänden von MFS-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen erhöht ist. Jedoch kam es zu einem reproduzierbaren MPO-Signal der Adventitia bei sämtlichen Mäusen, also auch bei MPO-defizienten Tieren. Die von uns verwendete MPO^{tm1lus/J} Mauslinie weist jedoch weder auf mRNA- noch auf Proteinebene MPO oder entsprechende Derivate auf. Identische Probleme wurden von Brennan et al (2001) beschrieben.¹⁶² Die Autoren vermuteten, dass es durch eine Kreuzreaktivität der verwendeten MPO-Antikörper zu einem falsch positiven Signal gekommen ist. Alternativ ist auch eine unspezifische Peroxidaseaktivität zu diskutieren, jedoch würde dies nicht das Signal in der IF erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass doch ein MPO-Residualprotein in den MPO-Knockoutmäusen vorkommt. Auch in der 2D10G9-IHC durch das Mike Davies Labor, Kopenhagen zeigt sich ein ähnliches Muster. Aus diesem Grund wurde der Ansatz eines immunhistologischen Nachweises in den MFS-TAAs trotz des vielversprechenden numerischen Trends nicht weiterverfolgt, sondern ein ELISA durchgeführt.

Hiermit konnte letztlich nachgewiesen werden, dass der MPO-Spiegel in den TAA-Aortenwänden von MFS-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht ist

Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, welche MPO in AAA-Wänden nachweisen konnten, sowie mit dem Nachweis von MPO in einer humanen TAA-Probe.¹⁵⁶ Ein Knockout von MPO konnte in zwei AAA-Mausmodellen die Entstehung von Aortenaneurysmen abschwächen, ebenso das Abfangen MPO-bedingter Oxidationen mittels Taurin.⁷³ Aufgrund der durch uns beobachteten Abschwächung der MFS-Aortenaneurysmen durch das Knockout von MPO und dem hier erfolgten Nachweis von MPO in den Aortenwänden von MFS-Mäusen ist von einer Beteiligung von MPO an der Pathogenese der MFS-TAA auszugehen.¹⁵⁸

Aufgrund des Vorliegens von MPO in den Aortenwänden und der hier aufgezeigten Fähigkeit von MPO, Fibrillin-1 zu oxidieren, erscheint ein Mechanismus über chronischen oxidativen Stress in der direkten Umgebung naheliegend. Jedoch kann auch ein indirektes Wirken beispielsweise über die Aktivierung von MMPs oder Makrophagenaktivierung nicht ausgeschlossen werden.

5.2. MPO kolokalisiert *in vitro* nicht primär mit Fibrillin-1, sondern mit HASMC Nuklei

In der Kofärbung von Fibrillin-1 und MPO konfluenter HASMCs zeigte sich keine Kolokalisation der beiden angefärbten Strukturen. Vielmehr kam es nach Inkubation mit MPO primär zu einer nukleären Anreicherung des Enzyms. Eine mögliche Erklärung lieferten *Cai et al* (2020), welche eine Bindung von MPO an die EZM von koronaren HASMCs (HCASMC) erst nach stattgehabter oxidativer Modifikation durch zweistündige HOCl-Inkubation nachweisen konnten.¹⁴⁰ In dem hier verwendeten Versuchsprotokoll erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit H₂O₂ nach zweistündiger Inkubation mit MPO allein. Zu diesem Zeitpunkt konnte im zuvor beschriebenen Versuch keine signifikante Bindungsaffinität zwischen MPO und der EZM nachgewiesen werden.

Eine nukleäre Bindung von MPO bei HASMCs ist nach aktuellem Wissensstand (2022) nicht beschrieben worden. Die Fähigkeit des kationischen MPOs, an die negativ geladene DNA zu binden, ist jedoch bekannt.^{167,168} Nachgewiesen wurden ebenfalls MPO- und HOCl-abhängige Schäden der DNA, auch bei HASMCs.¹⁶⁹⁻¹⁷² Würde MPO auch *in vivo* mit den HASMC-Nuklei kolokalisieren, wäre es somit durchaus denkbar, dass an den Nuklei oxidative Schäden entstehen.

In isolierten humanen TAA-ASMCs konnten Anzeichen einer verstärkten DNA-Schädigung nachgewiesen werden.¹⁷³ Ebenfalls bekannt ist ein Phänotyp-switching der HASMCs im Rahmen von MFS-TAAs, von einem kontraktilem zu einem synthetischen Phänotyp.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Dies geht einher mit einer verminderten Kontraktilität und einer vermehrten Sekretion von proteolytischen Enzymen wie MMPs sowie von EZM-Proteinen. Als auslösender Stimulus wurde unter anderem oxidative Modifikationen der EZM identifiziert.^{177,178} Zuletzt konnte aufgezeigt werden, dass auch HOCl-bedingte Oxidationen der EZM ein Phänotyp-switching von HASMCs verursachen können.¹⁷⁹ Auch wurde eine vermehrte Apoptose von HASMCs in TAAs detektiert,^{180,181} was unter anderem auf oxidativen Stress an der DNA zurückgeführt wurde.^{173,182,183} Auch in unseren Fbn1^{C1039G/+}-Mäusen zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate, welche im DKO attenuiert war.¹⁵⁸

In Zusammenschau der Fakten erscheint es somit möglich, dass eine nukleäre Bindung von MPO an die HASMC-DNA zu deren oxidativen Modifikation führt, was wiederum zum

vorbeschriebenen Phänotyp-switching oder der erhöhten Apoptoserate der Zellen beitragen könnte. Um hier weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wäre beispielsweise eine MS mit Proteom- und Sekretomanalyse von HASMCs nach Inkubation mit MPO/H₂O₂ interessant. Ebenfalls vielversprechend wären *in Vivo* Studien zur weiteren Einordnung der Ergebnisse.

5.3. Das MPO/H₂O₂ System induziert oxidativen Stress an Fibrillin-1

In diesem Dissertationsprojekt konnte aufgezeigt werden, dass MPO über das MPO/H₂O₂ System in der Lage ist, oxidativen Stress in Form von nTyr am Fibrillin-1 zu induzieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von *Cai et al (2020)*, die einen vermehrten oxidativen Stress der EZM von HCASMCs nach HOCl-Inkubation aufzeigen konnten.¹⁴⁰ Auch im Fbn1^{C1039G/+}-Mausmodell konnten wir in den MFS-TAA-Wänden ein deutlich erhöhtes nTyr-Signal nachweisen, welches im DKO im Normbereich lag.¹⁵⁸ Zur genauen Analyse der Lokalisation der Oxidationen wären konfokale Aufnahmen sinnvoll.

Um diese Oxidationen zu quantifizieren, erfolgte eine SDS-PAGE/WB-Untersuchung von mit MPO/H₂O₂ inkubierten rF11 (rekombinantes Fibrillin-1 Fragment). Tatsächlich konnte ein MPO/H₂O₂ induzierter, signifikanter Masseshift von im Mittel 2,55 kDa nachgewiesen werden. Auch, dass HOCl in der Lage ist rF11 zu oxidieren und zu denaturieren unterstützt die These, dass der Masseshift durch Oxidationen entstanden ist. Dabei müsste es nicht grundlegend zu einer großen Menge an Oxidationen gekommen sein. Unter nicht-reduzierenden Konditionen könnte bereits die oxidative Aufspaltung weniger Disulfidbrücken ein schnelleres Passieren von rF11 durch das Gels verursachen, da das Protein dann weniger kompakt wäre.¹⁸⁴

Überraschend ist, dass es bei der Inkubation von cb EGF 9-15 mit MPO/H₂O₂ zu keinem derartigen Masseshift kam, sowohl in der nativen als auch in der MFS-mutierten Form. Vergleicht man rF11, cb EGF 9-15 und Fibrillin-1, so fällt auf, dass cb EGF 9-15 keine Heparin-Bindungsstellen oder EGF-Domänen aufweist (vergleiche Abbildung 24). Nachgewiesen ist, dass MPO über gebundenes H/HS an Proteine herantreten kann und diese dann oxidiert, und dass ein Fehlen des H/HS diese oxidative Kapazität deutlich attenuiert.⁵¹⁻⁵⁴ In diesem Kontext könnte eine mögliche Erklärung für den fehlenden Masseshift von cb EGF 9-15 in den nicht vorhandenen Heparinbindungsstellen des Fragments liegen. Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis in der MS, dass oxidative Modifikationen von rF11 unter MPO/H₂O₂ signifikant näher an der nächsten Heparinbindungsstelle liegen als zufällige, methodenbedingte Oxidationen.

