

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

**Bedeutung von nitrierten Fettsäuren in der  
Pathophysiologie von thorakalen Aortenaneurysmen  
im Rahmen des Marfan-Syndroms**

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

vorgelegt von  
Julian Lemies  
aus Recklinghausen

promoviert am 12. Dezember 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2022

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

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.<sup>1</sup>

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

Herr Dr. med. Felix Nettersheim

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

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

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Nettersheim durchgeführt worden.

Die Organentnahmen an den Versuchstieren und die Implantation der osmotischen Pumpen wurde von mir nach Einarbeitung in die Methode durchgeführt. Die Echokardiographie der Versuchstiere wurde anfänglich von Herrn Nettersheim und mir zusammen durchgeführt, später von mir selbstständig. Die Auswertungen der Echokardiographie-Bilder wurde von Herrn Nettersheim und mir verblindet durchgeführt. Die für dieses Projekt durchgeführten histologischen Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen wurden von mir nach Erlernen der Methodik selbstständig durchgeführt und ausgewertet. Die qPCR und das Design der Primer führte ich selbstständig durch, wobei ich z. T. von Herrn Nettersheim unterstützt wurde. Die angegebenen kolorimetrischen Assays und ELISAs habe ich mit Unterstützung von Herrn Nettersheim durchgeführt.


Die Implantation der Transmitter für die invasive Blutdruckmessung wurde von Herrn Grimm durchgeführt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse mittels GraphPad übernahm Herr Nettersheim mit meiner Unterstützung.

Das Manuskript für die Veröffentlichung hat Herr Nettersheim mit meiner Hilfe verfasst und eingereicht.

## 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 verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 18.05.2022

Unterschrift: .....

<sup>1</sup>Bei kumulativen Promotionen stellt nur die eigenständig verfasste Einleitung und Diskussion die Dissertationsschrift im Sinne der Erklärung gemäß dieser Erklärung dar.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. Felix Nettersheim, der mich während des gesamten Prozesses dieses Projektes tatkräftig unterstützt und betreut hat und ohne dessen Unterstützung die Durchführung nicht möglich gewesen wäre. Auch möchte ich mich für das Korrekturlesen und die wertvollen Anmerkungen bei ihm bedanken. Des Weiteren danke ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Matti Adam, der maßgeblich zur Erarbeitung der Fragestellung und Qualität des Projektes beigetragen hat. Auch danke ich unserem Klinikdirektor Univ.-Prof. Dr. med. Stephan Baldus, der dem Projekt durch seine langjährige Erfahrung im Bereich der experimentellen Medizin immer konstruktive Vorschläge geliefert hat.

Ebenfalls möchte ich mich für die finanzielle Förderung durch das Köln Fortune-Programm bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Martin Mollenhauer, Dr. med. Dennis Mehrkens sowie dem gesamten Team Arbeitsgruppe der experimentellen Kardiologie für die tatkräftige Unterstützung und praktische Anleitung und Hilfe im Labor bedanken.

Für die Zusammenarbeit bei der Veröffentlichung des Artikels danke ich zusätzlich Felix Nettersheim, Simon Braumann, Simon Geißen, Senai Bokredenghel, Richard Nies, Alexander Hof, Holger Winkels, Bruce A. Freeman, Anna Klinke, Volker Rudolph, Stephan Baldus, Dennis Mehrkens, Martin Mollenhauer und Matti Adam.

Diese Arbeit ist meinen Eltern und Geschwistern gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>10</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1 Marfan Syndrom	12
2.1.1. Historie des Marfan-Syndroms	12
2.1.2. Diagnostik des Marfan-Syndroms	12
2.1.3. Genetik des Marfan-Syndroms	13
2.1.4. MMP-katalysierte Elastin-Fragmentierung im Rahmen des Marfan-Syndroms	14
2.1.5. Folgen des dysregulierten TGF- $\beta$ Signaling beim Marfan-Syndrom	15
2.1.6. Oxidativer Stress als weiterer Faktor des Aneurysma-Wachstums	16
2.1.7. Inflammatorische Prozesse im Rahmen des Marfan-Syndroms	17
2.1.8. NF- $\kappa$ B vermittelte Prozesse im Rahmen des Marfan-Syndroms	17
2.1.9. VSMC Phänotypwechsel in der Entwicklung des Aortenaneurysmas	18
2.1.10. Therapeutische Optionen des Marfan Syndroms	20
2.2 Nitroalkene	21
2.2.1. Elektrophile Reaktion vermittelt durch Nitroalkene	22
2.2.2. Translationale und transkriptionelle Wirkung	23
2.2.3. Wirkung von nitrierten Fettsäuren auf MMPs	24
2.2.4. Wirkung von nitrierten Fettsäuren auf die Entstehung von oxidativem Stress	25
2.2.5. Auswirkung von Nitroalkenen auf die NO-Produktion	26
2.2.6. Wirkung von Nitroalkenen in kardiovaskulären Erkrankungen	26
2.2.6.1 Arterielle Hypertonie	26
2.2.6.2 Arteriosklerose und andere inflammatorische Erkrankungen	27
2.2.6.3 NO <sub>2</sub> -FA bei pulmonal-arterieller Hypertonie	27
2.2.6.4 NO <sub>2</sub> -FA bei Vorhofflimmern	27
2.2.6.5 NO <sub>2</sub> -FA bei ischämischer Herzerkrankung	28
2.2.6.6 Antidiabetogene Wirkung von Nitroalkenen	28
2.2.7. Pharmazeutisches Potenzial der Nitroalkene	28
2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	30
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
3.1 Tiere und Experimentdesign	31

<b>3.2</b>	<b>Echokardiographie</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Akzeleriertes Modell der MFS bedingten aortalen Pathologie</b>	<b>32</b>
<b>3.4</b>	<b>Organentnahmen</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Histologische und molekularbiologische Methoden</b>	<b>33</b>
3.5.1.	Histologie	33
3.5.2.	In situ Zymographie	34
3.5.3.	Gelatine Zymographie	34
3.5.4.	Immunoblot Analyse	35
3.5.5.	Quantitative real-time PCR	35
3.5.6.	Aktives TGF- $\beta$ 1 ELISA	36
3.5.7.	Xanthinoxidase Aktivität Assay	36
3.5.8.	Nitrat / Nitrit kolorimetrischer Assay	36
<b>3.6</b>	<b>Blutdruckmessung</b>	<b>36</b>
<b>3.7</b>	<b>Plasma Zytokin Array</b>	<b>36</b>
<b>3.8</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>NO<sub>2</sub>-OA verhindert das Fortschreiten der MFS-bedingten Aortenerkrankung</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>NO<sub>2</sub>-OA vermindert die MMP-vermittelte Elastinfragmentierung</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>NO<sub>2</sub>-OA hemmt die Überaktivierung von ERK1/2 und Smad2 in der Aorta ascendens bei MFS-Mäusen</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Die NOX-vermittelte ROS-Produktion und Apoptose ist in Marfan-Aorten erhöht und wird durch NO<sub>2</sub>-OA abgeschwächt</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>MFS-bedingte NOS2-Überaktivität wird durch NO<sub>2</sub>-OA über die Hemmung von NF-<math>\kappa</math>B vermindert</b>	<b>45</b>
<b>4.6</b>	<b>NO<sub>2</sub>-OA verbessert das Überleben in einem beschleunigten Modell der MFS-bedingten Aortenerkrankung</b>	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Effekte von nitrierten Fettsäuren auf den Phänotyp des Marfan-Syndroms</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss von NO<sub>2</sub>-OA auf das dysregulierte TGF-<math>\beta</math> Signaling</b>	<b>50</b>

<b>5.3</b>	<b>NF-<math>\kappa</math>B Überaktivität als weiterer Progressionsfaktor des TAAs</b>	<b>52</b>
<b>5.4</b>	<b>Reduktion der ROS-Produktion durch NO<sub>2</sub>-OA</b>	<b>53</b>
<b>5.5</b>	<b>Effekt von NO<sub>2</sub>-OA auf das akzelerierte Marfan-Syndrom Modell</b>	<b>55</b>
<b>5.6</b>	<b>NO<sub>2</sub>-OA als potenzieller therapeutischer Ansatz</b>	<b>55</b>
<b>5.7</b>	<b>Limitation des Modelles und Ausblick</b>	<b>57</b>
<b>5.8</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>6.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>6.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>68</b>
<b>7.1</b>	<b>Ergänzende Abbildungen</b>	<b>68</b>
<b>7.2</b>	<b>Ergänzende Tabellen</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>78</b>



## Abkürzungsverzeichnis

·OH	Hydroxylradikal
ADAMTS1	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1
AR	Aortenwurzel (aortic root)
ARE	Antioxidant Response Element
BMAL1	Brain and Muscle ARNT-Like 1
BP	Blutdruck (blood pressure)
CD	cluster of differentiation
COL1A1	$\alpha$ -1-Typ-I-Kollagen
COL3A1	$\alpha$ -1-Typ-III-Kollagen
CXA-10	Positionsisomer 10-NO <sub>2</sub> -OA
Cys166	Cystein an Stelle 166 der ERK
DHE	Dihydroethidium Färbung
ERK1/2	extracellular-signal regulated kinase 1/2
EVG	Elastica-van-Gieson-Färbung
EZM	extrazelluläre Matrix
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBN1	Fibrillin-1 Protein
<i>FBN1</i>	Fibrillin-1 Gen
Fbn1 <sup>C1041G/+</sup>	Mausmodell, in dem an Position 1041 im Fbn1 Gen die Aminosäure Cystein durch Glycin ersetzt wird
FSGS	fokal segmentalen Glomerulus Sklerose
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HO-1	Häm-Oxygenase-1
IL1	Interleukin-1
I $\kappa$ B	inhibitor of nuclear factor kappa B
JNK	Janus-Kinase
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
MAA	Mitte der Aorta ascendens
MFS	Marfan-Syndrom
MFS-Mäuse	Fbn1 <sup>C1041G/+</sup> Mäuse
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> -FA	nitrierte Fettsäuren

NO <sub>2</sub> -LA	Nitrolinolensäure
NO <sub>2</sub> -OA	Nitroölsäure
NOS	NO Synthase
NOS1	neuronal NO Synthase, nNOS
NOS2	induzierbare NO Synthase, iNOS
NOS3	endotheliale NO Synthase, eNOS
NOX	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase
Nrf2	nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxide O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
p65	Untereinheit 65 des Transkriptionsfaktors NF-κB
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
pp65	phosphoryliertes p65
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ
PPRE	Peroxisom-Proliferator-aktivierende Elemente
PWG	Pulswellengeschwindigkeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems
RGS5	Regulator of G Protein Signaling 5
RHOBTB1	Rho Related BTB Domain Containing 1
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SM22	smooth Muscle 22
SM-MHC	smooth Muscle Myosin heavy chain
SOD	Superoxid-Dismutase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAA	thorakales Aortenaneurysma
Tgfr1	TGF-β-Rezeptor 1
Tgfr2	TGF-β-Rezeptor 2
TGF-β	transforming growth factor beta
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
XDH	Xanthinhydrogenase
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreduktase
Zn <sup>2+</sup>	Zink Ion
α-SMA	alpha-smooth muscle actin

## 1. Zusammenfassung

Das Marfan-Syndrom (MFS) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die hauptsächlich das Bindegewebe betrifft. Die prognosebestimmende Manifestation dieser Erkrankung ist die Entwicklung thorakaler Aortenaneurysmen (TAA), welche die Gefahr einer Ruptur oder Dissektion mit möglichem letalen Ausgang mit sich bringen. Als Ursache des MFS konnten Mutationen im sogenannten Fibrillin-1 (*FBN1*) Gen ausgemacht werden, welches für das gleichnamige Protein kodiert. *FBN1* ist ein wichtiger Bestandteil von elastischen Fasern, welche eine wichtige Rolle für die Elastizität und Stabilität der Aorta spielen. Durch die mit dem MFS-assoziierten Mutationen im *FBN1* Gen kommt es zu Defekten oder einem Mangel des Proteinprodukts, was letztlich zu Strangbrüchen der elastischen Fasern und einer daraus resultierenden Instabilität der Aortenwand führt. Pathophysiologisch spielt dabei eine Dysregulation der TGF- $\beta$  Signalkaskade, vor allem des sogenannten nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalwegs, eine entscheidende Rolle. Durch massive Überaktivität dieses Signalwegs kommt es zu einer vermehrten Bildung von oxidativem Stress und Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), was zur Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen führt. Dies treibt das maladaptive Remodeling der Aorta weiter voran.

Zusätzlich dazu konnte eine vermehrte Expression des Enzyms NOS2 und damit einhergehend eine verstärkte NO Synthese als wichtiger pathophysiologischer Treiber der Erkrankung identifiziert werden.

Obwohl in präklinischen Studien zahlreiche vielversprechende Therapieoptionen identifiziert werden konnten, schaffte es bislang keine spezifische Therapie zur Verhinderung der Progression des MFS-assoziierten Aortenaneurysmas, sich in der klinischen Praxis zu etablieren. Die Therapie von MFS-Patient\*innen ist auf die Gabe von Betablockern und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten beschränkt.

Nitroalkene sind Substanzen, die aus einer Reaktion von reaktiven Stickstoffspezies und ungesättigten Fettsäuren entstehen. Der Vertreter mit der größten klinischen Relevanz ist die Nitroölsäure ( $\text{NO}_2\text{-OA}$ ), welche endogen synthetisiert werden kann und pleiotrope Effekte aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass  $\text{NO}_2\text{-OA}$  die Aktivierung der extracellulär-signal regulierten Kinase 1/2 (ERK1/2), den wesentlichen Mediatoren des nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalwegs und die Expression von NOS2 reduziert. Eine Applikation von  $\text{NO}_2\text{-OA}$  konnte in verschiedenen präklinischen Krankheitsmodellen, wie z.B. Vorhofflimmern oder Ischämie-Reperfusion, substantielle therapeutische Effekte erzielen.  $\text{NO}_2\text{-OA}$  kann oral verabreicht werden und erzielt so wirksame Plasmakonzentrationen. Mehrere Phase I Studien wurden bereits erfolgreich abgeschlossen und zwei Phase II Studien für die Therapie der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) und fokal segmentaler Glomerulus Sklerose (FSGS) laufen bereits.

In dem Projekt, welches dieser Arbeit zugrunde liegt, konnte gezeigt werden, dass NO<sub>2</sub>-OA auch im MFS ein großes therapeutisches Potential besitzt. Durch Inhibition verschiedener pathophysiologisch relevanter Signalmoleküle wie ERK1/2, Smad2 sowie NF-κB konnte die Substanz im murinen MFS-Modell das aortale profibrotische Remodeling, die Fragmentierung elastischer Fasern und die Apoptose reduzieren. Dies führt letztendlich zu einer signifikanten Reduktion des Aneurysma-Wachstums. NO<sub>2</sub>-OA stellt daher mit seinen vielen verschiedenen Zielstrukturen sowie der einfachen Handhabung durch orale Applikation eine vielversprechende Therapieoption für die Behandlung des TAAs im Rahmen des MFS dar.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Marfan Syndrom**

#### **2.1.1. Historie des Marfan-Syndroms**

Das Marfan-Syndrom ist eine Erkrankung des Bindegewebes, welche nach dem französischen Pädiater Antonin-Bernard Marfan benannt ist. Dieser beschrieb das Syndrom erstmals 1896 im französischen „Société Médicale des Hôpitaux de Paris“. Dort berichtete er über ein fünf-jähriges Mädchen mit einem schlanken, überdurchschnittlich großen Körper und schmalen, langen Extremitäten. Besonderen Fokus legte er dabei auf die „pattes d’araignée“, die sogenannten Spinnenfinger<sup>1</sup>. Die weitere Erforschung dieses Syndroms dauerte allerdings noch länger. Das Krankheitsbild des Aortenaneurysmas wurde diesem Syndrom beispielsweise erst 50 Jahre später zugeordnet<sup>2</sup>.

Ob dieses Mädchen tatsächlich am Marfan-Syndrom erkrankt war, blieb allerdings unklar. Der Begriff Marfan-Syndrom wurde in dem Zusammenhang des charakteristischen Phänotyps das erste Mal von dem niederländischen Arzt Henricus Jacobus Marie Weve 1931 verwendet<sup>1</sup>.

#### **2.1.2. Diagnostik des Marfan-Syndroms**

Das Marfan-Syndrom (MFS) stellt eine genetische Erkrankung mit einer sehr variablen Ausbildung von Symptomen dar. Dabei kann es von einer milden Verlaufsform, welche nur wenige Organsysteme betrifft, bis zu einer schnell voranschreitenden Form mit neonatalem Multiorganversagen kommen<sup>3</sup>.

Zur Diagnosestellung des Marfan-Syndroms kommt es, wenn neben einer pathogenetisch bekannten Variante des Fibrillin-1 Gens, welches in mutierter Form die genetische Ursache des MFS darstellt, ebenfalls eine Dilatation der Aorta ascendens mit einem Z Score von über 2 vorliegt oder eine Linsenluxation akut oder anamnestisch festgestellt werden konnte<sup>3</sup>. Der Z-Score ist dabei eine Möglichkeit, die Dilatation der Aorta in einen Zusammenhang zur Körpergröße, dem Alter und Geschlecht zu setzen, um eine bessere Interpretation zu ermöglichen<sup>4</sup>. Ist dieser Wert über 2, befindet sich der Durchmesser der Aorta ascendens bereits auf oder über der 95. Perzentile<sup>3</sup>.

