

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

Der Einfluss der MLKL-Defizienz auf strukturelles Remodeling und Gen-Transkription im Rahmen Marfan-Syndrom assoziierter thorakaler Aortenaneurysmen

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

vorgelegt von
Sophia Riemen
aus Berlin

promoviert am 17.03.2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2026

Dekanin/Dekan:

Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. nat. M. Mollenhauer
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. Nat. H. Walczak

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. med. Henning Guthoff

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.

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 21.09.2025

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Henning Guthoff, für die exzellente Betreuung und Unterstützung. Sein allzeit offenes Ohr, die weiterführenden Anregungen und steten Ermutigungen zur Lösungsfindung haben mir auf dem Weg zur Erstellung dieser Dissertation sehr geholfen.

Des Weiteren danke ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Mollenhauer, für die Möglichkeit der Mitarbeit in der Arbeitsgruppe, seine wertvolle fachliche Betreuung sowie seine stets konstruktive Unterstützung während des gesamten Projekts.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG Baldus, die mir mit ihrer Hilfsbereitschaft, ihrem Wissen und ihrer Geduld zur Seite standen. Ich hatte sowohl im Labor, als auch auf den Laborausflügen eine tolle Zeit mit Euch und schaue auf viele schöne Erinnerungen zurück.

Darüber hinaus danke ich Oscar Zimmermann, der mir durch seine Einarbeitung den Einstieg in das experimentelle Arbeiten erheblich erleichtert hat.

Danken möchte ich auch Ph.D. Harshal Nemade für seine stets hilfreichen und erhellenden Ausführungen in aufkommenden Fragen vor allem im Bereich qPCR und Zellkultur.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Geduld. Ohne euren Rückhalt, eure Ermutigung und euer Verständnis wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit sowohl während der Forschungsarbeit im Labor als auch in der Zeit des Verfassens dieser Dissertation gab es noch weitere Personen, denen ich an dieser Stelle ungenannt meinen Dank ausspreche.

Widmung

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 8 |
| 1. ZUSAMMENFASSUNG | 10 |
| 2. EINLEITUNG | 11 |
| 2.1. Thorakale Aorta | 11 |
| 2.1.1. Mikroskopische Anatomie und Physiologie der Aorta | 11 |
| (1) Extrazelluläre Matrix | 12 |
| (2) Matrix-Metalloproteasen | 12 |
| (3) Vaskuläre glatte Muskelzellen | 13 |
| (4) Transforming growth factor- β Signaling | 13 |
| 2.1.2. Thorakale Aortenaneurysmen | 14 |
| 2.1.3. Ätiopathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen | 15 |
| 2.2. Marfan-Syndrom | 16 |
| 2.2.1. Diagnostik und Symptome | 16 |
| 2.2.2. Therapie | 18 |
| 2.2.3. Pathophysiologie des Marfan Syndrom | 19 |
| (1) Fibrillin-1 | 19 |
| (2) Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Marfan Snyderom | 19 |
| (3) Transforming growth factor- β Signaling | 20 |
| (4) Inflammation | 21 |
| 2.3. Mixed Lineage Kinase domain-Like | 22 |
| 2.3.1. Nekroptose | 22 |
| (1) Nekroptose in inflammatorischen Erkrankungen | 23 |
| 2.3.2. Extrazelluläre Vesikel und endosomaler Vesikeltransport | 24 |
| 2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit | 24 |
| 2.5. Vorarbeiten | 25 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 3.1. Material | 27 |
| 3.1.1. Antikörper | 28 |
| 3.1.2. Primer | 29 |
| 3.1.3. Mauslinien | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Methoden | 31 |
| 3.2.1. Mausmodell | 31 |
| 3.2.2. Organentnahme | 32 |
| 3.2.3. Kryo Schneiden | 32 |
| 3.2.4. Resorcin-Fuchsin-Färbung | 33 |
| 3.2.5. In-situ-Zymografie | 33 |
| 3.2.6. Immunfluoreszenzfärbung | 33 |
| 3.2.7. qPCR Aorta Descendens | 34 |
| 3.2.8. Isolation und Kultur von murinen aortalen glatten Muskelzellen | 35 |
| 3.2.9. Stimulation von murinen aortalen glatten Muskelzellen | 36 |
| 3.2.10. Statistische Auswertung | 37 |
| | |
| 4. ERGEBNISSE | 38 |
| | |
| 4.1. Inflammatorische Vorgänge in der Aortenwand | 38 |
| | |
| 4.2. Degradierung der extrazellulären Matrix | 40 |
| 4.2.1. Fragmentierung von elastischen Fasern | 40 |
| 4.2.2. Aktivität von Matrixmetalloproteinasen | 41 |
| | |
| 4.3. TGF- β -Signaling | 42 |
| 4.3.1. TGF- β -Rezeptor I Expression | 42 |
| 4.3.2. TGF- β -Signalweg | 47 |
| 4.3.3. Phänotyp der aortalen glatten Muskelzellen und Beeinflussung von EZM- Bestandteilen | 48 |
| | |
| 5. DISKUSSION | 53 |
| | |
| 5.1. Einfluss von MLKL-Defizienz auf vaskuläre Inflammation bei MFS-assozierten TAA | 53 |
| 5.1.1. Infiltration von Immunzellen in die Aortenwand | 53 |
| | |
| 5.2. Einfluss von MLKL-Defizienz auf die strukturelle Integrität von MFS-assozierten TAA | 54 |
| 5.2.1. Integrität der elastischen Fasern und Aktivität von MMPs | 55 |
| | |
| 5.3. Einfluss von MLKI-Defizienz auf den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen | 56 |
| 5.3.1. Unterschiede zwischen den Genotypen | 56 |
| 5.3.2. Stimulation mit TGF- β | 57 |
| 5.3.3. Stimulation mit TNF- α | 59 |
| | |
| 5.4. Zusammenfassung | 60 |
| | |
| 5.5. Ausblick | 61 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 63 |
| 7. | ANHANG | 69 |
| 7.1. | Abbildungsverzeichnis | 69 |
| 7.2. | Tabellenverzeichnis | 69 |
| 8. | VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN | 70 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------------------|--|
| μm | Mikrometer |
| (m)SMC | (Murine) smooth muscle cells, glatte Muskelzellen |
| A. | Arteria |
| AAA | Abdominelles Aortenaneurysma |
| Acta2 | Smooth muscle alpha-actin-2 |
| ADAM (-TS) | A disintegrin and metalloprotease (with thrombospondin-1-like domains) |
| Ao. Asc./ Desc./ Abd. | Aorta ascendens/ descendens/ abdominalis |
| AT-2 | Angiotensin 2 |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| Casp (3) | Caspase (3) |
| Ccn2 | Cellular Communication Network Factor 2 |
| CD(45/68) | Cluster of differentiation |
| cDNA | Complementary Desoxyribonukleinsäure |
| Col1a1 | Kollagen 1 |
| Col3a1 | Kollagen 3 |
| Ctgf | Connective Tissue Growth Factor |
| DAMP | Damage-associated molecular pattern |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal growth factor |
| Eln | Elastin |
| Erk | Extracellular-signal regulated kinase |
| ESCRT-II | Endosomal sorting complexes required for transport - II |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| Fbn1 | Fibrillin-1 |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| Fn1 | Fibronectin 1 |
| Gapdh | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution |
| Il (-6) | Interleukin (-6) |
| kDa | Kilo Dalton |
| Klf4 | Kruppel-like-factor 4 |

| | |
|---|--|
| LAP | Latency associated peptide |
| Lox | Lysyloxidase |
| LTBP | TGF- β -binding proteins |
| MAP | Mitogen-activated protein |
| MFS | Marfan-Syndrom |
| MLKL | Mixed lineage kinase domain like pseudokinase |
| mm | Millimeter |
| MMP | Matrixmetalloprotease |
| Myh11 | Smooth muscle myosin heavy chain 11 |
| NaCl | Natrium Chlorid |
| NF-κB | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NOX | NADPH oxidasen |
| O₂ / O₂⁻ / H₂O₂ | Sauerstoff / Superoxid Anion/ Wasserstoffperoxid |
| Pai1 | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Postn | Periostin |
| PRR / TLR / ZBP1 | Pattern recognition receptors/ toll-like receptors / Z-DNA binding protein 1 |
| qPCR | Quantitative polymerase chain reaction |
| RIPK | Receptor- interacting protein kinase |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SMAD | Small mothers against decapapentaplegic |
| SM-MHC | smooth muscle-myosin heavy chain |
| TAA | Thorakales Aortenaneurysma |
| TagIn | Transgelin |
| TGF-β | Transforming growth factor- β |
| TGF-β-R | Transforming growth factor- β -Rezeptor |
| Timp | Tissue inhibitor of metalloproteinase |
| TNF-α | Tumor necrosis factor- α |
| TNFR | Tumornekrosefaktor-Rezeptor |
| Tnfrsf11b | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

1. Zusammenfassung

Das MFS ist eine autosomal-dominant vererbte Bindegewebserkrankung deren Grundlage eine Mutation im Fibrillin-1 Gen ist. Die klinischen Auswirkungen dieser Mutation sind vielfältig und betreffen mehrere Organsysteme. Die Lebensdauer der Patienten wird maßgeblich durch kardiovaskuläre Komplikationen beeinflusst: Hierzu gehören vor allem die Dilatation der Aortenwurzel mit der Entwicklung von TAAs und deren Dissektion. Der endgültige Pathomechanismus des MFS ist trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Ursache die für die Entstehung von TAAs relevant sein könnte sind inflammatorische Vorgänge, wozu auch inflammatorische Zelltodarten wie Nekroptose zählen. Daher wurde in dieser Studie ein möglicher Zusammenhang zwischen MFS und Nekroptose bei der Entstehung von TAAs untersucht. Nekroptose ist eine regulierte Form der Nekrose, einer entzündlichen Zelltodform. Nekroptose wird durch die Bindung von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) vor allem an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) initiiert und führt zur Ausbildung eines Komplexes aus den beiden Enzymen RIPK1 und RIPK3 (receptor-interacting protein kinases 1 und 3), dem sogenannten Nekrosom. Durch die Bildung des Nekrosoms wird RIPK3 autophosphoryliert. Aktiviertes RIPK3 phosphoryliert dann mixed lineage kinase like protein (MLKL), welches oligomerisiert und in die Plasmamembran wandert, wo es über noch nicht vollständig aufgedeckte Mechanismen zu einer Permeabilisation der Zellmembran und Destruktion der Zelle führt. Dementsprechend ist der wichtigste Downstream-Exekutor der Nekroptose Mlkl.

Es wurde ein Mausmodell mit Mlkl-mutierten beziehungsweise Mlkl-defizienten Mäusen und Mäusen mit MFS etabliert und Mlkl-Mutation und MFS etabliert, um Zusammenhänge zwischen Nekroptose und der TAA Entstehung bei MFS zu erforschen. Anhand von 12 Wochen alten Mäusen konnten in Immunhistochemischen Färbungen Anhaltspunkte eine vermehrte Einwanderung von Makrophagen in die Media der Aortenwand von TAAs gefunden werden. Um die konkrete Rolle von inflammatorischem Geschehen bei der TAA-Entwicklung zu entschlüsseln, bedarf es tiefgehender Untersuchungen. Des Weiteren konnte sowohl in immunhistochemischen Färbungen, als auch in qPCRs aus ganzen Aorten und aus SMCs aus der thorakalen Aorta aus der Zellkultur eine Veränderung der extrazellulären Matrix gezeigt werden. Unter anderem führt ein gesteigertes Vorkommen von Matrixmetalloproteinasen in der Aortenwand zu einer gesteigerten Fragmentation von elastischen Fasern in der Media der Aorta. Auch andere Bestandteile der extrazellulären Matrix der Aortenwand, wie Kollagene konnten in gesteigerter Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls eine Veränderung im TGF- β -Signaling, wobei die eindrucklichste Manifestation hiervon eine gesteigerte Expression des TGF- β -Rezeptors ist. Dies zeigte sich sowohl in der Immunhistochemischen Färbung als auch in der qPCR der gesamten Aorta und der Zellkultur aus SMCs aus der Media der Aorta.

2. Einleitung

2.1. Thorakale Aorta

Die thorakale Aorta kann in vier verschiedene Abschnitte eingeteilt werden. Vom Herzen aus betrachtet, kommt zuerst die Aortenwurzel, welche den Ring der Aortenklappe, die Segel der Aortenklappe und die Valsalva Sinus umfasst. Die Aortenwurzel geht in die Aorta ascendens (Ao. Asc.) über. Diese beginnt am sinotubularen Übergang und erstreckt sich bis zum Abgang des Truncus brachiocephalicus. Die Ao. Asc. geht in den Aortenbogen über, welcher bis zum Abgang der Arteria (A.) subclavia sinister geht und die Abgänge für die Arterien enthält, die Kopf, Hals und Arme versorgen. Der letzte Teil der thorakalen Aorta ist die Aorta descendens (Ao. Desc.), welche zwischen der A. subclavia sinister und dem Ligamentum arteriosum beginnt und bis zum Zwerchfell an der Wirbelsäule entlang verläuft.¹

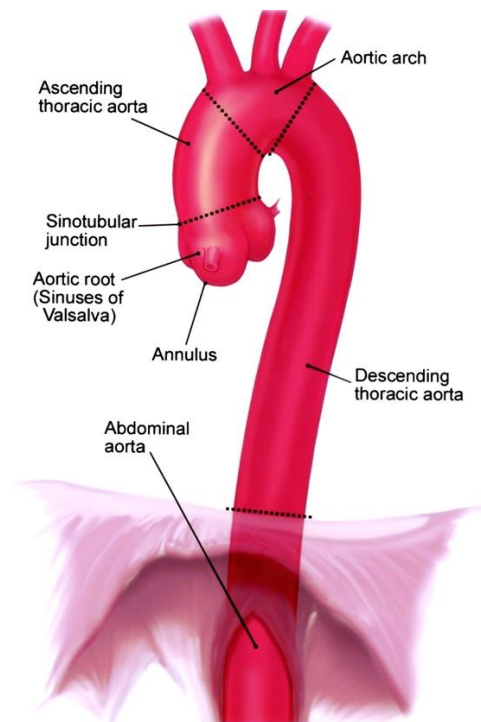


Abbildung 1: Makroskopische Anatomie der thorakalen Aorta²

2.1.1. Mikroskopische Anatomie und Physiologie der Aorta

Die Wand der Aorta besteht aus drei Wandschichten: Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die Intima besteht aus einer dünnen Schicht Endothelzellen, die fest in einer darunter liegenden Basalmembran verankert sind. Diese Basalmembran besteht aus einer hochspezialisierten extrazellulären Matrix (EZM), welche aus Laminin, Kollagen IV, Fibronectin (Fn), Perlecan und Proteoglykanen besteht. Die Intima erlaubt die Diffusion von Molekülen in die Media und wird von der Media durch die Membrana elastica interna abgegrenzt. In der Media finden sich konzentrische elastische Lamellen und darin eingelagerte glatte Muskelzellen (SMCs) sowie eine vielseitige EZM mit Proteoglykanen, Glykoproteinen, Glykoaminoglykanen und Kollagenen. Die elastischen Fasern und SMCs sind wichtig für die

Compliance und elastische Funktion der Aorta. An der Grenze von Media zu Adventitia findet sich die Membrana elastica externa. Die Adventitia besteht aus Fibroblasten, Kollagen und elastischen Fasern. Hier finden sich die Vasa vasorum sowie die lymphatische und nervale Innervation der Blutgefäße. Die Adventitia ist für die Stabilität der Aortenwand wichtig.³

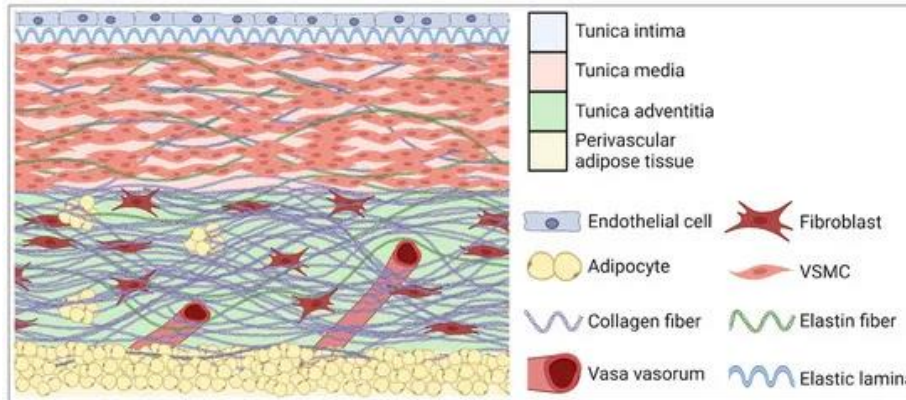


Abbildung 2: Mikroskopische Anatomie der Aortenwand⁴

(1) Extrazelluläre Matrix

Die Bestandteile der EZM können in vier große Gruppen, bestehend aus Elastin, Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen, eingeteilt werden.⁵ Elastin und Kollagen, welche von den SMCs produziert werden, sind essentiell für die mechanischen Eigenschaften der Aorta. Das dreidimensionale Elastin-Netz ist wichtig für die Elastizität und für die Verteilung von Druck, während das darin eingelagerte Kollagen zu einer passiven Wandspannung und begrenzter Wanddehnung bei steigendem intraluminären Druck führt.⁶ Darüber hinaus können elastische Fasern und fibrilläres Kollagen die Adhäsion, Proliferation und Migration von SMCs über Integrine beeinflussen. Glykosaminoglykane wie Hyaluron und Heparansulfat, können große Mengen an Wasser speichern und so einwirkenden Druck auf die Zellen mindern.³ Die Glykoproteine haben wichtige Funktionen bei der Zell-Matrix-Interaktion, wo insbesondere Fibronectin eine wichtige Rolle spielt. Auch Proteoglykane sind wichtig für Zell-Zell-Interaktionen, aber auch für einen ausgeglichenen Gehalt an Ionen.⁵

Die EZM unterliegt einem konstanten Umbau, wobei durch proteolytische Prozesse alte Proteine abgebaut werden und durch neu synthetisierte Proteine ersetzt werden. Für die proteolytischen Prozesse sind insbesondere Matrix-Metalloproteasen (MMPs) zuständig, aber auch andere Metalloproteinasen, wie A disintegrin and metalloprotease (ADAM), A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains (ADAM-TS) und Serin-/Cystein Proteinase sind hier relevant.

(2) Matrix-Metalloproteasen

MMPs sind zinkhaltige calciumabhängige Endopeptinasen, die eine wichtige Rolle in der Degradation der EZM besitzen.³ MMPs werden als pro-MMPs sekretiert und müssen, bevor sie ihre Funktion ausüben können, aktiviert werden. Dies kann durch Gewebe- oder

Plasmaproteinasen geschehen, auch bereits aktivierte MMPs sind hierbei relevant. Die MMP-Aktivität wird durch α -Makroglobulin und tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) inhibiert. Für die Degradation der aortalen EZM sind insbesondere die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 von Bedeutung, da sie unter anderem Kollagen und Elastin abbauen können.⁷ MMPs können darüber hinaus auch Transforming growth factor- β (TGF- β) aktivieren und mobilisieren und so einen Einfluss auf die Gewebemöostase haben.⁸ Auch können MMPs entzündliche Geschehen beeinflussen indem sie in den Stoffwechsel verschiedener inflammatorischer Zytokine wie Il-1 und TNF- α eingreifen.⁷ Synthetisiert werden MMPs unter anderem von SMCs, Fibroblasten, Neutrophilen und Makrophagen.⁹

(3) Vaskuläre glatte Muskelzellen

Die am häufigsten vorkommende Zellart in der Media der Aorta sind SMCs.¹⁰ SMCs werden durch Mikrofibrillen mit elastischen Fasern und somit der EZM verlinkt. Die entstehenden kontraktile-elastischen-Einheiten spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation der Media und beim Umgang mit mechanischem Stress der Gefäßwand.¹¹ Ihre Funktionen gehen über die Kontraktion und Relaxation zur Regulation des Aortendurchmessers und eines adäquaten Blutdrucks hinaus. Sie sind auch für die Synthese und Sekretion zahlreicher EZM-Bestandteile verantwortlich. Unterschiedlichen Funktionen der SMCs finden ihren Ausdruck in verschiedenen Phänotypen der SMCs, welche sich auf einem Spektrum von kontraktile bis synthetisch befinden. Für den kontraktile Phänotyp sind insbesondere Smooth muscle myosin heavy chain 11 (Myh11), Smooth muscle alpha-actin-2 (Acta2) und Transgelin (Tagln) kennzeichnend.¹² Im Gegensatz dazu weisen synthetische SMCs eine Vielzahl an synthetisch tätigen Organellen auf.¹³ Die SMC Differenzierung kann durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst werden, wie beispielsweise platelet derived growth factor (PDGF), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).¹² Darüber hinaus spielt TGF- β eine wichtige Rolle bei der SMC-Differenzierung bereits in der embryonalen Phase.¹⁴ Auch EZM-Bestandteile können einen Einfluss auf den SMC-Phänotyp haben. Während fibrilläres Kollagen eher zu einem kontraktilem Phänotyp führt, sorgt Fn1 für die Entwicklung eines synthetischen Phänotyps. Zusätzlich können auch Proteoglykane der EZM, wie Heparin oder Perlecan, den SMC-Phänotyp beeinflussen.¹²

(4) Transforming growth factor- β Signaling

Die TGF- β -Familie umfasst eine große Anzahl strukturell ähnlicher polypeptidaler Wachstumsfaktoren, welche unterschiedlichste zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Mobilität, Adhäsion und Zelltod beeinflussen können. Im Folgenden wird das Signaling von TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 besprochen. Sezerniert wird TGF- β als inaktives latentes TGF- β bestehend aus dem eigentlichen TGF- β , dem latency associated peptide (LAP) und dem latent TGF- β binding protein (LTBP). Das LAP ist essentiell für die Latenz des

Komplexes, während das LTBP entscheidend an der Sekretion, Lagerung in der EZM und Aktivierung von TGF- β beteiligt ist.¹⁵ LTBPs bestehen aus mehreren EGF-Domänen. Sie binden sowohl an TGF- β , wodurch dieses stabilisiert wird, als auch an das Fibrillin-1 (Fbn1) in den elastischen Fasern und tragen so zur Speicherung von TGF- β in der EZM bei. Zur Freisetzung von TGF- β von den elastischen Fasern tragen unter anderem inflammatorische proteolytische Prozesse bei. Darüber hinaus können auch Plasmin oder MMPs eine Freisetzung von TGF- β aus der EZM induzieren.¹⁶ Aktives TGF- β bindet an einen Komplex aus einem transmembranösen Typ I und Typ II Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor. Daraufhin phosphoryliert der Typ II Rezeptor den Typ I Rezeptor, welcher dann wiederum Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic (SMAD)-Proteine phosphoryliert. Die phosphorylierten SMAD-Komplexe können dann in den Nukleus eintreten, wo mit Partnerproteinen die Transkription von spezifischen Genen reguliert werden kann. Der Zugang zu Typ I und Typ II Rezeptoren kann durch Betaglykane oder Endogline, die als lösliche akzessorische Typ III Rezeptoren fungieren, reguliert werden.¹⁷ Nach Bindung an den Rezeptor kann es zu kanonischem oder nicht-kanonischem TGF- β Signaling kommen. Beim kanonischen Signalweg wird das Signal über SMAD2 und oder SMAD3, welche vom TGF- β -RI phosphoryliert werden, übertragen. Beim nicht-kanonischen Signalweg gibt es mehrere Möglichkeiten. Der wichtigste Weg involviert extracellular signal-regulated kinases (ERK)/ Mitogen-activated protein (MAP)-Kinase. Nach Phosphorylierung durch den TGF- β -RI kann ERK weitere Proteine und Transkriptionsfaktoren aktivierend phosphorylieren und somit Genexpression und Differenzierung regulieren.¹⁸