Somit konnte für das cb EGF 9-15^{C1039G/+} Fragment keine erhöhte Vulnerabilität für oxidative Modifikationen durch MPO nachgewiesen werden. Dies bedeutet aus oben genannten Gründen jedoch nicht, dass diese *in vivo* nicht vorliegt. Eine analoge Untersuchung von C1039G-mutiertem rF11 erscheint somit sinnvoll. Vielversprechend wäre eine MS-Analyse von cb EGF 9-15 nach MPO-Inkubation analog zur rF11-MS, da bereits einige wenige MPO-

bedingte oxidative Modifikationen an vulnerablen Stellen von Fibrillin-1 den Progress der MFS-Aortenaneurysmen aggravieren könnten. Grundsätzlich erscheint eine erhöhte Vulnerabilität von MFS-mutiertem Fibrillin-1 gegenüber MPO-bedingten oxidativen Modifikationen naheliegend. Für eine vermehrte enzymatische Proteolyse konnte dies bereits nachgewiesen werden.¹⁸⁵

Dass der Masseshift von rF11 durch Interaktionen der MPO- (ca. 130 kDa) und rF11 (ca. 170 kDa) Proteinbanden entstanden ist, erscheint aufgrund der Entfernung der beiden Banden unwahrscheinlich. Eine mögliche Fehlerquelle der WB-Versuche ist, dass keine Kontrolluntersuchung nur mit H₂O₂ durchgeführt wurde. Auch dieses ist in der Lage oxidative Modifikationen an einem Protein zu induzieren.

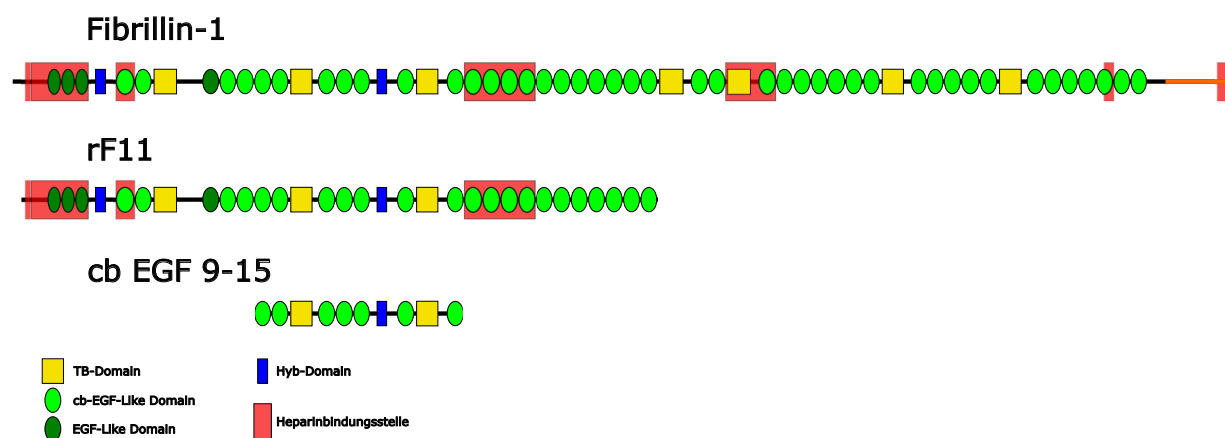


Abbildung 24: Vergleich der verwendeten Fibrillin-1 Fragmente

5.4. Kein MPO/H₂O₂-bedingter Masseshift von Tropoelastin

Der analog zu rF11 und cb EGF 9-15 erfolgte WB-Versuch von Tropoelastin erbrachte keinen Masseshift. Somit erscheint eine oxidative Modifikation des Proteins durch MPO/H₂O₂ in größerem Ausmaß unwahrscheinlich. Die *in vivo* zu beobachtende Fragmentierung der elastischen Fasern ist unter anderem durch die Hochregulation der enzymatischen Aktivität von MMP2 und -9 bedingt.⁶⁴ MPO ist mittels HOCl in der Lage, diverse MMPs *in vivo* zu aktivieren.^{127,186} Außerdem kann MPO selbst PMN und Makrophagen aktivieren, beziehungsweise die Dauer der PMN-Aktivierung zu verlängern.¹²³⁻¹²⁶ Beide Zellarten sezernieren MMPs, womit es gut möglich erscheint, dass MPO nicht direkt sondern vielmehr indirekt an der Elastinfragmentierung beim MFS beteiligt ist.

Der fehlende Masseshift könnte jedoch auch durch technische oder mechanistische Ursachen bedingt sein. Tropoelastin ist stark hydrophil und neigt zur Koazervation.¹⁸⁷ Das sind reversible, nicht-kovalente Bindungen zwischen den Tropoelastin-Mono- oder Polymeren, welche deren hydrophobe Eigenschaften deutlich verstärken, sodass es zu einem Ausfällen von Tropoelastin kommt. In den hier durchgeführten Versuchen wurde eine Inkubation mit

MPO/H₂O₂ bei 37°C durchgeführt, dem Temperaturoptimum der Koazervation. Ein Ausfällen des Tropoelastins konnte bei uns zwar nicht beobachtet werden, ist jedoch möglich und könnte das Protein vor oxidativen Modifikationen geschützt haben. Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlenden Oxidationen ist, dass Tropoelastin zwar über Heparin-Bindungsstellen verfügt,²⁸ jedoch in diesem Versuchsaufbau weder H/HS, noch GAGs aufgrund der hochgradigen Aufreinigung mittels HIS-Tag vorhanden waren. Im Gegensatz dazu wurden die rF11-Fragmente lediglich zentrifugiert, sodass EZM, das HEK293 Sekretom und Zelldebris im Versuchsaufbau vorhanden waren und somit auch GAGs.

Da unter nicht-reduzierenden Konditionen gearbeitet wurde, waren im WB und in der SDS-PAGE Tropoelastin-Polymeren zu sehen. Beobachtet wurde ein geringer Masseshift des Tropoelastin-Dimers, sofern mit MPO gearbeitet wurde. Es erscheint jedoch höchst unwahrscheinlich, dass isoliert die dimere Form, nicht aber die trimere oder monomere Form von Tropoelastin durch MPO/H₂O₂ oxidiert wurde. Die wahrscheinlichere Erklärung ist, dass der Shift durch Wechselwirkungen zwischen dem Tropoelastin-Dimer (127 kDa) und MPO (130 kDa) verursacht wurde (vgl. Abbildung 16).

5.5. Cystein-Mutationen als mit Abstand häufigste Ursache beim MFS, Methionin mit untergeordneter Rolle

MPO oxidiert bevorzugt die schwefelhaltigen AAs Cystein, Methionin, Homocystein und Taurin.^{135,136} Da sowohl Cystein als auch Methionin im Fibrillin-1 vorkommen, erfolgte eine Datenbankanalyse der von MFS-Missense-Mutationen betroffenen AAs. Die zugrundeliegende Überlegung war, dass AA-Residuen, welche beim MFS häufiger als andere von Missense-Mutationen betroffen sind, wichtiger für die strukturelle und funktionelle Integrität von Fibrillin-1 sind. Wenn das mutationsbedingte Austauschen dieser AA zum MFS führen kann, müsste folglich auch eine Oxidation durch MPO eine ähnliche Auswirkung haben.