Zusätzlich kann neben pathogenetischer Varianten des Fibrillin-1 Gens auch ein klinischer Aspekt beurteilt werden. Dazu wird ein systematischer Score erhoben, in den verschiedene phänotypische Veränderungen und Komplikationen des MFS mit eingehen. Dieser Score beinhaltet zum Beispiel Auffälligkeiten der Extremitäten, ein aufgetretener Pneumothorax oder das Vorliegen eines Mitralprolapses. Dabei kann ein Maximalwert von 19 Punkten erreicht werden<sup>3</sup>. Ab einem Wert von 7 und einem erhöhten Z-Score von 3, bei dem der Diameter der Aorta ascendens auf der 99. Perzentile liegt, kann von einem potenziellen Marfan-Syndrom

gesprochen werden. Bei Werten unter 7 und einem Z-Score unter 3 wird von einer unspezifischen Bindegewebserkrankung gesprochen. Hier sollten weitere Beobachtungen und Kontrollen erfolgen<sup>3</sup>.

Abschließend lässt sich sagen, dass das MFS durch eine weite Spanne von muskulären, okulären, skelettalen oder kardiovaskulären Symptomen auffallen kann. Prognosebestimmend ist allerdings die Ausbildung eines thorakalen Aortenaneurysmas (TAAs)<sup>5</sup> mit der möglichen letalen Komplikation einer akuten Aortendissektion oder -ruptur<sup>6,7</sup>. Die finale Diagnose kann zwar anhand eines klinischen Scores abgeschätzt werden, beweisend ist aber der Nachweis einer Mutation im *FBN1* Gen, welche mit dem MFS vergesellschaftet ist.

### 2.1.3. Genetik des Marfan-Syndroms

Das Marfan-Syndrom (MFS) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung des Bindegewebes mit einer Prävalenz von 1/5000<sup>8,9</sup>.

1991 identifizierten Dietz und Kollegen eine Mutation im Fibrillin-1-Gen (*FBN1*), welches für das extrazelluläre Matrixprotein Fibrillin-1 (FBN1) kodiert, als Ursache des Syndroms<sup>10</sup>. Fibrilline sind die Hauptbestandteile der sogenannten Mikrofibrillen, welche in der extrazellulären Matrix (EZM) ein Gerüst bilden, in das amorphes Elastin eingelagert ist. Die daraus resultierenden elastischen Fasern kommen vor allem in der Tunica media der Aorta vor und sorgen für ihre Elastizität<sup>11</sup>. Zusätzlich fungiert diese EZM als Reservoir für Signalmoleküle, wie beispielsweise TGF- $\beta$ , und verhindert im physiologischen Zustand die unkontrollierte Freisetzung solcher Signalmoleküle<sup>8</sup>.

Seit der Entdeckung im 19. Jahrhundert wurden mittlerweile über 3000 verschiedene Mutationen für dieses Krankheitsbild identifiziert, welche die gesamte Länge des Gens betreffen. Dabei treten am häufigsten, in circa zwei Drittel der Fälle, Missense-Mutationen auf. An zweiter Stelle stehen kleinere Insertionen, Deletionen und Duplikationen mit circa 10-15 %, welche häufig zu einem verfrühten Abbruch der Transkription führen. An dritter Stelle, ebenfalls mit einer Häufigkeit von 10-15 %, stehen Mutationen, welche zu Spleißdefekten führen<sup>12</sup>.

Durch Mutationen im *FBN1*-Gen mit resultierenden Defekten im Protein FBN1 kommt es zu einer reduzierten strukturellen Integrität von elastischen Fasern und daraus resultierenden Strangbrüchen<sup>13</sup> sowie vermehrter Freisetzung von in der EZM gebundenen Signalmolekülen. Wichtig ist dabei eine Unterscheidung der Restfunktionalität des Fibrillins. *FBN1* Mutationen können als haploinsuffizient oder dominant-negativ klassifiziert werden, je nach Auswirkung auf das Fibrillin-1 Protein<sup>14</sup>. Dominant-negative Mutationen führen zu einer gestörten Funktion bzw. Faltung des Proteins, was in einer desorganisierten EZM resultiert. Daraus kann eine reduzierte Stabilität der elastischen Fasern resultieren, welche mit einer vermehrten Freisetzung von TGF- $\beta$  aus der EZM einhergeht<sup>15</sup>. Unter dem Begriff der Haploinsuffizienz ist eine Gruppe von Mutationen zusammengefasst. Dabei werden geringere Mengen von unverändertem Fibrillin-1 produziert, woraus eine geringere Bindung von TGF- $\beta$  in der EZM resultiert. Dies

geschieht entweder durch eine Deletion des gesamten Gens, einer Degradierung des fehlerhaften Proteins oder einer Nonsense-Mutation. Das Resultat ist eine verminderte Bildung von Fibrillin-1 reicher EZM resultierend in einer verringerten Elastizität<sup>15</sup>.

#### **2.1.4. MMP-katalysierte Elastin-Fragmentierung im Rahmen des Marfan-Syndroms**

Die Fragmentierung von elastischen Fasern nimmt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des MFS ein.

Durch *FBN1*-Defekte kommt es zu Strukturdefiziten der elastischen Fasern, sodass diese leichter von sogenannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) abgebaut werden können<sup>16</sup>.

MMPs sind eine Gruppe von Enzymen, welche in 24 Isotypen in Säugetieren eingeteilt werden. Sie katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen und sind bei vielen degenerativen und entzündlichen Erkrankungen fehlreguliert<sup>17</sup>. MMPs stehen unter strengen transkriptionellen und posttranslationalen Regulationen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Degradierung und dem Umbau der extrazellulären Matrix, allerdings auch anderer Peptide, wie zum Beispiel Zytokinen<sup>18</sup>. Alle MMPs sind ähnlich aufgebaut und besitzen eine Pro-Domäne sowie eine katalytische Domäne, welche durch ein Zink Ion ( $Zn^{2+}$ ) im aktiven Zentrum gekennzeichnet ist<sup>18</sup>. Durch Abspaltung der Pro-Domäne wird das aktive Zentrum freigelegt und die MMP aktiviert. Dies kann proteolytisch durch andere MMPs oder Proteinasen geschehen oder aber auch nicht proteolytisch durch oxidative Prozesse, wie durch allosterische Prozesse oder ROS<sup>18</sup>.

Entscheidender Weise konnten Booms und Kollegen zeigen, dass FBN1-Fragmente ihrerseits die Expression von MMPs in-vitro erhöhen<sup>19</sup>. Auch im MFS-Mausmodell wurde eine erhöhte Expression von MMP-2 und -9 einhergehend mit einer Degeneration elastischer Fasern in TAAs gefunden<sup>20</sup>. Insgesamt führt die durch MMPs katalysierte Spaltung elastischer Fasern zur vermehrten Freisetzung von FBN1-Fragmenten, welche die MMP-Expression steigern und somit die Degradierung der EZM weiter verstärken.

Eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des MFS stellt eine Dysregulation der transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) Signalkaskade dar. TGF- $\beta$  ist ein Zytokin, welches bei verschiedenen Prozessen, wie zum Beispiel der Proinflammation, der Zelldifferenzierung, der Apoptose sowie dem Remodeling der EZM eine wichtige Rolle spielt<sup>21</sup>.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Bildung thorakaler Aortenaneurysmen bei MFS auf eine vermehrte Expression von TGF- $\beta$  zurückgeführt werden kann, und dass sich diese durch Inhibition von TGF- $\beta$  verhindern lässt<sup>8</sup>. Im physiologischen Zustand bleibt TGF- $\beta$  durch eine Bindung an Mikrofibrillen in der EZM inaktiviert<sup>22</sup>. Durch den Defekt im *FBN1*-Gen beim MFS und der daraus resultierenden gestörten Mikrofibrillen-Produktion kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von TGF- $\beta$  aus der EZM, welches wiederum MMPs aktiviert und so die Spaltung elastischer Fasern weiter vorantreibt<sup>23</sup>.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel von reaktiven Sauerstoff Radikalen (ROS) bei MFS-Patient\*innen als latente TGF- $\beta$  Aktivatoren fungieren<sup>24</sup>. Zusätzlich können ROS selber direkt MMPs aktivieren<sup>25</sup> und somit das Remodeling in der thorakalen Aorta weiter vorantreiben.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die MMP-katalysierte Spaltung von elastischen Fasern eine zentrale, multifaktorielle Rolle in der Pathologie des MFS einnimmt, da durch diese die Degradierung der EZM entscheidend vorangetrieben wird.

### **2.1.5. Folgen des dysregulierten TGF- $\beta$ Signaling beim Marfan-Syndrom**

Die Überaktivierung der TGF- $\beta$  Signalkaskade ist einer der treibenden Pathomechanismen in der Entwicklung und vor allem der Progression des TAAs beim MFS<sup>21,26</sup>.

Durch den proteolytischen Abbau von elastischen Fasern wird das in der EZM gebundene inaktive (latente) TGF- $\beta$  freigesetzt und kann anschließend aktiviert werden und seine Wirkung als Zytokin entfalten. Dies geschieht über Bindung an den TGF- $\beta$ -Rezeptor 1 oder 2 (Tgfr1, Tgfr2)<sup>8</sup>. Dabei bindet der Tgfr2 den Liganden und bildet anschließend einen heteromeren Komplex mit dem Tgfr1, woraus schließlich der aktive TGF- $\beta$ -Komplex entsteht<sup>27</sup>. Der anschließende Signalweg kann in einen kanonischen und einen nicht-kanonischen Weg eingeteilt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Inhibierung des nicht-kanonischen Signalweges das Fortschreiten des TAAs im Rahmen des MFS reduziert werden kann<sup>26</sup>. Daher scheint vor allem der nicht-kanonische Signalweg von zentraler Rolle für dieses Krankheitsbild zu sein.

Zentrale Mediatoren der nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalkaskade sind die Signalproteine extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Phosphorylierung der ERK1/2 und somit eine erhöhte Aktivität dieser eine Schlüsselrolle in der MFS bedingten Entwicklung des TAAs spielt<sup>26</sup>. Nach Phosphorylierung der ERK1/2 wirken diese, indem sie durch Regulation und Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen regulieren<sup>28</sup>. Infolge dieser Signalkaskade kommt es zu einer erhöhten Expression von MMPs, vor allem MMP-2 und -9, welche, wie bereits beschrieben, elastische Fasern degradieren und somit zur Dilatation der thorakalen Aorta beitragen<sup>29,30</sup>.

Es ist bekannt, dass MMP-2 selbst ERK1/2 aktivieren kann. Zusätzlich sprechen bisherige Erkenntnisse dafür, dass durch ERK1/2 Aktivierung die Expression von MMPs und somit die Degradierung von elastischen Fasern gesteigert wird. Dabei wird vermehrt das in der EZM gespeicherte TGF- $\beta$  freigesetzt, wodurch der ohnehin schon fehlregulierte TGF- $\beta$  Signalweg weiter verstärkt wird<sup>29</sup>. So treibt sich die dysregulierte TGF- $\beta$  Signalkaskade selbstständig weiter voran und aggraviert den Progress des Aortenaneurysmas.

Neben der direkten Wirkung von ERK1/2 auf MMPs wird durch den nicht-kanonischen Signalweg des TGF- $\beta$  Signalwegs auch eine vermehrte ERK1/2-bedingte Expression der NADPH Oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, kurz: NOX) vermittelt. Da



NOX ein potenter ROS-Produzent ist, kommt es dadurch zu einer erhöhten ROS-Produktion und damit einhergehenden maladaptiven Prozessen. Durch die erhöhten ROS Level können MMPs aktiviert werden<sup>25</sup>, was wiederum die NOX Expression durch vermehrte ERK1/2 Aktivierung steigert<sup>31</sup>.

Neben dem nicht-kanonischen Weg der TGF- $\beta$  Signaltransduktion spielt der kanonische Signalweg im MFS ebenfalls eine Rolle. Hier wird vor allem über einen Smad2 vermittelten profibrotischen Signalweg durch direkte Phosphorylierung eine Wirkung erzielt. Dies geschieht vor allem durch Smad2 induzierte Expression von Kollagenen<sup>27</sup>. Aus dem dysregulierten TGF- $\beta$  Signaling folgt eine erhöhte Phosphorylierung von Smad2. Dieses migriert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor, vor allem für Kollagen I und Kollagen III<sup>32</sup>. Der aus der vermehrten Kollagen-Expression resultierende fibrotische Umbau spiegelt sich ebenfalls phänotypisch in Form einer erhöhten Wandsteifigkeit wieder<sup>33</sup>.

Durch die Dysregulation des TGF- $\beta$  Signalwegs kommt es weiterhin zu einer gesteigerten Apoptose glatter Muskelzellen, was ebenfalls zur Aneurysma-Bildung beiträgt<sup>34</sup>. Da vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) fundamental für die Funktion der Gefäßwand sind, stellt ein vermehrter Zelltod einen essenziellen Progressionsfaktor für die Entwicklung des TAAs dar.

#### **2.1.6. Oxidativer Stress als weiterer Faktor des Aneurysma-Wachstums**

Eine weitere zentrale Rolle in der Entwicklung des Aortenaneurysmas scheint die Produktion und Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu spielen<sup>35</sup>. Oxidativer Stress in Form von ROS fällt auch im normalen oxidativen Stoffwechsel, allerdings in geringeren Konzentrationen, an und spielt eine wichtige Rolle in der Transduktion von Signalwegen und der Zellhomöostase. Konstant erhöhte Level an oxidativem Stress können hingegen die Entwicklung verschiedener vaskulärer Erkrankungen, wie beispielsweise Hypertonie und Arteriosklerose, begünstigen<sup>36</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass NOX induzierte ROS-Produktion die Aneurysma-Bildung im MFS vorantreibt und durch spezifische NOX-Inhibition der Progress der aortalen Pathologie reduziert werden kann<sup>25</sup>. Dieser Effekt beruht darauf, dass durch die verminderte Produktion von ROS weniger MMPs aktiviert werden, woraus eine geringere MMP-katalysierte Spaltung von elastischen Fasern resultiert<sup>25</sup>. Des Weiteren sind ROS latente Aktivatoren von TGF- $\beta$ , was, wie bereits beschrieben, vor allem über den nicht-kanonischen Signalweg ebenfalls das Aneurysma-Wachstum vorantreibt<sup>24,31</sup>.

Neben der NOX-bedingten ROS-Produktion konnten Yang et al. 2010 zeigen, dass in einem späteren Stadium des MFS eine durch die Xanthinoxidase (XO) bedingte ROS-Produktion entscheidend zur vasomotorischen Dysfunktion beiträgt. Durch die Inhibition der XO mittels Allopurinol in neun Monate alten MFS Mäusen konnte sowohl die Kontraktion als auch die Relaxation verbessert werden<sup>37</sup>.

Zusätzlich ist bekannt, dass durch erhöhte ROS-Level Apoptose von VSMCs ausgelöst werden kann, da durch die gebildeten Superoxide das Erbgut sowie Proteine der Zelle irreparabel geschädigt werden können<sup>38</sup>. Die Apoptose kann dabei auf verschiedenen Wegen eingeleitet werden. Diese enden in der Regel in einer Aktivierung von Cystein abhängigen, Aspartat spezifischen Proteasen, welche als Caspasen bezeichnet werden. Diese existieren in inaktiver Form und müssen durch Abspaltung ihrer Pro-Domäne aktiviert werden. Dabei können Caspasen sich gegenseitig aktivieren und so eine Signalkaskade auslösen, welche zum programmierten Zelltod führt<sup>39</sup>.

### **2.1.7. Inflammatorische Prozesse im Rahmen des Marfan-Syndroms**

Es gibt einige Hinweise, dass inflammatorische Prozesse entscheiden bei der Entstehung von Aneurysmen im MFS beteiligt sind<sup>40</sup>.

In einem Versuch mit sogenannten mgR/mgR-Mäusen, die nur 10 % des normalerweise exprimierten Fibrillin-1 sezernieren, konnte gezeigt werden, dass bereits nach 8 Wochen eine Migration von Monozyten in die Tunica media der Aorta erfolgt. Die daraus resultierende Inflammation führte zu einer Zerstörung des Elastin-Netzwerkes sowie einer verstärkten Fibrosierung der Tunica media<sup>41</sup>.

Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen Inflammation und dem Wachstum des Aneurysmas gezeigt werden. So wurde bei Marfan-Patient\*innen eine verstärkte Migration von T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD68<sup>+</sup>) in die proximale Aorta nachgewiesen<sup>42</sup>. Diese verstärkte Chemotaxis ist unter anderem Folge einer Bindung von Fibrillin-1- und Elastin-Fragmenten an das Elastin-Bindungs-Protein des Elastin-Rezeptor-Komplexes. Durch die Stimulation dieses Rezeptors wird zusätzlich die Zellproliferation und Mikrokalzifikation gesteigert, was möglicherweise die Fragmentierung elastischer Fasern beeinflusst<sup>13</sup>.

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass in die Tunica media der Aorta migrierte Leukozyten selbst MMPs aktivieren können und somit entscheidend zur Fragmentierung des elastischen Fasernetzwerkes und der damit einhergehenden Aneurysma-Bildung beitragen können<sup>43</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, welche in die Gefäßwand migrieren, die EZM degradieren, indem sie MMPs sezernieren<sup>43</sup>.

### **2.1.8. NF-κB vermittelte Prozesse im Rahmen des Marfan-Syndroms**

NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle für inflammatorische Reaktionen, die Zellproliferation, die Apoptose und die Immunantwort spielt. Die Expression von NF-κB wird hauptsächlich durch Zytokine, wie zum Beispiel den Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) oder Interleukin-1 (IL1) induziert<sup>44</sup>.