2.1.2. Thorakale Aortenaneurysmen

Bei thorakalen Aortenaneurysmen (TAA) handelt es sich um eine Erweiterung des Aortendurchmessers auf über 50% des physiologischen Durchmessers. Der Aortendurchmesser kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, darunter Alter, Geschlecht und Körpergröße.¹ TAAs kommen mit einer Inzidenz von 5,3 pro 100.000 Personen/Jahr vor.¹⁹ Sie sind zunächst meist asymptomatisch und werden als Zufallsbefund festgestellt. Bei einer Dissektion eines Aortenaneurysmas kommt es zu einer Störung der Media der Aorta aufgrund einer Einblutung in die Aortenwand. Meist geschieht dies in Folge eines Einrisses der Intima, welcher im Verlauf zur Auftrennung der Wandschichten der Aorta durch Einblutung in diese führt und somit ein wahres und ein falsches Lumen der Aorta entstehen lässt. Im weiteren Verlauf der Einblutung in die Aortenwand kommt es entweder zu einer Ruptur der Adventitia und somit der Aorta oder zu einem Wiedereintritt des falschen Lumens in das wahre Lumen der Aorta durch einen weiteren Einriss in der Intima.²⁰ Durch die Entstehung von wahrem und falschem Lumen kann es zu Malperfusion von abhängigem

Gewebe kommen.¹ Eine Dissektion führt, je nach Lokalisation, zu stärksten Schmerzen im Bereich von Brust, Nacken, Rücken oder Abdomen.² Dissektionen, die in der Ao. Asc. beginnen, werden nach Stanford als Typ A bezeichnet. Wenn die Dissektion nach der Abzweigung der linken A. subclavia beginnt, spricht man von einer Typ B Dissektion nach Stanford.¹⁰ Die Inzidenz von Dissektionen eines TAA liegt bei 3 bis 4 pro 100.000 Personen/Jahr, wobei die Mortalität bei einer Dissektion des TAAs hoch ist.²¹ Gefürchtet ist hier die Ruptur der Dissektion, die mit 80% einen großen Anteil an letal verlaufenden TAA-Dissektionen trägt. Die Inzidenz der Ruptur von TAAs beträgt 1,6 pro 100.000 Personen/Jahr, wobei die Mortalität bei Ruptur des TAA zwischen 97% und 100% liegt.^{19,22}

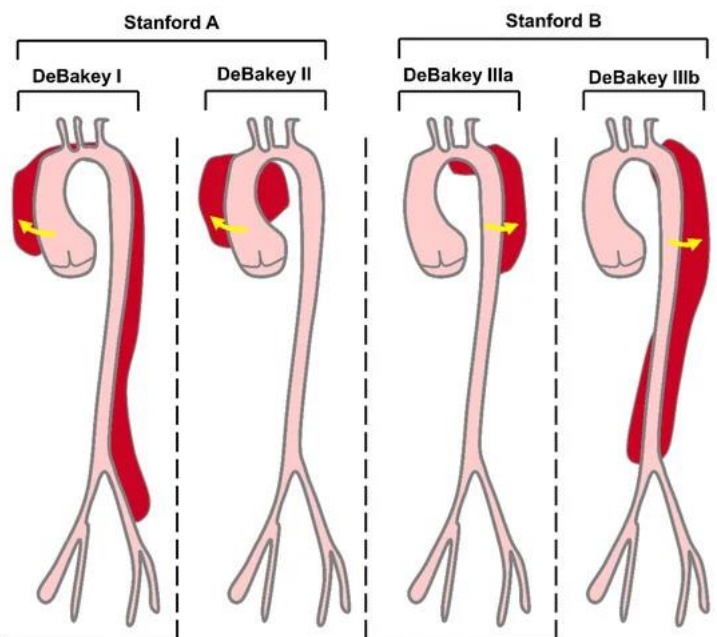


Abbildung 3: Einteilung von thorakalen Aortenaneurysmen²³

Zu den möglichen Komplikationen eines TAAs kann eine Aortenklappeninsuffizienz zählen.² Ursächlich für die entstehende Aortenklappeninsuffizienz ist die Erweiterung des Aortendurchmessers, wodurch die Segel der Aortenklappe nicht mehr adaptieren können und es zu einem Rückfluss von Blut in den linken Ventrikel kommt. Diese diastolische Volumenbelastung des linken Ventrikels kann zu einer diastolischen Herzinsuffizienz mit oder ohne reduzierter Pumpfunktion des linken Ventrikels führen.²⁴ Außerdem können bei großen TAAs Kompressionssymptome der umliegenden Strukturen, wie Ösophagus, Trachea oder der Nervus laryngeus recurrens auftreten.²

2.1.3. Ätiopathogenese von thorakalen Aortenaneurysmen

Der hauptsächliche Mechanismus bei der Entstehung von TAAs ist die Degeneration der zellulären und extrazellulären Bestandteile der Media. Dabei kommt es zu einem Ungleichgewicht von Produktion und Destruktion der EZM-Bestandteile, insbesondere von

Elastin und Kollagen. Ob auch ein Untergang von SMCs zur Atrophie der Media beiträgt, ist offen.²⁵

Zu denen für dieses Ungleichgewicht zugrundeliegenden Mechanismen zählen neben degenerativen, altersbedingten Prozessen auch hereditäre Erkrankungen. Die wichtigsten fünf sind hierbei das Marfan-Syndrom (MFS) mit Mutationen im Fbn1-Gen, das vaskuläre Ehlers-Dahnlos-Syndrom mit Mutationen von Kollagen-3 (Col3a1), das Loeys-Dietz-Syndrom mit Mutationen des TGF- β -Rezeptor-1 (TGF- β -R1) und TGF- β -R2, das Turner-Syndrom mit einer Monosomie X und familiäre TAAs und Dissektionen mit Mutationen in Myh11 oder Acta2.²⁶

2.2. Marfan-Syndrom

Das von Antonin Marfan, einem französischen Kinderarzt, 1896 erstmals beschriebene Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte, genetische Erkrankung des Bindegewebes und tritt mit einer Prävalenz von 1:5.000 auf.²⁷ Hervorgerufen wird die Bindegewebserkrankung durch eine Mutation im Fbn1-Gen. Hierbei werden aktuell verschiedene Mechanismen durch welche die Fbn1-Mutation den für das krankheitsbildtypischen Phänotyp hervorruft diskutiert.²⁸ Hierzu zählen ein negativ-dominantes Modell, wobei angenommen wird, dass das geschädigte Genprodukt die Fähigkeit besitzt das vom gesunden Allel hergestellte Genprodukt zu beeinflussen und so den Phänotypen hervorzurufen.²⁹ Darüber hinaus wird auch der Haploinsuffizienz des Wildtyp-Proteins eine Rolle in der Phänotypentstehung zugeschrieben.³⁰

2.2.1. Diagnostik und Symptome

Die klinischen Symptome des MFS sind von variabler Penetranz und können vielfältig in mehreren Organsystemen, wie dem muskuloskelettalen System, dem Auge, dem Nervensystem, der Lunge, der Haut und dem kardiovaskulären System auftreten.³¹

Zur Diagnostik wurden über die Jahre verschiedene Diagnosekriterien festgelegt. Zunächst wurden die diagnostischen Kriterien in der Berlin Nosologie festgehalten. Nach Überarbeitung dieser galt die Ghent Nosologie als Standard. Zuletzt wurde die Ghent Nosologie 2010 überarbeitet. Sie stellt den aktuellen Diagnosestandard dar, anhand dessen, mit Hilfe von festen Diagnosekriterien und einem Scoring System für die systemische Beteiligung, die Diagnose des MFS gestellt werden kann.³¹

Für die Diagnose eines MFS anhand der Ghent Nosologie muss eines der folgenden Kriterien erfüllt werden:

1. Aortendilatation mit Z-Score > 2 und Ektopie der Linse
2. Aortendilatation mit Z-Score > 2 und Fbn1-Mutation
3. Aortendilatation mit Z-Score > 2 und Systemischer Score über 7 Punkte (s.u.)
4. Ektopie der Linse und mit Aortendilatation assoziierte Fibrillin-1 (Fbn1) - Mutation

5. Ektopie der Linse und familiäre Anamnese eines MFS nach den Punkten 1 bis 4
6. Systemischer Score über 7 Punkte und familiäre Anamnese eines MFS nach den Punkten 1 bis 4
7. Aortendilatation mit Z-Score > 2 (älter als 20 Jahre) bzw. Z-Score ≥ 3 (jünger als 20 Jahre) und familiäre Anamnese eines MFS nach den Punkten 1 bis 4

Das Scoring System für die systemische Beteiligung beim MFS beinhaltet folgende Kriterien:

| Symptom | Punktzahl |
|---|-----------|
| Handgelenk- und Daumenzeichen positiv | 3 Punkte |
| Handgelenk- oder Daumenzeichen positiv | 1 Punkt |
| Kielbrust | 2 Punkte |
| Trichterbrust oder Thoraxasymmetrie | 1 Punkt |
| Hinterfuß Deformitäten | 2 Punkte |
| Plattfuß | 1 Punkt |
| Pneumothorax | 2 Punkte |
| Duralektasie | 2 Punkte |
| Protrusio acetabuli | 2 Punkte |
| Vermindertes Verhältnis von oberem Segment zu unterem Segment und vergrößertes Verhältnis von Armspannweite zu Körpergröße und keine schwerwiegende Skoliose | 1 Punkt |
| Skoliose oder thorakolumbale Kyphose | 1 Punkt |
| Reduzierte Extension des Ellenbogens | 1 Punkt |
| Gesichtsmerkmale (mindestens 3 von 5): <ul style="list-style-type: none"> - Dolichocephalie - Enophthalmus - Nach unten abweichende Lidachse - Molarhypoplasie - Retrognathie | 1 Punkt |
| Dehnungsstreifen | 1 Punkt |
| Myopie > 3 Dioptrien | 1 Punkt |
| Mitralklappenprolaps | 1 Punkt |

Tabelle 2: Scoring System für systemische Beteiligungen beim MFS

Für die Diagnosestellung einer systemischen Beteiligung müssen mindestens 7 Punkte von maximal 20 Punkten erreicht werden.³²

Die muskuloskelettalen Auffälligkeiten des MFS werden häufig zuerst entdeckt und legen den Verdacht eines MFS nahe.³¹ Viele von Ihnen werden im oben aufgeführten Scoring System für systemische Beteiligung bei MFS bereits erwähnt. Hierzu zählt das Daumenzeichen, bei dem

der Daumen des Patienten, wenn er in die Handfläche gelegt wird und danach eine Faust geformt wird, den ulnaren Handrand überragt. Auch das Handgelenkzeichen, bei dem bei Umschließen des einen Handgelenks mit der anderen Hand das Endglied des kleinen Fingers das Endglied des Daumens überragt gehört hierzu. Ebenfalls häufige Merkmale des MFS sind Thoraxauffälligkeiten mit Kielbrust, Trichterbrust oder Asymmetrien. Darüber hinaus kommen auch Fußdeformitäten, ein Extensionsdefizit des Ellenbogens, häufige Gelenkluxationen (besonders die Protrusio acetabuli) und Wirbelsäulenveränderungen mit Skoliose oder thorakolumbalen Kyphose gehäuft bei Patienten mit MFS vor. Zusätzlich zählt auch die Arachnodaktylie und eine reduzierte Knochendichte, eingehend mit erhöhtem Frakturrisiko, zu den mit dem MFS assoziierten muskuloskelettalen Symptomen.³³

Die geläufigsten kraniofazialen Dysmorphien, sowie die häufigste kutane Manifestation mit den Striae atrophicae³⁴, werden im Scoring System für systemische Beteiligung erfasst.

Okuläre Komplikationen des MFS umfassen neben der Ektopia lentis, welche bereits in den Diagnosekriterien auftaucht, sowie der Myopie, welche im Score für systemische Beteiligung berücksichtigt wird, auch eine abgeflachte Kornea und eine verlängerte Augachse.³⁵

Die wichtigste Manifestation vom MFS am Nervensystem ist die Duralektasie.³⁶ Der Pneumothorax ist eine der zu beachtenden pulmonalen Komplikation des MFS.³⁷

Die kardiovaskulären Komplikationen des MFS beinhalten eine Dilatation oder Dissektion der ascendierenden Aorta, mit oder ohne Aortenklappeninsuffizienz und einen Mitralklappenprolaps, mit oder ohne Mitralklappeninsuffizienz.³⁸ Insbesondere die aortale Pathologie führt zu einer häufig reduzierten Lebenserwartung von MFS-Patienten.³⁹

2.2.2. Therapie

Trotz intensiver Forschung konnte der Pathomechanismus der TAA-Entwicklung bisher nicht endgültig entschlüsselt werden, was auch die therapeutischen Optionen einschränkt. Aktuelle Therapieoptionen umfassen die Gabe von β -Blockern, welche die Vergrößerung des Aortendurchmessers verlangsamen und die Komplikationsrate verringern.⁴⁰ Vergleichbare Effekte konnten auch für Losartan nachgewiesen werden, einem Angiotensin-2 (AT-2)-Rezeptorblocker, welcher sowohl in Studien an Mäusen als auch in Studien an Menschen ein reduziertes Wachstum von TAAs hervorrief.^{41,42} Spätestens bei einem Durchmesser der Ao. Asc. > 50mm sollte ein operativer Ersatz der Aorta erfolgen, bei zusätzlich vorliegenden Risikofaktoren, wie Dissektionen in der Familienhistorie, Wachstum >3mm pro Jahr, schwerer Aorteninsuffizienz oder Schwangerschaftswunsch kann schon ab >45mm ein Aortenersatz erwogen werden.²⁰ Zusammenfassend sind die aktuellen Therapieoptionen auf eine Verlangsamung des Progresses begrenzt und können die Entwicklung von TAAs nicht verhindern. Daher ist ein Ziel dieser Arbeit, die Pathogenese der TAAs im MFS weiterführend zu entschlüsseln, um neue therapeutische Ansätze zu ermöglichen.

2.2.3. Pathophysiologie des Marfan Syndrom

(1) Fibrillin-1

Die Grundlage des MFS sind Mutationen in Fbn1, wobei es sich dabei zum Großteil um Missense-Mutationen handelt, aber auch Frameshift-, Nonsense- und Splicing-Mutationen sowie Inframe Deletionen und Insertionen können vorkommen. Die meisten Mutationen betreffen eine epidermal growth factor (EGF)-Domäne, es kommen aber auch Mutationen in einer Bindedomäne von TGF vor.²⁸ Die für das MFS ursächlichen Mutationen liegen auf Chromosom 15q15-21.3.⁴³

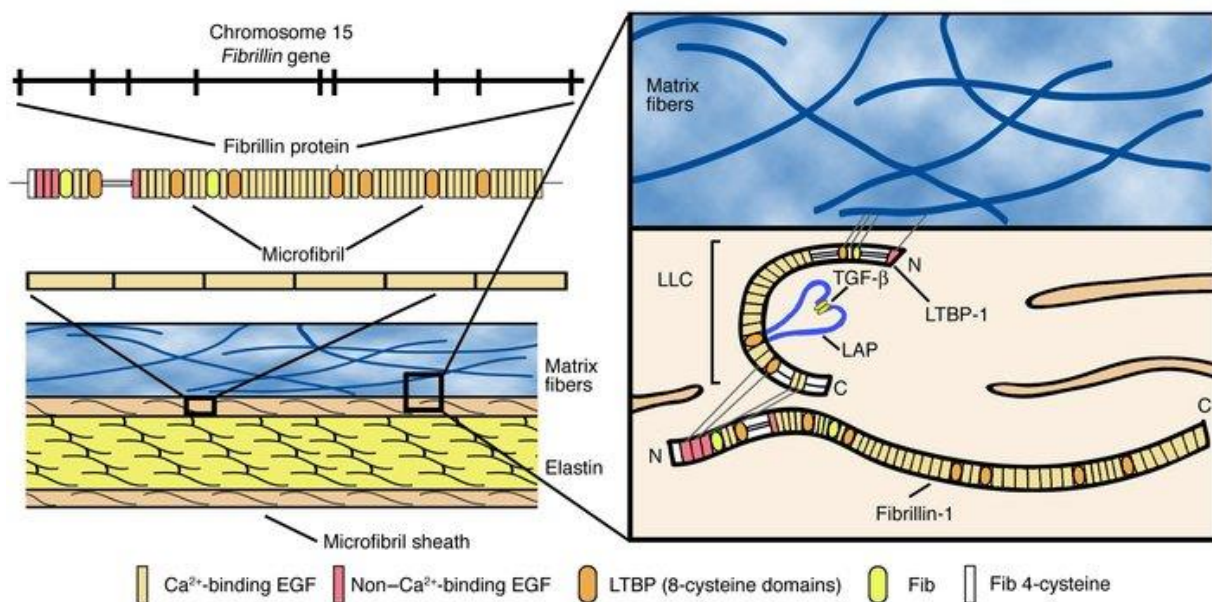


Abbildung 4: Fibrillin-1⁴⁴

Fbn-1 ist ein 350 kDa großes Glykoprotein und ein Strukturelement in Mikrofibrillen, welche im Bindegewebe verschiedener Organsysteme, wie beispielsweise Aorta, Haut, Knorpel, Kornea und Zonulafasern vorkommen.⁴⁵ Es besteht aus 46 bis 47 EGF-Domänen, welche darüber hinaus auch in vielen anderen Proteinen der EZM und des Serums erscheinen und Calcium binden können. Zusätzlich weist Fbn-1 eine TGF- β Bindungsstelle auf, welche auch in Fbn-1 und LTBP-1 vorhanden ist und aus acht Cysteinen besteht.⁴⁶ Die Fibrillin-Monomere werden zu Mikrofibrillen polymerisiert, in denen sich zusätzliche Proteine finden und welche eine starke Assoziation zum Elastin von elastischen Fasern haben. Als Strukturelement erfüllen sie verschiedene mechanische Ansprüche in unterschiedlichen Organsystemen und begünstigen unter anderem die Elastizität der Aortenwand.⁴⁷

(2) Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Marfan Syndrom

Die EZM-Bestandteile spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von TAAs, denn sowohl die Fragmentierung von Elastin als auch die Versteifung der Aortenwand durch ein

gesteigertes Vorkommen von Kollagen führen zu Aneurysmenbildung und erhöhter Dissektionsgefahr. Eine Veränderung in der Zusammensetzung von Proteoglykanen und Glykoproteinen kann zu Veränderung in der Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Matrix-Kommunikation führen und dadurch die SMCs in Ihrer Synthesetätigkeit, Proliferation und Migration beeinflussen.³ Proteoglykane sind aufgrund ihrer biophysikalischen Funktionen, welche zur Strukturierung der elastischen Fasern, Druckabsorbierung und Hydrierung der Media der Aorta beitragen essentielle Bestandteile einer normalen intakten Aortenwand. Es konnte gezeigt werden, dass in TAAs Aggrecan und Versican akkumuliert vorliegen, einerseits durch eine gesteigerte Produktion dieser, andererseits durch eine Reduktion ihres proteolytischen Abbaus. Diese Akkumulation kann zum einen zu einem gesteigerten osmotischen Druck in der Aortenwand führen, wodurch SMCs mechanisch maladaptieren und darüber hinaus den Kontakt zu anderen Zellen verlieren können und im weiteren Verlauf einen Zelltod durch Anoikis erfahren.⁴⁸ Des Weiteren spielen Hyaluronan und Versican eine entscheidene Rolle bei der Mitosetätigkeit und somit auch der Proliferation von SMCs.⁴⁹

In MFS-Patienten konnte ein erhöhtes Vorkommen elastolytischer MMPs nachgewiesen werden, was zu einer gesteigerten Elastin-Fragmentierung führt und dadurch für die TAA-Entstehung relevant ist.⁹ Unterstützt wird die These, dass MMP-induzierte Elastin-Fragmentierung für die TAA-Entstehung relevant ist, durch den Nachweis, dass Doxycyclin, als unspezifischer MMP-Inhibitor, die Ruptur von Aneurysmen in einem MFS-Mausmodell herauszögern kann.⁵⁰

Durch oben beschriebene Veränderungen der EZM verlieren die SMCs ihren Kontakt zu anderen Zellen und umliegenden Gewebe. Dies leitet eine phänotypische Veränderung der SMCs ein.⁵¹ Für SMCs in Aorten von Mäusen mit MFS konnte als Reaktion auf diese EZM- und Zell-Zell-Kontakt-Veränderungen ein eher synthetischer als kontraktiver Phänotyp der SMCs festgestellt werden.⁵² In einem MFS-Mausmodell konnten unter anderem Elastin (Eln) und Fn1 als starke Marker für diesen Wandel des SMC-Phänotyps nachgewiesen werden. Auch konnte eine gesteigerte Expression von Kollagen durch modifizierten, eher synthetischen SMCs nachgewiesen werden.⁵³ Darüber hinaus ist eine erhöhte Produktion von Eln sowie MMPs mit der Destruktion der EZM assoziiert,⁵¹ was die Rolle von SMCs bei der Pathogenese von TAAs unterstreicht. Für den beobachteten Unterschied im SMC-Phänotyp konnten tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Tnfrsf11b) und Kruppel-like factor 4 (Klf4) als Marker des Phänotypswitchs identifiziert werden.⁵³

(3) Transforming growth factor- β Signaling

Der Mechanismus des TGF- β Signaling im MFS ist komplex, wobei sich MFS und das TGF- β -Signaling wechselseitig beeinflussen. Es gibt sowohl Hinweise darauf, dass das MFS ursächlich für die Veränderungen im TGF- β -Signaling sind, als auch darauf, dass das TGF- β -Signaling einen Einfluss auf die Entstehung des MFS hat. Einerseits führt das MFS durch die

Verminderung des Fbn1-assoziierten Anteils an Mikrofibrillen und die Fragmentation der Mikrofibrillen-assoziierten elastischen Fasern in der EZM zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von TGF- β und somit verstärktem TGF- β Signaling.¹⁶ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch TGF- β Neutralisierung mit Antikörpern die Entwicklung von TAAs im MFS verhindert werden kann, was die Bedeutung des TGF- β Signaling als möglichen therapeutischen Ansatzpunkt bei MFS-assoziierten TAAs unterstreicht.⁴¹ Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass die Neutralisation von TGF- β in frühen Entwicklungsstufen von Mäusen die TAA-Pathologie verschlimmern kann.⁵⁴

In SMCs spielt TGF- β eine wichtige Rolle bei zahlreichen Prozessen, darunter Differenzierung, Wachstum und Migration. Darüber hinaus vermittelt TGF- β bei der Kommunikation zwischen Endothelzellen und SMCs, denn SMCs können sich aufgrund von durch Endothelzellen produziertem TGF- β differenzieren oder vascular endothelial growth factor (VEGF) produzieren.¹⁷

(4) Inflammation

In der Aortenwand von TAAs können vermehrt entzündliche Prozesse ablaufen, deren Rolle in der Pathogenese allerdings noch nicht abschließend aufgeklärt ist. Es kann hierbei zu einer vermehrten Infiltration von Immunzellen in der Media der Aorta kommen, wobei die räumliche Nähe von Immunzellen und SMCs für eine Interaktion der beiden Zelltypen bei der Entstehung von TAAs spricht.⁵⁵ Auch im MFS kann eine gesteigerte Infiltration von Immunzellen in die Media und Adventitia der Aorta nachgewiesen werden. Die Infiltration von Immunzellen ist nicht nur gegenüber Aorten ohne Aneurysmen verstärkt, sondern auch gegenüber Aorten mit sporadischen Aneurysmen.⁵⁶ Darüber hinaus kann im Mausmodell ein erhöhtes Vorkommen von inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-6 (Il-6), in der Media von MFS-Aorten festgestellt werden. Ein Knock-out von Il-6 führt zu einer Reduktion von MMPs, einer Perseveration der EZM und geringeren Progression der Aortendilatation.⁵⁷

ROS entstehen unter anderem durch die Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu einem Superoxid Anion (O_2^-) durch NADPH Oxidasen (NOX). In weiteren enzymatischen Reaktionen entsteht aus dem Superoxid Anion Wasserstoff Peroxid (H_2O_2). NOX kommen sowohl in zahlreichen Immunzellen vor, wie beispielsweise Makrophagen und Neutrophilen⁵⁸, als auch Zellen der großen Blutgefäße, wie SMCs oder vaskulären Fibroblasten.⁵⁹ ROS führen zu einem vermehrten oxidativen Stress und einer erhöhten Produktion von TGF- β .⁶⁰ Darüber hinaus folgt aus einem erhöhten Vorkommen von ROS eine verminderte Kollagensynthese, sowie eine gesteigerte Aktivität von MMPs.⁶¹ Reibungskräfte in der Gefäßwand führen zu einer Aktivierung von NOX2, welches für die Aktivierung von Makrophagen und die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen notwendig ist. Daher wird vermutet, dass NOX2 ein Faktor bei vaskulären entzündlichen Geschehen ist.⁶² Auch bei MFS kann in der Aorta verstärkt ROS

nachgewiesen werden und eine Inhibition von ROS führt zu einer Reduktion der EZM-Destruktion und Proteaseaktivität sowie reduzierte Aneurysmenbildung.⁶³

TNF- α ist ein Glykoprotein, welches eine wichtige Rolle bei diversen Prozessen rund um Inflammation, Infektion und malignen Prozessen spielt. Produziert wird TNF- α vordringlich von Makrophagen und T-Lymphozyten, aber auch von anderen Immunzellen, wie Mastzellen, B-Lymphozyten, natürlichen Killer-Zellen und Neutrophilen. Darüber hinaus können auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen und Fibroblasten TNF- α herstellen.⁶⁴

Die Bindung von TNF- α an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) führt zu verschiedenen intrazellulären Prozessen, welche vor allem mit dem Zellüberleben, Zellwachstum und Entzündungen in Verbindung stehen. Darüber hinaus kann die Bindung von TNF- α an den TNFR zum Zelltod führen und zwar in Form von Apoptose und Nekroptose.⁶⁵ Die Exposition mit TNF- α kann zu strukturellen Veränderungen von Zellen und der umgebenden Matrix führen und so Zellmigration beeinflussen. In SMCs kann sich durch den Einfluss von TNF- α das Zytoskelett verändern und die SMCs können durch TNF- α zu Migration in inflammatorische Umgebung angeregt werden.⁶⁶ In entzündlichen Aorten-Erkrankungen kann bei TNF- α -Blockade eine Verbesserung der elastischen Funktion der Aorta festgestellt werden.⁶⁷ Daher ist eine mögliche Überlegung, ob auch im oben beschrieben entzündlichen Milieu der Aorta bei MFS TNF- α eine Rolle zur TAA-Pathogenese beiträgt.