Hier konnte gezeigt werden, dass das Cystein mit einem Anteil von 50,45% aller dokumentierten Aminosäureaustauschmutationen, nicht aber das Methionin (0,31%) bei MFS-Missense-Mutationen eine tragende Rolle spielt. Der Fakt, dass Cystein im Fibrillin-1 insgesamt 155 Disulfidbrücken bildet, die sich hauptsächlich in den (cb) EGF- und TB-Domänen befinden, unterstreicht die übergeordnete funktionelle Rolle der AA.¹⁵⁹ Dies deckt sich weitgehend mit anderen durchgeführten Datenbankanalysen. So wurde eine signifikante Häufung von Cystein-Austauschmutationen bei schweren Formen des MFS, kardiovaskulärer Beteiligung und thoraxchirurgischer Interventionspflichtigkeit festgestellt.^{8,188-191}

Da lediglich MFS auslösende Missense-Mutationen in die Datenbankanalyse eingeschlossen wurden, gibt diese Datenbankanalyse keine umfassende Übersicht über jegliche Arten von MFS-Mutationen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Datenbankanalysen von MFS-

Mutationen wurde hier auf eine Analyse von durch Missense-Mutationen substituierten AAs verzichtet, da dies für die Zielsetzung der Analyse keinen informativen Zugewinn dargestellt hätte. Auf eine Genotyp-Phänotyp-Analyse wurde verzichtet, da eine unscharfe Genotyp-Phänotyp Korrelation beim MFS-Syndrom beobachtet wird. Außerdem erscheint es naheliegend, dass nicht eine einzelne MPO bedingte AA-Oxidation, sondern vielmehr eine Vielzahl an solchen Modifikationen zur weiteren Aggravation des MFS durch MPO führt.

5.6. MS mit höherer Detektionsrate an Peptiden nach Inkubation mit MPO/H₂O₂

Ein interessantes Ergebnis der MS war, dass in den MPO/H₂O₂-inkubierten rF11-Proben signifikant mehr dem rF11 zuzuordnende Peptide gefunden wurden als in der Kontrollgruppe. Um potenzielle Oxidationen zu erhalten, wurden die Proben unter nicht-reduzierenden Konditionen für die MS aufbereitet. Werden Disulfidbrücken nicht aufgespalten, erfolgt die Proteolyse des Proteins nur unvollständig und die Analyse im Massenspektrometer sowie die Identifizierung mittels DB-Abgleich ist deutlich erschwert.

Dies spiegelte sich auch in der niedrigen Sequenzabdeckung der Proben wider, welche beim Fibrillin-1 nach Inkubation mit MPO/H₂O₂ im Trend höher war als in der Kontrollgruppe.

Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass es zur oxidativen Aufspaltung von Disulfidbrücken durch das MPO/H₂O₂/HOCl-System gekommen ist, sodass nun die Proteinfragmente des zu etwas größeren Teilen denaturierten rF11 in der MS besser identifiziert werden konnten. Dies würde ebenfalls, wie im entsprechenden Absatz diskutiert, den beobachteten rF11-Masseshift im WB erklären.

Eigentlicher Standard der Einordnung von in der MS gefundener Oxidationen ist die Berechnung der Relative Site Occupancy (RSO). Hierbei wird für jedes AA-Residuum ein Prozentwert ermittelt, aus der Summe der Signalintensitäten der Oxidationen des Residuums geteilt durch die Summe der Signalintensitäten aller Peptide, die das Residuum enthalten (oxidiert und unmodifiziert). Ziel ist es, einen objektivierbaren Wert zu ermitteln, der aufzeigt, wie häufig ein Residuum modifiziert wurde.^{192,193} In diesem Versuchsaufbau war eine RSO jedoch methodenbedingt nicht sinnvoll durchführbar. Grund ist die starke Differenz an gefundenen Peptiden zwischen Kontrollgruppe und der MPO-Gruppe. Da die RSO ein relativer Wert ist und neben der höheren Anzahl an detektierten Oxidationen auch die Anzahl an „Referenzpeptiden“ in der MPO-Gruppe deutlich höher war, wurden die Ergebnisse der Berechnung verzerrt und waren nicht sinnvoll auswertbar.

5.7. MPO scheint über Heparinbindungsstellen an rF11 heranzutreten

In der hier durchgeführten MS wurden hauptsächlich Cystein-Carbamidomethylierungen detektiert. Im Rahmen der MS-Analyse erfolgte ein Alkylierungsschritt mittels CAA, welcher

freie Cysteine mit einem Carbamidomethyl markiert („Cap“). Dies soll den Datenbankabgleich erleichtern. Im Rahmen des Capping-Verfahrens können jedoch auch mögliche MPO-bedingte Oxidationen durch Carbamidomethyle ersetzt werden oder andere Oxidationen entstehen.¹⁹⁴⁻

¹⁹⁶ Auch MPO ist grundsätzlich dazu in der Lage Proteine zu carbamidomethylieren.^{194,197}

Es sollte daher analysiert werden, ob die gefundenen Oxidationen durch MPO verursacht wurden oder im Rahmen der Probenaufbereitung entstanden sind. Für viele andere EZM-Proteine konnte ein Herantreten von MPO über Heparinbindungsstellen bzw. gebundenes H/HS nachgewiesen werden. Insbesondere für Fibronectin konnte eine Häufung von MPO-bedingten Oxidationen nahe der Heparinbindungsstellen detektiert werden.¹⁹² Daher erfolgte eine Analyse der Entfernung der oxidierten AA-Residuen zur nächsten Heparinbindungsstelle von Fibrillin-1.

In diesem Dissertationsprojekt konnte gezeigt werden, dass die Oxidationen in den MPO-inkubierten rF11-Proben signifikant näher zur nächsten Heparinbindungsstelle lagen als in der Kontrollgruppe oder der Referenzentfernung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese gefundenen Cystein-Carbamidomethylierungen durch MPO oxidierte Cystein-Residuen von Fibrillin-1 markieren. Methodenbedingt konnte über die Art der Oxidationen keine Aussage getroffen werden. Hierfür wären andere Ansätze der MS-Aufbereitung notwendig, bei welchen beispielsweise andere Proteasen zum Einsatz kommen, auf einen Alkylierungsschritt verzichtet wird, die Proben weniger stark erhitzt werden oder ein Top-Down Ansatz gewählt wird.^{196,198} Auch wären Bindungsstudien von Fibrillin-1 und MPO ein interessanter Ansatz für weitere Forschungsprojekte.

In dieser Arbeit wurden in der MS 5 Oxidationen von Residuen identifiziert, welche nur in den MPO/H₂O₂ inkubierten Proben nachgewiesen wurden und bei denen auch in der Datenbankanalyse MFS-Missense Mutationen gefunden wurden. Diese befinden sich in der Hyb1-Domäne (C209), in der EGF4-Domäne (C460) sowie in der cb EGF14-Domäne (C1171, C1180, C1182). Ein Abgleich mit den MFS-Mutations-DBs und den entsprechenden Quellen ergab für die dokumentierte C209 Mutation in der Hyb1-Domäne keine weiteren Informationen, außer dass die Ghent-Kriterien für ein MFS erfüllt sind.¹⁹⁹ Die Missense-Mutation von C460 der EGF4-Domäne wurde bei einem 6-jährigem Mädchen nachgewiesen, das zu diesem Zeitpunkt einen leichtgradigen Mitralklappenprolaps, jedoch kein Aortenaneurysma aufwies.²⁰⁰ Eine Follow-up-Dokumentation lag nicht vor, aufgrund der frühzeitigen kardialen Beteiligung ist eine aortale Beteiligung im Krankheitsverlauf jedoch denkbar. Aminosäureaustauschmutationen der drei Cysteine der cb EGF14-Domäne (C1170, C1180, C1182) sind allesamt mit Aortenaneurysmen assoziiert, und jeweils mehrfach in den DBs dokumentiert. Beispielsweise bei Missense-Mutationen, die das C1171 betreffen, waren chirurgisch-interventionspflichtige Aortenaneurysmen, Aortendissektionen und frühzeitige

Aortendilatationen bereits ab dem Alter von 6 Jahren dokumentiert.¹⁶³ Mit Ausnahme von C209 bilden alle hier aufgezählten Cystein-Residuen Disulfidbrücken. In den hier durchgeführten Datenbankanalysen betrafen 92,5% aller Cystein-Austauschmutationen Disulfidbrücken (309/334) und störten somit deren Bildung. Dass HOCl in der Lage dazu ist Disulfidbrücken oxidativ aufzuspalten, ist bekannt. Exemplarisch könnte es sich bei den gefundenen Cystein-Residuen um mögliche Angriffsziele von MPO beim MFS handeln, welche eine Aggravation der Aortendilatation bewirken. Erkenntnisse über eine oxidative Aufspaltung von Disulfidbrücken konnten methodenbedingt nicht gewonnen werden, diese erscheinen jedoch aus weiter oben diskutierten Gründen denkbar.