Die Aktivierung von NF-κB geschieht dabei durch Phosphorylierung der p65 Untereinheit, welche anschließend in den Zellkern migriert und dort transkriptionell wirksam wird<sup>45</sup>.

Als ein zusätzlicher, TGF- $\beta$  unabhängiger Pathomechanismus der MFS-assoziierten Aortenerkrankung konnte 2017 eine Überexpression der induzierbaren NO-Synthase (NOS2, iNOS) identifiziert werden. Als Ursache dieser NOS2 Überaktivierung wurde ein Defekt der Metalloproteinase ADAMTS1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) postuliert. Es wird vermutet, dass es durch die *FBN1*-Mutation zu einer fehlerhaften Interaktion zwischen ADAMTS1 und der EZM kommt, wodurch das Enzym destabilisiert wird. Die aufgrund der ADAMTS1 Dysfunktion vermehrt anfallenden Substrate des Enzyms, wie zum Beispiel Syndecan4, können wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von NOS2 die MMP-katalysierte Elastin-Fragmentierung sowie der Progress des Aortenaneurysmas reduziert werden konnte, was erneut auf einen möglichen Zusammenhang hinweist<sup>46</sup>.

Daher wird vermutet, dass es aufgrund der NOS2 Überexpression und Überaktivität zu einer vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) kommt, was wiederum eine Kontraktionsstörung glatter Muskelzellen in der Aorta zur Folge hat. Zusätzlich kann es durch die Überaktivität der NOS2 zu einer sogenannten Entkopplung dieses Enzyms kommen, wodurch wiederum oxidativer Stress in Form von ROS generiert wird<sup>46</sup>.

Da ROS hingegen über eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B<sup>47,48</sup> eine Induktion von NOS2 bewirkt, stellt dieser sich selbst verstärkende Signalweg einen weiteren zentralen Mechanismus in der Entwicklung des Aortenaneurysmas im Rahmen des Marfan-Syndroms dar.

### **2.1.9. VSMC Phänotypwechsel in der Entwicklung des Aortenaneurysmas**

Bei der Entwicklung des thorakalen Aortenaneurysmas im Rahmen des MFS, wie auch bei der Entwicklung anderer vaskulärer Erkrankungen, kommt es zu einer Veränderung des Phänotyps der glatten Muskelzellen in der Tunica media der Aorta<sup>49</sup>.

Normal entwickelte VSMC weisen einen kontraktile Phänotyp auf, welcher durch eine niedrige Proliferationsrate und die Expression von kontraktile wirksamen Proteinen, wie zum Beispiel smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC), smooth muscle 22 (SM22) und Calponin gekennzeichnet ist<sup>50</sup>. Nach Gefäßtraumata, wie beispielsweise nach Angioplastie oder einer Bypass Operation, kann es zu einem Phänotypwechsel der VSMCs kommen. Dabei wechselt der kontraktile Phänotyp in einen synthetisierenden Typ, welcher mit einer verstärkten Proliferation sowie Migration und Produktion von Proteinen der EZM einhergeht. Zusätzlich wird dabei die Synthese von VSMC typischen kontraktile Proteinen reduziert. Der Phänotypwechsel von VSMCs spielt bei der Entwicklung verschiedener vaskulärer Erkrankungen, wie zum Beispiel Arteriosklerose, Hypertonie und der Entwicklung von Aortenaneurysmen, eine wichtige Rolle<sup>51</sup>.

Dieser Phänotypwechsel tritt ebenfalls in der Entwicklung des Aortenaneurysmas im Rahmen des MFS auf. Um diesen Prozess zu erklären und zu verstehen, warum sich das Aortenaneurysma im Rahmen des MFS auf die thorakale Aorta begrenzt, spielt die Embryologie eine

wichtige Rolle. Während die Zellen, welche später die thorakale Aorta bilden, embryologisch aus der Neuralleiste stammen, stammen die Zellen der abdominellen Aorta von mesodermalen Stammzellen ab<sup>52</sup>. Der Effekt von TGF- $\beta$ , einem der zentral dysregulierten Proteine im Rahmen des MFS, auf VSMCs, welche aus der Neuralleiste stammen, ist deutlich stärker als auf VMSCs, welche vom mesenchymalen Stammzellen abstammen. Die Wirkung von TGF- $\beta$  ist also stärker auf die Zellen, welche später die thorakale Aorta bilden. Daraus resultiert eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate sowie Bildung von Kollagen unter Einfluss von TGF- $\beta$  auf die VSMCs der thorakalen Aorta<sup>53</sup>. Zusätzlich wirkt sich das TGF- $\beta$  Signaling auch auf die Expression kontraktile Proteine und die Kollagenproduktion aus. So wird die Expression von Kollagen erhöht und die Produktion kontraktile Proteine, wie zum Beispiel  $\alpha$ -smooth muscle actin, smoothelin, smooth muscle protein 22  $\alpha$ , and Calponin reduziert<sup>22</sup>. Durch diese Veränderung des Phänotyps kommt es ebenfalls zu einer erhöhten Expression von MMP-9, was wiederum die Degradierung der EZM vorantreibt und zu einer Destruktion der Gefäßwand führt<sup>54</sup>. Dieser Zusammenhang ist graphisch in Abbildung 1 dargestellt.

### instabile EZM

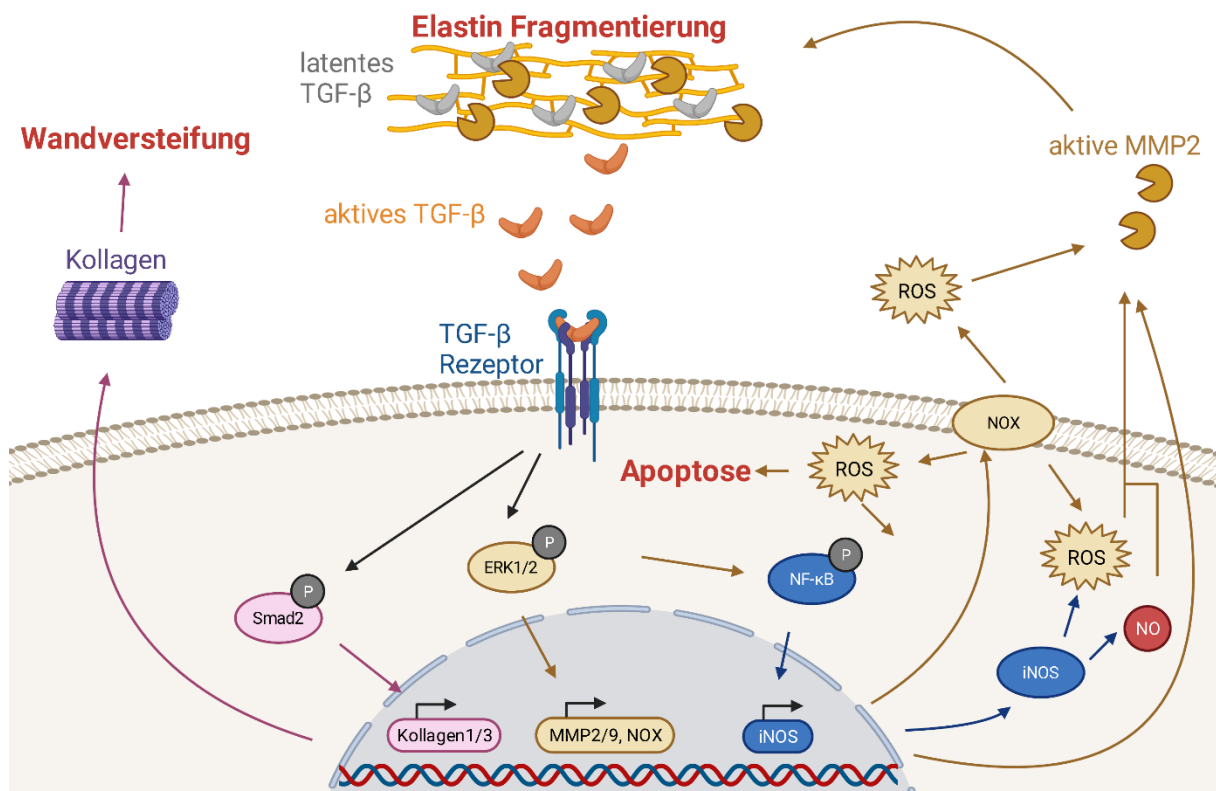


Abbildung 1: schematische Darstellung der Pathophysiologie des Marfan-Syndroms. Durch die Instabilität der EZM kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von TGF- $\beta$  und somit zu einer Aktivierung der TGF- $\beta$  vermittelten Signalkaskaden und einer vermehrten Aktivität von NF- $\kappa$ B. Durch den nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalweg kommt es in Folge einer ERK1/2 vermittelten NOX-Induktion zu einer vermehrten Bildung von ROS sowie einer vermehrten MMP-Expression. Durch den kanonischen Signalweg kommt es vor allem zu einer Smad2 vermittelten Expression von Kollagen, woraus eine vermehrte Wandsteifigkeit resultiert. Durch die Überaktivität von NF- $\kappa$ B wird eine vermehrte Expression der NOS2 (iNOS) begünstigt, welche ebenfalls zu erhöhten ROS-Spiegeln führt. Diese verschiedenen Signalkaskaden resultieren in einer vermehrten Produktion von ROS und einer vermehrten Expression und Aktivität von MMPs, was wiederum die EZM weiter degradiert und die aortale Pathologie und Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen weiter vorantreibt. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

### 2.1.10. Therapeutische Optionen des Marfan Syndroms

Obwohl in mehreren präklinischen Studien spezifische Inhibitoren und Medikamente die Entwicklung des Aortenaneurysmas beim Marfan-Syndrom reduzierten oder sogar verhindern konnten, wurde bislang keines dieser spezifischen Therapeutika zur klinischen Therapie zugelassen<sup>55</sup>.

Die pharmakologische Standardtherapie umfasst heutzutage die Therapie mit Betablockern, welche zwar den Progress des Aneurysma-Entwicklung reduzieren können, diesen aber nicht aufhalten können<sup>56</sup>. Zusätzlich kann eine pharmakologische Therapie mit Angiotensin-2-Rezeptorblockern, wie beispielsweise Losartan, angestrebt werden. Jedoch konnte in einer Metaanalyse kein eindeutiges Ergebnis auf das Wachstum des TAAs nachgewiesen werden. Es zeigten sich teils positive und teils negative Effekte<sup>57</sup>. Hinzu kommt, dass die Wirksamkeit der Therapie je nach Vorliegen der *FBN1*-Mutationsart variiert. Bei einer haploinsuffizienten Mutation zeigt sich ein besseres Ansprechen auf die Losartan Therapie als bei einer dominant negativen Mutation. Dies ist vermutlich auf die höhere Bildung unverändertem FBN1 bei Vorliegen einer haploinsuffizienten Mutation zurückzuführen<sup>15</sup>. Ziel dieser Therapie ist es, die Herzfrequenz sowie den Blutdruck zu senken, um so den hämodynamischen Stress an der proximalen Aorta zu reduzieren<sup>58</sup>.

Zusätzlich zur pharmakologischen Therapie sollte bei Patient\*innen mit der Diagnose MFS eine Lifestyle-Veränderung vorgenommen werden. Aufgrund des erhöhten Rupturrisikos sollten keine extremen Belastungen, wie Kontaktsportarten oder Gewichtheben durchgeführt werden<sup>59</sup>.

In einer Notfallsituation ist die 30 Tage Mortalität der Patient\*innen mit MFS mit ca. 12 % deutlich erhöht, sodass eine frühelektive operative Therapie, die mit einer 30 Tage Mortalität von ca. 1,5 % einhergeht, heutzutage bevorzugt wird<sup>60</sup>. Trotz der stetigen Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten, liegt die mediane Lebenserwartung von MFS-Patient\*innen noch immer bei nur 50 Jahren<sup>7</sup>. Nach einem chirurgischen Eingriff haben MFS-Patient\*innen heutzutage immer noch eine mehr als dreifach erhöhte Sterblichkeit aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich zur Normalbevölkerung<sup>7</sup>.

Bei Auftreten von Komplikation oder einer Aneurysmagröße über 5 cm im Bereich der Aorta ascendens sowie einem Aneurysma-Progress ist eine chirurgische Intervention indiziert, da ab einem Diameter von 6 cm das Ruptur- und Dissektionsrisiko um das Vierfache erhöht ist<sup>6</sup>. Hier werden bei Patient\*innen mit Bindegewebserkrankungen vor allem offen chirurgische Verfahren mit oder ohne autologem Ersatz der Aorta angestrebt, da kathetergestützte Verfahren eine höhere Komplikationsrate aufweisen<sup>59,61</sup>.

Abschließend lässt sich daher sagen, dass die bisherigen therapeutischen Optionen für betroffene Patient\*innen nicht ausreichend sind. Die konservativen Therapiemöglichkeiten mit

Betablockern und Angiotensin-2-Rezeptorantagonisten können zwar das Wachstum des thorakalen Aortenaneurysmas etwas verlangsamen, als einzige kausale Therapiemöglichkeit existiert jedoch nur die chirurgische Intervention mittels allogenen Aortenersatz, um Dissektionen und einen vorzeitigen Tod in letzter Konsequenz abzuwenden. Bisher existiert allerdings keine kausale nicht invasive Therapiemöglichkeit.

## 2.2 Nitroalkene

Nitroalkene sind elektrophile Moleküle, die durch eine Reaktion von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) mit ungesättigten Fettsäuren endogen synthetisiert werden können und unter Normalbedingungen im menschlichen Plasma im Bereich von nanomolaren Konzentrationen vorliegen<sup>62</sup>. Nach oraler Applikation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Nitrit ist es möglich, einen Anstieg der Plasmakonzentrationen von nitrierten Fettsäuren auf bis zu 10 nM zu beobachten<sup>63</sup>.

Die am besten untersuchten und stabilsten Verbindungen dieser Gruppe sind dabei Nitroölsäure ( $\text{NO}_2\text{-OA}$ ) und Nitrolinolensäure ( $\text{NO}_2\text{-LA}$ ) (Abbildung 2), welche daher auch für die meisten Experimente verwendet wurden<sup>64</sup>.

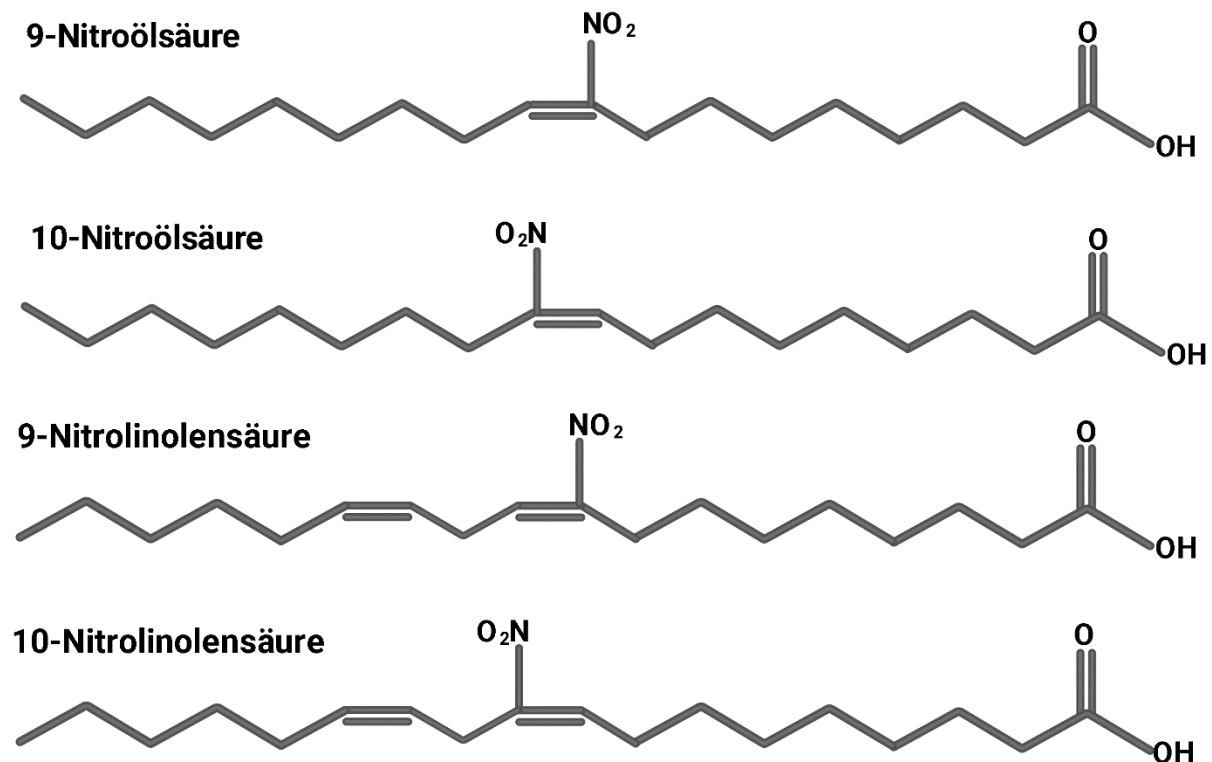


Abbildung 2: chemische Strukturformel der Nitroalkene. Strukturformel 9- und 10-Nitroölsäure und 9- und 10-Linolensäure, den zwei am häufigsten vertretenen Substanzen in der Forschung. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

### 2.2.1. Elektrophile Reaktion vermittelt durch Nitroalkene

Die Nitration von Fettsäuren kann direkt durch eine Radikal-Radikal Reaktion zwischen der Alkylgruppe einer ungesättigten Fettsäure und der Nitrogruppe entstehen. Diese Art der Bildung nitrierter Fettsäuren hat allerdings keine biologische Relevanz und kommt in-vivo nahezu nicht vor<sup>62</sup>.