2.3. Mixed Lineage Kinase domain-Like

2.3.1. Nekroptose

Nekroptose gehört, wie auch die Apoptose, zu den regulierten Formen des Zelltods. Sie wird wie Ferroptose oder Pyroptose zu den regulierten Nekrosen gezählt.⁶⁸

Aktiviert werden kann Nekroptose über verschiedenen Wege wie beispielsweise Zytokine oder Pathogene wie Viren und Bakterien. Die Bindung von Liganden an pattern recognition receptors (PRR), toll-like receptors (TLR) oder Z-DNA binding protein 1 (ZBP1) kann ebenfalls den Nekroptose-Signalweg aktivieren. Der wohl wichtigste Aktivator von Nekroptose ist TNF- α . Über nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) wird ein proinflammatorischer nekroptotischer Signalweg angestoßen.⁶⁹

Wichtige Moleküle des nekroptotischen Signalwegs sind unter anderem Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1), die RIP homotypic interaction motif (RHIM) und Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3). Der Signalweg von Nekroptose wird eingeleitet, wenn nach Bindung von TNF- α an den TNFR, in Abwesenheit oder Inaktivität von Caspase 8, RIPK1 sich über die RHIM mit RIPK3 verbinden kann und sich diese beiden Moleküle dadurch auto- und transphosphorylieren. RIPK1 und RIPK3 bilden dann

einen mikrofibrillen-ähnlichen Komplex, das Nekrosom. Daraufhin phosphoryliert RIPK3 Mixed Lineage Kinase domain-Like (MLKL) an den beiden Stellen Thr357 und Ser358 und aktiviert dieses dadurch. Bei der Maus unterscheiden sich die Phosphorylierungsstellen von denen des Menschen und finden sich bei Serin345, Serin347, Serin352 und Threonin349.⁶⁸ In Folge der Assoziation von phosphorylierten MLKL mit dem Nekrosom kommt es zu einer Bindung des Nekrosoms an membran-assoziierte Phosphatidylinositol-Phosphate und infolgedessen zur Unterbrechung der Integrität der Plasmamembran der Zelle. Durch die Zerstörung der Plasmamembran werden durch endosomal sorting complexes required for transport-II (ESCRT-II) reguliert Damage-associated molecular pattern (DAMPs) freigesetzt, welche zu einer Immunreaktion der Umgebung führen. Des Weiteren kann das Nekrosom die Bildung von ROS anregen, wodurch es stabilisiert wird.⁷⁰

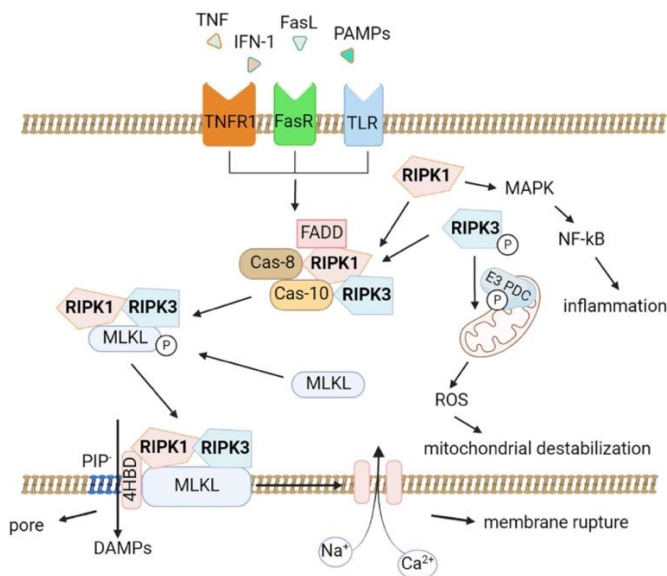


Abbildung 5: Schematische Darstellung des nekroptotischen Signalwegs⁷¹

Somit ist MLKL der Endpunkt verschiedener inflammatorischer Signalkaskaden und führt nicht nur zu Nekroptose assoziierten Membranschäden sondern auch zu einer Aktivierung von einem Inflammasom.⁷² Das Inflammasom kann dann weitere inflammatorische Signalkaskaden anstoßen und eine Reaktion des Immunsystems hervorrufen.⁷³

(1) Nekroptose in inflammatorischen Erkrankungen

Nekroptose kann eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Verstärkung chronischer Inflammation spielen, da viele Zytokine wie TNF- α , die bei inflammatorischen Vorgängen im Gewebe zirkulieren, auch Induktoren von Nekroptose sind. Es kann ein Teufelskreis aus Zelltod, der Freisetzung von DAMPs, Immunzellaktivierung und weiterer Zytokinfreisetzung zu einem prolongierten Entzündungsgeschehen bei chronischen inflammatorischen Erkrankungen kommen.⁷⁴ Für chronisch entzündliche Darmerkrankungen konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass mit RIPK3 und MLKL verstärkte Moleküle des nekroptotischen Signalwegs vorliegen und somit mögliche therapeutische Ziele sein können.⁷⁵

Auch in entzündlichen Hautkrankheiten ist Nekroptose von Bedeutung in der Pathogenese. Ein Knock-out von RIPK3 führt zu einem vollständigen Ausbleiben von nekroptotischem Zelltod von Keratinozyten.⁷⁶ Darüber hinaus kann dargestellt werden, dass durch das Fehlen von RIPK3 Mäuse vor hepatischen Entzündungsvorgängen geschützt sind.⁷⁷ Auch in anderen Zusammenhängen wurde die Relevanz von Nekroptose gezeigt, wie beispielsweise bei ischämischen Schlaganfällen und neurodegenerativen Erkrankungen, sowie chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen und ARDS, Organtransplantationen und akuten Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Pankreatitis und Infektionen.⁷⁸ Beim Remodeling nach Myokardinfarkt spielt Nekroptose ebenso eine wichtige Rolle. Mäuse mit Nekroptosedefizienz zeigen bessere Ejektionsfraktionen, sowie eine geringere Narbenbildung und weniger inflammatorisches Geschehen.⁷⁹

Für abdominale Aortenaneurysmen (AAA) in einem murinen Modell ist bereits belegt, dass deren Entstehung durch den Knockout verschiedener Moleküle des nekroptotischen Signalwegs, wie MLKL und RIPK1, verhindert werden kann.⁸⁰ Der Nekroptose-Inhibitor Necrostatin-1 kann in Mäusen sowohl in einem Modell mit Elastase-induzierten AAA, als auch mit Angiotensin-induzierten AAA, den Untergang von SMCs durch Nekroptose verhindern und somit die Entwicklung von AAA abschwächen.⁸¹

2.3.2. Extrazelluläre Vesikel und endosomaler Vesikeltransport

Neben seiner Funktion in der nekroptotischen Signalkaskade konnten weitere Zelltod-unabhängige Aufgaben von MLKL nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass MLKL RIPK3-abhängig und RIPK3-unabhängig einen Einfluss auf den endosomalen Vesikeltransport hat. Zellen in denen MLKL durch RIPK3 phosphoryliert wurde, wiesen eine deutlich gesteigerte Bildung von extrazellulären Vesikeln, sowie einen verstärkten endosomalen Vesikeltransport auf. In Abwesenheit von RIPK3 konnten diese Funktionen von MLKL weiterhin auf einem basalen Niveau nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich, dass bei einer Mutation von MLKL an den Stellen T537 und S358 diese Aufgaben nicht mehr ausgeführt werden konnten. Darüber hinaus, konnte ebenfalls dargestellt werden, dass wenn MLKL nicht durch RIPK3 aktiviert wurde, der endosomale Transport und die lysosomale Degradierung von unter anderem TNF und EGFR reduziert stattfinden.⁸²

2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der MLKL-Defizienz auf die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen beim MFS zu untersuchen. Dabei wird zunächst der Einfluss von MLKL-Defizienz auf die vaskuläre Inflammation und strukturelle Integrität von MFS-assoziierten TAA untersucht.

1. Zur Untersuchung der vaskulären Inflammation wird eingangs das Vorkommen von inflammatorischen Zellen und ROS in der Aortenwand bestimmt. Um die Auswirkung auf die strukturelle Integrität der Aorta zu ermitteln, werden die elastischen Fasern und das Vorkommen von MMPs beleuchtet.
2. Zusätzlich wird der Einfluss von MLKL-Defizienz auf den Phänotyp von vaskulären glatten Muskelzellen genauer untersucht. Hierzu werden relevante Gene mittels qPCR im Aortengewebe untersucht und eine SMC-Zellkultur etabliert, die eine Stimulation der Zellen mit TGF- β und TNF- α ermöglicht. Anschließend wird das genetische Profil der SMCs ebenfalls mittels qPCR analysiert.
3. Der dritte Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von MLKL-Defizienz auf Veränderungen des TGF- β -Signalwegs in aortalem Gewebe und Zellkultur. Neben qPCR-Analysen von aortalem Gewebe und Zellkulturen mit und ohne Stimulation werden immunhistochemische Färbungen zur Darstellung von Teilen des TGF- β -Signalwegs durchgeführt.

2.5. Vorarbeiten

Um den Einfluss von MLKL-Defizienz auf das MFS zu überprüfen hat der Kollege cand. Med. Oscar Zimmermann bereits einige Versuche durchgeführt. Dafür wurde ein Mausmodell aus 6 verschiedenen Genotypen etabliert. Dieses umfasst Wildtyp-Tiere (im folgenden WT; Fbn1^{+/+}, Mkl^{+/+}) ohne jegliche Mutation, Mäuse mit homozygoter MLKL-Mutation (im folgenden pMLKL; Fbn1^{+/+}, Mkl^{S345/7A/S345/7A}) oder homozygoter MLKL-Knockout (im folgenden MLKL KO; Fbn1^{+/+}, Mkl^{-/-}), Mäuse mit Marfan-Syndrom (im folgenden MFS; Fbn1^{+C1041G}, Mkl^{+/+}) und Mäuse mit MFS und homozygoter MLKL-Mutation (im folgenden pDKO; Fbn1^{+C1041G}, Mkl^{S345/7A/S345/7A}) oder MFS und homozygoter MLKL-Knockout (im folgenden DKO KO; Fbn1^{+C1041G}, Mkl^{-/-}). All diese verschiedenen Genotypen begründen Ihre Notwendigkeit darin, dass es so möglich ist sowohl den individuellen als auch den kombinierten Einfluss jeder Mutation zu untersuchen. In bisher unveröffentlichten Vorarbeiten wurden diese Mäuse zum Zeitpunkt von 12 Wochen echokardiographisch untersucht. Es konnte dargestellt werden, dass der Durchmesser des Aortenbulbus in den pMLKL Tieren mit durchschnittlich 1,838mm signifikant größer war als der von den WT-Tieren mit 1,685mm (p=0,0148). Zusätzlich zeigte sich eine signifikant ausgeprägtere Dilatation bei den MFS-Tieren mit durchschnittlich 1,991mm gegenüber den WT (p<0,0001) und pMLKL Tieren (p=0,0046). Die pDKO-Tiere wiesen mit 2,224mm den größten Durchmesser des Aortenbulbus auf, welcher auch im Vergleich zu dem der WT (p<0,0001), pMLKL (p<0,0001) und MFS Tiere (p<0,0001) signifikant größer war. Zwischen den pMLKL (1,838mm) und MLKL KO (1,785mm) Tieren (p=0,9064), sowie den pDKO (2,224mm) und DKO KO (2,237mm) Tieren konnte kein Unterschied festgestellt werden (p=0,9998), weshalb im Folgenden für die ultrastrukturellen Analysen nur die Tiere mit der

MLKL-Mutation (pMLKL) und nicht auch die Tiere mit MLKL-Knockout (MLKL KO) verwendet wurden.

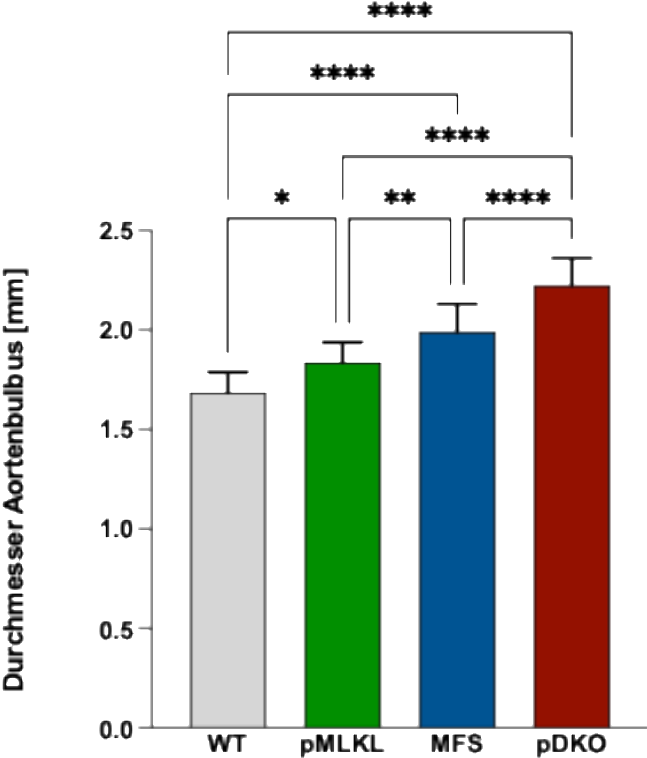


Abbildung 6: Durchmesser des Aortenbulbus in der Sonografie (n=10, 17, 15, 18; * p<0,05, ** p<0,01, **** p<0,0001), mit freundlicher Genehmigung von cand. med. Oscar Zimmermann

3. Material und Methoden

3.1. Material

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| 2-Propanol | Sigma |
| Aceton | ROTH |
| Albumin Fraktion V | ROTH |
| Ampuwa | Fresenius Kabi |
| Bupresol vet. 0,3mg/ml | Cp-pharma |
| CaCl ₂ | ROTH |
| Chloroform | SIGMA-Aldrich |
| Collagenase I | EMP Millipore Corp. |
| cOmplete Tablets (Protease Inhibitor Cocktail Tablets) | Roche |
| DAPI | SIGMA-Aldrich |
| DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX-I | gibco |
| DQ gelatin from pig skin, fluorescein conjugate | invitrogen |
| Elastase (from porcine pancreas, 9,7mg Protein/ml, 4 units/mg Protein) | Sigma-Aldrich |
| Ethanol (80%, 96%, 100%) | ROTH |
| Eukitt | SIGMA |
| Fetal Bovine Serum | SIGMA |
| Go Taq qPCR Master Mix | Promega |
| Goat-Serum | gibco |
| HBSS inkl. CaCl ₂ und MgCl ₂ | gibco |
| HCl 1M | ChemSolute |
| HCl 37% | ROTH |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Appliedbiosystems, Thermofisher Scientific |
| ImmEdge Pen | Vector Laboratories |
| Isofluran | Piramal Critical Care |
| MiniCollect Tube EDTA, Lithium Heparin | Greiner Bio-One |
| Mono-Natriumcitrat | ROTH |
| mTGF-β1 (Maus) | R&D systems |
| NaCl | BRAUN |
| NaN ₃ | ROTH |

| | |
|--|----------------------------------|
| Nuclease-freies Wasser | Promega |
| PBS Tablets | Gibco, Life Technologies Limited |
| Penicillin-Streptomycin | Sigma-Aldrich |
| PFA (4% in PBS) | Sigma-Aldrich |
| PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) | Roche |
| Plasmocin treatment 50mg | InvivoGen |
| ProLong Gold antifade reagent | invitrogen |
| Quiazol | Qiagen |
| Resorchin-Fuchsin-Färbelösung nach Weigert | ROTH |
| RNeasy Plus Micro Kit | Qiagen |
| Tissue-Tek | Sakura |
| TNF-α (Maus) | MedChemExpress |
| Tris | ROTH |
| Trypsin-EDTA Solution | SIGMA |
| Trypsin-Inhibitor from soybean | Roche Diagnostics GmbH |
| Tween 20 | Sigma |
| Vector TrueVIEW Autofluorescence Quencing Kit with DAPI | BIOZOL |
| Zitronensäure-Monohydrat | ROTH |

Tabelle 3: Material

3.1.1. Antikörper

| Ziel-Antigen | Typ | Spezies des Spendertiers | Klon | Hersteller | Verdünnung |
|--|------------|--------------------------|---------------|----------------------------|------------|
| CD45 | monoklonal | Ratte | I3/2.3 30-F11 | BioLegend | 1 : 500 |
| Alexa Fluor 594 anti-mouse CD68 | monoklonal | Ratte | FA-11 | BioLegend | 1 : 200 |
| P44/42 MAPK (ERK 1/ 2) | Polyklonal | Hase | - | Cell Signaling | 1 : 500 |
| NOX2/gp91phox | Monoklonal | Hase | EPR6991 | abcam | 1 : 100 |
| TGF-β-Rezeptor 1 | Polyklonal | Hase | - | Santa Cruz Biotechnologies | 1 : 500 |

Tabelle 4: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

| Bezeichnung | Spezies des Spendertiers | Wellenlänge | Hersteller | Verdünnung |
|------------------------------------|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Alexa Fluor 488 anti-rabbit | Ziege | 488nm | Invitrogen | 1 : 500 |
| Alexa Fluor 594 anti-rabbit | Ziege | 594nm | Invitrogen | 1 : 500 |
| Alexa Fluor 594 anti-rat | Ziege | 594nm | Invitrogen | 1 : 500 |

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

3.1.2. Primer

| Gen | Sequenz | Spezies | Hersteller |
|-------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| Acta2_for | TGCTGACAGAGGCACCACTGAA | Maus | Eurofins Genomics |
| Acta2_rev | CAGTTGTACGTCCAGAGGCATAG | Maus | Eurofins Genomics |
| Casp3_for | GGAGTCTGACTGGAAAGCCGAA | Maus | Eurofins Genomics |
| Casp3_rev | CTTCTGGCAAGCCATCTCCTCA | Maus | Eurofins Genomics |
| Ccn2_for | TGCGAAGCTGACCTGGAGGAAA | Maus | Eurofins Genomics |
| Ccn2_rev | CCGCAGAACTTAGCCCTGTATG | Maus | Eurofins Genomics |
| Col1a1_for | CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC | Maus | Eurofins Genomics |
| Col1a1_rev | CAGAAGGACCTTGTGGCCAGG | Maus | Eurofins Genomics |
| Col3a1_for | GACCAAAAGGTGATGCTGGACAG | Maus | Eurofins Genomics |
| Col3a1_rev | CAAGACCTCGTGCTCCAGTTAG | Maus | Eurofins Genomics |
| Eln_for | TCCTGGGATTGGAGGCATTGCA | Maus | Eurofins Genomics |
| Eln_rev | ACCAGGCACTAAACCTCCAGCA | Maus | Eurofins Genomics |

| | | | |
|--|-------------------------|------|----------------------|
| Fn1_for | CCCTATCTCTGATACCGTTGTCC | Maus | Eurofins Genomics |
| Fn1_rev | TGCCGCAACTACTGTGATTCGG | Maus | Eurofins Genomics |
| Gapdh_for | CATCACTGCCACCCAGAAGACTG | Maus | Eurofins Genomics |
| Gapdh_rev | ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG | Maus | Eurofins Genomics |
| Lox_for | CATCGGACTTCTTACCAAGCCG | Maus | Eurofins Genomics |
| Lox_rev | GGCATCAAGCAGGTCATAGTGG | Maus | Eurofins Genomics |
| Mmp2_for | CAAGGATGGACTCCTGGCACAT | Maus | Eurofins Genomics |
| Mmp2_rev | TACTCGCCATCAGCGTTCCCAT | Maus | Eurofins Genomics |
| Mmp9_for | GCTGACTACGATAAGGACGGCA | Maus | Eurofins Genomics |
| Mmp9_rev | TAGTGGTGCAGGCAGAGTAGGA | Maus | Eurofins Genomics |
| Pai1_for | CCCCACGGAGATGGTTATAG | Maus | Eurofins Genomics |
| Pai1_rev | ATCACTTGGCCCATGAAGAG | Maus | Eurofins Genomics |
| Tagln_for | GCAGATGGAACAGGTGGCTCAA | Maus | Eurofins Genomics |
| Tagln_rev | CCCAAAGCCATTAGAGTCCTCTG | Maus | Eurofins Genomics |
| Tgf-β- Rezeptor1_for | TGCTCAAACCACAGAGTAGGC | Maus | Eurofins Genomics |
| Tgf-β- Rezeptor1_rev | CCCAGAACACTAAGCCCATTGC | Maus | Eurofins Genomics |
| Tnfrsf11b_for | CGGAAACAGAGAAGCCACGCAA | Maus | Eurofins Genomics |
| Tnfrsf11b_rev | CTGTCCACCAAAACTCAGCC | Maus | Eurofins Genomics |

Tabelle 6: qPCR Primer

3.1.3. Mauslinien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------------|--|
| Fbn1^{+C1041G} | The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, Vereinigte Staaten) |
| Mikl^{S345/7A/S345/7A} | Prof. Dr. Manolis Pasparakis, Institut für Genetik, Universität zu Köln, Deutschland |
| Mikl^{-/-} | Prof. Dr. Manolis Pasparakis, Institut für Genetik, Universität zu Köln, Deutschland |

Tabelle 7: Mauslinien

3.2. Methoden

3.2.1. Mausmodell

Für die Versuche wurden Mäuse aus der Mauslinie Fbn1^{+C1041G}, welche kommerziell bei The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, Vereinigte Staaten) erworben wurden, mit Mäusen der Mikl^{S345/7A/S345/7A} Mauslinie oder Mäusen der Mauslinie Mikl^{-/-} gekreuzt, welche uns von Prof. Dr. Manolis Pasparakis (Institut für Genetik, Universität zu Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Mit dem Inzuchtstammverfahren wurden die Mäuse der oben genannten Mauslinien zur Generierung der gewünschten sechs Genotypen generiert:

- Wildtyp (im folgenden WT; Fbn1^{+/+}, Mikl^{+/+})
- homozygote MLKL-Mutation (im folgenden pMLKL; Fbn1^{+/+}, Mikl^{S345/7A/S345/7A}) oder homozygoter MLKL-Knockout (im folgenden MLKL KO; Fbn1^{+/+}, Mikl^{-/-})
- Marfan-Syndrom (im folgenden MFS; Fbn1^{+C1041G}, Mikl^{+/+})
- MFS und homozygote MLKL-Mutation (im folgenden pDKO; Fbn1^{+C1041G}, Mikl^{S345/7A/S345/7A}) oder MFS und homozygoter MLKL-Knockout (im folgenden DKO KO; Fbn1^{+C1041G}, Mikl^{-/-}).

Die Notwendigkeit der Verwendung von sechs Genotypen besteht darin, dass derart einzelne Effekte der jeweiligen genetischen Mutation separat betrachtet werden können, aber auch die kumulierten Effekte der MFS-Mutation und MLKL-Mutation, beziehungsweise des MLKL-Knockouts feststellbar sind.