Natürlich kann nicht grundsätzlich von einem identischen Effekt eines Aminosäureaustausches und einer Oxidation derselben AA ausgegangen werden. MPO-bedingte Oxidationen würden vermutlich erst am reifen, bereits sezernierten und häufig in der EZM deponierten Fibrillin-1 auftreten. Missense-Mutationen hingegen wirken sich bereits auf DNA-Ebene aus. Somit beeinflussen diese nicht immer nur die Stabilität des reifen, deponierten Proteins, sondern können sich auf jegliche Schritte der Proteinbiosynthese sowie der Elastogenese auswirken.

MPO scheint also in der Pathogenese von MFS-TAAs eine wichtige Rolle zu spielen. In diesem Dissertationsprojekt konnte nachgewiesen werden, dass sich MPO vermehrt in der Tunica media von MFS-TAAs befindet und potenziell dazu in der Lage ist, Fibrillin-1 oxidativ zu modifizieren. Außerdem wurden Hinweise darauf gefunden, dass MPO über Heparinbindungsstellen an Fibrillin-1 bindet. Mögliche Zielresiduen solcher Oxidationen im Fibrillin-1 wurden in diesem Dissertationsprojekt identifiziert und könnten im Pathomechanismus der MFS-TAAs eine wichtige Rolle spielen.

Zum genauen Verständnis von Qualität und Quantität MPO-bedingter Oxidationen im Fibrillin-1 würden weitere MS-Studien mit Proben von humanem oder murinen MFS-TAAs beitragen. Ebenfalls interessant wären Bindungsstudien von MPO und Fibrillin-1 in An- und Abwesenheit von H/HS zum genaueren mechanistischen Verständnis der Bindung über Heparinbindungsstellen. Zur Einordnung der nukleären Kollokalisierung von MPO mit HASMC-Nuklei wären Sekretom- und Proteomanalysen der HASMC nach Inkubation mit MPO spannend, da im Rahmen des MFS ein Phänotyp-Switching dieser Zellen beobachtet wird. Auf translationaler Ebene wären Prophylaxe-Studien mittels MPO-Inhibitor denkbar.

6. Literaturverzeichnis

1. Gray JR, Bridges AB, Faed MJ, et al. Ascertainment and severity of Marfan syndrome in a Scottish population. *J Med Genet* 1994; **31**(1): 51-4.
2. Marfan AB. Un cas de déformation congénitale des quatre membres plus prononcée aux extrémités caractérisée par l'allongement des os avec un certain degré d'amincissement. *Bull Mém Soc Med Hop Paris* 1896; **3**(13): 220-26.
3. Weve H. Über Arachnodaktylie (Dystrophia mesodermalis congenita, Typus Marfan). *Arch Augenheilk* 1931; (104): 1-46.
4. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991; **352**(6333): 337-9.
5. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010; **47**(7): 476-85.
6. v. Kodolitsch Y, Raghunath M, Nienaber CA. Das Marfan-Syndrom: Prävalenz und natürlicher Verlauf der kardiovaskulären Manifestationen. *Z Kardiol* 1998; **87**(3): 150-60.
7. Groth KA, Von Kodolitsch Y, Kutsche K, et al. Evaluating the quality of Marfan genotype-phenotype correlations in existing FBN1 databases. *Genet Med* 2017; **19**(7): 772-7.
8. Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys BL, et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *Am J Hum Genet* 2007; **81**(3): 454-66.
9. van Karnebeek CD, Naeff MS, Mulder BJ, Hennekam RC, Offringa M. Natural history of cardiovascular manifestations in Marfan syndrome. *Arch Dis Child* 2001; **84**(2): 129-37.
10. Pyeritz RE. The Marfan syndrome in childhood: features, natural history and differential diagnosis. *Progress in Pediatric Cardiology* 1996; **5**(3): 151-7.
11. Roman MJ, Rosen SE, Kramer-Fox R, Devereux RB. Prognostic significance of the pattern of aortic root dilation in the Marfan syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1993; **22**(5): 1470-6.
12. Ruddy JM, Jones JA, Ikonomidis JS. Pathophysiology of thoracic aortic aneurysm (TAA): is it not one uniform aorta? Role of embryologic origin. *Prog Cardiovasc Dis* 2013; **56**(1): 68-73.

13. Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 1986; **103**(6 Pt 1): 2499-509.
14. Kewley MA, Williams G, Steven FS. Studies of elastic tissue formation in the developing bovine ligamentum nuchae. *J Pathol* 1978; **124**(2): 95-101.
15. Lin G, Tiedemann K, Vollbrandt T, et al. Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. *J Biol Chem* 2002; **277**(52): 50795-804.
16. Reinhardt DP, Keene DR, Corson GM, et al. Fibrillin-1: organization in microfibrils and structural properties. *J Mol Biol* 1996; **258**(1): 104-16.
17. Ono RN, Sengle G, Charbonneau NL, et al. Latent transforming growth factor β -binding proteins and fibulins compete for fibrillin-1 and exhibit exquisite specificities in binding sites. *J Biol Chem* 2009; **284**(25): 16872-81.
18. Hirani R, Hanssen E, Gibson MA. LTBP-2 specifically interacts with the amino-terminal region of fibrillin-1 and competes with LTBP-1 for binding to this microfibrillar protein. *Matrix Biol* 2007; **26**(4): 213-23.
19. Sengle G, Charbonneau NL, Ono RN, et al. Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem* 2008; **283**(20): 13874-88.
20. Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresch DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem* 1996; **271**(9): 4916-22.
21. Bax DV, Bernard SE, Lomas A, et al. Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins. *J Biol Chem* 2003; **278**(36): 34605-16.
22. Jovanovic J, Takagi J, Choulier L, et al. $\alpha V\beta 6$ is a novel receptor for human fibrillin-1: Comparative studies of molecular determinants underlying integrin-RGD affinity and specificity. *J Biol Chem* 2007; **282**(9): 6743-51.
23. Kutz WE, Wang LW, Bader HL, et al. ADAMTS10 protein interacts with fibrillin-1 and promotes its deposition in extracellular matrix of cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 2011; **286**(19): 17156-67.
24. Cain SA, Mularczyk EJ, Singh M, Massam-Wu T, Kielty CM. ADAMTS-10 and -6 differentially regulate cell-cell junctions and focal adhesions. *Sci Rep* 2016; **6**: 35956.

25. Bader HL, Wang LW, Ho JC, et al. A disintegrin-like and metalloprotease domain containing thrombospondin type 1 motif-like 5 (ADAMTSL5) is a novel fibrillin-1-, fibrillin-2-, and heparin-binding member of the ADAMTS superfamily containing a netrin-like module. *Matrix Biol* 2012; **31**(7-8): 398-411.
26. Tsutsui K, Manabe R, Yamada T, et al. ADAMTSL-6 is a novel extracellular matrix protein that binds to fibrillin-1 and promotes fibrillin-1 fibril formation. *J Biol Chem* 2010; **285**(7): 4870-82.
27. Sabatier L, Chen D, Fagotto-Kaufmann C, et al. Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(3): 846-58.
28. Cain SA, Baldock C, Gallagher J, et al. Fibrillin-1 interactions with heparin. Implications for microfibril and elastic fiber assembly. *J Biol Chem* 2005; **280**(34): 30526-37.
29. Cain SA, Baldwin AK, Mahalingam Y, et al. Heparan sulfate regulates fibrillin-1 N- and C-terminal interactions. *J Biol Chem* 2008; **283**(40): 27017-27.
30. Reber-Muller S, Spissinger T, Schuchert P, Spring J, Schmid V. An extracellular matrix protein of jellyfish homologous to mammalian fibrillins forms different fibrils depending on the life stage of the animal. *Dev Biol* 1995; **169**(2): 662-72.
31. Pereira L, D'Alessio M, Ramirez F, et al. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* 1993; **2**(7): 961-8.
32. Baldock C, Siegler V, Bax DV, et al. Nanostructure of fibrillin-1 reveals compact conformation of EGF arrays and mechanism for extensibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(32): 11922-7.
33. Smallridge RS, Whiteman P, Werner JM, Campbell ID, Handford PA, Downing AK. Solution structure and dynamics of a calcium binding epidermal growth factor-like domain pair from the neonatal region of human fibrillin-1. *J Biol Chem* 2003; **278**(14): 12199-206.
34. Wess TJ, Purslow PP, Sherratt MJ, Ashworth J, Shuttleworth CA, Kielty CM. Calcium determines the supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol* 1998; **141**(3): 829-37.
35. Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Brownlee GG, Stuart Z D. The structure of a Ca²⁺-binding epidermal growth factor-like domain: Its role in protein-protein interactions. *Cell* 1995; **82**(1): 131-41.