Bei der biologisch relevanten Nitration hingegen kommt es zu einem direkten Angriff der Nitrogruppe auf eine Doppelbindung einer Fettsäure. Die so entstehende Additionsreaktion ist reversibel und kann an allen Doppelbindungen einer Fettsäure stattfinden. Das Ergebnis dieser Additionsreaktion ist ein Nitroalkylradikal. Im nächsten Schritt wird das Radikal durch Resonanz stabilisiert<sup>62</sup> (Abbildung 3).

Der biologischer Effekt von nitrierten Fettsäuren wird hauptsächlich durch reversible posttranslationale Proteinmodifikation an Schwefel Atomen von Cystein-, Lysin- oder Histidin-Resten in Form der sogenannten Michael-Addition erzielt<sup>64</sup>. Dabei entsteht eine Einfachbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen. Die Michael-Addition findet dabei an einer  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindung statt, welche als Michael-Akzeptor fungiert. So entsteht aus einer Kohlenstoff-Doppelbindung zwei Einzelbindungen, da der Michael-Akzeptor mit einem Michael-Donor in Form eines Mesomerie-stabilisierten Carbanion Enolats reagiert<sup>65</sup> (Abbildung 3).

Zusätzlich wird durch die elektrophile Nitrogruppe die Kohlenstoffdoppelbindung polarisiert, was in einer Instabilität der Doppelbindung resultiert. Diese Instabilität begünstigt wiederum die elektrophilen Eigenschaften der  $\text{NO}_2$ -FA und ermöglicht die nukleophile Reaktivität<sup>66</sup>. Des Weiteren können Michael-Additionen auch an Proteinkomplexen stattfinden. Dabei reagiert das  $\beta$ -Kohlenstoffatom der ungesättigten Carbonylgruppe mit den Thiolatanionen des Proteins<sup>67</sup>.

Die Nitratgruppe ist eine äußerst elektrophile Gruppe, welche durch Reaktion des Nitratmoleküls mit der Alkylgruppe der Fettsäure die Elektrophile auf das  $\beta$ -Kohlenstoffatom überträgt. So ist es der  $\text{NO}_2$ -FA möglich, stabile Michael-Additionen mit nukleophilen Gruppen anderer Strukturen einzugehen<sup>68</sup>. Zusätzlich können  $\text{NO}_2$ -FA Proteinbindungen eine Nitroalkylation eingehen, wodurch eine kovalente Bindung zwischen der Nitrogruppe und der nukleophilen Gruppe des Proteins entsteht<sup>69</sup> (Abbildung 3). Der schematische Mechanismus der Michael-Addition und Nitroalkylation ist in Abbildung 3 dargestellt.

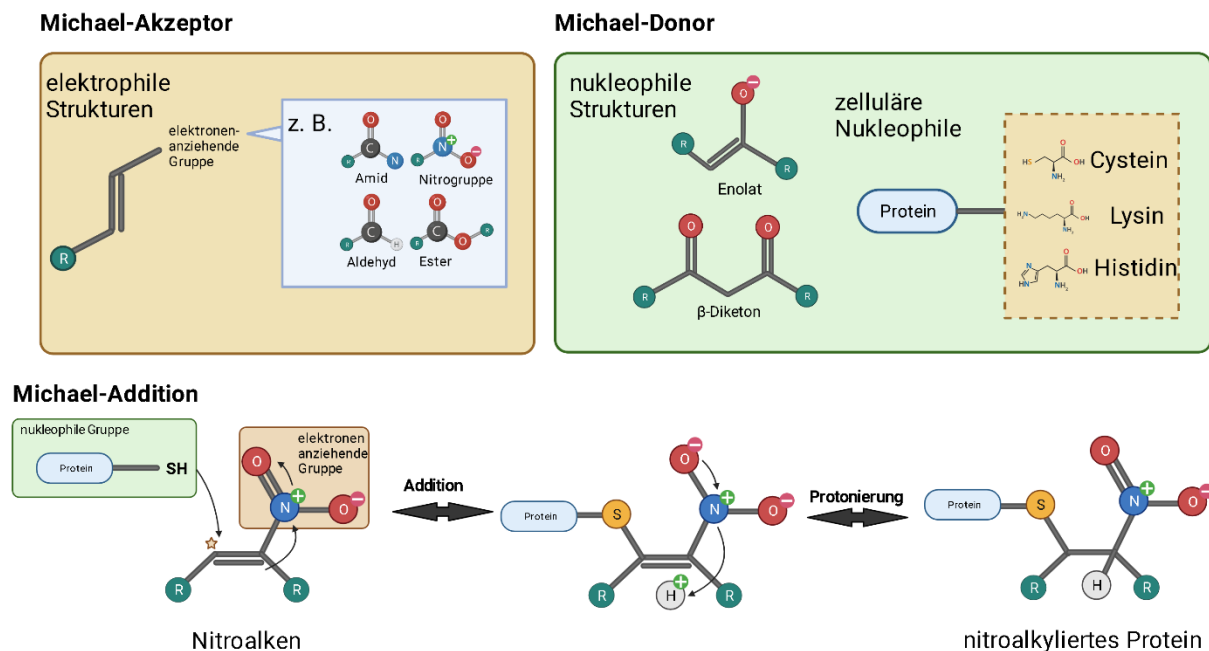


Abbildung 3: Michael-Akzeptor, -Donor und Mechanismus der Michael-Addition bei Nitroalkenen. Generelle Strukturen von Michel-Akzeptoren und Michael-Donoren: Der Akzeptor besteht aus einer Olefin-Struktur, an die eine elektronenanziehende Gruppe grenzt. Beispiele für diese Gruppen sind Amide, Aldehyde, Ester oder die Nitro-Gruppe. Der Donor besteht aus nukleophilen Strukturen, wie Enolaten,  $\beta$ -Diketonen, Thiole von Cysteinen, Imidazole von Histidinen oder  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen. Mechanismus der Michael-Addition: durch nukleophilen Angriff auf das elektrophilen  $\beta$ -Kohlenstoff (\*) der Nitrogruppe findet eine Addition statt. Anschließend findet eine Protonation zur Bildung einer Nitroalkylierung statt. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt

### 2.2.2. Translationale und transkriptionelle Wirkung

Die transkriptionelle Wirkung von Nitroalkenen beruht vornehmlich auf einer erhöhten Transi-tion des nukleären Transkriptionsfaktors nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) und der Inhibition der transkriptionellen Aktivität des nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B)<sup>64</sup>.

Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von antioxidativen Proteinen steigert und die Zelle dadurch vor oxidativem Stress schützt. So kann dieser Transkriptionsfaktor gezielt die Expression protektiver Gene, wie zum Beispiel Konjugationsenzyme der Biotransformation in Form der Superoxid-Dismutase und Glutathion, aktivieren<sup>70</sup>.

NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle für inflammatorische Reaktionen, die Zellproliferation, die Apoptose und die Immunantwort spielt und dessen Expression haupt-sächlich durch Zytokine, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  oder IL1, induziert wird. Im Normalzustand



wird NF- $\kappa$ B durch Verbindung mit dem inhibitorischen Protein I $\kappa$ B (inhibitor of nuclear factor kappa B) sequestriert. Durch diverse Stimuli wird die I $\kappa$ B-Kinase aktiviert, wodurch dieses Protein abgebaut und die Migration von NF- $\kappa$ B in den Zellkern erleichtert wird<sup>71</sup>. Die häufigste Form von NF- $\kappa$ B ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten p65 und p50<sup>71</sup>. Die Alkylation dieser Untereinheiten kann nachgewiesener Weise die DNA-Bindungsaffinität herabsetzen und somit die transkriptionellen Effekte von NF- $\kappa$ B reduzieren<sup>45</sup>. Die Inhibition der transkriptionellen Aktivität von NF- $\kappa$ B durch NO<sub>2</sub>-FA wird hauptsächlich durch die Nitroalkylation der p65 Untereinheit an einem Cystein-Rest (Cys38) vermittelt, wodurch diese nicht mehr phosphoryliert und somit aktiviert werden kann<sup>45</sup>. Durch Cui et al. konnte gezeigt werden, dass nitrierte Fettsäuren direkt kovalent an NF- $\kappa$ B binden und somit seine DNA-Bindungsaffinität herabsetzen<sup>45</sup>.

Eine weitere zentrale und bereits gut untersuchte Funktion von NO<sub>2</sub>-FA ist ein partieller Agonismus am Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Dabei kommt es zu einer selektiven Verdrängung von Korepressoren durch NO<sub>2</sub>-FA und einer Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierenden Elementen (PPRE)<sup>72,73</sup>. Die Wirkung von NO<sub>2</sub>-FA auf PPAR $\gamma$  vermittelte in vielen verschiedenen kardiovaskulären Krankheitsmodellen therapeutische Effekte<sup>74</sup>. Vor allem sind in diesem Zusammenhang die Regulierung der Transkription von Proteinen der Zelldifferenzierung, des Lipidstoffwechsels, des Glukosemetabolismus und inflammatorischer Prozesse zu nennen<sup>75</sup>.

### **2.2.3. Wirkung von nitrierten Fettsäuren auf MMPs**

Entscheidender Weise konnte in mehreren Modellen von kardiovaskulären Erkrankungen ein Effekt von NO<sub>2</sub>-FA auf die Aktivität und Expression von MMPs gezeigt werden.

Neben den indirekten Wirkmechanismen, wie der Inhibition von NF- $\kappa$ B, der Reduktion des nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalings, der ROS-Reduktion und der verminderten Leukozyteninfiltration, können NO<sub>2</sub>-FA MMPs auch direkt beeinflussen.

Die direkte Beeinflussung von MMPs durch NO<sub>2</sub>-FA ist dabei auf zwei Mechanismen zurückzuführen. Es ist bekannt, dass die Pro-Domäne von MMPs durch NO<sub>2</sub>-OA an einem Cystein-Rest durch Michael-Addition alkyliert werden kann, woraufhin diese abgespalten wird und die MMPs somit aktiviert werden<sup>76</sup>. Dies geschieht in einem biphasischen-dosisabhängigen Verlauf mit einer gesteigerten Aktivität bei geringeren NO<sub>2</sub>-OA Konzentrationen und einer reduzierten Aktivität bei höheren Konzentrationen<sup>76</sup>. Über einen weiteren Mechanismus konnte gezeigt werden, dass NO<sub>2</sub>-FA die Expression von MMPs reduzieren. Durch eine Interaktion mit der PPAR $\gamma$ -Liganden-Bindungsdomäne an einem Cystein-Rest kann die nachgeschaltete Genregulation beeinflusst werden<sup>75</sup>. Durch den so erzielten Agonismus am PPAR $\gamma$ -Rezeptor wird die Expression inflammatorischer Proteine, wie beispielsweise MMP-9, reduziert<sup>76</sup>.

#### 2.2.4. Wirkung von nitrierten Fettsäuren auf die Entstehung von oxidativem Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen durch inkomplette Reduktion von Sauerstoff ( $O_2$ ) während normaler Atmung in allen aeroben Organismen. ROS sind hochreaktiv und beinhalten freie Radikale, welche ein zusätzliches freies Elektronenpaar besitzen. Die dabei entstehenden Strukturen werden als Superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) oder als Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ) bezeichnet. Superoxide entstehen dabei nicht nur in den Mitochondrien, sondern ebenfalls durch Enzyme wie zum Beispiel NOX, verschiedene Isoformen der NO-Synthase (NOS), Xanthinoxidase (XO) und viele weitere. Da physiologisch an vielen Stellen innerhalb der Zelle oxidativer Stress in Form von ROS anfällt, besitzen Zellen viele verschiedene enzymatische sowie nicht-enzymatische Mechanismen, um diese freien Radikale abzufangen<sup>77</sup>. Ein zentraler Mechanismus ist die Verstoffwechslung freier Radikale und ROS durch die Superoxid-Dismutase (SOD). Dabei werden Superoxide bzw. ROS zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff verstoffwechselt und somit unschädlich gemacht<sup>78</sup>.

Oxidativer Stress wiederum oxidiert mit seinen freien Radikalen Lipide, DNA und Proteine. Der Hauptmechanismus, durch den ROS spezifische zelluläre Effekte vermitteln, ist die posttranslationale kovalente Modifikation von Schwefelatomen an Cystein-Resten<sup>77</sup>.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass nitrierte Fettsäuren entscheidend Einfluss auf die Bildung von ROS und den damit einhergehenden intrazellulären Schäden nehmen. In-vitro wurde demonstriert, dass  $NO_2$ -FA die NOX2 in Makrophagen direkt inhibieren und damit die NOX-bedingte ROS-Produktion senken<sup>79</sup>. Die aktivierte NOX generiert Superoxide, indem zwei Elektronen von NADPH im Zytosol auf FAD und auf zwei Häm-Gruppen übertragen werden, wobei die zweite Häm-Gruppe zwei Moleküle elementaren Sauerstoffs oxidiert<sup>77</sup>.

Zusätzlich konnte in-vitro nachgewiesen werden, dass insbesondere  $NO_2$ -OA die Xanthinoxidase (XO) durch eine kovalente Bindung irreversibel hemmt und so die Produktion von ROS signifikant senkt<sup>80</sup>. Die XO und die Xanthinhydrogenase (XDH) sind vertauschbare Isoenzyme der Xanthinoxidoreduktase (XOR), welche die letzten beiden Schritte des Purinabbaus katalysieren, wobei Hypoxanthin zu Xanthinsäure reduziert wird. Hierbei reduziert die XO ausschließlich molekularen Sauerstoff, wobei Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) und Superoxide entstehen, wohingegen die XDH vornehmlich  $NAD^+$  (Nicotinamidadeninucleotid) oxidiert<sup>81</sup>. Dabei produzieren, ähnlich wie bei der NOX, beide Formen ROS, wobei die ROS-Produktion bei der XDH größer ist als bei der XO<sup>77</sup>.

Neben den beschriebenen Mechanismen besitzen  $NO_2$ -FA weitere protektive antioxidative Effekte. Insbesondere ist hier die antioxidative Wirkung durch eine Nrf2-vermittelte Induktion der Superoxid-Dismutase, einem der zentralen Enzyme des ROS-Abbaus, zu nennen<sup>70</sup>.

Zusammengefasst stellt die Administration von NO<sub>2</sub>-OA somit einen potenziellen Therapie-Ansatz für vaskuläre Erkrankungen mit inflammatorischer Komponente dar, da die Substanz über verschiedene Mechanismen die Produktion von oxidativem Stress reduziert.

### **2.2.5. Auswirkung von Nitroalkenen auf die NO-Produktion**

In vorherigen Studien konnte eine Einflussnahme von NO<sub>2</sub>-OA auf die NOS2 gezeigt werden. Diese Isoform spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Marfan-Syndroms.

Im Vergleich zu den anderen NO-Synthase Isoformen kann es durch die induzierbare Form der NO-Synthase unter pathologischen Bedingungen zu einer bis zu tausendfach erhöhten NO Konzentration kommen<sup>82</sup>. Zusätzlich wird durch das Überangebot des von der NOS2 produzierten NO vor allem in pathologisch veränderten Gefäßen eine Hyperdilatation und Degradierung der Tunica media bewirkt. Dies führt zu einer verminderten Kontraktilität und fördert aortale Pathologien<sup>46</sup>. Da NOS2 vor allem transkriptionell reguliert wird und NF-κB nachweislich die Transkription von NOS2 beeinflusst<sup>83</sup>, kann NO<sub>2</sub>-OA, wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, über eine kovalente Bindung an NF-κB die Phosphorylierung und somit Aktivierung der NOS2 reduzieren<sup>45</sup>. Durch die reduzierte Expression von NOS2 durch NO<sub>2</sub>-FA kommt es ebenfalls zu einer geringeren Rate von Entkopplungen der NOS2, woraus wiederum eine geringere ROS-Produktion resultiert<sup>45</sup>. Dies wirkt sich wiederum positiv auf vaskuläre Pathologien aus<sup>46</sup>.

### **2.2.6. Wirkung von Nitroalkenen in kardiovaskulären Erkrankungen**

Aufgrund der geschilderten Wirkmechanismen können Nitroalkene in verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen Einfluss auf die Pathogenese und den Krankheitsverlauf nehmen. Hierzu existieren bereits eine Vielzahl an Daten und unterschiedliche Krankheitsmodelle, in denen NO<sub>2</sub>-FA einen positiven Effekt gezeigt haben.

#### **2.2.6.1 Arterielle Hypertonie**

Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen ist die arterielle Hypertonie<sup>84</sup>. Diese ist definiert als Erhöhung des Blutdrucks über einen systolischen Wert von 140 mmHg und einen diastolischen Wert über 90 mmHg. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass NO<sub>2</sub>-FA über eine Inhibition des Angiotensin-II Rezeptor-1 die Calciumkonzentration in VSMCs reduziert und somit ihre Kontraktilität herabsetzen. Interessanterweise wird die Bindung von Angiotensin-II an den Rezeptor selbst dabei nicht beeinflusst<sup>85</sup>.

### **2.2.6.2 Arteriosklerose und andere inflammatorische Erkrankungen**

Die Arteriosklerose ist die Hauptursache zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Hierbei kommt es zu einer Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand und einer chronischen vaskulären Entzündung, vor allem an Stellen mit turbulenter Strömung, wie beispielsweise Gefäßverzweigungen<sup>86</sup>.