Die C1041G-Mutation gilt als anerkanntes Mausmodell zur Untersuchung der Auswirkung von MFS, wobei es zu einem Austausch von Cystein zu Glycin am Exon 25 im Fbn1-Gen kommt, welches für eine EGF-Domäne kodiert. Es zeigen sich ähnliche histopathologische Vorgänge im Vergleich zu älteren MFS-Mausmodellen, wie beispielsweise dem Δ mg/ Δ mg- oder dem mgR/mgR-Mausmodell. Insbesondere die Alteration der Mikrofibrillen und die Fragmentation von elastischen Fasern sind auffallende Veränderungen der genetisch veränderten Mäuse.^{30,83,84} Darüber hinaus kommt es auch zu einer gesteigerten Kollageneinlagerung und erhöhter MMP-Aktivität.³⁰

S345/7A ist eine Phosphorylierungsstelle von murinem MLKL. Wird es an dieser phosphoryliert, kommt es zu einer Änderung der Konformation des Proteins, welche zu einer Oligomerisation, Translokation zur Zellmembran und dortiger Disruption der Zellmembran führt.⁸⁵ Wenn durch eine Mutation an dieser Stelle MLKL nicht von RIPK3 phosphoryliert werden kann, findet keine Nekroptose statt.⁸⁶

Durch den kompletten MLKL-Knockout bilden die Mäuse kein MLKL mehr.⁸⁷

Die Betrachtung von Mäusen sowohl mit Mkl-Knockout als auch mit einer Mkl-Mutation dient somit der Darstellung, dass die Mkl-Mutation und der Mkl-Knockout die gleichen Auswirkungen auf die nekroptotischen Prozesse haben. Zusätzlich können so eventuelle sterische Effekte von MLKL untersucht werden.

3.2.2. Organentnahme

Im Alter von 12 Wochen wurde bei den Mäusen gemäß des Tierversuchsantrags die Organentnahme durchgeführt. Nach Analgesie durch eine subkutane Injektion von 0,2mg/kg Körpergewicht Buprenorphin wurden die Mäuse mit 4% Isofluran narkotisiert. Während der Narkose wurden Atmung und Körpertemperatur mittels einer rektalen Temperatursonde überwacht. Mit einem Bauchschnitt wurden, nach Sicherstellung einer adäquaten Analgesie mittels ausbleibender Reaktion auf Schmerzreize (Zwischenzehenreflex), die abdominalen Organe freigelegt und durch das Zwerchfell hindurch der linke Ventrikel punktiert, wobei mittels einer 25G Kanüle ca. 1ml Blut entnommen wurde. Anschließend wurden, nach Durchtrennung der Vena cava inferior, über die gleiche Einstichstelle das Kreislaufsystem der Maus mit NaCl perfundiert, in welchem Phospho-Stop und Protease-Inhibitor gelöst wurden. Die Perfusion wurde mit den oben beschriebenen Phosphatase- und Proteaseinhibitoren durchgeführt, um das Abfließen von postmortalen enzymatischen Prozessen während beziehungsweise nach der Organentnahme zu verhindern. Im nächsten Schritt wurde die thorakale Aorta (Ao. Asc., Aortenbogen und Ao. Desc.) freigelegt und entnommen. Zuletzt wurde die abdominale Aorta dargestellt und entnommen. Zur späteren Analyse wurden sowohl die Ao. Asc., als auch die untere Hälfte der thorakalen Ao. Desc. in TissueTec eingebettet. Der Aortenbogen und die obere Hälfte der thorakalen Ao. Desc., sowie die abdominale Aorta (Ao. Abd.) wurden nativ in entsprechenden Probegefäßen in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann ebenso wie die in TissueTec eingebetteten Präparate bei -80° Celsius gelagert. Das entnommene Blut wurde in EDTA- und Heparin-Röhrchen gefüllt. Letztere wurden zentrifugiert und das so gewonnene Plasma wurde ebenfalls in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80° Celsius gelagert.

3.2.3. Kryo Schneiden

Für die histologischen und Immunfluoreszenzfärbungen wurden an einem -18°C kalten Kryotom die entnommenen und in TissueTec eingebetteten Aorten im Querschnitt geschnitten.

Die Querschnitte der Aorta ascendens wurden 8µm dick geschnitten. Es wurden jeweils 3 Querschnitte auf einen Objektträger platziert. Anschließend wurden die Objektträger bei -80°C eingefroren.

Für die Auswertung der Färbungen wurde nur die Media der Aorta betrachtet, da davon ausgegangen wird, dass dies der hauptsächliche Ort der Pathogenese ist.

3.2.4. Resorcin-Fuchsin-Färbung

Mit der Resorcin-Fuchsin-Färbung werden elastische Fasern dargestellt. Hierzu wurden die kryokonservierten Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Schnitte für vier Stunden in die Resorcin-Fuchsin-Färbelösung eingetaucht. Danach wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser so lange gespült, bis das Wasser klar war. Zusätzlich wurde mit destilliertem Wasser nachgespült. Als nächstes wurde mit 80% Ethanol differenziert und nochmals mit destilliertem Wasser zur Unterbrechung der Differenzierung nachgespült. Zuletzt wurden die Schnitte mit 96% Ethanol und 100% Ethanol entwässert und mittels Eukitt eingedeckt.

3.2.5. In-situ-Zymografie

Die in-situ-Zymografie illustriert die Aktivität und Lokalisation der MMP2 und MMP9 durch Zersetzung von aufgetragener DQ-Gelatine. Die dye quenched- (DQ-)Gelatine ist eine mit Fluorescein versetzte Gelatine, bei der durch gelatinolytischer Aktivität das inaktive Fluorescein in grün fluoreszierende Peptide umgewandelt wird. Die in diesem Fall verwendete DQ-Gelatine wird durch MMPs zersetzt und kann somit zur Quantifizierung und Lokalisierung von MMP-Aktivität verwendet werden.⁸⁸ Zuerst wurde der Reaktionspuffer bestehend aus NaCl, CaCl₂, NaN₃ und Tris angesetzt und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,6 titriert. Danach wurde die DQ-Gelatine in einer Konzentration von 10µg/ml im Reaktionspuffer gelöst. Nach dem Auftauen der Kryoschnitte wurden die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger mit einem Wachsstift umkreist, um dadurch die benötigte Menge an Gelatine möglichst gering zu halten. Die DQ-Gelatine, gelöst im Reaktionspuffer, wurde aufgetragen und die Schnitte für drei Stunden bei 37° Celsius in einer feuchten Kammer inkubiert. Pro Objektträger wurde eine Negativkontrolle mittels des Reaktionspuffers ohne DQ-Gelatine durchgeführt. Nach drei Stunden wurde dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger mittels Anti-Fade Mounting Medium eingedeckt.

3.2.6. Immunfluoreszenzfärbung

Das folgende Protokoll wurde für die Immunfluoreszenzfärbungen auf TGF-β, NOX und ERK1/2 verwendet: Nach dem Auftauen der Kryoschnitte wurden diese für zehn Minuten mit 4% PFA fixiert und anschließend einmal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger in die Pufferlösung, bestehend aus 630ml Ampuwa, 12,6ml 2,1%iger Zitronensäure, 57,4ml 3%igem Natriumcitrat und 350µl Tween 20, gestellt und viermal fünf

Minuten auf 700 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Dann erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBS und anschließend wurden die Schnitte mit dem Wachsstift, zur Beschränkung des Antikörperverbrauchs, markiert. Die Blockierlösung, welche sich aus 10% FBS und 1% BSA in PBS zusammensetzt, wurde für eine Stunde aufgetragen. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper, in 1%iger Blockierlösung entsprechend dem Verhältnis in Tabelle 4 verdünnt, aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde als erstes dreimal mit PBS gewaschen und danach wurde der sekundäre Antikörper, in PBS entsprechend dem Verhältnis in Tabelle 5 verdünnt, aufgetragen und für eine Stunden inkubiert. Nach einem weiteren PBS-Waschschrift wurden die Zellkerne für 15 Minuten mit DAPI, ebenfalls 1 : 1000 in PBS verdünnt, angefärbt. Abschließend wurden die Schnitte erneut gewaschen und mit Anti-Fade Mounting Medium eingedeckt.

Für die CD45-Färbung wurden die aufgetauten Schnitte mit Aceton für zehn Minuten bei -20°C fixiert und anschließend eine Stunde bis zum kompletten Verdampfen des Acetons bei Raumtemperatur gelagert. Nach dem Umkreisen der Schnitte mit Wachsstift wurde mit PBS für zehn Minuten rehydriert. Danach wurde für eine Stunde mit 5% Ziegen Serum in PBS geblockt und dann über Nacht mit dem primären Antikörper, verdünnt in 5% Ziegen Serum entsprechend dem Verhältnis in Tabelle 4 in PBS, inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS eine Stunde mit dem sekundären Antikörper verdünnt entsprechend dem Verhältnis in Tabelle 5 inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde für fünf Minuten der TrueVIEW Reagent aufgetragen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Objektträger mit dem VECTASHIELD Vibrance with DAPI eingedeckt.

Bei der CD68-Färbung wurde zunächst mit 4% PFA fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach Umkreisen der Schnitte mit dem Wachsstift wurde mit 3% BSA in PBS für 90 Minuten blockiert und im Anschluss über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper, gelöst in 3% BSA in PBS und verdünnte entsprechend dem Verhältnis in Tabelle 4, inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dem Waschen für 60 Minuten mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls in 3% BSA in PBS entsprechend dem Verhältnis in Tabelle 5 verdünnt, inkubiert. Auf den folgenden Waschschrift folgte eine 15-minütige Inkubation mit DAPI. Nach einem letzten Waschen wurden die Objektträger mit Anti-Fade Mounting Medium eingedeckt.

3.2.7. qPCR Aorta Descendens

Für die quantitative PCR wurden die bei der Organentnahme nativ eingefrorenen Aorten (Ao. Desc.) verwendet. Als erstes wurden die Aorten in Quiazol gelegt und im Precellys homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit Chloroform versetzt und zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in die DNA-Elimination Säule des RNA-Kits überführt. Zum Durchfluss wurde Isopropanol hinzugefügt und alles in die RNA-Säule umgefüllt. Anschließend wurden die Proben in mehreren Wasch- und Zentrifugierschritten nacheinander

entsprechend den Angaben des Herstellers mit Buffer RW, RPE und 80% Ethanol purifiziert und final mit RNA-freiem Wasser aus der RNA-Column gelöst.

Für die cDNA wurde die RNA auf eine Konzentration von 100ng/ 10 μ l mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Zur cDNA-Synthese wurde die RNA mit 10x RT Buffer, 25x dNTP Mix (100 mM), 10x RT Random Primers, MultiScribe Reverse Transcriptase und nukleasefreiem Wasser zusammen im Thermocycler transkribiert.

Mit der synthetisierten cDNA wurden mit dem GoTaq qPCR Master Mix qPCRs auf die folgenden Targets durchgeführt: Gapdh, Tnf, Casp 8, NF- κ B, Casp 3, Ripk1, Ripk3, Mkl1, Tgf β , Tgf β - Rezeptor, Mmp2, Mmp9, Smad2, Erk1, Erk2, Timp1, Col1a1, Col3a1, Ccn2, Eln, Fn1, Lox, Fbn1, Tnfrsf11b, Klf4, Acta2, Myh11, Tagln, Il-1b, Il-6, Il-11.

3.2.8. Isolation und Kultur von murinen aortalen glatten Muskelzellen

Für die Isolation der glatten Muskelzellen aus der Aorta (mSMCs) wurden den Mäusen wie bei der Organentnahme, sowohl die thorakale als auch die abdominelle Aorta entnommen. Einziger Unterschied zum oben beschriebenen Vorgehen bei der Organentnahme ist, dass die Aorten nicht mit Phosphatase- und Protease-Inhibitor perfundiert wurden, sondern hierbei erfolgte die Perfusion mit HBSS, um die SMCs möglichst wenig zu beeinträchtigen. Die entnommenen Gefäße wurden bis zur weiteren Verarbeitung in HBSS auf Eis gelagert. Danach wurden die Aorten für zehn Minuten in eine im Inkubator auf 37°C vorgewärmte Enzymlösung gelegt. Die Enzymlösung bestand aus Kollagenase (Konzentration 1mg/ml), Trypsin Inhibitor (Konzentration 1mg/ml), HBSS, Elastase (Konzentration 1mg/ml) und Penicillin/Streptomycin (Konzentration 2%). Im Folgenden wurden die Aorten in ebenfalls vorgewärmtes DMEM platziert und unter dem Mikroskop wurde die Adventitia von der Media abgelöst. Um die Endothelzellen von der Media abzutrennen, wurden die Aorten nach dem Entfernen der Adventitia aufgeschnitten und es wurde mit der Pinzette über das Innere der Gefäße gestrichen. Anschließend wurden die Aorten für 90 Minuten zum Verdauen in eine ebenfalls vorgewärmte Enzymlösung, mit der gleichen Zusammensetzung wie zuvor, gelegt. Nach dem Verdau wurden die gelösten SMCs mit DMEM gewaschen und für eine Woche in DMEM versetzt mit 20%FBS, 1% Penicillin/ Streptomycin und 0,1% Plasmocin ausplattiert. Dabei wurde eine thorakale Aorta in ein Well einer 48-Well-Platte ausplattiert.

Für die weitere Kultur der mSMCs wurden die Zellen bei ca. 90%iger Konfluenz 1:2 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und anschließend mit Trypsin/ EDTA von der Platte gelöst, zentrifugiert und in DMEM mit 20% FBS und 1% Penicillin/ Streptomycin ausplattiert.

Zur Kontrolle, dass es sich bei den isolierten und kultivierten Zellen sicher um SMCs handelt wurde eine Färbung auf α -SMA durchgeführt (siehe Abbildung 7).

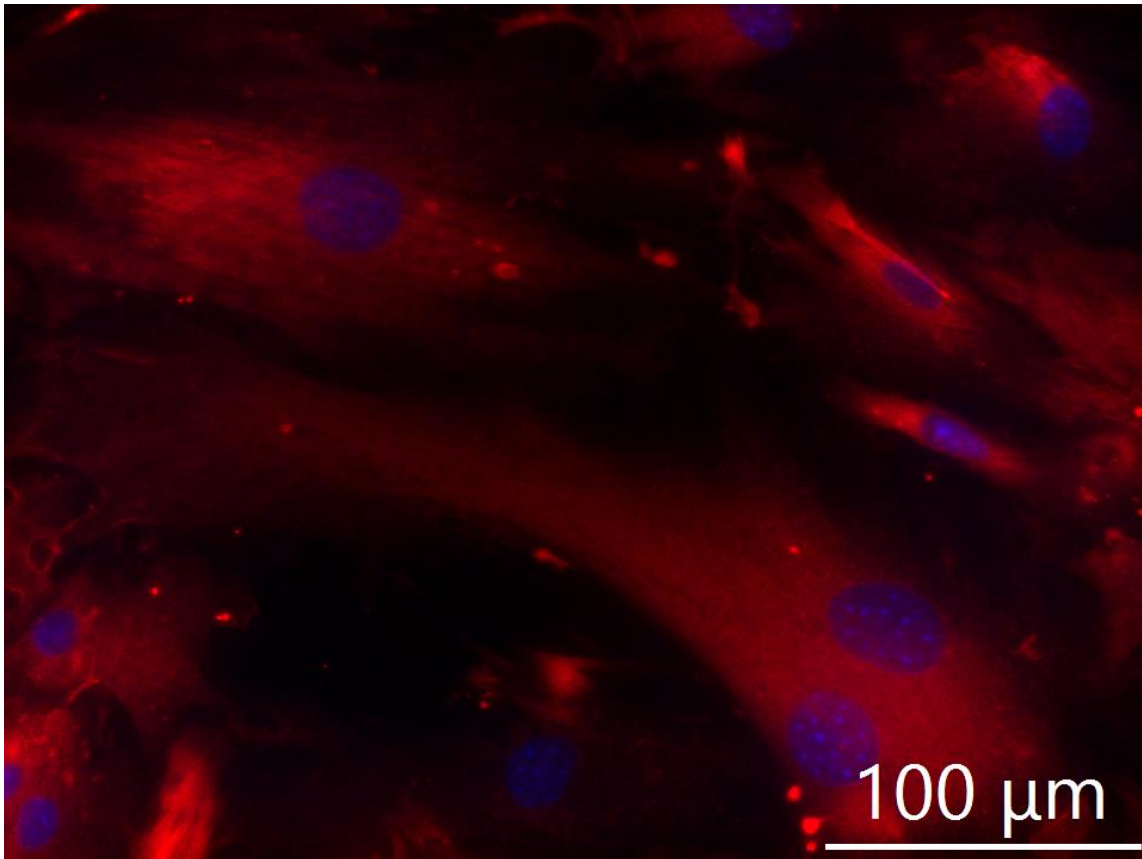


Abbildung 7: α -SMA Färbung von SMCs in Zellkultur; Zellkerne: blau, α -SMA: rot

3.2.9. Stimulation von murinen aortalen glatten Muskelzellen

Für die Stimulationsversuche wurden mSMCs in Passage 4 bis 7 verwendet. Die Zellen wurden für die Versuche auf 12 Wells einer 48-Well Platte ausplattiert. Im ersten Schritt wurde das oben beschriebene Kulturmedium der konfluenten Zellen für 24 Stunden durch DMEM mit 0,1% BSA ersetzt, um somit die Zellen in einen Hungerstoffwechsel zu versetzen und den Zellzyklus zu synchronisieren. Anschließend wurden die Zellen jeweils im dreifachen Ansatz mit 0,1% BSA-haltigem DMEM, 5ng/ml TGF- β -I in 0,1% BSA in DMEM, 4nM HCl in 0,1% BSA in DMEM oder 10ng/ml TNF- α in 0,1% BSA in DMEM für 48 Stunden stimuliert. Die Salzsäure diente hierbei als Kontrolle für das TGF- β , da dieses in 4mM HCl gelöst ist. Nach Ende der Stimulationszeit wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die mSMCs wurden in Quiazol gelöst und ebenfalls bei -80°C eingefroren.

Zur Auswertung der Stimulationsversuche wurde, wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben, RNA isoliert und cDNA hergestellt. Abschließend wurden qPCRs mit der synthetisierten cDNA auf folgende Targets durchgeführt: Gapdh, Caspase 3, Tgf β - Rezeptor I, Mmp2, Mmp9, Col1a1, Col3a1, Ccn2, Eln, Fn1, Lox, Tnfrsf11b, Acta2 und Tagln.

3.2.10. Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 10 für Mac (Dotmatics, Boston, Massachusetts, USA) durchgeführt. Für alle Versuche wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angesetzt.

Für die Resorcin-Fuchsin-Färbung, die in-situ-Zymografie und die Immunfluoreszenzfärbungen wurde die normalverteilten Daten mittels one-way-ANOVA und nicht-normalverteilte Daten mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich der einzelnen Genotypen untereinander durchgeführt. Die Testung der Normalverteilung wurde nach Kolmogorov Smirnov durchgeführt.

Die qPCRs wurden zunächst mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode analysiert, wobei der WT als Referenz verwendet wurde. Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode stellt ein gängiges Analyseverfahren von qPCR-Ergebnissen dar und zeigt bereits relative Expressionsänderung auf.⁸⁹ Durch die Verwendung vom WT als Referenz können hier bereits Unterschiede der Genotypen zum WT und der Genotypen untereinander dargestellt werden. Im nächsten Schritt wurden zusätzlich zur $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte mittels 2-way-ANOVA weiterführend ausgewertet. Hierbei wurden alle Genotypen auf einmal miteinander verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Inflammatorische Vorgänge in der Aortenwand

Zunächst wurde untersucht, inwieweit sich der in der Einleitung beschriebene Phänotyp der verschiedenen Genotypen durch ein inflammatorisches Geschehen in der Aortenwand erklären lassen könnte. Es ist bekannt, dass MFS eine inflammatorische Komponente besitzt, die zur Pathologie beiträgt. Des Weiteren ist beschrieben, dass Nekroptose Inflammation induzieren kann.⁷⁴ Andererseits können aber auch inflammatorische Stimuli Nekroptose induzieren.⁷²

CD45⁺ ist ein allgemeiner Oberflächenmarker auf Leukozyten.⁹⁰ Daher wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht, ob dysfunktionales MLKL die Infiltration von CD45⁺-Leukozyten in die Aortenwand beeinflusst und den aggravierten Phänotyp der pMLKL und pDKO erklärt (siehe Abbildung 8). Es zeigten sich numerische Unterschiede zwischen den Genotypen, die auf eine eventuell erhöhte Leukozyteninfiltration der Media der Aorta in den pMLKL, MFS und pDKO Tieren hinweisen könnten, statistisch signifikante Unterschiede konnten allerdings nicht festgestellt werden.

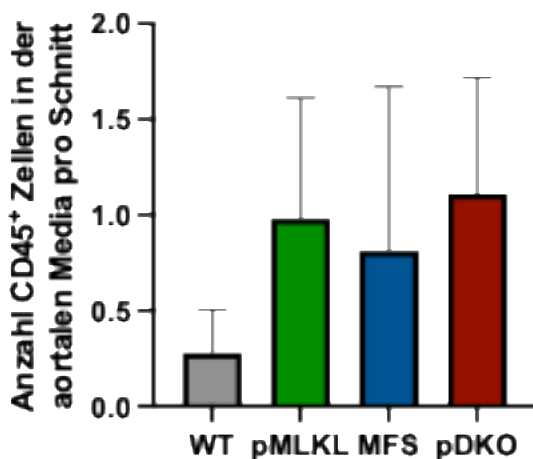


Abbildung 8: Leukozyteninfiltration in der Media der Aortenwand anhand von CD45 positiven Leukozyten pro Querschnitt (n = 6, 9, 8, 9)

Zellen, die CD68 als Oberflächenmarker exprimieren, sind zum Großteil Makrophagen.⁹¹ Um die Infiltration von Immunzellen in die Aortenwand weiter als mit der bereits beschriebenen CD45⁺-Immunfluoreszenzfärbung zu untersuchen und mögliche Unterschiede in Leukozytensubpopulationen herauszufinden wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf CD68⁺-Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 9). Hierbei konnte festgestellt werden, dass es bei pDKO (1,125 Leukozyten pro Aortenquerschnitt) gegenüber WT (0 Leukozyten pro Aortenquerschnitt) ($p=0,0032$) und gegenüber pMLKL (0 Leukozyten pro Aortenquerschnitt) ($p=0,0065$) eine signifikant höhere Infiltration an Makrophagen gab. Für MFS konnte lediglich eine numerische Steigerung der Makrophagenanzahl in der Media festgestellt werden, statistisch signifikant war die Steigerung der Makrophagenanzahl nicht. Zwischen MFS und

pDKO konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im Unterschied zu der oben dargestellten Leukozyteninfiltration zeigte sich keine gesteigerte Infiltration von Makrophagen bei den pMLKL-Tieren gegenüber WT.

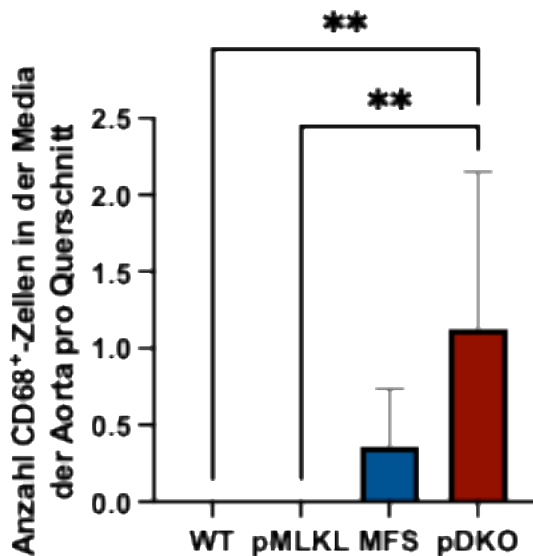


Abbildung 9: Infiltration von CD68 positiven Zellen in die Aortenwand pro Querschnitt (n = 8, 6, 7, 8; ** p<0,01)

Bei Betrachtung der Immunfluoreszenzfärbungen auf oben beschriebene Leukozytenantigene konnten Hinweise darauf gefunden werden konnte, dass ein inflammatorisches Geschehen in der Aortenwand insbesondere der MFS- und pDKO-Tiere stattfindet. Um den beobachteten Phänotypen weiter zu erforschen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf Nox-2 durchgeführt, um dies als möglichen pathomechanistischen Zusammenhang zu untersuchen. Nox, welches vor allem in Neutrophilen und Makrophagen vorkommt, reduziert Sauerstoff zu einem Superoxid Anion, was dann zu Wasserstoffperoxid reagiert. TGF- β ist für die Aktivierung von Nox, durch die von Nox produzierten ROS, bedeutsam und trägt somit zu einem entzündlichen Milieu bei.⁵⁸

Die Immunfluoreszenzfärbung auf Nox-2 (siehe Abbildung 10) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Durch Nox hervorgerufene ROS scheint also keinen entscheidenden Einfluss auf die Pathologie der TAA-Entstehung in diesem Modell zu haben.