36. Reinhardt DP, Ono RN, Sakai LY. Calcium stabilizes fibrillin-1 against proteolytic degradation. *J Biol Chem* 1997; **272**(2): 1231-6.
37. Hubmacher D, El-Hallous EI, Nelea V, Kaartinen MT, Lee ER, Reinhardt DP. Biogenesis of extracellular microfibrils: Multimerization of the fibrillin-1 C terminus into bead-like structures enables self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(18): 6548-53.
38. Yadin DA, Robertson IB, McNaught-Davis J, et al. Structure of the fibrillin-1 N-terminal domains suggests that heparan sulfate regulates the early stages of microfibril assembly. *Structure* 2013; **21**(10): 1743-56.
39. Robertson I, Jensen S, Handford P. TB domain proteins: evolutionary insights into the multifaceted roles of fibrillins and LTBPs. *Biochem J* 2011; **433**(2): 263-76.
40. Jensen SA, Corbett AR, Knott V, Redfield C, Handford PA. Ca²⁺-dependent interface formation in fibrillin-1. *J Biol Chem* 2005; **280**(14): 14076-84.
41. Kettle S, Yuan X, Grundy G, Knott V, Downing AK, Handford PA. Defective calcium binding to fibrillin-1: consequence of an N2144S change for fibrillin-1 structure and function. *J Mol Biol* 1999; **285**(3): 1277-87.
42. Yuan X, Werner JM, Lack J, et al. Effects of the N2144S mutation on backbone dynamics of a TB-cbEGF domain pair from human fibrillin-1. *J Mol Biol* 2002; **316**(1): 113-25.
43. Saharinen J, Keski-Oja J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell* 2000; **11**(8): 2691-704.
44. Jensen SA, Iqbal S, Lowe ED, Redfield C, Handford PA. Structure and interdomain interactions of a hybrid domain: a disulphide-rich module of the fibrillin/LTBP superfamily of matrix proteins. *Structure* 2009; **17**(5): 759-68.
45. El-Hallous E, Sasaki T, Hubmacher D, et al. Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J Biol Chem* 2007; **282**(12): 8935-46.
46. Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB. Latent TGF-beta-binding proteins. *Matrix Biol* 2015; **47**: 44-53.
47. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2003; **33**(3): 407-11.

48. Mellody KT, Freeman LJ, Baldock C, et al. Marfan syndrome-causing mutations in fibrillin-1 result in gross morphological alterations and highlight the structural importance of the second hybrid domain. *J Biol Chem* 2006; **281**(42): 31854-62.
49. Baldock C, Koster AJ, Ziese U, et al. The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol* 2001; **152**(5): 1045-56.
50. Romere C, Duerschmid C, Bournat J, et al. Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell* 2016; **165**(3): 566-79.
51. Daphna EM, Michaela S, Eynat P, Irit A, Rimon S. Association of myeloperoxidase with heparin: oxidative inactivation of proteins on the surface of endothelial cells by the bound enzyme. *Mol Cell Biochem* 1998; **183**(1-2): 55-61.
52. Baldus S, Eiserich JP, Mani A, et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 2001; **108**(12): 1759-70.
53. Rees MD, Whitelock JM, Malle E, et al. Myeloperoxidase-derived oxidants selectively disrupt the protein core of the heparan sulfate proteoglycan perlecan. *Matrix Biol* 2010; **29**(1): 63-73.
54. Kubala L, Kolarova H, Vitecek J, et al. The potentiation of myeloperoxidase activity by the glycosaminoglycan-dependent binding of myeloperoxidase to proteins of the extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1830**(10): 4524-36.
55. Sabatier L, Djokic J, Hubmacher D, Dzafik D, Nelea V, Reinhardt DP. Heparin/heparan sulfate controls fibrillin-1, -2 and -3 self-interactions in microfibril assembly. *FEBS Lett* 2014; **588**(17): 2890-7.
56. Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavaleiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 2009; **81**(3): 409-29.
57. Tiedemann K, Batge B, Muller PK, Reinhardt DP. Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *J Biol Chem* 2001; **276**(38): 36035-42.
58. Rock MJ, Cain SA, Freeman LJ, et al. Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. *J Biol Chem* 2004; **279**(22): 23748-58.

59. Perejda AJ, Abraham PA, Carnes WH, Coulson WF, Uitto J. Marfan's syndrome: structural, biochemical, and mechanical studies of the aortic media. *J Lab Clin Med* 1985; **106**(4): 376-83.
60. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114**(2): 172-81.
61. Fleischer KJ, Nousari HC, Anhalt GJ, Stone CD, Laschinger JC. Immunohistochemical abnormalities of fibrillin in cardiovascular tissues in Marfan's syndrome. *Ann Thorac Surg* 1997; **63**(4): 1012-7.
62. Waters KM, Rooper LM, Guajardo A, Halushka MK. Histopathologic differences partially distinguish syndromic aortic diseases. *Cardiovasc Pathol* 2017; **30**: 6-11.
63. Hindson VJ, Ashworth JL, Rock MJ, Cunliffe S, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: identification of amino- and carboxy-terminal cleavage sites. *FEBS Lett* 1999; **452**(3): 195-8.
64. Okamura H, Emrich F, Trojan J, et al. Long-term miR-29b suppression reduces aneurysm formation in a Marfan mouse model. *Physiol Rep* 2017; **5**(8): e13257.
65. Perrucci GL, Rurali E, Gowran A, et al. Vascular smooth muscle cells in Marfan syndrome aneurysm: the broken bricks in the aortic wall. *Cell Mol Life Sci* 2017; **74**(2): 267-77.
66. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 2006; **312**(5770): 117-21.
67. Lacro RV, Dietz HC, Sleeper LA, et al. Atenolol versus losartan in children and young adults with Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 2014; **371**(22): 2061-71.
68. He R, Guo DC, Sun W, et al. Characterization of the inflammatory cells in ascending thoracic aortic aneurysms in patients with Marfan syndrome, familial thoracic aortic aneurysms, and sporadic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; **136**(4): 922-9.
69. Zhang L, Qiu Z, Zheng H, et al. Single Cell RNA Sequencing Reveals the Pathogenesis of Aortic Dissection Caused by Hypertension and Marfan Syndrome. *Front Cell Dev Biol* 2022; **10**: 880320.

70. Fiorillo C, Becatti M, Attanasio M, et al. Evidence for oxidative stress in plasma of patients with Marfan syndrome. *Int J Cardiol* 2010; **145**(3): 544-6.
71. Zuniga-Munoz AM, Perez-Torres I, Guarner-Lans V, et al. Glutathione system participation in thoracic aneurysms from patients with Marfan syndrome. *Vasa* 2017; **46**(3): 177-86.
72. Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, et al. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis* 2009; **202**(1): 128-34.
73. Kim HW, Blomkalns AL, Ogbi M, et al. Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017; **313**(6): H1168-79.
74. Hibender S, Franken R, van Roomen C, et al. Resveratrol Inhibits Aortic Root Dilatation in the Fbn1 C1039G/+ Marfan Mouse Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; **36**(8): 1618-26.
75. Guo G, Munoz-Garcia B, Ott CE, et al. Antagonism of GxxPG fragments ameliorates manifestations of aortic disease in Marfan syndrome mice. *Hum Mol Genet* 2013; **22**(3): 433-43.
76. Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2005; **112**(2): 232-40.
77. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 2002; **161**(5): 1701-10.
78. Halpern BL, Char F, Murdoch JL, Horton WB, McKusick VA. A prospectus on the prevention of aortic rupture in the Marfan syndrome with data on survivorship without treatment. *Johns Hopkins Med J* 1971; **129** 3(3): 123-9.
79. Groenink M, de Roos A, Mulder BJ, Spaan JA, van der Wall EE. Changes in aortic distensibility and pulse wave velocity assessed with magnetic resonance imaging following beta-blocker therapy in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol* 1998; **82**(2): 203-8.
80. Simpson CF, Kling JM, Palmer RF. The use of propranolol for the protection of turkeys from the development of beta-aminopropionitrile-induced aortic ruptures. *Angiology* 1968; **19**(7): 414-8.