Hier greifen NO<sub>2</sub>-FA nicht nur über die bereits in Kapitel 2.2.2 erwähnte Inhibition von NF-κB und gesteigerte Aktivität von Nrf2 ein, sondern ebenfalls über einer Inhibierung von verschiedenen proinflammatorischen Kinasen und Signalproteinen, wie STAT1/3/6, ERK1/2, JNK und p38<sup>87</sup>.

Ein weiteres Signalmolekül, über die NO<sub>2</sub>-FA seine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung vermittelt, ist Smad1. Hier wird durch Reduktion der Phosphorylierung die Signalvermittlung reduziert<sup>66</sup>. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NO<sub>2</sub>-OA arteriosklerotische Plaques stabilisieren, da sie den Gehalt an kontraktilen Proteinen in VSMCs erhöhen und die Infiltration entzündlicher Zellen und die Zytokinproduktion reduzieren<sup>66</sup>. Außerdem wird aufgrund verminderter Expression von MMP-9 die Stabilität der Plaques durch reduzierte Degradierung der EZM gesteigert<sup>76</sup>.

### **2.2.6.3 NO<sub>2</sub>-FA bei pulmonal-arterieller Hypertonie**

Die pulmonale Hypertonie ist definiert als Erhöhung des systolischen Blutdrucks im pulmonal-arteriellen System auf Werte über 25 mmHg. Dabei kommt es zu einem Remodeling der pulmonalen Gefäße mit endothelialer Dysfunktion und Proliferation von VSMCs<sup>64</sup>.

In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von NO<sub>2</sub>-FA der rechtsventrikuläre Druck reduziert werden kann. Zusätzlich kann ein vermindertes myokardiales Remodeling, in Form von Fibrose und Hypertrophie, durch die erhöhte Nachlast beobachtet werden<sup>88</sup>. Als Mechanismus für diesen Effekt wurde dabei die reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und die damit einhergehende reduzierte Superoxidproduktion in Makrophagen und VSMCs sowie eine Nrf2 vermittelte verbesserte Endothelfunktion angeführt<sup>88</sup>.

### **2.2.6.4 NO<sub>2</sub>-FA bei Vorhofflimmern**

Das Vorhofflimmern ist die am häufigsten auftretende Herzrhythmusstörung in Deutschland und geht mit einem erhöhten Herzinfarkt- und Schlaganfallrisiko einher<sup>89</sup>.

Neuere Forschungen gehen davon aus, dass diese Rhythmusstörung durch eine Dilatation und Fibrose des Vorhofes sowie Veränderungen der Ionenkanalzusammensetzung und vermehrter Produktion von ROS sowie einer Überaktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) bedingt ist<sup>64</sup>. In diesem Zusammenhang konnte im Mausmodell die Anfälligkeit für Vorhofflimmern durch Inhibition von Smad2 reduziert werden. Es konnte eine verminderte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch eine Inhibition von Smad2 nachgewiesen werden, welche maßgeblich am fibrotischen Umbau des Vorhofes bei

Vorhofflimmern beteiligt sind<sup>79</sup>. Verstärkt wurde dieser Effekt zusätzlich durch eine Inhibition von NOX2, wodurch die NOX-bedingte ROS-Produktion vermindert werden konnte<sup>79</sup>.

#### **2.2.6.5 NO<sub>2</sub>-FA bei ischämischer Herzerkrankung**

Grundlage der ischämischen Herzerkrankung ist ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf. Häufig kommt es dabei aufgrund einer koronaren Herzerkrankung oder Stenosen bzw. Verschlüssen von Koronararterien zu einem Untergang oder Schaden von Kardiomyozyten. Ursächlich für diesen Zellschaden ist dabei eine vermehrte Produktion von ROS sowie die Entstehung eines proinflammatorischen Milieus und eine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe<sup>90</sup>.

Hier konnte in einem murinen Infarktmodell gezeigt werden, dass durch die exogene Zufuhr von NO<sub>2</sub>-FA die Infarktgröße reduziert und die linksventrikuläre Funktion verbessert werden konnte. Ursächlich dafür war die NO<sub>2</sub>-FA-bedingte Inhibition von NF-κB mit einer daraus resultierenden verminderten Leukozyteninfiltration und Produktion proinflammatorischer Zytokine<sup>91</sup>.

#### **2.2.6.6 Antidiabetogene Wirkung von Nitroalkenen**

Die antidiabetogene Wirkung von NO<sub>2</sub>-FA ist vor allem auf eine aktivierende Wirkung der Nitroalkene auf den Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  via S-Alkylierung zurückzuführen<sup>70</sup>.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  stellt einen zentralen Angriffspunkt in der oralen antidiabetischen Therapie dar. Orale Antidiabetika aus der Gruppe der Glitazone fungieren dabei als Insulin-Sensitizer und werden in der Zweitlinientherapie bei Diabetes mellitus Typ II eingesetzt<sup>75</sup>. Durch die Aktivierung des PPAR $\gamma$  Rezeptors wird die Aufnahme freier Fettsäuren gesteigert und die Insulinsensitivität verbessert. Allerdings weisen diese Therapeutika ebenfalls ein erhebliches Nebenwirkungs-Potenzial auf. Durch den kompletten Antagonismus am PPAR $\gamma$  Rezeptor wird die Adipozytendifferenzierung und eine damit einhergehende Gewichtszunahme stimuliert. Zusätzlich kommt es zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse sowie zur Ödembildung<sup>75</sup>. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass NO<sub>2</sub>-FA, insbesondere NO<sub>2</sub>-OA reversibel an den PPAR $\gamma$  Rezeptor binden, sich so positiv auf den diabetischen Stoffwechsel auswirken und gleichzeitig ein deutlich reduziertes Nebenwirkungsprofil aufweisen<sup>75</sup>.

#### **2.2.7. Pharmazeutisches Potenzial der Nitroalkene**

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Substanzgruppe der nitrierten Fettsäuren bzw. Nitroalkene ein großes Potenzial zur Behandlung verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen aufweisen, indem sie verschiedene pathophysiologisch relevante Signalwege günstig beeinflussen.

Die Arbeitsgruppe von Bruce Freeman am pharmakologischen Institut der Universität Pittsburgh entwickelte daraufhin ein Verfahren zur Synthese von NO<sub>2</sub>-FA und patentierte dies für die medizinische Anwendung<sup>92</sup>. In den Fokus ist dabei NO<sub>2</sub>-OA bzw. das Positionsisomer 10-NO<sub>2</sub>-OA (bezeichnet als CXA-10) gerückt. Dieses besitzt bei oraler Gabe eine gute Bioverfügbarkeit und therapeutische Plasmakonzentrationen können sowohl bei der Maus als auch beim Menschen erreicht werden<sup>93</sup>. Im Tierversuch konnte eine Absorption von mindestens 35 % gezeigt werden sowie ein vorteilhaftes Biodistributionsprofil, ähnlich wie bei Lipoproteinen, mit einer Verteilung in Herz, Leber, Niere und Fettgewebe. Diese weitflächige Verteilung ist insbesondere günstig bei der Identifikation von Zielproteinen in den o.g. Krankheiten, da CXA-10 die einzige elektrophile Substanz ist, welche Organe mit einer hohen metabolischen Umsatzrate erreicht<sup>92</sup>. Ein weiterer wichtiger Angriffspunkt ist, dass eben diese Organe, aufgrund ihrer erhöhten Stoffwechselaktivität, meist einem höheren Level an oxidativem Stress ausgesetzt sind und daher gut von den antioxidativen Mechanismen der Nitroalkene profitieren können<sup>92</sup>. In mehreren präklinischen Studien konnten bereits überzeugende Ergebnisse generiert werden. Auch mehrere Phase I Studien waren erfolgreich<sup>93</sup>. Seit 2018 laufen zwei Phase II Studien, welche die Wirksamkeit der Substanz bei mit fokal segmentaler Glomerulus Sklerose (FSGS) und pulmonal-arterieller Hypertonie untersuchen.

Die PRIMEx Studie (NCT03449524) untersucht die Auswirkungen, Sicherheit und Effizienz bei Patient\*innen mit pulmonal-arterieller Hypertonie. Dabei wurde in verschiedenen Dosierungen (75 mg, 150 mg) bei einmal täglicher morgendlicher Einnahme die rechtsventrikuläre Funktion sowie der pulmonal vaskuläre Widerstand und die sechs Minuten Gehstrecke in einem Rahmen von sechs Monaten im Vergleich zu Placebo im Erwachsenen untersucht. Die Studie wurde bereits im August 2020 abgeschlossen, bisher wurden jedoch noch keine Ergebnisse publiziert<sup>94</sup>.

Dem gegenüber steht die FIRSTx Studie (NCT03422510), welche dieselben Aspekte in Bezug auf die FSGS untersucht. Hierbei wurde die Wirkung von CXA-10 in vier verschiedenen Studienarmen untersucht. Dabei wurde entweder mit einer Dosis von 75 mg bzw. 150 mg begonnen, wobei die Dosierung innerhalb des Studienzeitraums von drei Monaten auf 150 mg bzw. 300 mg erhöht wurde. Alternativ wurde die anfänglich verabreichte Dosis beibehalten. Die Endpunkte der Studie wurden auf unterschiedliche Weise definiert. Als primärer Endpunkt dieser Studie wurde die Reduktion der Proteinurie am Ende des Beobachtungszeitraums gewählt. Der sekundäre Endpunkt wurde als prozentuale Abweichung von den Baseline-Ergebnissen in der kompletten Remission, partiellen Remission oder modifiziert partiellen Remission definiert. Auch diese Studie wurde bereits abgeschlossen, jedoch liegen hier bis heute ebenfalls keine Ergebnisse vor<sup>95</sup>.

### **2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen von nitrierten Fettsäuren auf die Entwicklung und die Progression des thorakalen Aortenaneurysmas im Rahmen des Marfan-Syndroms zu untersuchen.

In der Einleitung wurde dargelegt, dass nitrierte Fettsäuren, insbesondere das Isomer Nitroölsäure (NO<sub>2</sub>-OA), in viele beim Marfan-Syndrom veränderte Signalwege eingreifen kann.

In-vitro Studien konnten zeigen, dass NO<sub>2</sub>-OA das nicht-kanonische TGF-β Signaling inhibiert sowie die Aktivität von NF-κB durch kovalente Bindung reduzieren kann. Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob diese Effekte auch in-vivo nachweisbar sind und ob dadurch die Progression der MFS-assozierten Aortenerkrankung reduziert werden kann.

Dazu wurde ein genetisches Mausmodell (Fbn1<sup>C1041G/+</sup>) verwendet, welches nachweislich die humane Pathologie des TAAs gut widerspiegelt. Diese Mäuse spiegeln die humane Pathologie gut wider, da sie ein proximales thorakales Aortenaneurysma, ähnlich wie beim Menschen und muskuloskelettale Defekte entwickeln.

Zusammengefasst wird im Rahmen dieser Dissertation das große therapeutische Potential von NO<sub>2</sub>-OA bei der MFS-assozierten Aortenerkrankung demonstriert, welches in Zukunft eine kausale Therapieoption darstellen könnte.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Tiere und Experimentdesign

Acht Wochen alte  $Fbn1^{C1041G/+}$  Mäuse (MFS-Mäuse), die heterozygot für eine Missense-Mutation im *FBN1*-Gen (Substitution von Glycin durch Cystein an Position 1041) sind, wurden entweder mit  $NO_2$ -OA (1,04 nmol/g/h, d.h. 8 mg/kg/Tag; gelöst in Polyethylenglykol/Ethanol (90:10, vol/vol) oder ausschließlich mit Vehikel (Polyethylenglykol/Ethanol, 90:10, vol/vol) behandelt. Die Applikation geschah über subkutan implantierten Minipumpen (ALZET Modell 2002) über einen Zeitraum von vier Wochen (die Pumpen wurden nach zwei Wochen ausgetauscht). Dieses Verabreichungsschema wurde am häufigsten in den jüngsten präklinischen Studien zur Untersuchung der in-vivo-Wirkungen von  $NO_2$ -OA verwendet<sup>62</sup> und die so erreichten Plasmaspiegel stimmten mit denen, die in klinischen Studien beobachtet wurden, überein<sup>93</sup>.  $NO_2$ -OA ist nachweislich mindestens einen Monat lang bei 37°C stabil<sup>68</sup>. Wildtyp-Wurfgeschwister (WT-Mäuse), denen Vehikel freisetzende Minipumpen implantiert wurden, dienten als Kontrollgruppe. Echokardiographie, Blutdruckmessungen und Analyse verschiedener Zytokine im Blutplasma wurden zusätzlich bei  $NO_2$ -OA-behandelten WT-Mäusen durchgeführt. Angesichts der Tatsache, dass männliche  $Fbn1^{C1041G/+}$  Mäuse im Vergleich zu weiblichen Mäusen eine schwerere Aortenpathologie aufweisen<sup>96</sup>, wurden in dieser Studie nur männliche Mäuse verwendet. Für die Implantation bzw. den Austausch der Minipumpe, die Implantation des Blutdrucksenders und die Euthanasie wurden die Mäuse durch Inhalation von Isofluran (Isofluran-Piramal®, Piramal Critical Care, Voorschoten, Niederlande; 5 % vol/vol für die Einleitung und 2 % vol/vol zur Aufrechterhaltung der Anästhesie) und subkutane Injektion von Buprenorphin (TEMGESIC®, Indivior Europe Limited, Dublin, Irland; 0,1 mg pro kg Körpergewicht) tief narkotisiert. Die Angemessenheit der Anästhesie wurde durch Test des Fußhebereflex bestätigt. Alle Tierversuche wurden von den örtlichen Tierschutzausschüssen genehmigt (Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen: Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), NRW, Deutschland) und entsprachen den Richtlinien der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.

#### 3.2 Echokardiographie

Die transthorakale Echokardiographie wurde vor der Implantation der Minipumpen (Baseline) und nach vierwöchiger Behandlung, d. h. vor der Gewebeentnahme, an mit Isofluran betäubten Mäusen (Isofluran-Piramal®, Piramal Critical Care, Voorschoten, Niederlande; 5 % vol/vol zur Einleitung und 2 % vol/vol zur Aufrechterhaltung der Narkose) durchgeführt. Die Aorta wurde in der B-Mode-Ansicht des Aortenbogens wie von Lee et al.<sup>97</sup> beschrieben mit einem Vevo 3100 Ultraschallgerät (FUJIFILM VisualSonics, Toronto, ON, Kanada) mit MX550D Schallkopf (25-55 MHz, Sendezentrum: 40 MHz, axiale Auflösung: 40 µm) aufgenommen. Die



Messungen wurden von zwei verblindeten Untersuchern in zweifacher Ausführung durchgeführt. Die Aortendiameter in Höhe der Aortenwurzel (AW) und der Mitte der Aorta ascendens (MAA) wurden von Vorderkante zu Vorderkante enddiastolisch gemessen (Abbildung 5A). Zur Berechnung der Pulswellengeschwindigkeit (PWG) des Aortenbogens, wurden gepulste Dopplersignale in der Aortenwurzel und am Anfang der Aorta descendens aufgezeichnet (ergänzende Abbildung 1). Der Abstand zwischen diesen beiden Positionen (d), d. h. die Länge des Aortenbogens wurde in der B-Mode-Ansicht gemessen. Die Zeiten von der EKG-R-Wellen-Spitze bis zum Einsetzen der Doppler-Wellenformen der Aortenwurzel (t1) und der Aorta descendens (t2) wurden anhand der jeweiligen Dopplerbildern gemessen. Die erhaltenen Werte für t1 und t2 wurden über 10 Herzzyklen gemittelt und die Transitzeit des Aortenbogens wurde als Differenz dieser beiden Zeiten bestimmt (t2-t1). Schließlich wurde die Länge des Aortenbogens (d) durch die Transitzeit des Aortenbogens (t2-t1) geteilt, um die PWG zu berechnen ( $PWG = d/(t2-t1)$ ).

### **3.3 Akzeleriertes Modell der MFS bedingten aortalen Pathologie**

Um die Pathologie der Aorta zu beschleunigen, erhielten 12 Wochen alte Fbn1<sup>C1041G/+</sup> Mäuse, die mit NO<sub>2</sub>-OA oder Vehikel (wie in 3.3.1 beschrieben) sowie Vehikel behandelte WT-Mäuse zusätzlich Angiotensin-II (AT-II; 4,5 mg/kg/Tag; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), gelöst in isotonischer Kochsalzlösung mit 1 mM Essigsäure über eine subkutan implantierte Minipumpen (ALZET Modell 1002) für einen Zeitraum von maximal sechs Wochen (die Pumpen wurden nach zwei und vier Wochen ausgetauscht). NO<sub>2</sub>-OA- oder Vehikel- Behandlung wurde eine Woche vor Beginn der AT-II-Behandlung begonnen. Das Überleben wurde täglich überwacht, und bei tot aufgefundenen Mäusen wurde zur Feststellung der Todesursache eine Autopsie durchgeführt. Echokardiographie (wie in 3.3.2 beschrieben) wurde vor Beginn der AT-II-Behandlung (Baseline) und danach wöchentlich durchgeführt.

### **3.4 Organentnahmen**

Die Euthanasie der tief narkotisierten Mäuse (wie in Abschnitt 3.1 beschrieben) erfolgte durch eine finale kardiale Blutentnahme. Anschließend wurde die Maus mit Kochsalzlösung perfundiert und die Aorta ascendens (der Teil der Aorta zwischen dem Aortenannulus und dem Truncus brachiocephalicus) wurde präpariert und herausgeschnitten. Für histologischen Analysen wurde die Aorta ascendens in Tissue-Tek optimum cutting (O.C.T.) Medium eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Serienschnitte der gefrorenen Gewebeproben mit einer Dicke von 5 µm wurden hergestellt und in Dreiergruppen auf einen Objektträger montiert. Alternativ dazu wurde die Adventitia vorsichtig entfernt und die Aorta ascendens in flüssigem Stickstoff für weitere molekularbiologische Analysen schockgefroren.