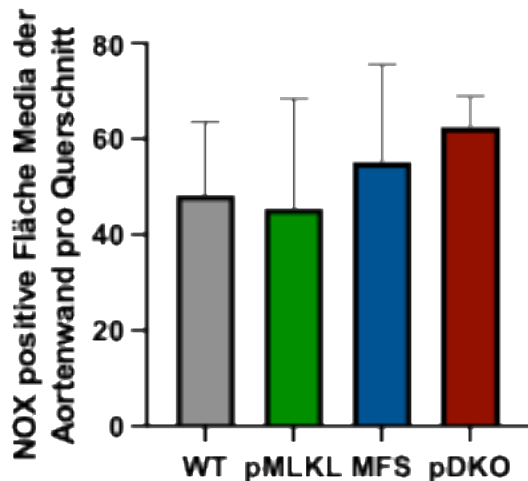


Abbildung 10: Prozentuales Nox-2 Vorkommen in der Media der Aortenwand pro Querschnitt (n = 8, 9, 9, 9)

Zusammenfassend konnten allein in der CD68⁺-Immunzellfärbung signifikante Unterschiede zwischen WT und pMLKL gegenüber pDKO festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich weder in den Immunfluoreszfärbungen auf CD45⁺- oder CD68⁺-Immunzellen, noch in der Färbung auf NOX-2 relevante statistisch signifikante Unterschiede zwischen den weiteren Genotypen. Numerische Unterschiede deuten darauf hin, dass es möglicherweise unterschwellige Unterschiede in den entzündlichen Vorgängen der Genotypen gibt, als hauptsächliche Erklärung für die phänotypischen Unterschiede lässt sich, basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen, Inflammation erstmal hintenanstellen.

4.2. Degradierung der extrazellulären Matrix

4.2.1. Fragmentierung von elastischen Fasern

Die Degradierung und Fragmentierung von elastischen Fasern spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von TAAs.⁹² Daher wurde mittels einer Resorcin-Fuchsin-Färbung (siehe Abbildung 11), welche elastische Fasern darstellt, untersucht, ob sich durch die MLKL-Mutation der Grad der Fragmentierung der elastischen Fasern verändert. Ausgewertet wurde die Anzahl der Strangbrüche pro 100µm Media, um herauszufinden, ob eine geringere oder höhere Degradierung der elastischen Fasern unter den verschiedenen Genotypen festgestellt werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl MFS (1,580 Strangbrüche pro 100µm) ($p=0,0021$), als auch pDKO (1,796 Strangbrüche pro 100µm) ($p<0,0001$) signifikant mehr Strangbrüche auf 100 µm Media aufwiesen als WT (0,894 Strangbrüche pro 100µm). Auch wurde eine signifikant höhere Zahl an Strangbrüchen bei den pDKO im Vergleich zu pMLKL (1,234 Strangbrüche pro 100µm) festgestellt ($p=0,0207$). Ebenso dargestellt wurde eine numerisch gesteigerte Fragmentierung der elastischen Fasern in den pMLKL Tieren gegenüber den WT Tieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die MLKL-Mutation, aber auch das MFS, eine bedeutende Rolle bei der Degradierung der elastischen Fasern und somit der Pathogenese von TAAs spielen.

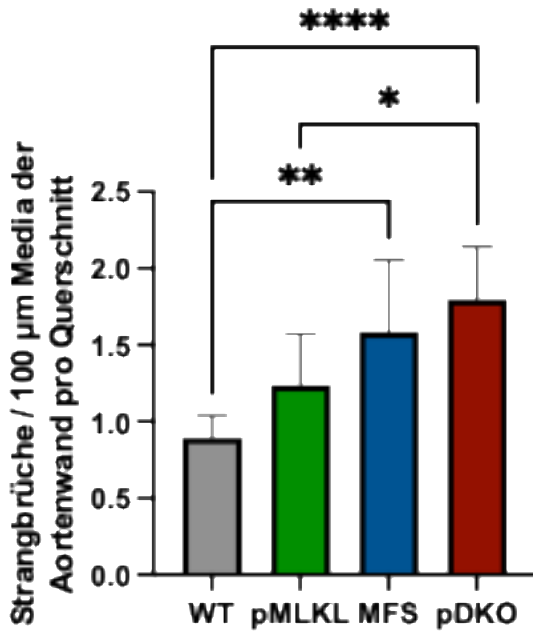


Abbildung 11: Quantifizierung der Fragmentierung der elastischen Fasern in der Media der Aortenwand ($n = 9, 7, 7, 7$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$)

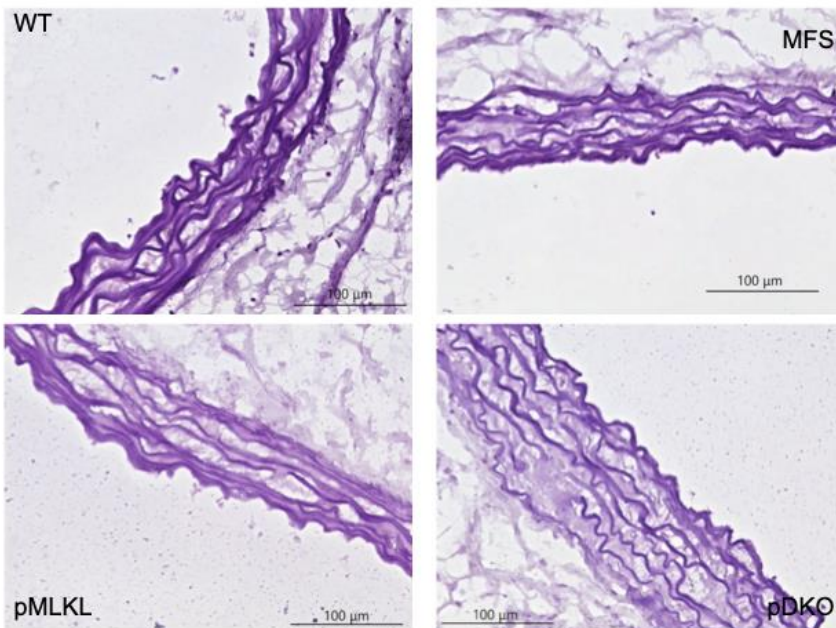


Abbildung 12: Resorcin-Fuchsin-Färbung von histologischen Schnitten der Ao. asc.

4.2.2. Aktivität von Matrixmetalloproteinasen

MMP-Aktivität spielt eine wichtige Rolle beim Remodeling der EZM, insbesondere durch die Degradierung von Elastin, in der Aortenwand und der Aortendilatation beim MFS. Es konnte gezeigt werden, dass eine verringerte MMP-Aktivität die Formation und Ruptur von TAAs mildert.⁹³ Die in-situ-Zymografie (siehe Abbildung 13) dient der Darstellung von Aktivität und Lokalisation der MMP-Aktivität. Hierbei zersetzen MMP-2 und -9 die auf die Aortenringe aufgetragene DQ-Gelatine. Beim Zersetzen der DQ-Gelatine entsteht eine grüne Fluoreszenz. Je größer die autofluoreszierende Fläche, desto mehr MMP-Aktivität besteht. Dementsprechend wurde untersucht, ob MLKL ebenfalls einen Einfluss auf die MMP-Aktivität

besitzt und somit die aggravierte aortale Pathologie der pMLKL- und pDKO-Tiere erklärt werden kann. Bei der Untersuchung von Kyroschnitten konnte gezeigt werden, dass pMLKL (0,4845 prozentuale positive Fläche pro Aortenquerschnitt) ($p=0,0433$) und pDKO (0,5853 prozentuale positive Fläche pro Aortenquerschnitt) ($p=0,0015$) eine signifikant größere Fläche an Autofluoreszenz haben als WT (0,3052 prozentuale positive Fläche pro Aortenquerschnitt). Auch konnte dargestellt werden, dass pDKO ebenfalls signifikant mehr MMP-Aktivität als MFS (0,3359 prozentuale positive Fläche pro Aortenquerschnitt) ($p=0,0046$) hat. Dies zeigt, dass die MLKL-Mutation einen großen Einfluss auf die Aktivität der MMPs und somit auch auf das Remodeling der EZM in der Aortenwand hat.

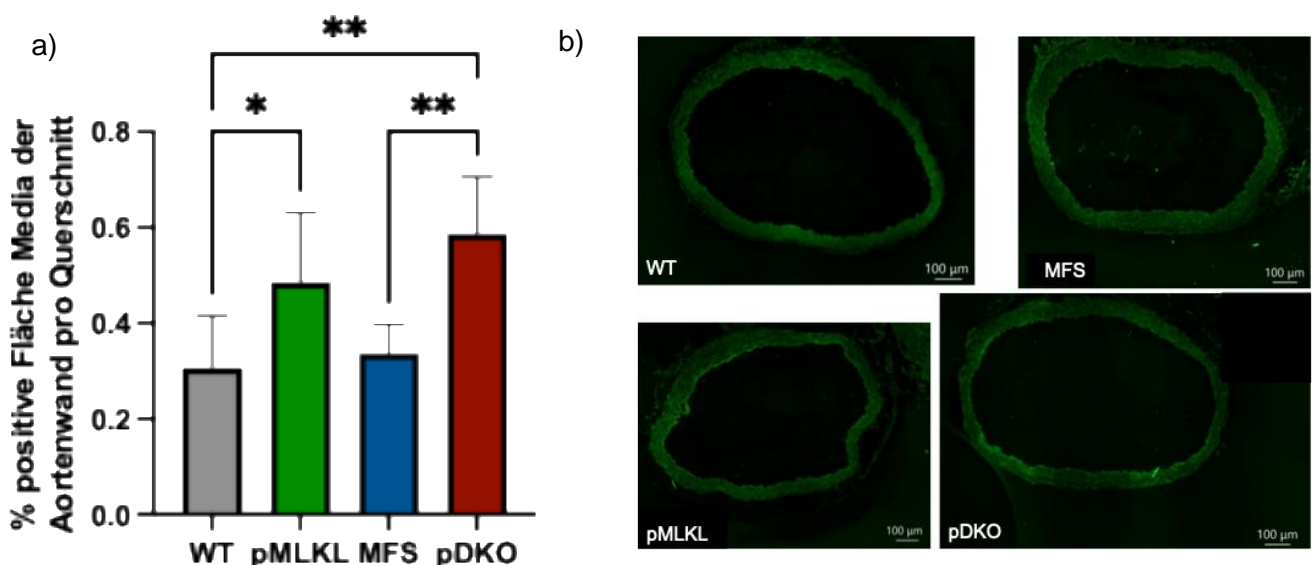


Abbildung 13: a) Quantifizierung MMP-2/9-Aktivität als prozentuale positive Fläche der Media der Aorta ($n = 6, 8, 6, 7$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$); b) in-situ-Zymografie der Ao. Asc.; Signalaktivität: Grün

4.3. TGF- β -Signaling

Das TGF- β -Signaling spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des MFS und hat nachweislich einen Einfluss auf die EZM.⁵² Fbn-1 reiche Mikrofibrillen spielen durch die Freisetzung von TGF- β eine wichtige Rolle bei der Regulation des TGF- β -Signalings. Durch die Fbn-1-Mutation kommt es zu einer vermehrten Verfügbarkeit von TGF- β , welches einen Einfluss auf die EZM-Struktur sowie verschiedene andere Signalwege, wie Erk und AngII. Die EZM wird zum einen durch eine Beeinträchtigung der Biosynthese von EZM-Bestandteilen verändert, zum anderen wird durch TGF- β die MMP-Aktivität und somit die Fragmentierung von elastischen Fasern gesteigert.⁹⁴

4.3.1. TGF- β -Rezeptor I Expression

Zuerst wurde zur Untersuchung einer möglichen Veränderung im TGF- β Signalweg eine Immunfluoreszenzfärbung auf den TGF- β -Rezeptor I (siehe Abbildung 14) durchgeführt. Es konnte dargestellt werden, dass pMLKL und pDKO eine numerisch höhere Expression des

TGF- β -Rezeptor I haben als WT und MFS. Eine statistische Signifikanz konnte nicht festgestellt werden.

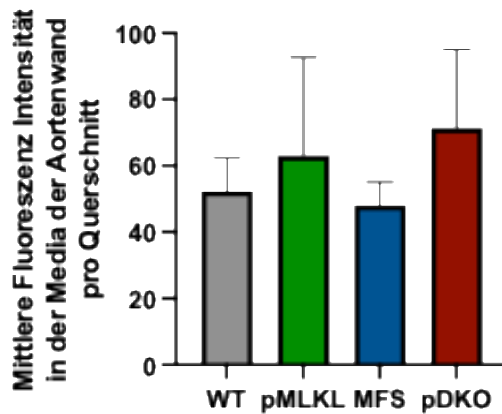


Abbildung 14: Quantifizierung TGF- β Rezeptor I Vorkommen in der Media der Aortenwand pro Querschnitt ($n = 8, 6, 8, 8$)

Im folgenden wurde eine qPCR der Ao. Desc. (siehe Abbildung 15) durchgeführt. Die dabei untersuchten Gene sind mit der Fragmentierung von elastischen Fasern und dem TGF- β -Signaling assoziiert und liegen beim MFS häufig alteriert vor.

Hierbei zeigte sich eine numerische Erhöhung des TGF- β -Rezeptors bei pMLKL, MFS und pDKO gegenüber dem WT. Auch konnten numerische Steigerungen der Expression von MMP9 und LOX insbesondere in den pMLKL Tieren festgestellt werden (siehe Abbildung 15). Statistisch signifikante Ergebnisse konnten nicht festgestellt werden. Dies könnte möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass nicht die Ao. Desc., sondern die Ao. Asc. der Hauptort der Pathologie ist. Auch sind nicht alle Wandschichten gleichermaßen an der TAA-Entwicklung beteiligt, die Tunica Media gilt hier als vordergründiger Ort der Pathogenese.

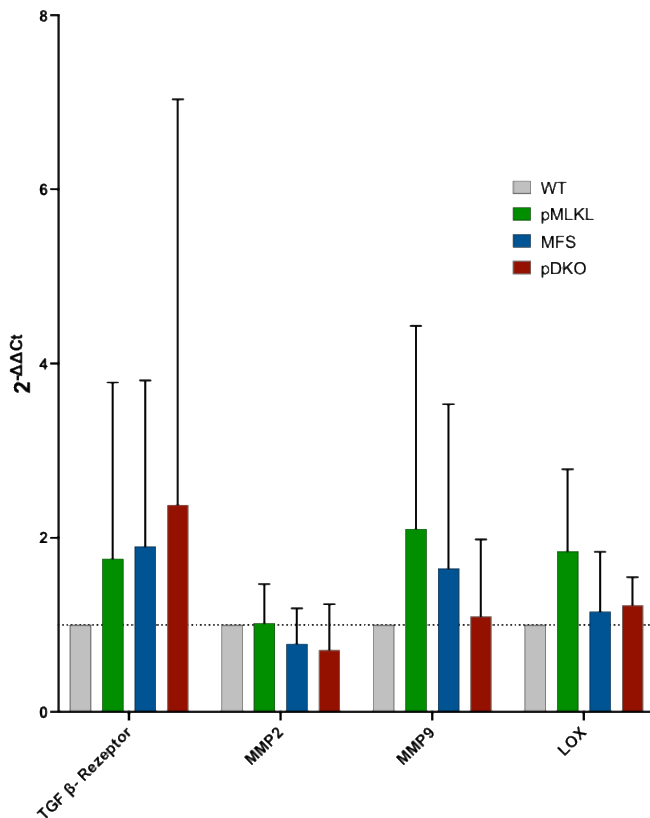


Abbildung 15: qPCR Ao. desc. TGF- β -Primer ($n = 8, 8, 8, 8$)

Im nächsten Schritt wurde eine Zellkultur etabliert, um mSMCs auf Veränderungen in der Genexpression von mit MFS assoziierten Genen zu untersuchen. Die mSMCs spielen in der Pathophysiologie des MFS eine wichtige Rolle, da sie bei verschiedenen Aspekten dieser, wie beispielsweise der EZM-Homöostase³ und dem TGF- β -Signaling¹⁶, relevant sind. Die Zellen wurden entweder mit TGF- β oder TNF- α stimuliert. Als Kontrolle zur Etablierung einer Baseline wurden Zellen verwendet, die lediglich im Medium inkubiert wurden und nicht stimuliert wurden.

In der Zellkultur zeigte sich bei Zellen, die zur Kontrolle nur im Medium inkubiert wurden (siehe Abbildung 16), bei allen Genotypen gegenüber WT eine deutlich erhöhte Expression des TGF- β -Rezeptor I, eine statistische Signifikanz erreichte diese Expressionssteigerung gegenüber WT bei MFS ($p < 0,0001$), pMLKL ($p = 0,0157$) und DKO KO ($p = 0,0023$). Darüber hinaus zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen allen Mfkl-mutierten Genotypen gegenüber MFS. Konkret lagen diese Unterschiede bei $p < 0,0001$ für MFS gegenüber pDKO und $p = 0,0018$ gegenüber DKO KO, sowie $p = 0,0013$ gegenüber pMLKL und $p < 0,0001$ gegenüber MLKL KO. Des Weiteren zeigten numerisch gesteigerte Expression von Mmp9 und Lox bei pMLKL, MLKL KO, MFS, pDKO und DKO KO gegenüber WT. Hierbei wurde keine statistische Signifikanz erreicht.

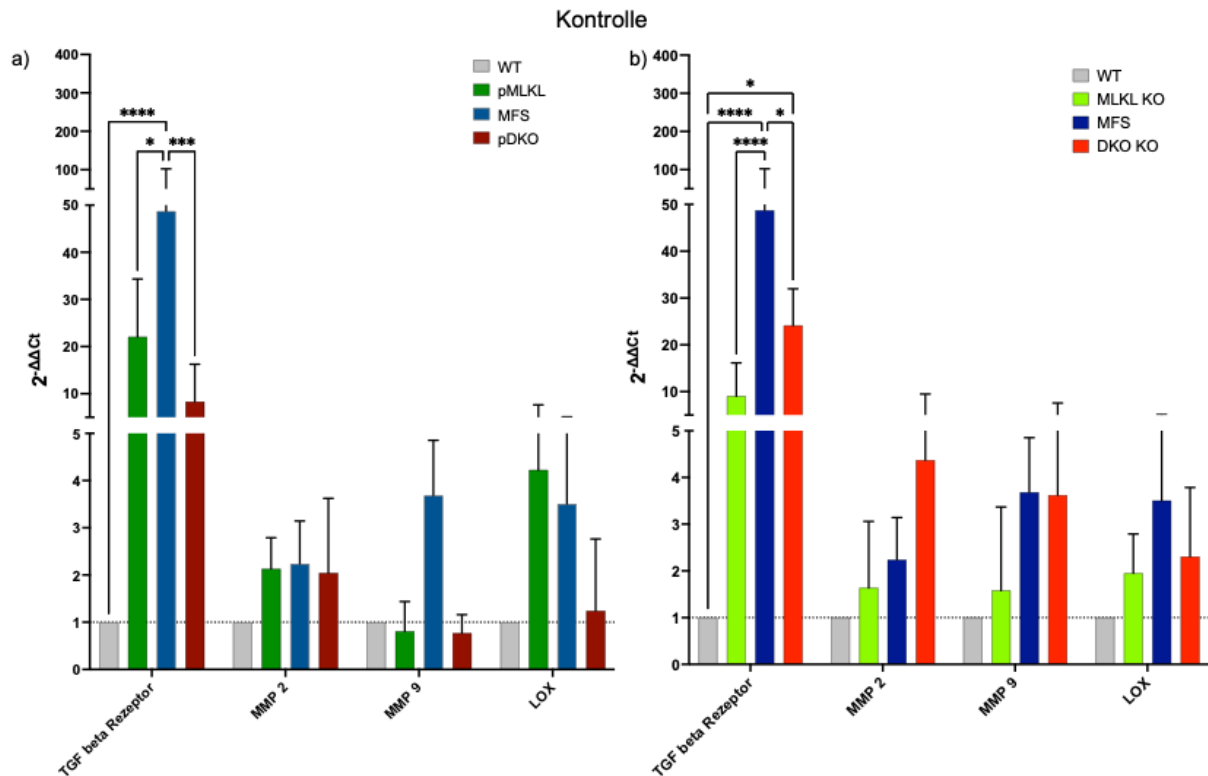


Abbildung 16: qPCR Zellkultur Kontrolle (inkubiert in Medium) TGF- β -Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Um unter anderem das dysregulierte TGF- β -Signaling des MFS zu simulieren⁹⁵, wurden die mSMCs in der Zellkultur nach einer 24 stündigen Hungerphase für 48 Stunden lang mit TGF- β stimuliert.

Hier (siehe Abbildung 17) zeigten sich ebenfalls in der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode eine numerisch deutlich gesteigerte Expression des TGF- β -Rezeptors in allen Genotypen gegenüber WT, wobei eine statistische Signifikanz bei MFS ($p < 0,0001$) und DKO KO ($p = 0,0277$) gegenüber WT bestand. Auch zeigte sich bei MFS im Vergleich zu pMLKL ($p = 0,0272$), MLKL KO ($p < 0,001$), pDKO ($p < 0,0001$) und DKO KO ($p = 0,0240$) eine statistische Signifikanz. Darüber hinaus konnten numerische Expressionssteigerungen vom Mmp2 und Lox in allen Genotypen gegenüber WT gezeigt werden (siehe Abbildung 16).

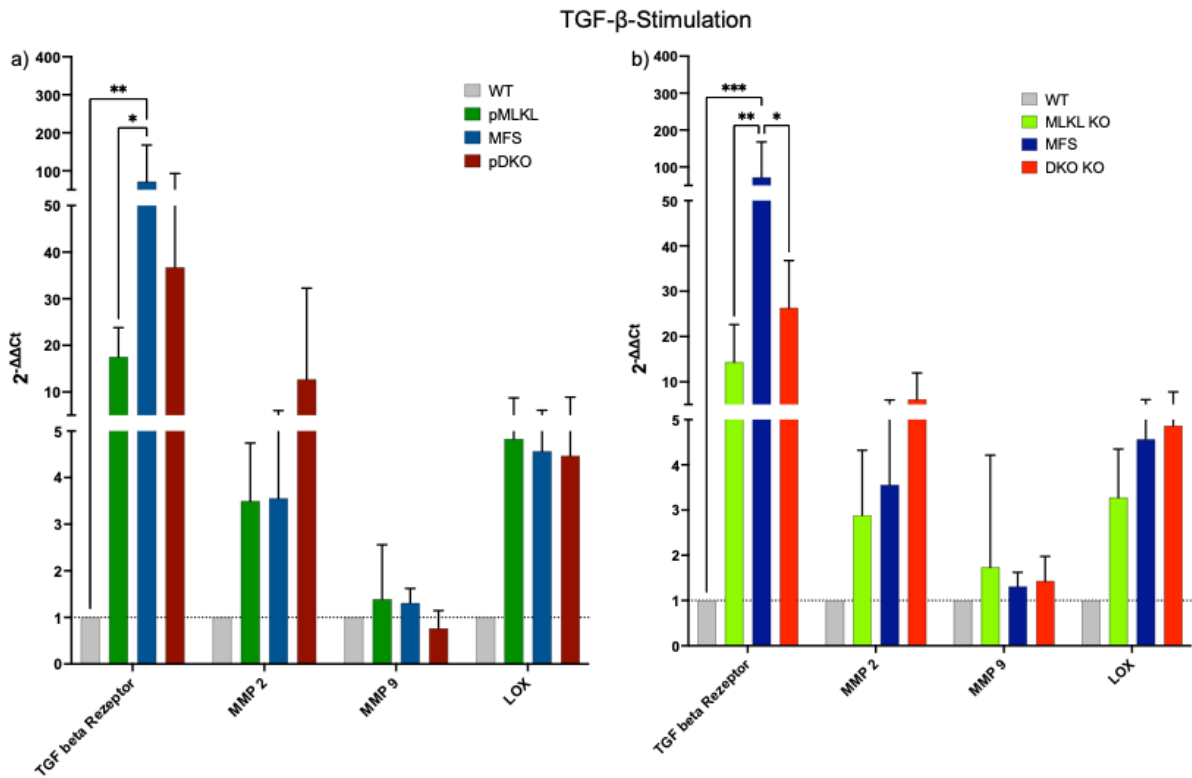


Abbildung 17: qPCR TGF- β -Stimulation. TGF- β -Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Außerdem wurden die SMCs mit TNF- α stimuliert, um ein inflammatorisches Milieu zu schaffen.⁹⁶ Dabei zeigte sich ebenfalls in der qPCR (siehe Abbildung 18) eine numerisch deutlich gesteigerte Expression des TGF- β -Rezeptors von allen Genotypen gegenüber WT. Statistisch signifikant waren hierbei pMLKL mit $p = 0,0016$, MFS mit $p < 0,0001$, MLKL KO mit $p = 0,026$ und DKO KO mit $p = 0,0002$. Auch hier zeigte sich eine nicht signifikante Steigerung der Expression der mit dem TGF- β -Signaling assoziierten Gene Mmp2, Mmp9 und Lox.