81. Gersony DR, McClaughlin MA, Jin Z, Gersony WM. The effect of beta-blocker therapy on clinical outcome in patients with Marfan's syndrome: a meta-analysis. *Int J Cardiol* 2007; **114**(3): 303-8.
82. Gao L, Mao Q, Wen D, Zhang L, Zhou X, Hui R. The effect of beta-blocker therapy on progressive aortic dilatation in children and adolescents with Marfan's syndrome: a meta-analysis. *Acta Paediatr* 2011; **100**(9): e101-5.
83. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2014; **35**(41): 2873-926.
84. Pitcher A, Spata E, Emberson J, et al. Angiotensin receptor blockers and beta blockers in Marfan syndrome: an individual patient data meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2022; **400**(10355): 822-31.
85. Williams A, Kenny D, Wilson D, et al. Effects of atenolol, perindopril and verapamil on haemodynamic and vascular function in Marfan syndrome - a randomised, double-blind, crossover trial. *Eur J Clin Invest* 2012; **42**(8): 891-9.
86. Phomakay V, Huett WG, Gossett JM, Tang X, Bornemeier RA, Collins RT, 2nd. beta-Blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors: comparison of effects on aortic growth in pediatric patients with Marfan syndrome. *J Pediatr* 2014; **165**(5): 951-5.
87. Doyle JJ, Doyle AJ, Wilson NK, et al. A deleterious gene-by-environment interaction imposed by calcium channel blockers in Marfan syndrome. *Elife* 2015; **4**: e08648.
88. Baumgartner H, De Backer J, Babu-Narayan SV, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease. *Eur Heart J* 2021; **42**(6): 563-645.
89. Benedetto U, Melina G, Takkenberg JJ, Roscitano A, Angeloni E, Sinatra R. Surgical management of aortic root disease in Marfan syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Heart* 2011; **97**(12): 955-8.
90. Murdoch JL, Walker BA, Halpern BL, Kuzma JW, McKusick VA. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. *N Engl J Med* 1972; **286**(15): 804-8.
91. Silverman DI, Burton KJ, Gray J, et al. Life expectancy in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol* 1995; **75**(2): 157-60.

92. Aricescu AR, Owens RJ. Expression of recombinant glycoproteins in mammalian cells: towards an integrative approach to structural biology. *Curr Opin Struct Biol* 2013; **23**(3): 345-56.
93. Stanley P. Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Mol Cell Biol* 1989; **9**(2): 377-83.
94. Portolano N, Watson PJ, Fairall L, et al. Recombinant protein expression for structural biology in HEK 293F suspension cells: a novel and accessible approach. *J Vis Exp* 2014; (92): e51897.
95. Price TH, Chatta GS, Dale DC. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood* 1996; **88**(1): 335-40.
96. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; **303**(5663): 1532-5.
97. Wilson ME. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Rev Infect Dis* 1985; **7**(3): 404-18.
98. Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM, Worthen GS, Johnson GL. Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem* 1996; **271**(5): 2832-8.
99. Buhl AM, Avdi N, Worthen GS, Johnson GL. Mapping of the C5a receptor signal transduction network in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(19): 9190-4.
100. Goldman DW. Regulation of the receptor system for leukotriene B₄ on human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 1988; **524**(1): 187-95.
101. Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- α , LPS, and IL-1 β . *Science* 1989; **243**(4897): 1467-9.
102. Canetti C, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *Br J Pharmacol* 2001; **134**(8): 1619-28.
103. Mitchell MJ, Lin KS, King MR. Fluid shear stress increases neutrophil activation via platelet-activating factor. *Biophys J* 2014; **106**(10): 2243-53.

104. Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys* 1962; **96**(3): 465-7.
105. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2004; **90**(3): 724-33.
106. Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. *Am J Pathol* 2001; **159**(6): 2081-8.
107. Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997; **78**(1-2): 97-107.
108. Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1981; **95**(3): 293-301.
109. Gerber CE, Kuci S, Zipfel M, Niethammer D, Bruchelt G. Phagocytic activity and oxidative burst of granulocytes in persons with myeloperoxidase deficiency. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; **34**(11): 901-8.
110. Agner K. Verdoperoxidase: a ferment isolated from leucocytes. *Acta Physiol Scand* 1941; (2): 1-62.
111. Theorell H, Akeson A. Highly purified milk peroxidase. *Arkiv för Kemi, Minerologi, och Geologi*; 1943.
112. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol* 1968; **95**(6): 2131-8.
113. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; **52**(3): 741-4.
114. Babior BM, Curnutte JT, McMurrich BJ. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest* 1976; **58**(4): 989-96.
115. Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008; **10**(7): 1199-234.
116. Marquez LA, Dunford HB. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. *J Biol Chem* 1995; **270**(51): 30434-40.

117. van Dalen CJ, Whitehouse MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem J* 1997; **327 (Pt 2)**(2): 487-92.
118. Husgafvel-Pursiainen K, Sorsa M, Engstrom K, Einisto P. Passive smoking at work: biochemical and biological measures of exposure to environmental tobacco smoke. *Int Arch Occup Environ Health* 1987; **59**(4): 337-45.
119. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem* 2006; **281**(52): 39860-9.
120. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2000; **275**(8): 5425-30.
121. Lakshmi VM, Nauseef WM, Zenser TV. Myeloperoxidase potentiates nitric oxide-mediated nitrosation. *J Biol Chem* 2005; **280**(3): 1746-53.
122. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(12): 4003-8.
123. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(2): 431-6.
124. El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res* 2008; **103**(4): 352-9.
125. Lefkowitz DL, Mills KC, Moguevsky N, Bollen A, Vaz A, Lefkowitz SS. Regulation of macrophage function by human recombinant myeloperoxidase. *Immunol Lett* 1993; **36**(1): 43-9.
126. Gelderman MP, Stuart R, Vigerust D, et al. Perpetuation of inflammation associated with experimental arthritis: the role of macrophage activation by neutrophilic myeloperoxidase. *Mediators Inflamm* 1998; **7**(6): 381-9.
127. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; **276**(44): 41279-87.
128. Gomez-Mejiba SE, Zhai Z, Gimenez MS, et al. Myeloperoxidase-induced genomic DNA-centered radicals. *J Biol Chem* 2010; **285**(26): 20062-71.

129. Lane AE, Tan JT, Hawkins CL, Heather AK, Davies MJ. The myeloperoxidase-derived oxidant HO₂SCN inhibits protein tyrosine phosphatases and modulates cell signalling via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *Biochem J* 2010; **430**(1): 161-9.
130. Szuchman-Sapir AJ, Pattison DI, Davies MJ, Witting PK. Site-specific hypochlorous acid-induced oxidation of recombinant human myoglobin affects specific amino acid residues and the rate of cytochrome b₅-mediated heme reduction. *Free Radic Biol Med* 2010; **48**(1): 35-46.
131. Pattison DI, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. *Chem Res Toxicol* 2003; **16**(4): 439-49.
132. Pattison DI, Hawkins CL, Davies MJ. What are the plasma targets of the oxidant hypochlorous acid? A kinetic modeling approach. *Chem Res Toxicol* 2009; **22**(5): 807-17.
133. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 2008; **4**(5): 278-86.
134. Rees MD, Kennett EC, Whitelock JM, Davies MJ. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**(12): 1973-2001.
135. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1703**(2): 93-109.
136. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem* 2016; **85**: 765-92.
137. Karimi M, Ignasiak MT, Chan B, et al. Reactivity of disulfide bonds is markedly affected by structure and environment: implications for protein modification and stability. *Sci Rep* 2016; **6**: 38572.
138. Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J* 1993; **290 (Pt 1)**(1): 165-72.
139. Hazell LJ, Arnold L, Flowers D, Waeg G, Malle E, Stocker R. Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1996; **97**(6): 1535-44.