## 3.5 Histologische und molekularbiologische Methoden

### 3.5.1. Histologie

Die Fragmentierung der elastischen Fasern wurde mittels Elastica-van-Gieson (EVG)-Färbung von Aorten-Kryoschnitten analysiert (Elastica-van-Gieson-Färbekit, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Mikroskopaufnahmen wurden mit einem Keyence BZ-9000 Mikroskop (Keyence, Osaka, Japan) bei 10-facher (Übersicht über den gesamten Aortenquerschnitt) und 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Elastinbrüche, definiert als Unterbrechungen in den elastischen Fasern  $>1 \mu\text{m}$ , wurden in vier Schnitten pro Maus von einem verblindeten Untersucher gezählt. Die durchschnittliche Anzahl der Elastinbrüche pro  $10 \mu\text{m}$  Länge der elastischen Fasern wurde berechnet.

Zur Quantifizierung der ROS-Produktion wurde eine Dihydroethidium (DHE)-Färbung von Aorten-Kryoschnitten durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit DAPI (1/1000 in 1x PBS) angefärbt, mit DHE (5  $\mu\text{M}$ , verdünnt in DMSO und HBSS-Puffer) 30 Minuten lang bei 37 °C in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert und anschließend mit einem Keyence BZ-9000 Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung abgebildet. Die Ethidium-positive Fläche wurde von einem verblindeten Untersucher mit Hilfe der Keyence BZ-II Analysesoftware planimetrisch quantifiziert.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die gefrorenen Schnitte aufgetaut, 10 Minuten lang mit 4 % Paraformaldehydlösung fixiert, in Citratpuffer (1 mM Zitronensäure, 1 mM Natriumcitrat, 0,05% Tween 20) gekocht, um Zelloberflächenantigene oder in EDTA-Puffer (0,1 mM EDTA, pH 9, 0,05% Tween 20), um zytoplasmatische Antigene zu aktivieren und 60 Minuten lang mit Blockierlösung (10 % fetales Kälberserum plus 1 % BSA in 1 x PBS) blockiert. Die Proben wurden dann mit primären Antikörpern inkubiert (ergänzende Tabelle 1; Antikörperverdünnungslösung: 1 x PBS mit 1,5 % Blocking-Lösung) über Nacht bei 4 °C in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit sekundären Antikörpern (pERK1/2, NOS2, NOX2: Alexa Fluor 594 konjugierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper, Invitrogen A-11012, 1/100, gelöst in 1 x PBS;  $\alpha$ -SMA: Alexa Fluor 488 konjugierter Hühner-Anti-Maus-Antikörper, Invitrogen A-21200, 1/100, gelöst in 1 x PBS; Ly6G und F4/80: Es wurde kein sekundärer Antikörper verwendet, da die primären Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor 594 bzw. 488 konjugiert waren) für 60 Minuten inkubiert und mit DAPI (1/1000, gelöst in 1 x PBS) für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer gefärbt. Für jede Färbung wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen kein primärer Antikörper hinzugefügt wurde. Zusätzlich wurden Isotypkontrollen durchgeführt, um die Spezifität der primären Antikörper zu bestätigen (pERK1/2, NOS2, NOX2: polyklonales Kaninchen-IgG, R&D Systems # AB-105-C, ergänzende Abbildung 7 A; Ly6G und F4/80: Alexa Fluor 488 konjugiertes Ratten-IgG2a, Biolegend #400525, ergänzende Abbildung 4). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss Meta 710 (Zeiss,

Oberkochen, Deutschland) bei 10-facher (Übersicht des gesamten Aortenquerschnitts), 20-facher (Ly6G/F4/80-Färbungen) und 63-facher Vergrößerung (repräsentative Bilder von pERK1/2, NOX2 und NOS2/ $\alpha$ -SMA-Färbungen und Bilder für die Quantifizierung von pERK1/2) oder auf einem Keyence BZ-9000-Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung (Ly6G/F4/80-Färbungen von Milzgewebe, die als Positivkontrollen verwendet wurden und Bilder für die Quantifizierung von NOX2 und NOS2) aufgenommen, die positiv gefärbte Fläche wurde von einem verblindeten Untersucher mit der Keyence BZ-II-Analysesoftware (NOX2, NOS2) oder Image J (pERK1/2) quantifiziert.

### **3.5.2. In situ Zymographie**

Zur Quantifizierung der gelatinolytischen Aktivität von MMP-2/-9 wurde eine In-situ-Zymographie nach dem von Gkantidis et al.<sup>98</sup> beschriebenen Protokoll durchgeführt. Aortenschnitte wurden mit 50  $\mu$ l Gelatinase-Reaktionspuffer (150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NaN<sub>3</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH 7,6), der 10  $\mu$ g/ml DQ-Gelatine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) enthielt, 3 h lang bei 37 °C in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Negativkontrollen wurden durchgeführt, indem dem Gelatinase-Reaktionspuffer 10 mM EDTA (ein starker Inhibitor der MMP-2/-9-Aktivität) zugesetzt wurde (ergänzende Abbildung 7 B). Die Bilder wurden mit einem Keyence BZ-9000 Mikroskop bei 10-facher (Übersicht über den gesamten Aortenquerschnitt) und 40-facher Vergrößerung aufgenommen und die gelatinolytischen Bereiche wurden von einem verblindeten Untersucher mit der Keyence BZ-II Analysesoftware planimetrisch quantifiziert.

### **3.5.3. Gelatine Zymographie**

Gefrorene Aortengewebeproben wurden in Precellys-Keramik-Kit-Röhrchen (1,4 mm, 0,5 ml) mit 150  $\mu$ l EDTA-freiem Triton-X-Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, 1 % Triton X-100) unter Verwendung des Precellys 24 Gewebehomogenisators (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) homogenisiert. Nach wiederholtem Vortexen und Zentrifugieren wurde der Überstand gesammelt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. 10  $\mu$ g Protein wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf Novex™ 10 % Zymogram Plus Gels (Thermo Fisher Scientific) fraktioniert. Die Gele wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers entwickelt und anschließend mit Coomassie Blue gefärbt. Die Gele wurden mit einem ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) visualisiert und die Banden durch Densitometrie mit der Software ImageJ quantifiziert. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurden 10  $\mu$ g Protein aus denselben Proben, die für die Zymographie verwendet wurden, auf ein separates Gel geladen und einer Immunoblot-Analyse der GAPDH-Proteinexpression unterzogen (wie unter 3.5.4 beschrieben). Schließlich wurde die MMP-2-Aktivität auf

die GAPDH-Proteinexpression normalisiert. Ungeschnittene Zymogramme sind in der ergänzenden Abbildung 3A dargestellt.

#### **3.5.4. Immunoblot Analyse**

Gefrorene Aortengewebebeobproben wurden in Precellys-Keramik-Kit-Röhrchen (1,4 mm, 2,0 ml) homogenisiert, die mit 300 µl eiskalten RIPA-Lysepuffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Tris pH 8,0, 1 % NP40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 0,1 % SDS), ergänzt mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (Roche, Mannheim, Deutschland) gefüllt waren. Es wurden Precellys 24 Gewebekomogenisator verwendet. Nach wiederholtem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Überstände gesammelt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt. 15 µg Protein aus jeder Probe wurden unter reduzierenden Bedingungen auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Ein ausreichender Transfer der Proteine wurde durch Ponceau-Färbung überprüft. Die Membranen wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert, über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörpern inkubiert und anschließend eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit sekundären Antikörpern inkubiert. Die Proteine wurden mit den in der ergänzenden Tabelle 1 aufgeführten primären Antikörpern nachgewiesen. Als Sekundärantikörper wurde mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (1/10000, Vector Laboratories #PI-1000) verwendet. Nach Inkubation mit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) und Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) im Verhältnis 1:1 wurde das Fluoreszenzsignal mit einem Fusion FX Imaging System (Vilber Lourmat, Collegien, Frankreich) visualisiert. Die Banden wurden mit der Fusion FX-Software quantifiziert. Vollständige Immunoblots (einschließlich aller Proben) mit Schwerpunkt auf den für die Analyse verwendeten Banden sind in der ergänzenden Abbildung 3B zu sehen. Vollständige, unbearbeitete Immunoblots sind außerdem in den ergänzenden Abbildungen 8 und 9 zu sehen.

#### **3.5.5. Quantitative real-time PCR**

Die Gesamt-RNA aus Aortenproben wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) extrahiert und gereinigt. Die RNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Komplementäre DNA (cDNA) wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) aus 1 µg RNA revers transkribiert. Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurde mit dem GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) auf einem 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Primer-Sequenzen sind in der ergänzenden Tabelle 2 aufgeführt. Die relative mRNA-Expression (vielfache Veränderung relativ zu WT) wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode quantifiziert, wobei  $\beta$ -Actin zur Normalisierung verwendet wurde.

### **3.5.6. Aktives TGF- $\beta$ 1 ELISA**

Gefrorene Aortengewebebeobproben wurden homogenisiert und die Proteinkonzentrationen wurden wie unter 3.5.4 beschrieben analysiert. 10  $\mu$ g Protein aus jeder Probe wurden mit dem Biolegend LEGEND MAX™ Free Active TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit (Cat # 437707; BioLegend, San Diego, CA, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers untersucht.

### **3.5.7. Xanthinoxidase Aktivität Assay**

Gefrorene Aortengewebebeobproben wurden in Precellys-Keramik-Kit-Röhrchen (1,4 mm, 0,5 ml) mit 150  $\mu$ l Assay-Puffer homogenisiert und zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Assay wie unter 3.5.4 beschrieben analysiert. 50  $\mu$ l Proteinextrakt wurden mit dem Abcam Xanthine Oxidase Activity Assay Kit (ab 102522) gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Schließlich wurde die nachweisbare Xanthinoxidase-Aktivität auf die einzelnen Proteinkonzentrationen normalisiert, wie durch den BCA-Assay bestimmt.

### **3.5.8. Nitrat / Nitrit kolorimetrischer Assay**

Aortengewebebeobproben wurden in Precellys-Keramik-Kit-Röhrchen (1,4 mm, 2,0 ml) mit 300  $\mu$ l PBS unter Verwendung des Precellys 24 Gewebhomogenisators homogenisiert und zentrifugiert. Anschließend wurde die überstehende Lösung ultrazentrifugiert und dann mit Microcon 10 kDa Zentrifugalfiltern (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) ultrafiltriert. Schließlich wurden 50  $\mu$ l des Ultrafiltrats aufgefangen und dem kolorimetrische Nitrat/Nitrit-Assay-Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) zur Messung der Gesamtnitrat/Nitrit-Konzentration, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, zugeführt.

## **3.6 Blutdruckmessung**

Der Blutdruck wurde invasiv bei acht bis zehn Wochen alten MFS- und WT-Mäusen mit DSI PhysioTel PA-C10 Drucktransmittern (DSI, St. Paul, MN, USA) gemessen. Die Implantation der Sender erfolgte in tiefer Narkose, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Die Transmitter wurden subkutan entlang der seitlichen Flanke platziert und der Druckmesskatheter wurde über die linke A. carotis eingeführt. Baseline-Messungen wurden kontinuierlich einen Tag nach der Implantation des Senders über einen Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden Vehikel oder NO<sub>2</sub>-OA freisetzende Minipumpen implantiert und an zwei weitere Zeitpunkten wurde 48-Stunden-Messungen durchgeführt (Tag 1 bis Tag 3 nach Beginn der Behandlung und Tag 4 bis Tag 6 nach Beginn der Behandlung).

## **3.7 Plasma Zytokin Array**

Das Blut wurde in tiefer Narkose durch kardiale Punktion entnommen, in heparinisierten Röhrchen gesammelt und anschließend für 10 Minuten bei 1300 x g zentrifugiert. 100  $\mu$ l Plasma aus zwei Proben wurden mit dem Abcam Mouse Cytokine Antibody Array (ab133993) gemäß

den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Protein Array Analyzer von ImageJ wurde zur Quantifizierung der Spot-Intensitäten verwendet.

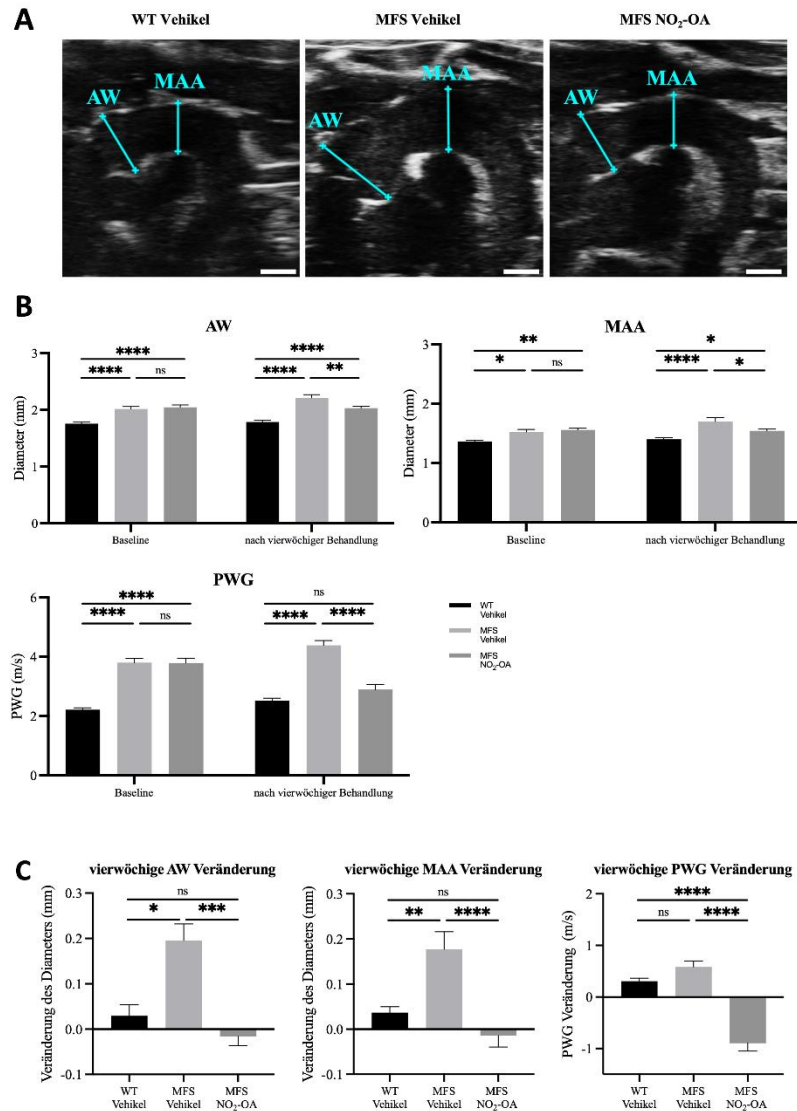
### **3.8 Statistische Analyse**

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Der Shapiro-Wilk-Test und der Brown-Forsythe-Test wurden verwendet, um auf Normalverteilung bzw. Gleichheit der Varianzen zu prüfen. Unterschiede zwischen den drei oder vier Gruppen wurden mittels ein- oder zweiseitiger Varianzanalyse mit wiederholten Messungen (ANOVA) und Tukey-Test (post-hoc) bewertet, wenn die Daten normal verteilt und die Varianzen gleich waren. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc-Test durchgeführt. Bei ungleichen Varianzen wurde die Welch ANOVA mit Dunnett's T3 post-hoc-Test angewendet. Für den Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde eine zweifache ANOVA mit wiederholten Messungen mit Sidak's post-hoc Test oder ein ungepaarter t-Test verwendet (ergänzende Abbildung 2, die Daten waren normalverteilt und die Varianzen waren gleich, wie der Shapiro Wilk Test und der F-Test zum Vergleich der Varianzen zeigten). Wenn Datenpunkte in Analysen mit wiederholten Messungen fehlten, wurde eine Mixed-Effects-Modell-Analyse mit post-hoc Tukey's Test durchgeführt (Abbildung 9G, 10C und ergänzende Abbildung 6). Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede in der Überlebensanalyse wurde der Log-Rank-Test (Mantel-Cox) mit post-hoc Bonferroni-Korrektur verwendet (Abbildung 10A). Ein Wert von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 8.4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 NO<sub>2</sub>-OA verhindert das Fortschreiten der MFS-bedingten Aortenerkrankung

Die Echokardiographie im Alter von 8 Wochen zeigte eine signifikante Dilatation der Aortenwurzel (AW) und der mittleren Aorta ascendens (MAA) sowie eine signifikant erhöhte Pulswellengeschwindigkeit (PWG) des Aortenbogens bei MFS-Mäusen im Vergleich zu den WT-Wurfgeschwistern. Nach vier Wochen, d. h. im Alter von 12 Wochen, wiesen MFS-Mäuse immer noch höhere Aortendiameter und PWG auf als Wildtypen (Abbildung 4A und B). Innerhalb dieser vier Wochen nahmen die Aortendiameter weiter zu und die PWG blieb bei MFS-Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt wurden, im Vergleich zu WT-Kontrollen konstant erhöht (Abbildung 4C). Eine vierwöchige NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung verhinderte das Fortschreiten der AW- und MAA-Dilatation und reduzierte die PWG wieder auf WT-Niveau (Abbildung 4B und C). Um einen negativen Effekt von NO<sub>2</sub>-OA auf nicht pathologisch veränderte Aorta ascendens auszuschließen, wurde eine weitere Kohorte 8 Wochen alter WT-Mäuse mit Vehikel oder NO<sub>2</sub>-OA vier Wochen lang behandelt. Echokardiographische Messungen des Aortendiameter ergaben keine Unterschiede zwischen den Gruppen (ergänzende Abbildung 2).