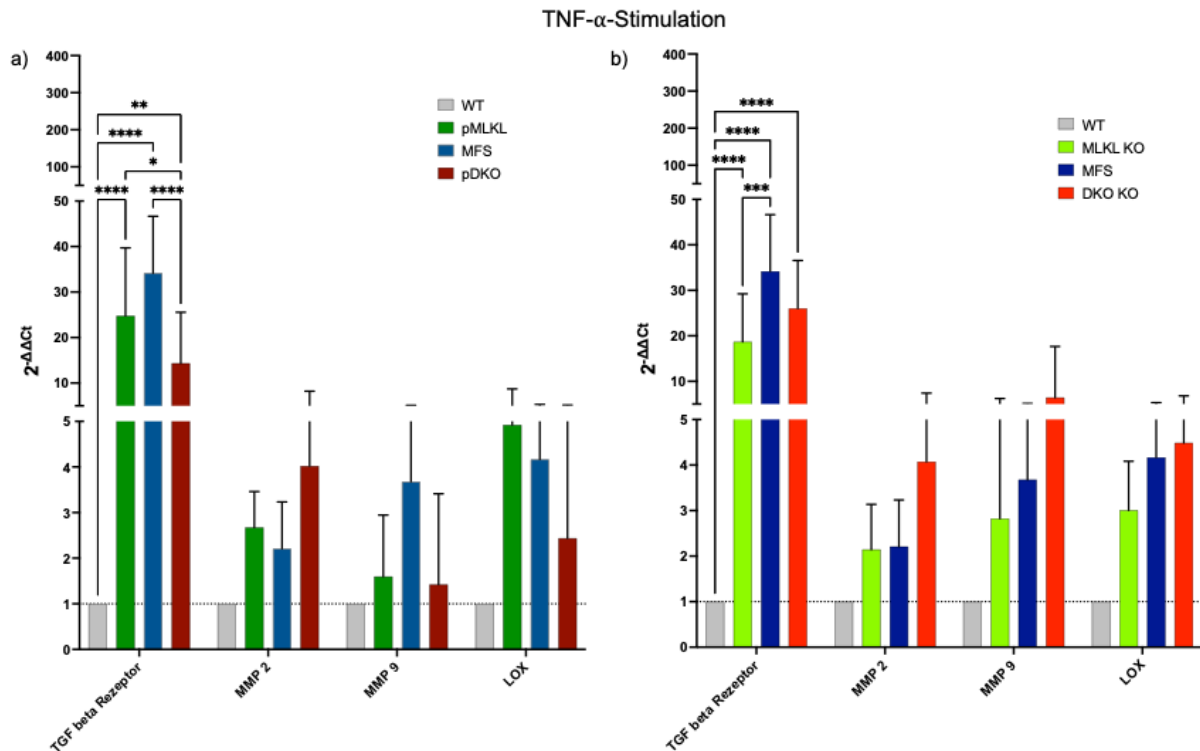


Abbildung 18: qPCR TNF- α -Stimulation. TGF- β -Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Zusammenfassend zeigen oben beschriebene Ergebnisse eine deutlich gesteigerte Expression des TGF- β -Rezeptors in allen Genotypen gegenüber WT und unter allen untersuchten Konditionen. Die Ergebnisse weisen so auf ein alteriertes TGF- β -Signaling nicht nur in den Mäusen mit MFS-Mutation, sondern auch in denen nur mit einer reinen oder zum MFS additiven MLKL-Mutation. Dementsprechend kann vermutet werden, dass MLKL eine Rolle beim TGF- β -Signaling spielt und es gilt dies weiter zu untersuchen.

4.3.2. TGF- β -Signalweg

Die MAP Kinasen (Mitogen-activated protein kinasen) Erk1/ Erk2 werden durch TGF- β phosphoryliert und somit aktiviert.⁹⁷ Aktiviertes pERK übt eine Reihe weiterer Funktionen aus, unter anderem die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wodurch es an der Regulation von Zellwachstum, Apoptose und Zelldifferenzierung beteiligt ist.⁹⁸ Daher wurde, um die Veränderungen der TGF- β -Rezeptor Expression weiter zu erforschen, eine Immunfluoreszenzfärbung auf pErk1/2 durchgeführt (siehe Abbildung 19). Hier zeigte sich eine numerische Erhöhung des pErk sowohl in den pMLKL, als auch den pDKO Tieren gegenüber dem WT. Weitere Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene, wie beispielsweise genetischer Expression könnten hier weitere Erkenntnisse liefern.

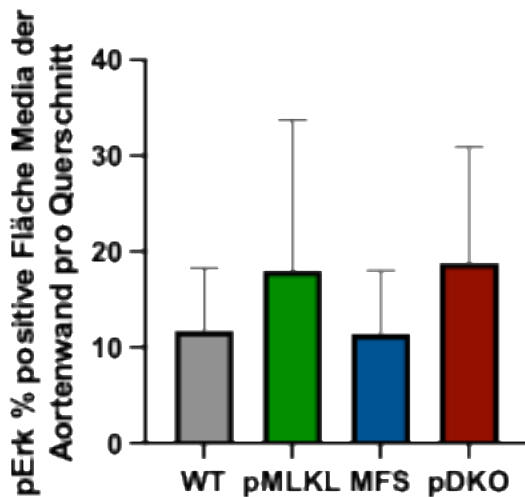


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung auf pErk-Vorkommen in der Media der Aorta pro Querschnitt ($n = 8, 10, 9, 10$)

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den durchgeführten qPCRs der Ao. Desc. (s. Abbildung 15) neben dem TGF- β -Rezeptor auch weitere Gene, die mit TGF- β -Signaling assoziiert sind untersucht wurden, wie Mmp2 und Mmp9.⁹⁹ Hierbei konnten leichte numerische Veränderungen sowohl bei Mmp2, als auch bei Mmp9 festgestellt werden, da keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte kann dies nur als weiteres Indiz auf ein alteriertes TGF- β -Signaling gewertet werden.

In der Zellkultur (s. Abbildungen 16 bis 18) zeigten sich unter allen drei Konditionen (Medium, TGF- β -Stimulation, TNF- α -Stimulation) ebenfalls numerische Veränderungen bei Mmp2 und Mmp9, wobei auch hier keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte.

Alle diese Ergebnisse deuten auf ein alteriertes TGF- β -Signaling hin, auch wenn diese Ergebnisse Großteiles nicht statistisch signifikant sind, macht die Kumulation ähnlicher Ergebnisse dies wahrscheinlich.

4.3.3. Phänotyp der aortalen glatten Muskelzellen und Beeinflussung von EZM-Bestandteilen

Als nächstes wurden Gene betrachtet, die den Phänotypen der SMCs charakterisieren, wie Kollagen-1 (Col1a1) und -3 (Col3a1), Connective Tissue Growth Factor (Ccn2), Eln und Fn1. Auch Tnfrsf11b, als Marker für den Phänotyp-Switch wurde untersucht.⁵³

Bereits die qPCR der Ao. Desc. (s. Abbildung 20), als Untersuchung des gesamten aortalen Gewebes ohne vorherige Isolation und Kultivierung von SMCs, deutete auf Veränderungen des SMC-Phänotyps hin. Numerische Veränderungen zeigten sich in der gesteigerten Expression von Fn1 bei allen Genotypen gegenüber WT. Bei Ccn2 waren sowohl bei pMLKL ($p < 0,0001$) als auch bei pDKO ($p = 0,0061$) signifikante Erhöhungen der Expression gegenüber WT herausgefunden worden. Und auch bei Eln zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung der pMLKL Tiere gegenüber WT ($p = 0,0187$).

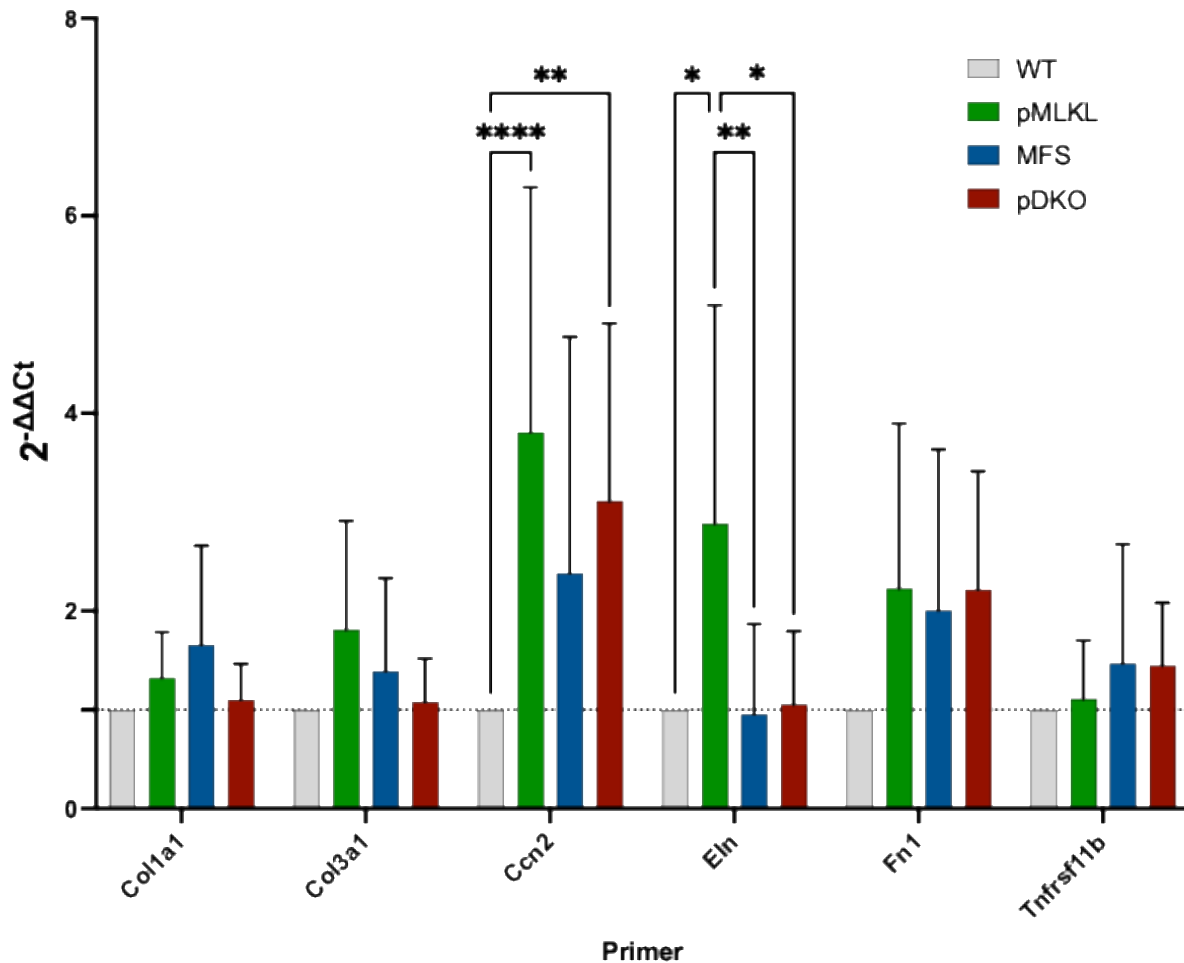


Abbildung 20: qPCR Ao. desc.. EZM-Primer. (n = 8, 8, 8, 8, * p<0,05, ** p<0,01, **** p<0,0001)

In der qPCR der Zellkultur der SMCs zeigte sich im der Kontrolle, die lediglich in Medium inkubiert wurde, insbesondere bei den pDKO (p=0,001) und DKO KO (p=0,0009) gegenüber WT, aber auch pMLKL und MLKL KO eine deutlich vermehrte Expression von Col3a1 (siehe Abbildung 21). Auch bei pMLKL, MLKL KO und MFS war Col3a1 gesteigert exprimiert, wobei hier keine statistische Signifikanz festgestellt werden konnte. Das bereits bei basalen Bedingungen ein veränderter SMC-Phänotyp vorliegt wird unterstützt durch zahlreiche weitere numerisch gesteigerte Expression von Genen, die für einen synthetischen SMC-Phänotyp sprechen wie Eln, Lox und Pai1. Dazu kommt die verstärkte Expression des Phänotypswitch-Markers Tnfrsf11b, was für eine Entwicklung des Phänotyps von kontraktile zu synthetisch spricht.

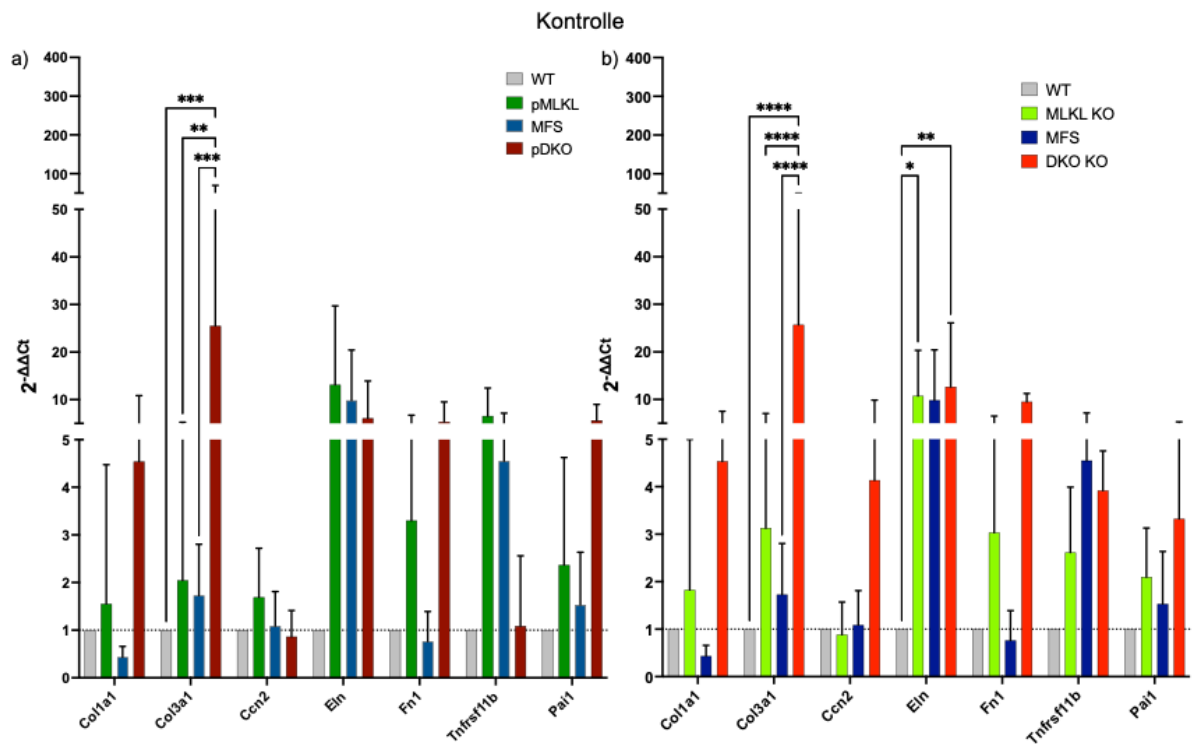


Abbildung 21: qPCR Zellkultur Kontrolle (inkubiert in Medium). EZM-Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Die Stimulation der SMCs mit TGF- β zeigte ebenfalls stark erhöhte Expression bei pDKO gegenüber WT ($p = 0,0014$) und MFS ($p = 0,0019$) von Col3a1 (siehe Abbildung 22), was dafürspricht, dass die Mkl-Mutation eine Rolle bei der Phänotyp-Veränderung der SMCs spielt. Weiterhin spricht für einen alterierten SMC-Phänotyp, dass es hier ebenfalls deutliche numerisch gesteigerte Expression in den $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werten von Eln, Fn1 und Pai1 bei allen Genotypen gegenüber WT beobachtet wurden. Tnfrsf11b als Marker für den Phänotyp-Switch war ebenfalls stark erhöht, wenn auch nicht signifikant.

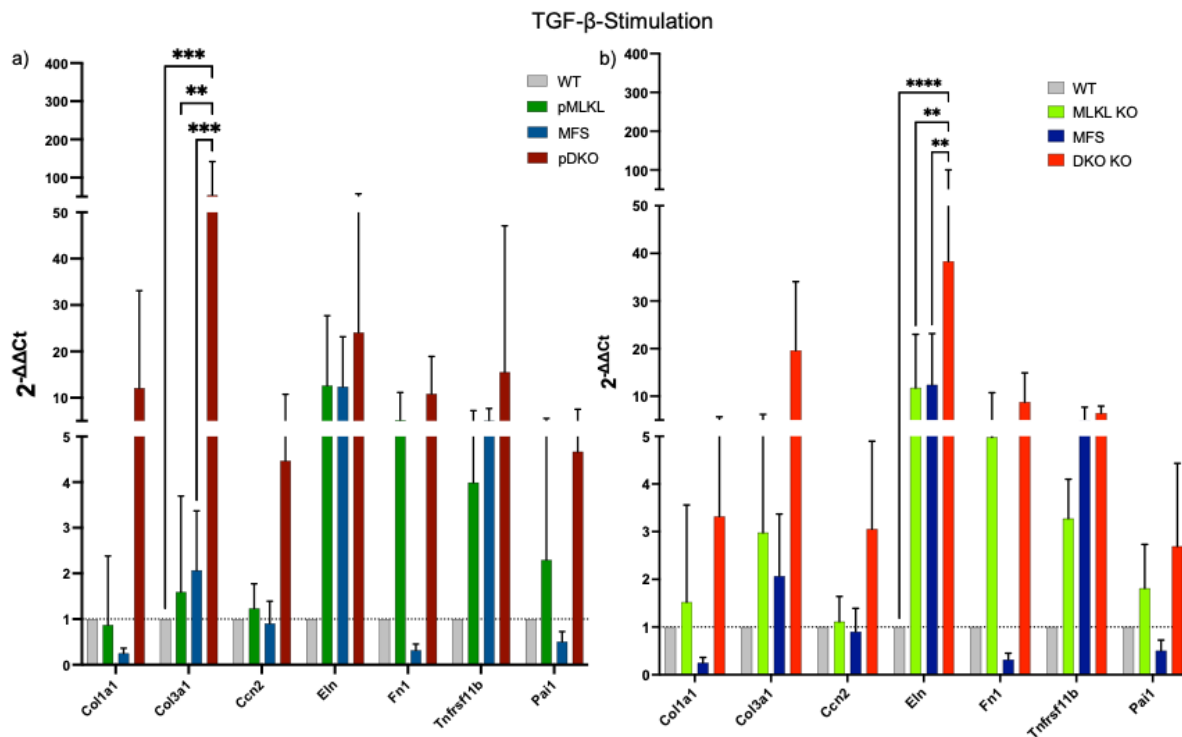


Abbildung 22: qPCR TGF- β -Stimulation. EZM-Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Das entzündliche Milieu der TNF- α -Stimulation führte zu ähnlichen Genexpressionen, wie die Stimulation mit TGF- β . Signifikante Expressionssteigerung fand sich bei Col3a1 von pDKO gegenüber WT ($p < 0,0001$) und MFS ($p < 0,0001$). Hinzu kamen numerische erhöhte Expressionen von Eln, Fn1 und Pai1, wobei hier auffällig ist, dass die SMCs mit Mkl1-Mutation hierbei deutlich stärkere Expressionsveränderungen zeigen als die mit MFS. Das ein entzündliches Milieu ebenfalls Einfluss auf den Phänotyp-Switch hat zeigt sich dadurch, dass bei Tnfrsf11b DKO gegenüber WT ($p = 0,001$) signifikant erhöht war und alle anderen Genotypen ebenfalls numerisch deutlich gesteigert waren (siehe Abbildung 23).

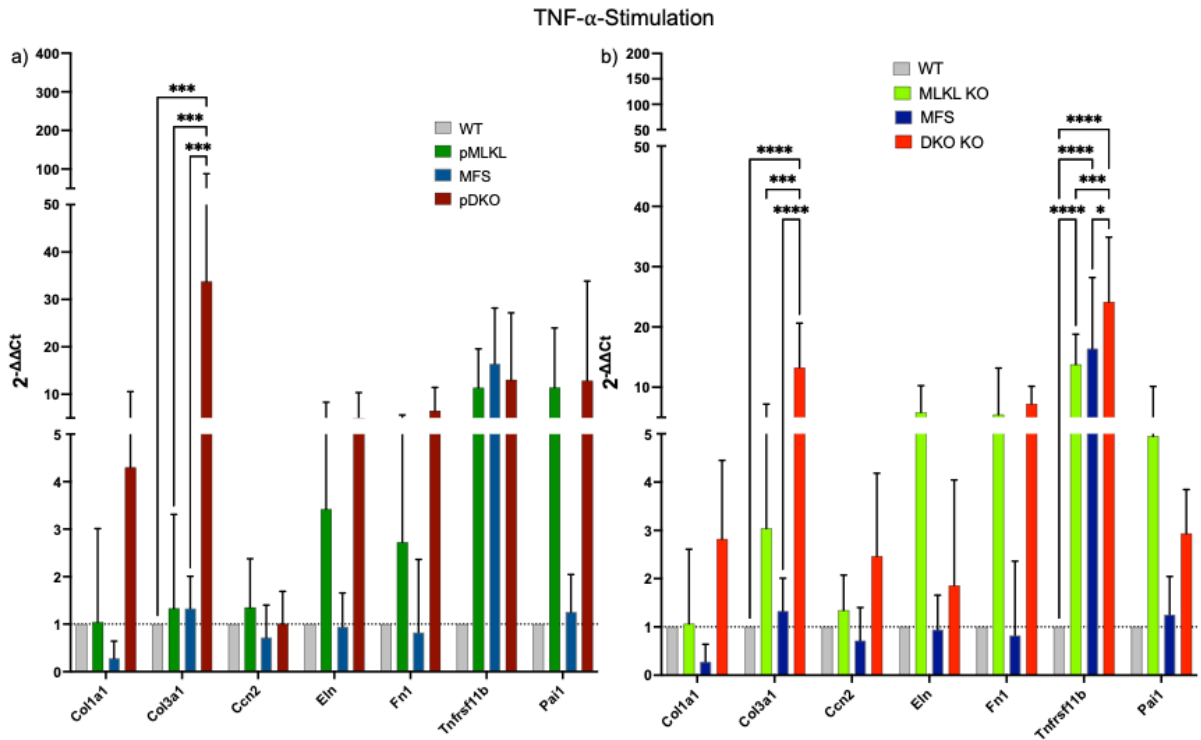


Abbildung 23: qPCR TNF- α -Stimulation. EZM-Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Da die Gene, die charakteristisch für einen synthetischen SMC-Phänotyp sind auch einen Einfluss auf die EZM haben, unterstützen diese Ergebnisse die in Abschnitt 4.3 dargestellten und unterstreicht die wichtige Rolle der EZM bei der TAA-Pathogenese.

5. Diskussion

5.1. Einfluss von MLKL-Defizienz auf vaskuläre Inflammation bei MFS-assoziierten TAA

Vor dem Hintergrund, dass sowohl MFS als auch Nekroptose eng mit Inflammation assoziiert sind, wurde zunächst untersucht, ob ein inflammatorisches Geschehen bei der Entstehung des TAA-Phänotyps eine Rolle spielt.