140. Cai H, Chuang CY, Hawkins CL, Davies MJ. Binding of myeloperoxidase to the extracellular matrix of smooth muscle cells and subsequent matrix modification. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 666.
141. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002; **347**(1): 5-12.
142. Rudolph V, Andrie RP, Rudolph TK, et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nat Med* 2010; **16**(4): 470-4.
143. Mollenhauer M, Friedrichs K, Lange M, et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circ Res* 2017; **121**(1): 56-70.
144. Kettle AJ, Chan T, Osberg I, et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **170**(12): 1317-23.
145. O'Donnell C, Newbold P, White P, Thong B, Stone H, Stockley RA. 3-Chlorotyrosine in sputum of COPD patients: relationship with airway inflammation. *COPD* 2010; **7**(6): 411-7.
146. Wassef M, Baxter BT, Chisholm RL, et al. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Vasc Surg* 2001; **34**(4): 730-8.
147. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**(5): 987-94.
148. Miller FJ, Jr., Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**(4): 560-5.
149. Tang PC, Yakimov AO, Teesdale MA, et al. Transmural inflammation by interferon- γ -producing T cells correlates with outward vascular remodeling and intimal expansion of ascending thoracic aortic aneurysms. *FASEB J* 2005; **19**(11): 1528-30.
150. Yang HH, van Breemen C, Chung AW. Vasomotor dysfunction in the thoracic aorta of Marfan syndrome is associated with accumulation of oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2010; **52**(1-2): 37-45.
151. Abdul-Hussien H, Hanemaaijer R, Verheijen JH, van Bockel JH, Geelkerken RH, Lindeman JH. Doxycycline therapy for abdominal aneurysm: Improved proteolytic balance through reduced neutrophil content. *J Vasc Surg* 2009; **49**(3): 741-9.

152. Chu Y, Wilson K, Gu H, et al. Myeloperoxidase is increased in human cerebral aneurysms and increases formation and rupture of cerebral aneurysms in mice. *Stroke* 2015; **46**(6): 1651-6.
153. Ollikainen E, Tulamo R, Lehti S, et al. Myeloperoxidase Associates With Degenerative Remodeling and Rupture of the Saccular Intracranial Aneurysm Wall. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018; **77**(6): 461-8.
154. Memon AA, Zarrouk M, Agren-Witteschus S, Sundquist J, Gottsater A, Sundquist K. Identification of novel diagnostic and prognostic biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Prev Cardiol* 2020; **27**(2): 132-42.
155. Zagraban B, Eilenberg W, Prausmueller S, et al. A Novel Diagnostic and Prognostic Score for Abdominal Aortic Aneurysms Based on D-Dimer and a Comprehensive Analysis of Myeloid Cell Parameters. *Thromb Haemost* 2019; **119**(5): 807-20.
156. Sherrah A, Wilson M, Thomas S, et al. Haem-Enzymes Predictive of Coronary Artery Disease Are Present in Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysm. *Heart, Lung and Circulation* 2017; **26**: S405.
157. Landis BJ, Lai D, Guo DC, et al. Identification of a common polymorphism in COQ8B acting as a modifier of thoracic aortic aneurysm severity. *HGG Adv* 2022; **3**(1).
158. Mehrkens D, Nettersheim FS, Ballmann F, et al. Inhibition of myeloperoxidase attenuates thoracic aortic aneurysm formation in Marfan disease. *bioRxiv* 2022: 2022.11.24.517172.
159. UniProt C. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021; **49**(D1): D480-D9.
160. Dietz HC, Saraiva JM, Pyeritz RE, Cutting GR, Francomano CA. Clustering of fibrillin (FBN1) missense mutations in Marfan syndrome patients at cysteine residues in EGF-like domains. *Hum Mutat* 1992; **1**(5): 366-74.
161. Schrijver I, Liu W, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. Cysteine substitutions in epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1: distinct effects on biochemical and clinical phenotypes. *Am J Hum Genet* 1999; **65**(4): 1007-20.
162. Brennan ML, Anderson MM, Shih DM, et al. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest* 2001; **107**(4): 419-30.

163. Collod-Beroud G, Le Bourdelles S, Ades L, et al. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. *Hum Mutat* 2003; **22**(3): 199-208.
164. Malle E, Hazell L, Stocker R, Sattler W, Esterbauer H, Waeg G. Immunologic detection and measurement of hypochlorite-modified LDL with specific monoclonal antibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**(7): 982-9.
165. Segura AM, Luna RE, Horiba K, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation* 1998; **98**(19 Suppl): I1331-7; discussion I17-8.
166. Switzar L, Nicolardi S, Rutten JW, Oberstein SA, Aartsma-Rus A, van der Burgt YE. In-Depth Characterization of Protein Disulfide Bonds by Online Liquid Chromatography-Electrochemistry-Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2016; **27**(1): 50-8.
167. Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, et al. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care* 2018; **22**(1): 176.
168. Murao S, Stevens FJ, Ito A, Huberman E. Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**(4): 1232-6.
169. Prutz WA. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch Biochem Biophys* 1996; **332**(1): 110-20.
170. Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chem Res Toxicol* 2001; **14**(8): 1071-81.
171. Takeshita J, Byun J, Nhan TQ, et al. Myeloperoxidase generates 5-chlorouracil in human atherosclerotic tissue: a potential pathway for somatic mutagenesis by macrophages. *J Biol Chem* 2006; **281**(6): 3096-104.
172. Jenner AM, Ruiz JE, Dunster C, Halliwell B, Mann GE, Siow RC. Vitamin C protects against hypochlorous Acid-induced glutathione depletion and DNA base and protein damage in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**(4): 574-80.
173. Acilan C, Serhatli M, Kacar O, et al. Smooth muscle cells isolated from thoracic aortic aneurysms exhibit increased genomic damage, but similar tendency for apoptosis. *DNA Cell Biol* 2012; **31**(10): 1523-34.

174. Sung HJ, Eskin SG, Sakurai Y, Yee A, Kataoka N, McIntire LV. Oxidative stress produced with cell migration increases synthetic phenotype of vascular smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng* 2005; **33**(11): 1546-54.
175. Malashicheva A, Kostina D, Kostina A, et al. Phenotypic and Functional Changes of Endothelial and Smooth Muscle Cells in Thoracic Aortic Aneurysms. *Int J Vasc Med* 2016; **2016**: 3107879.
176. Rombouts KB, van Merrienboer TAR, Ket JCF, Bogunovic N, van der Velden J, Yeung KK. The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections. *Eur J Clin Invest* 2022; **52**(4): e13697.
177. Zhong L, He X, Si X, et al. SM22alpha (Smooth Muscle 22alpha) Prevents Aortic Aneurysm Formation by Inhibiting Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching Through Suppressing Reactive Oxygen Species/NF-kappaB (Nuclear Factor-kappaB). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; **39**(1): e10-e25.
178. Peng H, Zhang K, Liu Z, et al. VPO1 Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch by Activating Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK 1/2) in Abdominal Aortic Aneurysms. *J Am Heart Assoc* 2018; **7**(17): e010069.
179. Cai H, Chuang CY, Vanichkitrungruang S, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorous acid-modified extracellular matrix contributes to the behavioral switching of human coronary artery smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2019; **134**: 516-26.
180. He R, Guo DC, Estrera AL, et al. Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; **131**(3): 671-8.
181. Nataatmadja M, West M, West J, et al. Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation* 2003; **108 Suppl 1**(10_suppl_1): II329-34.
182. Adiguzel Z, Arda N, Kacar O, et al. Evaluation of apoptotic molecular pathways for smooth muscle cells isolated from thoracic aortic aneurysms in response to oxidized sterols. *Mol Biol Rep* 2014; **41**(12): 7875-84.
183. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett* 1997; **404**(2-3): 249-52.