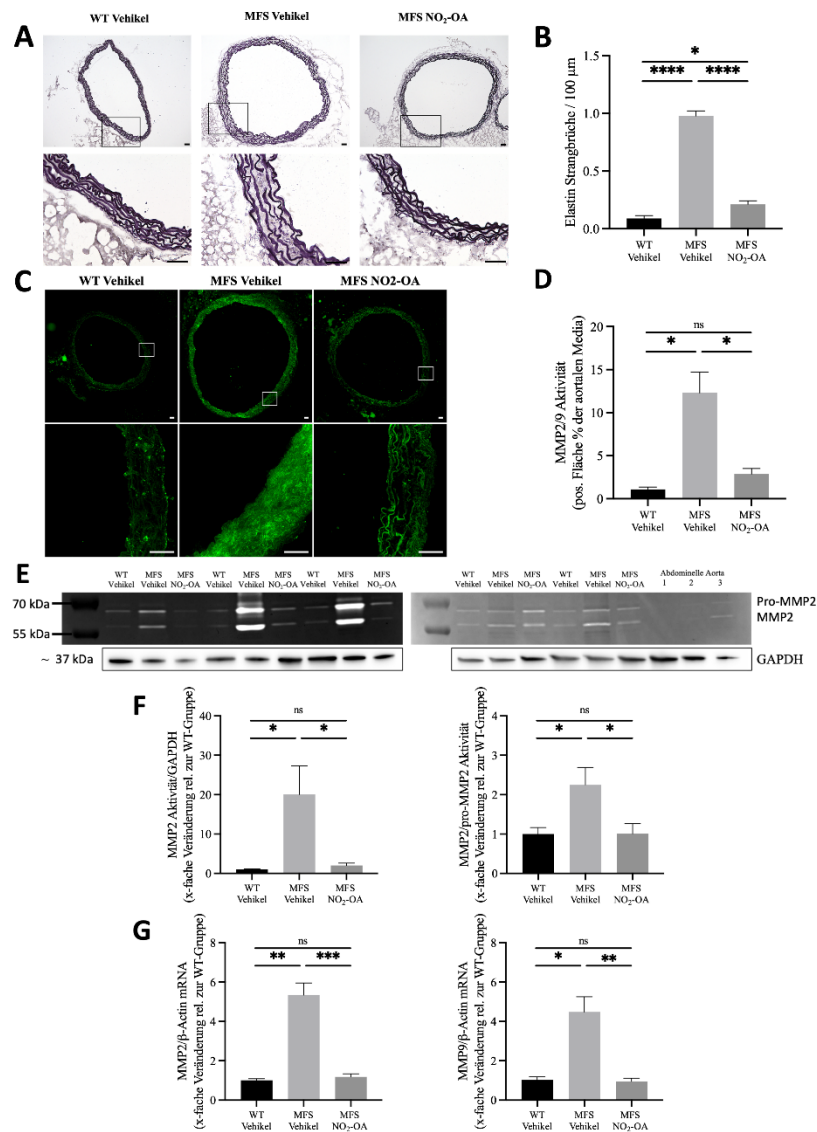
**Abbildung 4:** NO<sub>2</sub>-OA mildert die MFS-bedingte Aortendilatation und -versteifung. (A) Repräsentative 2D-echokardiographische Aufnahmen mit Durchmessermessungen an der Position der Aortenwurzel (AW) und der mittleren Aorta ascendens (MAA). Der Maßstabsbalken zeigt 1 mm. (B) AW-Durchmesser, MAA-Durchmesser und Pulswellengeschwindigkeit (PWG) des Aortenbogens Baseline (im Alter von 8 Wochen) und nach vierwöchiger Behandlung mit NO<sub>2</sub>-OA oder Vehikel (im Alter von 12 Wochen). (C) Veränderungen durch 4-wöchige Therapie (8-12 Wochen Alter) der jeweiligen Messungen innerhalb eines Tieres. (n = 15-17 pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch zweifache ANOVA mit wiederholten Messungen und Tukey's multiplem Vergleichstest (B), Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiplem Vergleichstest (C: AW und MAA) oder Welch ANOVA mit Dunnett's T3 multiplem Vergleichstest (C: PWG) bestimmt. ns = nicht signifikant, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

## 4.2 NO<sub>2</sub>-OA vermindert die MMP-vermittelte Elastinfragmentierung

Die Elastica-van-Gieson-Färbung (EVG) zeigte eine deutliche Fragmentierung des Elastins in Aortenschnitten von 12 Wochen alten, mit Vehikel behandelten MFS-Mäusen, während die elastischen Fasern in WT-Aorten kaum fragmentiert waren (Abbildung 5A und B). Im Einklang damit wiesen MFS-Mäuse signifikant höhere MMP-2/-9-Aktivität in der Aorta im Vergleich zu WT-Mäusen auf, wie die In-situ-Zymographie zeigte (Abbildung 5C und D). Die Gelatine-Zymographie zeigte, dass die MMP-Überaktivierung in den MFS-Aorten auf eine erhöhte MMP-



2-Aktivität zurückzuführen ist, während die MMP-9-Aktivität fast nicht nachweisbar war (Abbildung 5E-F und ergänzende Abbildung 3A). Zusätzlich war die Expression von MMP-2 und -9 mRNA in MFS-Aorten erhöht (Abbildung 5G). Die NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung normalisierte die aortale MMP-2/-9-mRNA-Expression und gelatinolytische Aktivität von MMP-2 (Abbildung 5C-G). Gleichzeitig wurden die Elastinfragmentierung in der Aorta deutlich reduziert (Abbildung 5A und B), was darauf hindeutet, dass NO<sub>2</sub>-OA den MMP vermittelten maladaptiven Strukturumbau hemmt. In Anbetracht der Tatsache, dass MMPs durch inflammatorische Zellen (insbesondere Makrophagen) bei Aortendissektionen produziert werden können<sup>43</sup>, wurde die Leukozyteninfiltration der Aorta ascendens histologisch untersucht. Sowohl Ly6G<sup>+</sup> Neutrophile als auch F4/80<sup>+</sup> Makrophagen waren kaum nachweisbar, was darauf hindeutet, dass Leukozyten nicht wesentlich zur MMP-Überproduktion in MFS-Aorten beitragen (ergänzende Abbildung 4).



**Abbildung 5:** NO<sub>2</sub>-OA reduziert die MMP-vermittelte Elastinfragmentierung der Aorta in MFS-Mäusen. (A) Repräsentative Bilder von Elastic-van-Gieson gefärbten Schnitten der Aorta ascendens und (B) durchschnittliche Anzahl von Elastinbrüchen pro 100 µm elastische Faser (n = 6-7 pro Gruppe). (C) Repräsentative Bilder (ein Maß für die MMP-2/-9-Aktivität) von Schnitten der Aorta ascendens und (D) entsprechende Quantifizierung der MMP-2/-9-Aktivität der Aorta ascendens (gelatinolytische Fläche (hellgrün) als Prozentsatz der Aortenmedia). (n = 7 pro Gruppe). (E) Repräsentative Bilder von der Gelatine-Zymographie von Gewebeextrakten der Aorta ascendens, die pro-MMP-2/MMP-2-Aktivität zeigen (die Bauchorta wurde als Negativkontrolle verwendet) und

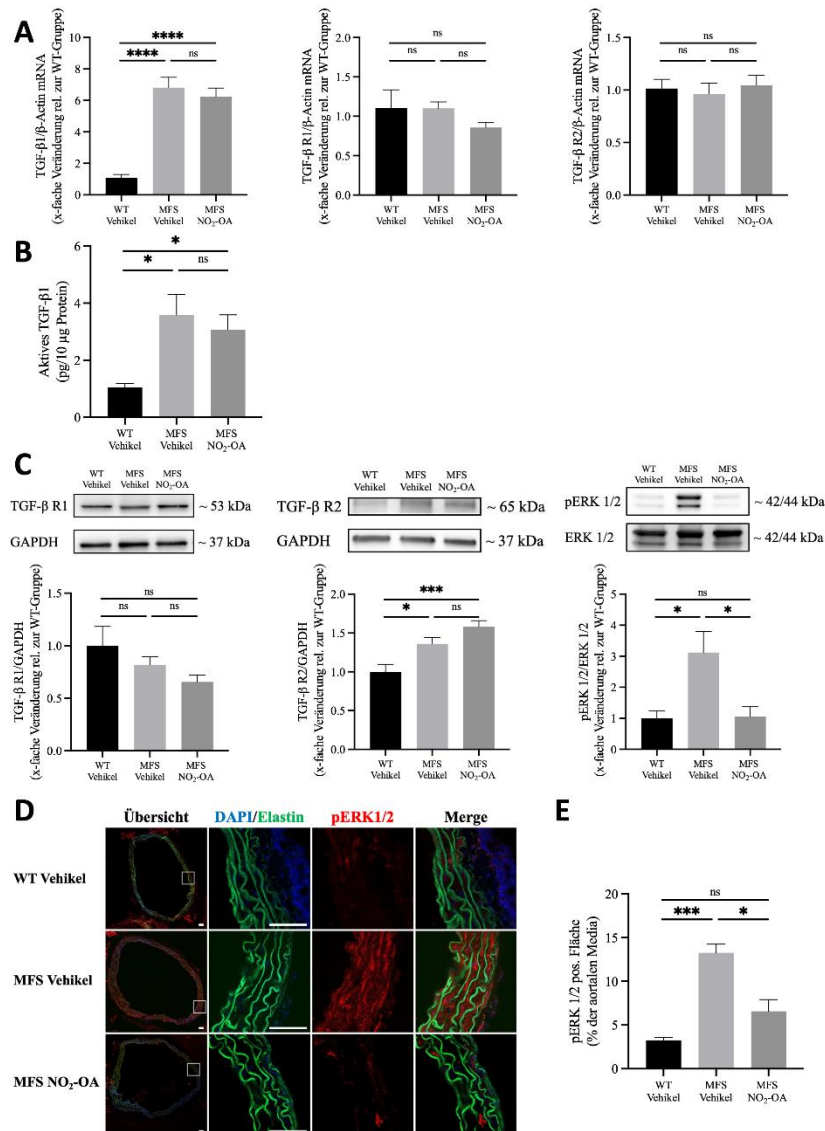
Immunoblot-Analyse der GAPDH-Proteinexpression, die von einem separaten Gel stammt, das mit denselben Proben beladen wurde, die für die Zymographie verwendet wurden und (F) entsprechende Quantifizierung der MMP-2-Aktivität im Verhältnis zur GAPDH-Proteinexpression und der MMP-2-Aktivität im Verhältnis zur pro-MMP-2-Aktivität. (n = 6 pro Gruppe). (G) Quantifizierung der aortalen MMP-2 (links) und MMP-9 (rechts) mRNA-Expression. (n = 4-7 pro Gruppe). (A und C) Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu\text{m}$ . (B, D, F, G) Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest (B, F) oder Welch ANOVA mit Dunnett's T3 multiplem Vergleichstest (D, G) ermittelt. ns = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### **4.3 NO<sub>2</sub>-OA hemmt die Überaktivierung von ERK1/2 und Smad2 in der Aorta ascendens bei MFS-Mäusen**

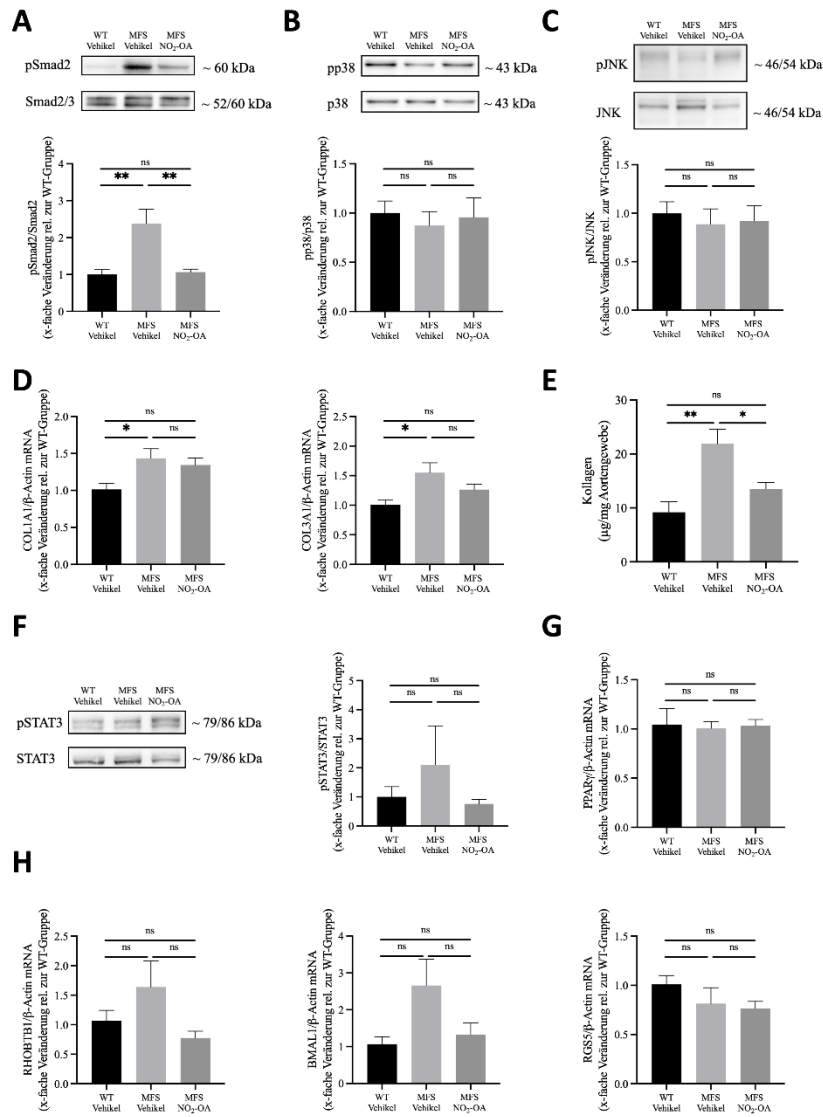
Die MFS-bedingte MMP-Überexpression wird durch verstärkte ERK1/2-Signalgebung angetrieben<sup>30</sup>, die aus einer TGF- $\beta$ -Überaktivierung resultiert<sup>26</sup>. In Übereinstimmung damit wurden bei MFS-Mäusen eine höhere Expression von TGF- $\beta$ 1 mRNA und erhöhte aktive TGF- $\beta$ 1- sowie TGF- $\beta$ -Rezeptor (Tgfbr) 2 Proteinspiegel in der Aorta, im Vergleich zu WT-Wurfgeschwistern gefunden, während die Tgfbr1/2 mRNA-Expression und die Tgfbr1-Proteinspiegel in MFS-Mäusen nicht verändert waren (Abbildung 6A-C). Entsprechend war die Phosphorylierung von ERK1/2 in den MFS-Aorten erhöht, wie die Immunoblot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbung zeigen (Abbildung 6C-E). Weder die mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 1 und Tgfbr1/2 Expression noch die aktiven TGF- $\beta$ 1- und Tgfbr1/2-Proteinspiegel wurden durch die NO<sub>2</sub>-OA Behandlung beeinflusst (Abbildung 6A-C). Allerdings reduzierte NO<sub>2</sub>-OA signifikant die Phosphorylierung von ERK1/2 (Abbildung 6C-E).

Zusätzlich wurde die Phosphorylierung von Smad2 analysiert, dem zentralen Vermittler der kanonischen TGF- $\beta$  Signalisierung, sowie p38 und JNK, die an der nicht-kanonischen TGF- $\beta$ -Signalisierung beteiligt sind<sup>26</sup>. In Übereinstimmung mit früheren Daten<sup>26,99</sup> war die Smad2-Phosphorylierung (d. h. die Aktivierung) in MFS-Aorten im Vergleich zu WT signifikant erhöht, während die Phosphorylierung von p38 und JNK unverändert war. NO<sub>2</sub>-OA hemmte die Smad2-Phosphorylierung, hatte aber keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung von p38 und JNK (Abbildung 7A-C). Neben der oben beschriebenen Induktion der MMP-Expression und anschließenden Elastinfragmentierung hat sich gezeigt, dass eine TGF- $\beta$ -Überaktivierung zu einer übermäßigen Kollagenproduktion in der Aorta bei MFS führt<sup>32</sup>. Dementsprechend wurde eine erhöhte COL1A1 und COL3A1 mRNA- und Kollagenproteinexpression in MFS-Aorten gefunden, während die NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung den Gesamtkollagenproteingehalt signifikant reduzierte (Abbildung 7D und E).

STAT3 und PPAR $\gamma$  sind zwei weitere Angriffspunkte von NO<sub>2</sub>-OA<sup>87</sup> mit möglicher Beteiligung bei MFS. Jedoch waren weder die STAT3-Phosphorylierung noch die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  und VSMC spezifischen PPAR $\gamma$ -Zielgenen (BMAL1, RGS5 und RHOBTB1) in den MFS-Aorten verändert und/oder durch NO<sub>2</sub>-OA beeinflusst (Abbildung 7F-H).