Inflammation kann zur Progression der aortalen Pathologie bei MFS beitragen und möglicherweise einen Beitrag zur Erklärung der klinischen Variabilität des Phänotyps des MFS leisten.¹⁰⁰ Zum einen kommt es beim MFS zu einer vermehrten Immunzellinfiltration in die Media der Aorta sowie zu einer vermehrten Expression von inflammatorischen Genen.¹⁰⁰ Zum anderen tragen die eingewanderten Makrophagen über Nox zur Produktion von ROS bei und führen so zu der Entstehung eines inflammatorischen Milieus.⁵⁸ MMPs werden von inflammatorischen Zellen produziert und führen durch ihre elastolytische Aktivität zu einer Degradierung von Elastin.¹⁰¹ Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Veränderung der inflammatorischen Abläufe in der Media der Aorta zu einer Veränderung der MFS-Pathologie führt.

Als Endpunkt verschiedener inflammatorischer Signalkaskaden führt MLKL nicht nur zu Nekroptose assoziierten Membranschäden sondern auch zu einer Aktivierung des Inflammasoms.⁷² Daher wird angenommen, dass es bei nekroptosedefizienten Mäusen zu einer Reduktion der entzündlichen Vorgänge kommt. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass durch Ausbleiben von Nekroptose weniger DAMPs von untergehenden Zellen freigesetzt werden und es somit zu geringerer Inflammation kommt.⁷⁴ Im Gegensatz zu dieser Vermutung konnte ebenfalls festgestellt werden, dass nekroptosedefiziente Mäuse eine verstärkte inflammatorische Aktivität aufweisen, da die Möglichkeit des nekroptotischen Zelltods fehlt.⁸⁶ Diese konträren Ergebnisse aus verschiedenen Studien könnten darauf hinweisen, dass unterschiedlichen Zelltypen in verschiedenen Geweben einen differierenden Effekt von MLKL beziehungsweise Nekroptosedefizienz hervorrufen können. Unter der Voraussetzung das inflammatorische Prozesse bei TAA eine Rolle spielen, könnte dies auch in dieser Arbeit eine Rolle spielen. Daher ist es besonders interessant zu untersuchen, wie die Pathologie von TAAs durch die MLKL-Defizienz beeinflusst wird.

5.1.1. Infiltration von Immunzellen in die Aortenwand

In der CD68-Immunfluoreszenzfärbung zeigten sich eine numerisch gesteigerte Anzahl an Makrophagen in der Media der Aortenwand der MFS Tiere. Dies wurde im Einklang mit der entzündlichen Komponente des MFS erwartet.⁸⁴ In den pDKO Tieren zeigte sich im Vergleich zu WT und pMLKL eine signifikant erhöhte Anzahl an Makrophagen in der Media.

Die Infiltration von CD68⁺-Immunzellen in die Media der Aorta kann möglicherweise durch die dortige Degradation von Elastin und Freisetzung von elastin binding protein herbei geführt werden, da dies chemotaktisch für Makrophagen wirkt.¹⁰²

Eine gesteigerte Infiltration von Immunzellen in der Media in den pMLKL Tieren, sowie der MFS und pDKO Tiere zeigte sich trendweise ebenfalls in der Immunfluoreszenzfärbung auf CD45⁺-Zellen. Wobei hier allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass CD45⁺-Leukozyten im Vergleich zu CD68⁺-Immunzellen vorrangig durch inflammatorische Zytokine zur Einwanderung in die Aortenwand angeregt werden.¹⁰³ Durch die fehlende Möglichkeit der Nekroptose ist die Freisetzung von chemotaktischen Zytokinen verändert und somit fehlt für die Einwanderung CD45⁺-Leukozyten ein inflammatorischer Stimulus.

Ursächlich für dieses verstärkte Vorkommen von inflammatorischen Zellen den Tieren ohne funktionales MLKL und somit ohne funktionierende Nekroptose müssen andere Trigger, als die Ausschüttung von DAMPs durch nekroptotische Zellen in Betracht gezogen werden, da durch die fehlende Nekroptose weniger DAMPs freigesetzt werden. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass von Nekroptose unabhängige Signalwege inflammatorische Vorgänge ablaufen, wie beispielsweise Ripk3 vermittelte Interleukin-1 β -Aktivierung oder TNF- α -Produktion.¹⁰⁴ In diesem Mausmodell würde dementsprechend dieser inflammatorische, Nekroptose-unabhängige Signalweg von Ripk3 durch das Fehlen von funktionalem MLKL vermehrt eingeschlagen werden und somit die gesteigerte Immunzellinfiltration bei MLKL-Defizienz möglicherweise erklären.

Hier muss einschränkend berücksichtigt werden, dass es sich bei den durchgeführten Experimenten allein um Immunfluoreszenzfärbungen von histologischen Schnitten der Aorta handelt und nur teilweise statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten. Möglicherweise spielen hier auch eine zu kleine Anzahl der untersuchten Tiere eine Rolle. Weiterführende Untersuchungen, wie zum Beispiel eine FACS-Analyse oder Zytokin-Assays der Ao. Asc., sollten durchgeführt werden, um die beschriebenen Erkenntnisse zu validieren und pathophysiologisch zu analysieren. In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede in der Immunzellinfiltration festgestellt werden, die eine wesentliche Kontribution für den beobachteten Phänotypen darstellen.

5.2. Einfluss von MLKL-Defizienz auf die strukturelle Integrität von MFS-assoziierten TAA

Einen wichtigen Beitrag zur strukturellen Integrität der Wand von Blutgefäßen stellt die EZM dar.¹⁰⁵ Die EZM besteht aus Kollagenen, elastischen Fasern, Proteoglykanen und strukturellen Glykoproteinen.⁵ Insbesondere die Degradierung und Umstrukturierung der elastischen Fasern spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Aneurysmen.¹⁰⁶

5.2.1. Integrität der elastischen Fasern und Aktivität von MMPs

In der Resorcin-Fuchsin-Färbung konnte gezeigt werden, dass nicht nur bei den MFS Tieren, sondern auch bei den pDKO Tieren eine signifikant erhöhte Zahl an Strangbrüchen der elastischen Fasern im Vergleich zum WT vorliegt. Zusätzlich konnte eine vermehrte Fragmentierung der elastischen Fasern bei den pMLKL Tieren festgestellt werden. Daraus lässt sich folgern, dass sowohl die MLKL-Defizienz als auch das MFS, Einfluss auf die Integrität der elastischen Fasern in der EZM und somit auch auf die Struktur der Aortenwand haben. Die gesteigerte Fragmentierung von elastischen Fasern ist ein bekannter Bestandteil der aortalen Pathologie des MFS.⁹² Hierzu trägt zum einen die Fbn1 Mutation an sich bei, als auch daraus resultierende Veränderungen des SMC Phänotyps, von einem kontraktilen zu einem synthetischen Phänotypen, des TGF- β -Signaling und der MMP-Aktivität.⁹⁴ MMPs führen zu einer Zersetzung der elastischen Fasern.¹⁰⁷ Der synthetische SMC Phänotyp führt unter anderem zu einer gesteigerten Produktion der MMPs.⁹⁴ Dies legt nahe, dass sich die Fbn1 Mutation, der SMC Phänotyp, das TGF- β -Signaling und die MMP-Aktivität wechselseitig beeinflussen. Veränderungen der SMCs, aufgrund der Fbn1 Mutation, hinzu einem synthetischen Phänotypen können durch verändertes TGF- β -Signaling die MMP-Aktivität erhöhen und somit die Entstehung von TAAs begünstigen.

Eine gesteigerte MMP-Aktivität war in der durchgeführten in-situ-Zymografie erkennbar. Hierbei hatten sowohl die pMLKL, also auch die pDKO Tiere eine signifikant erhöhte MMP-Aktivität im Vergleich zum WT. Zusätzlich zeigte sich, dass die pDKO Tiere ebenfalls gegenüber den MFS-Tieren eine signifikant erhöhte MMP-Aktivität haben. Was die Vermutung zulässt, dass nicht nur das MFS, sondern auch die MLKL-Mutation einen Einfluss auf die MMP-Aktivität hat. Darüber hinaus zeigen auch die qPCRs der Zellkultur eine numerische Steigerung der Mmp-Expression in allen Genotypen gegenüber WT, was dafürspricht, dass die gesteigerte MMP-Aktivität durch ein gesteigertes MMP-Vorkommen auf der Basis einer gesteigerten MMP-Sekretion beruhen könnte.

Zusammenfassend kann hier dargestellt werden, dass die heruntergesetzte strukturelle Integrität der EZM in MLKL-defizienten MFS-assoziierten TAAs möglicherweise durch gesteigerte MMP-Aktivität entsteht. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse sollten weitere Experimente folgen, wobei es sich hier anbieten würde dies durch die Behandlung der Tiere mit einem MMP-Inhibitor zu erreichen und dann die oben durchgeführten Untersuchungen zu wiederholen. Es liegt nahe, dass die gesteigerte MMP-Aktivität unter anderem auf den synthetischen Phänotyp der SMCs zurückzuführen ist. Und das auf diesen veränderten Phänotyp über das MFS hinaus auch die MLKL-Mutation einen Einfluss hat. Dies wird im Folgenden weiterführend dargestellt.

5.3. Einfluss von MLKI-Defizienz auf den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen

SMCs führen in der Gefäßwand verschiedene Funktionen aus. Zum einen sind sie für die Kontraktilität und somit die Anpassung des Blutdrucks und der Gefäßweite zuständig, zum anderen für die Synthese von EZM-Bestandteilen. Um diese vielfältigen Aufgaben auszuführen, können SMCs verschiedene Phänotypen annehmen, welche auf einem Spektrum von kontraktile bis synthetisch liegen. Für die verschiedenen Phänotypen sind neben einer unterschiedlichen Morphologie auch verschiedene genetische Marker etabliert. Für den kontraktile Phänotyp sind dies unter anderem α -SMA und smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC).¹² Synthetische SMCs sind vor allem für die Homöostase von EZM-Bestandteilen, wie Elastin und Kollagen, zuständig und können anhand dieser charakterisiert werden.^{51,108} Im MFS gelten SMCs als der für die Pathologie der TAAs hauptverantwortliche Zelltyp.⁵³ SMCs im MFS durchlaufen eine Veränderung ihres Phänotyps hin zu einem modifizierten SMC-Subcluster. Ein Marker für einen ablaufenden Phänotypswitch ist Tnfrsf11b.⁵³ Definiert wird dieses Subcluster durch eine gesteigerte Expression von Genen die in der EZM vorkommen und welchen die im NO-Signaling zu finden sind. Parallel findet sich in diesem SMC-Subcluster eine verringerte Expression von Genen, die das kontraktile Netzwerk betreffen.¹⁰⁹

5.3.1. Unterschiede zwischen den Genotypen

In den durchgeführten qPCRs von Aortengewebe konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zum WT bei den MFS, pMLKL und pDKO Tieren Gene, die als Marker für den synthetischen Phänotyp von SMCs gelten, wie beispielsweise Ccn2 und Fn1, numerisch gesteigert exprimiert werden. Ccn2 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der EZM.¹¹⁰ Fn1 ist ein wichtiger Bestandteil der EZM und ist nicht nur für ihre Stabilität von Bedeutung, sondern auch bei der Integration von Kollagenen in die EZM und der Assemblierung von elastischen Fasern.¹¹¹ Dies legt nahe, dass eine Veränderung in der Expression dieser Gene einen Einfluss auf die Entwicklung von TAAs haben kann. Zusammen mit der angedeuteten Hochregulation von Tnfrsf11b, einem Marker für den Phänotypswitch von SMCs, lässt sich aus diesen Resultaten vorsichtig schließen, dass in den pMLKL, pDKO und MFS Tieren ein eher synthetischer als kontraktile Phänotyp der SMCs vorliegt. Bei Betrachtung der qPCRs des gesamten Aortengewebe muss allerdings beachtet werden, dass nicht nur SMCs, sondern auch andere Zelltypen, wie beispielsweise Fibroblasten und Endothelzellen, in dem Gewebe vorhanden waren und somit die Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden sollten. Hinzu kommt das hier die Ao. Desc. zur Analyse verwendet wurde, welche nicht der Hauptort der Pathologie ist.

Um die Einschränkungen der qPCR des Aortengewebes möglichst zu reduzieren und ausschließlich SMCs zu betrachten, wurde die Zellkultur aus SMCs der Aorta etabliert. Hier

zeigten sich bei unbehandelten isolierten SMCs ebenfalls numerisch gesteigerte Expression von synthetischen Genen, wie Pai1, Eln und Fn1. Auch hier zeigte sich eine Hochregulation des SMC-Phänotypswitch-Markers Tnfrsf11b. Neben Fn1 hat auch Pai1 einen wichtigen Anteil an der Zusammensetzung der EZM, denn es kann durch MMP-Inhibition die Degradation der EZM abschwächen.¹¹² Eln wird von SMCs synthetisiert und bildet die geschichtete Struktur der EZM, womit Eln wichtig für die Elastizität der Aorta ist.⁵ Col3a1 ist bei den pDKO gegenüber WT signifikant gesteigert, zusammen gesehen mit dem numerisch gesteigerten Vorkommen bei pMLKL und MFS könnte angenommen werden, dass eine kompensatorisch gesteigerte Kollagenproduktion die Stabilität der Aorta wahren soll. Allerdings sollte hier berücksichtigt werden, dass nur die Expression betrachtet wurde und keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit die gesteigerte Expression tatsächliche Auswirkungen auf die Kollagendeposition in der Media und der daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften der Aorta hat.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass nicht nur, wie bereits bekannt, das MFS einen Einfluss auf den Phänotypen der SMCs und damit auf die von Ihnen produzierten EZM-Bestandteile hat, sondern dass auch die MLKL-Mutation eine Rolle bei der Entwicklung und Veränderung des SMC-Phänotyps und damit der EZM spielt und somit möglicherweise die Entstehung von TAAs bei pMLKL und MLKL KO Mäusen, sowie die Aggravation der TAAs bei den pDKO und DKO KO Mäusen erklären könnte.

5.3.2. Stimulation mit TGF- β

Um das dysregulierte TGF- β Signaling des MFS zu simulieren und dessen Auswirkungen auf die SMCs zu untersuchen, wurden in der Zellkultur die SMCs mit TGF- β stimuliert und danach auf Veränderungen der Genexpressionen, die auf eine Veränderung des Phänotyps hinweisen, untersucht. Hier konnte bei allen Genotypen gegenüber WT eine deutliche Steigerung der Expression von Genen, die für einen synthetischen Phänotyp sprechen, festgestellt werden. Mmp2, Col3a1, Eln, Ccn2, Fn1, Pai1 und Lox lagen deutlich erhöht vor, welches dafürspricht, dass die ohne Stimulation bereits festgestellten Unterschiede sich bei der Stimulation mit TGF- β verdeutlichen. Auch zeigen diese Ergebnisse, dass die SMCs der verschiedenen Genotypen offenbar unterschiedlich stark auf die Stimulation mit TGF- β reagieren. Es spielen also womöglich nicht nur die unterschiedlichen genetischen Ausgangsbedingungen der SMCs eine Rolle bei der Pathogenese. Sondern darüber hinaus kann die Genexpression, von für die Pathologie relevanten Genen, auch durch externe Faktoren, wie in diesem Fall durch das gesteigerte Vorhandensein von TGF- β , Genotyp-abhängig verändert werden. Für einen möglichen therapeutischen Ansatz könnte dies bedeuten, dass man mehrere Ansatzpunkte für Interventionen hat, mit einerseits der

Genexpression und andererseits dem Vorkommen von Wachstumshormonen, welche bei Bedarf auch synergistisch kombiniert werden könnten.

Dass *Ccn2*, *Col3a1*, *Fn1*, *Pai1* und *Eln* einen wichtigen Beitrag zur Homöostase und Integrität der EZM beitragen, wurde oben (s. 5.3.1) bereits erläutert. Dass sich dementsprechend durch einen veränderten Phänotyp die Expression dieser Gene und dadurch die EZM verändert, liegt somit nahe. Durch die Stimulation mit TGF- β zeigten sich nun weitere Veränderungen in durch SMCs produzierten, für einen veränderten Phänotyp sprechende und für die Integrität der EZM relevanten Gene. Zum einen führt die Hochregulation von *Mmp2* zu einer gesteigerten Degradation der EZM,⁹⁴ zum anderen führt eine verstärkte Produktion von Kollagen zu einer steiferen Aortenwand und somit zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine Ruptur.³ LOX ist essentiell zur Verlinkung von Kollagen³ und daher ebenfalls wichtig für die Homöostase und Integrität der EZM, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung von TAAs hat. Dass diese veränderte Genexpression Resultat eines Phänotypswitch ist, wird durch die Steigerung der Expression von *Tnfrsf11b* unterstrichen.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur der Genotyp an sich, sondern auch die SMCs umgebenes TGF- β einen Einfluss auf die Entwicklung des Phänotyps der SMCs hat. Da der Phänotyp maßgeblich die Synthese wichtiger EZM-Bestandteile beeinflusst, kann angenommen werden, dass aufgrund der Wichtigkeit der EZM für die Entwicklung von TAAs, der SMC-Phänotyp eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Pathologie spielt. Hervorzuheben ist hier auch, dass diese Veränderung nicht nur wie aufgrund der aktuellen Forschungslage erwartet bei MFS Tieren vorliegen, sondern dass sie in sehr ähnlicher Ausprägung auch bei den MLKL-defizienten Tieren vorliegen. Dies unterstreicht die wichtige Rolle die MLKL offenbar zur regulären SMC-Funktion und somit der Integrität der Aortenwand beiträgt.

Das der Phänotyp der SMCs und das TGF- β -Signaling miteinander verknüpft sind, legen nicht nur die oben bereits beschriebenen Ergebnisse und Primer der Zellkulturversuche nahe. In weiteren Analysen der Zellkultur mit anderen Primern zeigten eine gesteigerte Expression des TGF- β -RI in allen Genotypen gegenüber WT schon im Medium und deutlich ausgeprägter noch unter Stimulation mit TGF- β . Auch unter Stimulation mit TNF- α konnte eine gesteigerte Expression der TGF- β -RI in allen Genotypen im Vergleich zum WT festgestellt werden. Das Ansprechen auf eine Stimulation mit TNF- α deutet an, dass ein inflammatorischer Stimulus das TGF- β -Signaling beeinflusst und dadurch den Phänotyp der SMCs und auch die EZM. Insgesamt legen die Ergebnisse der Zellkultur zunächst nahe, dass nicht allein das MFS einen Einfluss auf die Anwesenheit des TGF- β -RI und somit das TGF- β -Signaling hat, sondern dass auch die MLKL-Mutation hier eine Rolle spielt. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Ergebnisse der qPCR des Aortengewebes, wo sich ebenfalls eine verstärkte Expression des TGF- β -RI in den pMLKL und pDKO Tieren zeigte. Darüber hinaus ergab auch die IF auf TGF-

RI ebenfalls eine numerische Steigerung von TGF-RI bei den pMLKL und pDKO Tieren. Zusätzlich deuten auch die Ergebnisse der IF auf pERK, wo sich eine numerische Steigerung der pERK-Vorkommens in den pMLKL und pDKO Tieren erahnen ließ, in eine ähnliche Richtung. Dass das TGF- β -Signaling der SMCs in der Media der Aortenwand der thorakalen Aorta verändert ist, kann nicht nur an der erhöhten Expression des TGF- β -RI festgemacht werden, sondern wird durch das ebenfalls gesteigerte Vorliegen von Fn1 und Col3a1 unterstützt. Gesteigerte Expression von Fn1 und vermehrtes Kollagen sind Folgen einer gesteigerten Aktivierung des TGF- β Signalwegs und Zeichen eines Gefäßumbaus.¹¹³ Eine mögliche Ursache für das verstärkte TGF- β -Signaling ist das gesteigerte Vorhandensein von MMP2.¹¹³ Eine gesteigerte MMP-Aktivität konnte in der in-situ-Zymografie nachgewiesen werden, ein vermehrtes Vorkommen von MMPs in den qPCRs von Gewebe und in der Zellkultur sowohl unter nativen Bedingungen, als auch nach Stimulation mit TGF- β .

In der Zusammenschau kann festgestellt werden, dass eine mögliche Ursache der Entstehung der TAAs in pMLKL, MFS und pDKO Tieren die beschriebenen Veränderungen der EZM sind. Hierbei spielen wahrscheinlich insbesondere die Degradation des Elastins, mit kompensierender erhöhter Produktion von Kollagen, durch das gesteigerte Vorkommen von MMPs eine wichtige Rolle. Ebenfalls bedeutsam ist die vermehrte Produktion von Fn1, Pai1, Lox und Kollagenen, welche essenziell für die Homöostase der EZM sind. Die vermehrte Produktion dieser EZM-Bestandteile resultiert mit großer Wahrscheinlichkeit aus dem veränderten Phänotyp der SMC, welcher tendenziell nicht mehr dem kontraktiven Spektrum zugeordnet werden kann, sondern eher synthetisch ist. Da sich das TGF- β -Signaling und die EZM wechselseitig beeinflussen, ist zu vermuten, dass das TGF- β -Signaling und der SMC-Phänotyp sich ebenso gegenseitig beeinflussen und dadurch einen großen Anteil an der Entstehung der TAA-Pathologie haben. Da diese Veränderungen des TGF- β -Signalings und SMC-Phänotyp auch bei Stimulation mit TNF- α nachgewiesen werden konnten, ist zu bedenken, dass eine gewisse latente Inflammation eine Rolle in der Pathogenese einnehmen kann. Auch zeigen diese Erkenntnisse, dass nicht nur das MFS das TGF- β -Signaling beeinflussen, auch die MLKL-Mutation scheint hier einen entscheidenden Einfluss zu haben.

5.3.3. Stimulation mit TNF- α

Beim MFS kommt vermehrt TNF- α in der Aorta vor und es ist ein allgemein gesteigertes inflammatorisches Geschehen in der Aorta vorhanden.¹¹⁴ Auch bei der Nekroptose spielt TNF- α eine wichtige Rolle, da es als wichtigster Stimulus für die Einleitung dieser gesehen wird.⁶⁹ Um dieses inflammatorische Milieu, zu simulieren und weitergehend zu untersuchen, wurden die SMCs aller untersuchten Genotypen in der Zellkultur mit TNF- α stimuliert. Um diese Einflüsse auf den SMC Phänotyp zu untersuchen, wurden die hierfür ausgesuchten Gene untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der inflammatorische Stimulus ebenfalls zu einen

Phänotypswitch der SMCs aus der thorakalen Aorta beitragen kann, denn Tnfrsf11b lag in allen Genotypen (pMLKL, MLKL KO, MFS, pDKO und DKO KO) im Vergleich zum WT ebenfalls erhöht vor. Konsequenterweise konnte in der qPCR ebenfalls eine gesteigerte Expression von Mmp2, Eln, Fn1, Pai1 und Col3a1 insbesondere in den Mlkl-mutierten mit und ohne zusätzlichem MFS festgestellt werden. Auch hier ist anzunehmen, dass die Veränderung dieser Genexpressionen essenzielle Auswirkungen auf die EZM haben. Des Weiteren spricht dieses Expressionsmuster für das Entwickeln eines eher synthetischen Phänotyps der SMCs unter Stimulation mit TNF- α . Dementsprechend ist eine inflammatorische Komponente, welche womöglich durch die MLKL-Defizienz verstärkt wird, in der Pathogenese der TAAs nicht zu vernachlässigen und sollte weitergehend untersucht werden. Hierbei sollte auch der inflammatorische, nekroptose-unabhängige Signalweg von RIPK3 (s. 5.1.1.) untersucht werden, da dieser zu einer vermehrten Produktion von TNF- α führt und möglicherweise das Ansprechen der SMCs auf TNF- α so erklärt werden könnte. Andererseits ist zu berücksichtigen, dass TNF- α an Fn1 binden kann und die Einwanderung von Leukozyten in die EZM fördern kann.¹¹⁵ Das würde wiederum bedeuten, dass die EZM-Veränderung auch zu einer Aufrechterhaltung beziehungsweise Verstärkung der Entzündung in der Aortenwand führen kann. Den Ergebnissen nach beeinflusst anscheinend nicht nur das MFS, sondern insbesondere auch die MLKL-Mutation die zelluläre Antwort auf die Stimulation mit TNF- α . Möglicherweise spielt hier der durch die MLKL-Mutation veränderte endosomale Vesikeltransport sowie die lysosomale Degradierung von Vesikeln eine Rolle.⁸²

5.4. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse mögliche Ursachen der Aggravation der aortalen MFS-Pathologie durch die MLKL-Defizienz.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich weder bei der Immunzellinfiltration noch bei Nox-induziertem ROS ein entscheidender Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte. Somit lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass sie wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle in der TAA-Pathogenese einnehmen.