184. Braakman I, Lamriben L, van Zadelhoff G, Hebert DN. Analysis of Disulfide Bond Formation. *Curr Protoc Protein Sci* 2017; **90**: 14 1 1- 1 21.
185. Booms P, Tiecke F, Rosenberg T, Hagemeyer C, Robinson PN. Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments. *Hum Genet* 2000; **107**(3): 216-24.
186. Zhang Y, Dong H, Seeburg DP, et al. Multimodal Molecular Imaging Demonstrates Myeloperoxidase Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity in Neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 2019; **56**(2): 954-62.
187. Vrhovski B, Jensen S, Weiss AS. Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin. *Eur J Biochem* 1997; **250**(1): 92-8.
188. Chen ZX, Jia WN, Jiang YX. Genotype-phenotype correlations of marfan syndrome and related fibrillinopathies: Phenomenon and molecular relevance. *Front Genet* 2022; **13**: 943083.
189. Aubart M, Gazal S, Arnaud P, et al. Association of modifiers and other genetic factors explain Marfan syndrome clinical variability. *Eur J Hum Genet* 2018; **26**(12): 1759-72.
190. Stengl R, Bors A, Agg B, et al. Optimising the mutation screening strategy in Marfan syndrome and identifying genotypes with more severe aortic involvement. *Orphanet J Rare Dis* 2020; **15**(1): 290.
191. Arnaud P, Milleron O, Hanna N, et al. Clinical relevance of genotype-phenotype correlations beyond vascular events in a cohort study of 1500 Marfan syndrome patients with FBN1 pathogenic variants. *Genet Med* 2021; **23**(7): 1296-304.
192. Nybo T, Cai H, Chuang CY, Gamon LF, Rogowska-Wrzesinska A, Davies MJ. Chlorination and oxidation of human plasma fibronectin by myeloperoxidase-derived oxidants, and its consequences for smooth muscle cell function. *Redox Biol* 2018; **19**: 388-400.
193. Chen HJ, Yang YF, Lai PY, Chen PF. Analysis of Chlorination, Nitration, and Nitrosylation of Tyrosine and Oxidation of Methionine and Cysteine in Hemoglobin from Type 2 Diabetes Mellitus Patients by Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2016; **88**(18): 9276-84.
194. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J Lipid Res* 2009; **50 Suppl**(Suppl): S346-51.

195. Kuznetsova KG, Levitsky LI, Pyatnitskiy MA, et al. Cysteine alkylation methods in shotgun proteomics and their possible effects on methionine residues. *J Proteomics* 2021; **231**: 104022.
196. Nybo T, Davies MJ, Rogowska-Wrzesinska A. Analysis of protein chlorination by mass spectrometry. *Redox Biol* 2019; **26**: 101236.
197. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 2007; **13**(10): 1176-84.
198. Rykaer M, Svensson B, Davies MJ, Hagglund P. Unrestricted Mass Spectrometric Data Analysis for Identification, Localization, and Quantification of Oxidative Protein Modifications. *J Proteome Res* 2017; **16**(11): 3978-88.
199. Stheneur C, Collod-Beroud G, Faivre L, et al. Identification of the minimal combination of clinical features in probands for efficient mutation detection in the FBN1 gene. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**(9): 1121-8.
200. Zadeh N, Bernstein JA, Niemi AK, et al. Ectopia lentis as the presenting and primary feature in Marfan syndrome. *Am J Med Genet A* 2011; **155A**(11): 2661-8.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der funktionellen Einheiten von Fibrillin-1..... | 14 |
| Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen funktionellen Einheiten von rF11 und Vergleich mit Fibrillin-1..... | 19 |
| Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen funktionellen Einheiten von cb EGF 9-15 und Vergleich mit Fibrillin-1. | 19 |
| Abbildung 4: Schematische vereinfachte Zeichnung der durch MPO katalysierten Reaktionen. ¹¹⁷⁻¹²¹ | 22 |
| Abbildung 5: Kontrolle der erfolgreichen Inaktivierung der Peroxidaseaktivität von MPO..... | 39 |
| Abbildung 6: MPO AEC Färbung der Aorta ascendens in 20-facher Vergrößerung. | 43 |
| Abbildung 7: MPO IF Färbung der Aorta ascendens in 20-facher Vergrößerung..... | 45 |
| Abbildung 8: 2D10G9-AEC-Färbung der Aorta ascendens in 20-facher Vergrößerung..... | 46 |
| Abbildung 9: MPO-ELISA von Aortenlysat der Aorta ascendens. | 47 |
| Abbildung 10: MPO- und Fibrillin-1 IF Kofärbung konfluenter HASMCs in 20-facher Vergrößerung..... | 48 |
| Abbildung 11: nTyr- und Fibrillin-1 IF Kofärbung konfluenter HASMCs in 40-facher Vergrößerung..... | 49 |
| Abbildung 12: WB von rF11 auf Fibrillin-1 nach Inkubation mit MPO und H ₂ O ₂ (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle). | 51 |
| Abbildung 13: Coomassie-Blau Färbung einer SDS-PAGE von rF11 nach Inkubation mit MPO und H ₂ O ₂ (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle). | 52 |
| Abbildung 14: SDS-PAGE von rF11 nach 30-minütiger Inkubation mit HOCl (HOCl) oder Aqua dest (Kontrolle). | 52 |
| Abbildung 15: Coomassie-Blau Färbung einer SDS-PAGE von C1039G- oder WT cb EGF 9-15 nach Inkubation mit MPO und H ₂ O ₂ (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle). | 53 |
| Abbildung 16: WB (linkes Bild) und Vergleich mit der Coomassie-Blau Färbung (rechtes Bild) des rekombinanten Tropoelastins nach Inkubation mit MPO und H ₂ O ₂ (MPO) oder Aqua dest (Kontrolle). | 54 |
| Abbildung 17: Statistische Verteilung der MFS-auslösenden Missense-Punktmutationen von Fibrillin-1 nach betroffener Domäne..... | 55 |
| Abbildung 18: Graphische Darstellung der gefundenen MFS-Missense-Mutationen nach Domäne von Fibrillin-1..... | 56 |
| Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der in beiden DBs dokumentierten MFS-Missense-Mutationen nach AA..... | 57 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 20: Faktor von MFS-Missense-Mutationen betroffener AAs bezogen auf deren Häufigkeit im WT-Protein..... | 58 |
| Abbildung 21: Prozentuale Verteilung aller AAs im WT Fibrillin-1. | 58 |
| Abbildung 22: Graphische Darstellung der in der MS abgedeckten Proteinsequenz. | 61 |
| Abbildung 23: Vergleich der mittleren Entfernung der Cystein-Oxidationen zur nächsten Heparinbindungsstelle von MPO-inkubierten Proben versus in beiden Gruppen zu findende Oxidationen..... | 64 |
| Abbildung 24: Vergleich der verwendeten Fibrillin-1 Fragmente | 68 |

7.2. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Chemikalienliste | 27 |
| Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien | 27 |
| Tabelle 3: Kits | 28 |
| Tabelle 4: verwendete Geräte und Software | 28 |
| Tabelle 5: In der HASMC-Zellkultur verwendete Materialien | 30 |
| Tabelle 6: In der HEK293-Zellkultur verwendete Materialien | 31 |
| Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper und Verdünnung..... | 32 |
| Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper und Verdünnung..... | 33 |
| Tabelle 9: Alter der Mäuse nach Färbung..... | 34 |
| Tabelle 10: SDS-PAGE-Laufzeiten und verwendete Gele. | 36 |
| Tabelle 11: Verwendeter WB-Marker je nach Probenart | 37 |
| Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper im WB..... | 38 |
| Tabelle 13: Verwendete Zweitantikörper im WB..... | 38 |
| Tabelle 14: Auflistung der verschiedenen Konditionen zur Probeninkubation für die SDS-PAGE/WB. | 39 |
| Tabelle 15: Übersichtstabelle gefundener Peptide und Oxidationen in der MS von rF11 und graphische Darstellung der statistischen Auswertung. | 60 |
| Tabelle 16: Auflistung der in der MS gefundenen rF11-Oxidationen..... | 62 |