Es konnten dafür wesentliche Unterschiede in der Degradierung der EZM der Aortenwand vor allem durch vermehrte Elastin-Strangbrüche und eine gesteigerte Expression von Kollagen gezeigt werden. Als mögliche mechanistische Grundlage für die Elastin-Degradation konnte eine gesteigerte MMP-Aktivität dargestellt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass weitere wichtige Bestandteile der EZM, welche zur Homöostase dieser beitragen, in den SMCs, nicht nur denen mit MFS, sondern auch in denen mit alleiniger MLKL-Mutation, verstärkt exprimiert wurden. Das daraus zustande kommende Remodeling der EZM führt zu einer weniger stabilen Aortenwand und begünstigt dadurch wahrscheinlich die TAA-Bildung.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der Phänotypenswitch der SMCs sein. Es zeigten sich schon in der qPCR des Aortengewebe, aber insbesondere in der Zellkultur veränderte Expressionsmuster der SMCs. Die SMCs wandeln sich von einem kontraktilem Phänotyp, der wichtig für die mechanische Funktion der Aorta ist, hin zu einem synthetischen Phänotyp, der die Zusammensetzung der EZM der Aortenwand stark beeinflusst und somit auch die Anfälligkeit dieser für Dilatation und Dissektion. Auch konnte angedeutet werden, dass ein alteriertes TGF- β -Signaling einerseits einen Beitrag zur Veränderung der EZM-Zusammensetzung durch vermehrtes Vorhandensein von Fn1 und Kollagen leistet. Andererseits hat dieses auch Einfluss auf den SMC-Phänotyp, da die SMCs primär für die Produktion der EZM-Bestandteile zuständig sind. Beim Phänotypenwandel der SMCs konnte dargestellt werden, dass sowohl der Genotyp als auch die Stimulation mit TGF- β , also das Milieu einen entscheidenden Einfluss auf den Phänotypen haben können. Hierbei spielt nicht nur das MFS eine Rolle, auch die MLKL-Mutation an sich führt zu einer Veränderung des SMC-Phänotyps. Darüber hinaus konnte bei den Tieren mit MLKL-Mutation und MFS kann angedeutet ein additiver Effekt beider genetischer Modifikationen beobachtet werden. Somit kann abschließend festgehalten werden, dass nicht nur das MFS die SMCs, welche als wichtiger Bestandteil der Pathologie herausgearbeitet wurden, beeinflusst. Auch MLKL spielt hier gegebenenfalls eine entscheidende Rolle, welche es weiter zu untersuchen gilt.

5.5. Ausblick

Der naheliegende veränderte Phänotyp der SMCs wurde bisher allein auf RNA-Ebene untersucht. Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen auf die Proteinbiosynthese der SMCs könnten weitere Klärung der molekularen Geschehnisse liefern.

Dass das TGF- β -Signaling verändert ist, konnte bisher nur in kleinen Anteilen dargestellt werden und erfordert tiefgreifendere Analysen des kanonischen und nicht-kanonischen TGF- β -Signalwegs, um spezifische Ansatzpunkte für eine pharmakologische Intervention identifizieren zu können.

Weiterhin ist zu klären, wie es zu dem gesteigerten Vorhandensein des TGF- β -RI kommt und insbesondere, welche Rolle MLKL hierbei spielt, da sich dies nicht zwangsläufig anhand der aktuellen Erkenntnisse zum MFS erklären lässt. Möglicherweise spielt hier die, für TNF- α bereits beschriebene, MLKL-vermittelte Rezeptorendozytose eine Rolle.⁸²

Da AT-II-Rezeptorblocker bereits erfolgreich in der Klinik angewendet werden und Wechselwirkungen zwischen dem Angiotensin-Signalweg und TGF- β -Signalweg beschrieben wurden,¹¹⁶ sollte auch dieser Zusammenhang weiterführend erforscht werden.³¹

Darüber hinaus sollte die Rolle von Inflammation in der Aortenwand noch mit umfassenderen Methoden betrachtet werden, um auch hier mögliche pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zu entdecken.

Ein weiterer Forschungsansatz kann sein, ob durch die inhibierte Nekroptose eine Veränderung der Apoptose bei der Entstehung der TAAs von Bedeutung ist.

Zusammenfassend ist zur definitiven Aufklärung des molekularen Pathomechanismus noch weitere Forschung notwendig. Dafür konnte diese Arbeit oben beschriebene mögliche Forschungsansätze aufzeigen.

6. Literaturverzeichnis

1. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, et al. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM Guidelines for the Diagnosis and Management of Patients With Thoracic Aortic Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; **55**(14): e27-e129.
2. Isselbacher EM. Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* 2005; **111**(6): 816-28.
3. Jana S, Hu M, Shen M, Kassiri Z. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Experimental & Molecular Medicine* 2019; **51**(12): 1-15.
4. Domagała D, Data K, Szyller H, et al. Cellular, Molecular and Clinical Aspects of Aortic Aneurysm—Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* 2024; **13**(3): 274.
5. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Letters* 1990; **268**(2): 386-93.
6. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews* 2009; **89**(3): 957-89.
7. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 2006; **69**(3): 562-73.
8. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology* 2004; **16**(5): 558-64.
9. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, et al. Expression of Matrix Metalloproteinases and Endogenous Inhibitors Within Ascending Aortic Aneurysms of Patients With Marfan Syndrome. *Circulation* 2006; **114**(1_supplement): I-365-I-70.
10. Milewicz DM, Guo D-C, Tran-Fadulu V, et al. Genetic Basis of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections: Focus on Smooth Muscle Cell Contractile Dysfunction. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2008; **9**(Volume 9, 2008): 283-302.
11. Davis EC. Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab Invest* 1993; **68**(1): 89-99.
12. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007; **15**(3): 100-8.
13. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiological Reviews* 1979; **59**(1): 1-61.
14. Guo X, Chen SY. Transforming growth factor- β and smooth muscle differentiation. *World J Biol Chem* 2012; **3**(3): 41-52.
15. Massagué J. TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry* 1998; **67**(Volume 67, 1998): 753-91.
16. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; **8**(11): 857-69.
17. Goumans M-J, Liu Z, ten Dijke P. TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Research* 2009; **19**(1): 116-27.
18. Clayton SW, Ban GI, Liu C, Serra R. Canonical and noncanonical TGF- β signaling regulate fibrous tissue differentiation in the axial skeleton. *Scientific Reports* 2020; **10**(1): 21364.
19. Gouveia e Melo R, Silva Duarte G, Lopes A, et al. Incidence and Prevalence of Thoracic Aortic Aneurysms: A Systematic Review and Meta-analysis of Population-Based Studies. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2022; **34**(1): 1-16.
20. Raimund Erbel VA, Catherine Boileau., Eduardo Bossone RDB, Holger Eggebrecht, Arturo Evangelista, Volkmar Falk, Herbert Frank, Oliver Gaemperli, Martin Grabenwöger., Axel Haverich BI, Athanasios John Manolis, Folkert Meijboom, Christoph A. Nienaber, Marco Roffi, Hervé Rousseau, Udo Sechtem, Per Anton Sirnes, Regula S. von Allmen, Christiaan J.M. Vrints. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases. *European Heart Journal* 2014; **35**: 2873–926.
21. LeMaire SA, Russell L. Epidemiology of thoracic aortic dissection. *Nature Reviews Cardiology* 2011; **8**(2): 103-13.
22. Johansson G, Markström U, Swedenborg J. Ruptured thoracic aortic aneurysms: A study of incidence and mortality rates. *Journal of Vascular Surgery* 1995; **21**(6): 985-8.

23. Ding W, Liu Y, Su Z, Li Q, Wang J, Gao Y. Emerging Role of Non-Coding RNAs in Aortic Dissection. *Biomolecules* 2022; **12**(10): 1336.
24. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 2021; **77**(4): e25-e197.
25. Tang PCY, Coady MA, Lovoulos C, et al. Hyperplastic Cellular Remodeling of the Media in Ascending Thoracic Aortic Aneurysms. *Circulation* 2005; **112**(8): 1098-105.
26. Halushka MK. Single gene disorders of the aortic wall. *Cardiovascular Pathology* 2012; **21**(4): 240-4.
27. Ramachandra CJ, Mehta A, Guo KW, Wong P, Tan JL, Shim W. Molecular pathogenesis of Marfan syndrome. *Int J Cardiol* 2015; **187**: 585-91.
28. Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys BL, et al. Effect of Mutation Type and Location on Clinical Outcome in 1,013 Proband with Marfan Syndrome or Related Phenotypes and FBN1 Mutations: An International Study. *The American Journal of Human Genetics* 2007; **81**(3): 454-66.
29. Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY, et al. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics* 1993; **17**(2): 468-75.
30. 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.
31. Zeigler SM, Sloan B, Jones JA. Pathophysiology and Pathogenesis of Marfan Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2021; **1348**: 185-206.
32. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of Medical Genetics* 2010; **47**(7): 476-85.
33. Pollock L, Ridout A, Teh J, et al. The Musculoskeletal Manifestations of Marfan Syndrome: Diagnosis, Impact, and Management. *Curr Rheumatol Rep* 2021; **23**(11): 81.
34. Pyeritz RE. The Marfan syndrome. *Annu Rev Med* 2000; **51**: 481-510.
35. Konradsen TR, Zetterström C. A descriptive study of ocular characteristics in Marfan syndrome. *Acta Ophthalmologica* 2013; **91**(8): 751-5.
36. Lundby R, Rand-Hendriksen S, Hald JK, et al. Dural Ectasia in Marfan Syndrome: A Case Control Study. *American Journal of Neuroradiology* 2009; **30**(8): 1534-40.
37. Sensenig DM, LaMarche P. Marfan's syndrome and spontaneous pneumothorax. *The American Journal of Surgery* 1980; **139**(4): 602-4.
38. De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RCM, Pyeritz RE. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 1996; **62**(4): 417-26.
39. Groth KA, Stochholm K, Hove H, Andersen NH, Gravholt CH. Causes of Mortality in the Marfan Syndrome (from a Nationwide Register Study). *The American Journal of Cardiology* 2018; **122**(7): 1231-5.
40. Shores J, Berger KR, Murphy EA, Pyeritz RE. Progression of Aortic Dilatation and the Benefit of Long-Term β -Adrenergic Blockade in Marfan's Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1994; **330**(19): 1335-41.
41. 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.
42. Groenink M, den Hartog AW, Franken R, et al. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *European Heart Journal* 2013; **34**(45): 3491-500.
43. Dietz HC, Cutting CR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991; **352**(6333): 337-9.
44. Byers PH. Determination of the molecular basis of Marfan syndrome: a growth industry. *The Journal of Clinical Investigation* 2004; **114**(2): 161-3.
45. 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.

46. Hubmacher D, Tiedemann K, Reinhardt DP. Fibrillins: From Biogenesis of Microfibrils to Signaling Functions. *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press; 2006: 93-123.
47. Ramirez F, Dietz HC. Marfan syndrome: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Current Opinion in Genetics & Development* 2007; **17**(3): 252-8.
48. Cikach FS, Koch CD, Mead TJ, et al. Massive aggrecan and versican accumulation in thoracic aortic aneurysm and dissection. *JCI Insight* 2018; **3**(5).
49. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of Hyaluronan- and Versican-Rich Pericellular Matrix Is Required for Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999; **19**(4): 1004-13.
50. Xiong W, Knispel RA, Dietz HC, Ramirez F, Baxter BT. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg* 2008; **47**(1): 166-72; discussion 72.
51. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic Alteration of Vascular Smooth Muscle Cells Precedes Elastolysis in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Circulation Research* 2001; **88**(1): 37-43.
52. Dietz HC, Loeys B, Carta L, Ramirez F. Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; **139c**(1): 4-9.
53. Pedroza AJ, Tashima Y, Shad R, et al. Single-Cell Transcriptomic Profiling of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Modulation in Marfan Syndrome Aortic Aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2020; **40**(9): 2195-211.
54. Cook JR, Clayton NP, Carta L, et al. Dimorphic Effects of Transforming Growth Factor- β Signaling During Aortic Aneurysm Progression in Mice Suggest a Combinatorial Therapy for Marfan Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2015; **35**(4): 911-7.
55. He R, Guo D-C, Estrera AL, et al. Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2006; **131**(3): 671-8.e2.
56. 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, 9.e1.
57. Ju X, Ijaz T, Sun H, et al. IL-6 Regulates Extracellular Matrix Remodeling Associated With Aortic Dilatation in a Fibrillin-1 Hypomorphic mgR/mgR Mouse Model of Severe Marfan Syndrome. *Journal of the American Heart Association* 2014; **3**(1): e000476.
58. Herranz-Iturbide M, Peñuelas-Haro I, Espinosa-Sotelo R, Bertran E, Fabregat I. The TGF- β /NADPH Oxidases Axis in the Regulation of Liver Cell Biology in Health and Disease. *Cells* 2021; **10**(9).
59. Manea A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell and Tissue Research* 2010; **342**(3): 325-39.
60. Li P-F, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor- β 1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Letters* 1999; **448**(2-3): 206-10.
61. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2001; **280**(1): C53-C60.
62. Lassègue B, Martín AS, Griendling KK. Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. *Circulation Research* 2012; **110**(10): 1364-90.
63. Emrich F, Penov K, Arakawa M, et al. Anatomically specific reactive oxygen species production participates in Marfan syndrome aneurysm formation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2019; **23**(10): 7000-9.
64. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology* 2008; **214**(2): 149-60.
65. Seo J, Kim MW, Bae K-H, Lee SC, Song J, Lee E-W. The roles of ubiquitination in extrinsic cell death pathways and its implications for therapeutics. *Biochemical Pharmacology* 2019; **162**: 21-40.

66. Jovinge S, Hultgårdh-Nilsson A, Regnström J, Nilsson J. Tumor Necrosis Factor- α Activates Smooth Muscle Cell Migration in Culture and Is Expressed in the Balloon-Injured Rat Aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; **17**(3): 490-7.
67. Vizzardi E, Cavazzana I, Sciatti E, et al. Evaluation of ascending aorta wall in rheumatoid arthritis by tissue and strain Doppler imaging during anti-tumor necrosis factor- α therapy. *Clin Cardiol* 2014; **37**(12): 738-43.
68. Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; **15**(2): 135-47.
69. Seo J, Nam YW, Kim S, Oh D-B, Song J. Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Experimental & Molecular Medicine* 2021; **53**(6): 1007-17.
70. Kim EH, Wong S-W, Martinez J. Programmed Necrosis and Disease: We interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death & Differentiation* 2019; **26**(1): 25-40.
71. Mitroshina EV, Saviuk M, Vedunova MV. Necroptosis in CNS diseases: Focus on astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2023; **14**.
72. Liccardi G, Annibaldi A. MLKL post-translational modifications: road signs to infection, inflammation and unknown destinations. *Cell Death & Differentiation* 2023; **30**(2): 269-78.
73. Li Y, Lv J, Shi W, et al. Inflammasome Signaling: A Novel Paradigm of Hub Platform in Innate Immunity for Cancer Immunology and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 2021; **12**.
74. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 2015; **517**(7534): 311-20.
75. Pierdomenico M, Negroni A, Stronati L, et al. Necroptosis Is Active in Children With Inflammatory Bowel Disease and Contributes to Heighten Intestinal Inflammation. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 2014; **109**(2): 279-87.
76. Bonnet Marion C, Preukschat D, Welz P-S, et al. The Adaptor Protein FADD Protects Epidermal Keratinocytes from Necroptosis In Vivo and Prevents Skin Inflammation. *Immunity* 2011; **35**(4): 572-82.
77. Roychowdhury S, McMullen MR, Pisano SG, Liu X, Nagy LE. Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury. *Hepatology* 2013; **57**(5): 1773-83.
78. Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *The American Journal of Pathology* 2020; **190**(2): 272-85.
79. Luedde M, Lutz M, Carter N, et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2014; **103**(2): 206-16.
80. Nemade HN, Mehrkens D, Lottermoser HS, et al. Inhibition of MLKL impairs abdominal aortic aneurysm development by attenuating smooth muscle cell necroptosis. *bioRxiv* 2022: 2022.11.24.517638.
81. Wang Q, Zhou T, Liu Z, et al. Inhibition of Receptor-Interacting Protein Kinase 1 with Necrostatin-1s ameliorates disease progression in elastase-induced mouse abdominal aortic aneurysm model. *Scientific Reports* 2017; **7**(1): 42159.
82. Yoon S, Kovalenko A, Bogdanov K, Wallach D. MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity* 2017; **47**(1): 51-65.e7.
83. Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J, et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet* 1997; **17**(2): 218-22.
84. Pereira L, Lee SY, Gayraud B, et al. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(7): 3819-23.
85. Garcia LR, Tenev T, Newman R, et al. Ubiquitylation of MLKL at lysine 219 positively regulates necroptosis-induced tissue injury and pathogen clearance. *Nature Communications* 2021; **12**(1): 3364.

86. Murphy James M, Czabotar Peter E, Hildebrand Joanne M, et al. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity* 2013; **39**(3): 443-53.
87. Wu J, Huang Z, Ren J, et al. Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis. *Cell Res* 2013; **23**(8): 994-1006.
88. Vandooren J, Geurts N, Martens E, et al. Gelatin degradation assay reveals MMP-9 inhibitors and function of O-glycosylated domain. *World J Biol Chem* 2011; **2**(1): 14-24.
89. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402-8.
90. Donovan JA, Koretzky GA. CD45 and the immune response. *J Am Soc Nephrol* 1993; **4**(4): 976-85.
91. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation* 2017; **97**(1): 4-13.
92. Wanga S, Hibender S, Ridwan Y, et al. Aortic microcalcification is associated with elastin fragmentation in Marfan syndrome. *The Journal of Pathology* 2017; **243**(3): 294-306.
93. Xiong W, Meisinger T, Knispel R, Worth JM, Baxter BT. MMP-2 regulates Erk1/2 phosphorylation and aortic dilatation in Marfan syndrome. *Circ Res* 2012; **110**(12): e92-e101.
94. Seeburun S, Wu S, Hemani D, et al. Insights into elastic fiber fragmentation: Mechanisms and treatment of aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Vascular Pharmacology* 2023; **153**: 107215.
95. Dietz HC. TGF-beta in the pathogenesis and prevention of disease: a matter of aneurysmic proportions. *J Clin Invest* 2010; **120**(2): 403-7.
96. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(5).
97. Huang F, Chen Y-G. Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell & Bioscience* 2012; **2**(1): 9.
98. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* 2005; **118**(16): 3569-72.
99. Takeda N, Hara H, Fujiwara T, Kanaya T, Maemura S, Komuro I. TGF- β Signaling-Related Genes and Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; **19**(7): 2125.
100. Radonic T, de Witte P, Groenink M, et al. Inflammation aggravates disease severity in Marfan syndrome patients. *PLoS One* 2012; **7**(3): e32963.
101. THOMPSON RW, PARKS WC. Role of Matrix Metalloproteinases in Abdominal Aortic Aneurysms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996; **800**(1): 157-74.
102. Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: Role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *Journal of Vascular Surgery* 2002; **35**(2): 254-61.
103. Cho MJ, Lee M-R, Park J-G. Aortic aneurysms: current pathogenesis and therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine* 2023; **55**(12): 2519-30.
104. Lawlor KE, Khan N, Mildenhall A, et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nature Communications* 2015; **6**(1): 6282.
105. Xu J, Shi G-P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2014; **1842**(11): 2106-19.
106. Cocciolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, Johnson EO, Murshed M, Wagenseil JE. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2018; **315**(2): H189-H205.
107. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, et al. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with bicuspid or tricuspid aortic valves. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2007; **133**(4): 1028-36.
108. Pedroza AJ, Koyano T, Trojan J, et al. Divergent effects of canonical and non-canonical TGF- β signalling on mixed contractile-synthetic smooth muscle cell phenotype in human Marfan syndrome aortic root aneurysms. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2020; **24**(3): 2369-83.
109. Sun Y, Asano K, Sedes L, et al. Dissecting aortic aneurysm in Marfan syndrome is associated with losartan-sensitive transcriptomic modulation of aortic cells. *JCI Insight* 2023; **8**(10).

110. Tsoutsman T, Wang X, Garchow K, Riser B, Twigg S, Semsarian C. CCN2 plays a key role in extracellular matrix gene expression in severe hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2013; **62**: 164-78.
111. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; **26**: 397-419.
112. Rahman FA, Krause MP. PAI-1, the Plasminogen System, and Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; **21**(19): 7066.
113. Wang M, Zhao D, Spinetti G, et al. Matrix Metalloproteinase 2 Activation of Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 1–Type II Receptor Signaling Within the Aged Arterial Wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006; **26**(7): 1503-9.
114. Guido MC, Lopes NdM, Albuquerque CI, et al. Treatment With Methotrexate Associated With Lipid Core Nanoparticles Prevents Aortic Dilatation in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2022; **9**.
115. Franitza S, Hershkoviz R, Kam N, et al. TNF-alpha associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells. *J Immunol* 2000; **165**(5): 2738-47.
116. Humphrey JD, Schwartz MA, Tellides G, Milewicz DM. Role of Mechanotransduction in Vascular Biology. *Circulation Research* 2015; **116**(8): 1448-61.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Makroskopische Anatomie der thorakalen Aorta | 11 |
| Abbildung 2: Mikroskopische Anatomie der Aortenwand | 12 |
| Abbildung 3: Einteilung von thorakalen Aortenaneurysmen..... | 15 |
| Abbildung 4: Fibrillin-1 | 19 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des nekroptotischen Signalwegs..... | 23 |
| Abbildung 6: Durchmesser des Aortenbulbus in der Sonografie | 26 |
| Abbildung 7: α -SMA Färbung von SMCs in Zellkultur..... | 36 |
| Abbildung 8: Leukozyteninfiltration in der Media der Aortenwand anhand von CD45 positiven Leukozyten pro Querschnitt..... | 38 |
| Abbildung 9: Infiltration von CD68 positiven Zellen in die Aortenwand pro Querschnitt..... | 39 |
| Abbildung 10: prozentuales Nox-2 Vorkommen in der Media der Aortenwand pro Querschnitt | 40 |
| Abbildung 11: Quantifizierung der Fragmentierung der elastischen Fasern in der Media der Aortenwand..... | 41 |
| Abbildung 12: Resorcin-Fuchsin-Färbung von histologischen Schnitten der Ao. asc. | 41 |
| Abbildung 13: a) Quantifizierung MMP-2/9-Aktivität als prozentuale positive Fläche der Media der Aorta; b) in-situ-Zymografie der Ao. Asc..... | 42 |
| Abbildung 14: Quantifizierung TGF- β Rezeptor I Vorkommen in der Media der Aortenwand pro Querschnitt..... | 43 |
| Abbildung 15: qPCR Ao. desc. TGF- β -Primer..... | 44 |
| Abbildung 16: qPCR Zellkultur Kontrolle (inkubiert in Medium) TGF- β -Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout. | 45 |
| Abbildung 17: qPCR TGF- β -Stimulation. TGF- β -Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout..... | 46 |
| Abbildung 18: qPCR TNF- α -Stimulation. TGF- β -Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout..... | 47 |
| Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung auf pErk-Vorkommen in der Media der Aorta pro Querschnitt..... | 48 |
| Abbildung 20: qPCR Ao. desc.. EZM-Primer. | 49 |
| Abbildung 21: qPCR Zellkultur Kontrolle (inkubiert in Medium). EZM-Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout..... | 50 |
| Abbildung 22: qPCR TGF- β -Stimulation. EZM-Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout..... | 51 |

Abbildung 23: qPCR TNF- α -Stimulation. EZM-Primer. a) Genotypen mit MLKL-Mutation. b) Genotypen mit MLKL-Knockout.....52

7.2. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| Tabelle 2: Scoring System für systemische Beteiligungen beim MFS..... | 17 |
| Tabelle 3: Material..... | 28 |
| Tabelle 5: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen | 28 |
| Tabelle 6: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen | 29 |
| Tabelle 7: qPCR Primer..... | 30 |
| Tabelle 8: Mauslinien..... | 31 |

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Aktuell wurden keine Ergebnisse dieser Arbeit in bereits vorab veröffentlicht.