**Abbildung 6:** Die Phosphorylierung von ERK1/2, den Schlüsselvermittlern des nicht-kanonischen TGF- $\beta$ -Signalwegs, ist in MFS-Aorten erhöht und wird durch NO<sub>2</sub>-OA gehemmt. (A) Quantifizierung der aortalen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ -Rezeptor (R) 1 und TGF- $\beta$ -Rezeptor (R) 2 mRNA-Expression. (n = 5-7 pro Gruppe). (B) Aktive TGF- $\beta$ 1-Spiegel in Gewebeproben der Aorta ascendens, bestimmt durch ELISA. (n = 7-8 pro Gruppe). (C) Repräsentative Immunoblots von TGF- $\beta$  R1, TGF- $\beta$  R2 und phospho(p)/total ERK1/2 in Gewebeproben der Aorta ascendens und entsprechende Quantifizierungen der Proteinexpression. (n = 6 pro Gruppe). (D) Repräsentative pERK1/2-Immunfluoreszenzfärbungen von Schnitten der Aorta ascendens. Erste Spalte: Überblick über den gesamten Aortenquerschnitt. Zweite Spalte: DAPI-gefärbte Zellkerne (blau) und Elastin-Autofluoreszenz (grün). Dritte Spalte: pERK1/2-Färbung (rot). Vierte Spalte: zusammengeführte Bilder (DAPI, pERK1/2 und Elastin-Autofluoreszenz). Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu$ m. (E) Quantifizierung des pERK1/2-Proteinspiegels in der Aorta durch Immunfluoreszenzfärbung (pERK1/2-positive Fläche als Prozentsatz des Aortenmedia). (n = 6-7 pro Gruppe). (A, B, C, E) Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch einseitige ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest (A: TGF- $\beta$  1 und TGF- $\beta$  R2, C, E), oder Welch ANOVA mit Dunnett's T3 multiplem Vergleichstest (A: TGF- $\beta$  R1, B) bestimmt. ns = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

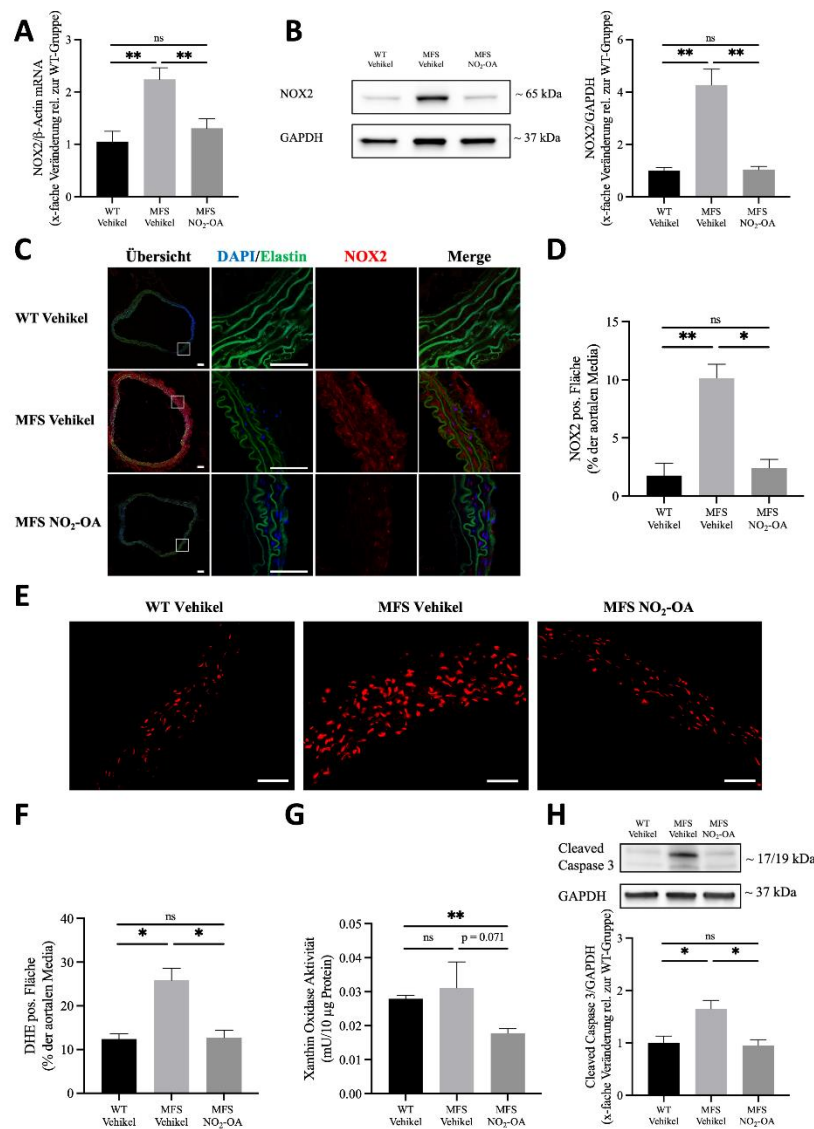


**Abbildung 7:** NO<sub>2</sub>-OA vermindert die Smad2-Aktivierung und die Kollagenablagerung in MFS-Aorten. (A, B, C, F) Repräsentative Immunoblots von phospho(p) Smad2/Gesamt-Smad2/3 (A), phospho(p)/Gesamt-p38 (B), phospho(p)/Gesamt-JNK (C) und phospho(p)/Gesamt-SAT3 (F) in Gewebeproben der Aorta ascendens und entsprechende Quantifizierungen der Proteinexpression. (n = 6 pro Gruppe). (D) Quantifizierung der mRNA-Expression von COL1A1 und COL3A1 in der Aorta. (n = 5-7 pro Gruppe). (E) Quantifizierung des Gesamtkollagenspiegels in Gewebeproben der Aorta ascendens, bestimmt mit dem Total Collagen Assay Kit. (n = 5 pro Gruppe). (G und H) Quantifizierung der aortalen PPAR $\gamma$ - (G) und VSMC-spezifischen PPAR $\gamma$ -Zielgene (H; BMAL1, RGS5, RHOBTB1) mRNA-Expression. (n = 5-7 pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest (A, B, C, D, E, G, H: RGS 5) oder Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiplem Vergleichstest (F, H: BMAL1 und RHOBTB1) bestimmt. ns = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

#### 4.4 Die NOX-vermittelte ROS-Produktion und Apoptose ist in Marfan-Aorten erhöht und wird durch NO<sub>2</sub>-OA abgeschwächt

NOX ist ein ROS-erzeugendes Enzym, das durch ERK1/2 reguliert wird<sup>31</sup> und mit einer MMP-Überaktivierung und Elastinfragmentierung in Verbindung gebracht wird<sup>25,100</sup>. Dementsprechend waren die NOX-mRNA-Expression und Proteingehalt in MFS-Aorten im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe erhöht, was durch qPCR, Immunoblot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbung von NOX2 (auch bezeichnet als gp91phox), der katalytischen Untereinheit von NOX, nachgewiesen wurde. NO<sub>2</sub>-OA reduzierte signifikant die NOX-mRNA- und Proteinexpression

(Abbildung 8A-D). Zum Nachweis der funktionellen Bedeutung der NOX-Hochregulierung, wurde eine DHE-Färbung durchgeführt. Hier wiesen MFS-Mäuse höhere ROS-Level in der Aorta auf als WT-Kontrollen, während die NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung die MFS-bedingte ROS-Überproduktion verringerte (Abbildung 8E und F). Neben NOX spielt auch die Xanthinoxidase (XO), die durch NO<sub>2</sub>-OA in-vitro gehemmt wird<sup>80</sup>, an der MFS-bedingten ROS-Überproduktion und der vasomotorischen Dysfunktion in späteren Krankheitsstadien eine Rolle<sup>37</sup>. Um zu untersuchen, ob NO<sub>2</sub>-OA die XO-Aktivität in MFS-Aorten beeinflusst, wurde Aortengewebe auf Veränderungen der XO-Aktivität untersucht. Die XO-Aktivität in den Aorten von NO<sub>2</sub>-OA-behandelten MFS-Mäusen war im Vergleich zu Wildtypen signifikant reduziert und fast signifikant reduziert im Vergleich zu Vehikel-behandelten MFS-Mäusen ( $p = 0,071$ ), während keine Unterschiede zwischen WT-Kontrollen und Vehikel-behandelten MFS-Mäusen beobachtet werden konnten (Abbildung 8G). ROS sind potente Induktoren der VSMC-Apoptose<sup>38</sup>, von denen kürzlich gezeigt wurde, dass sie den TGF- $\beta$ -abhängigen Progress des Aortenaneurysmas bei MFS vorantreibt<sup>34</sup>. Dementsprechend wurden erhöhte Werte des Apoptosemarkers gespaltene (aktivierten) Caspase3 in MFS-Aorten gefunden. Die Behandlung mit NO<sub>2</sub>-OA verringerte signifikant die Menge an gespaltener und somit aktivierter Caspase3, was mit der hemmenden Wirkung auf die ERK1/2-Aktivierung und die ROS-Produktion erklärt werden kann (Abbildung 8H).



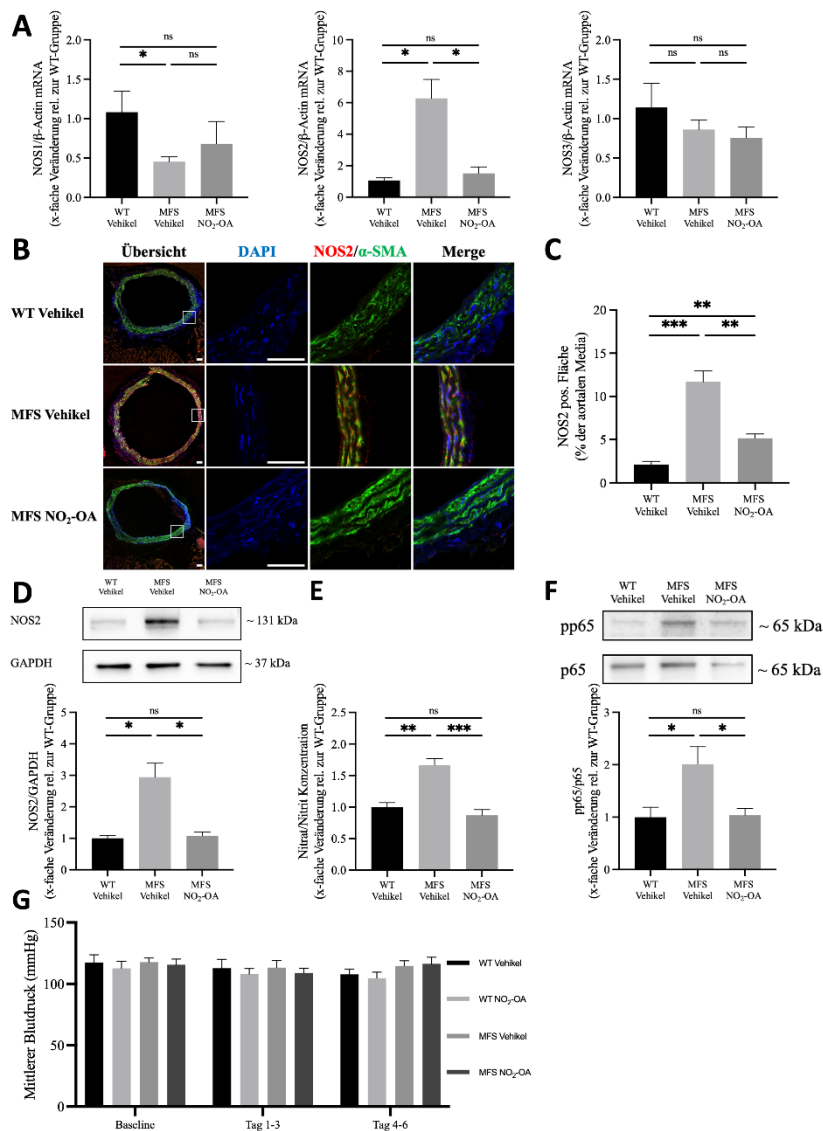
**Abbildung 8:** MFS-bedingte ROS-Überproduktion in der Aorta durch NOX und Apoptose werden durch NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung abgeschwächt. (A) Aortale NOX2-mRNA-Expression. (n = 4-7 pro Gruppe). (B) Repräsentative Immunoblots von NOX2 in Gewebeproben der Aorta ascendens und Quantifizierung der NOX2-Proteinexpression in der Aorta. (n = 6 pro Gruppe). (C) Repräsentative NOX2-Immunfluoreszenzfärbungen von Schnitten der Aorta ascendens. Erste Spalte: Überblick über den gesamten Aortenquerschnitt. Zweite Spalte: DAPI-gefärbte Zellkerne (blau) und Elastin-Autofluoreszenz (grün). Dritte Spalte: NOX2-Färbung (rot). Vierte Spalte: zusammengeführte Bilder (DAPI, NOX2 und Elastin-Autofluoreszenz). NOX2 steht für die katalytische Untereinheit von NOX. (D) Quantifizierung des NOX2-Proteinspiegels in der Aorta durch Immunfluoreszenzfärbung (NOX2-positive Fläche als Prozentsatz der Aortenmedia). (n = 6-8 pro Gruppe). (E) Repräsentative DHE-Färbung von Schnitten der Aorta ascendens und (F) Quantifizierung der ROS-Level in der Aorta (DHE-positive Fläche (rot) als Prozentsatz der Aortenmedia). (n = 7 pro Gruppe). (G) XO-Aktivitätswerte in Gewebeproben der Aorta ascendens, bestimmt mit dem XO-Aktivitäts-Assay-Kit. (n = 5 pro Gruppe). (H) Repräsentative Immunoblots von gespaltenen Caspase 3 in Gewebeproben der Aorta ascendens und Quantifizierung der Proteinexpression von gespaltenen Caspase 3 in der Aorta. (n = 6 pro Gruppe). (C und E) Maßstabsbalken zeigt 50 μm. (A, B, D, F, G, H) Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest (A, B) oder Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiplem Vergleichstest (D, F, G, H) bestimmt. ns = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

#### 4.5 MFS-bedingte NOS2-Überaktivität wird durch NO<sub>2</sub>-OA über die Hemmung von NF-κB vermindert

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Oller et al.<sup>46</sup> wurde eine Überexpression von NOS2 mRNA und Protein in MFS-Aorten im Vergleich zu WT-Aorten nachgewiesen (Abbildung 9A-D). Außerdem lieferte der Nitrat/Nitrit kolorimetrischer Assay den Nachweis einer

MFS-bedingten NO-Überproduktion in der Aorta (Abbildung 9E). Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigte eine Ko-Lokalisation von NOS2 und  $\alpha$ -SMA, wie bereits beschrieben<sup>46</sup>, was darauf hindeutet, dass VSMCs für die NOS2 Überproduktion verantwortlich sind (Abbildung 9B). Überraschenderweise war die NOS1-mRNA-Expression in MFS-Aorten leicht reduziert, während die NOS3-mRNA-Spiegel nicht verändert waren (Abbildung 9A). Die NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung verringerte signifikant die aortale NOS2-Protein und mRNA-Expression sowie die Nitrit/Nitrat Konzentration, was auf eine verringerte NO-Produktion hindeutet. Die Behandlung hatte allerdings keinen Einfluss auf die NOS1 und NOS3 mRNA-Expression (Abbildung 9A-E). In Übereinstimmung mit den gezeigten Ergebnissen ist NOS2 bekannt dafür, dass es hauptsächlich auf der Transkriptionsebene reguliert wird<sup>83</sup>. Einer der wichtigsten Regulatoren von NOS2 ist NF- $\kappa$ B<sup>83</sup>. Es ist bekannt, dass NO<sub>2</sub>-OA die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Nitroalkylierung seiner Untereinheit p65 verhindert<sup>45</sup>. Daher wurde die Phosphorylierung von p65, einem Marker für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung, im Aortengewebe quantifiziert und festgestellt, dass MFS-Mäuse in der Aorta erhöhte Werte von phosphorylierten p65 (pp65) im Vergleich zu WT-Kontrollen aufwiesen, während die NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung die Phosphorylierung von p65 normalisierte (Abbildung 9F). NO<sub>2</sub>-OA hat durch seine hemmende Wirkung auf NF- $\kappa$ B in verschiedenen präklinischen Krankheitsmodellen starke entzündungshemmende Eigenschaften gezeigt<sup>62</sup>. Um die Rolle einer solchen entzündungshemmenden Wirkung im MFS zu bewerten, wurden Plasmaproben einem Zytokin-Array unterzogen. Dabei zeigte sich, dass keines der 22 gemessenen Zytokine / Chemokine bei MFS-Mäusen verändert war oder signifikant von der NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung beeinflusst wurde (ergänzende Abbildung 5). Dies deutet darauf hin, dass die NO<sub>2</sub>-OA-abhängige Modulation der Zytokinreaktion, die bei entzündlichen Zuständen beobachtet wurde, nicht zur schützenden Wirkung der Substanz im MFS beiträgt.

Da NO ein potenter Mediator der Vasodilatation ist, haben wir den Blutdruck (BP) bei WT- und MFS-Mäusen vor und während der Behandlung mit NO<sub>2</sub>-OA oder Vehikel gemessen. In Übereinstimmung mit einer früheren Studie<sup>101</sup> wiesen MFS-Mäuse im Vergleich zu WT-Kontrollen keine veränderten Blutdruckwerte auf und die Behandlung mit NO<sub>2</sub>-OA beeinflusste den Blutdruck weder bei MFS- noch bei WT-Mäusen (Abbildung 9G und ergänzende Abbildung 6). Diese Daten stimmen mit der Hypothese überein, dass die NO Überproduktion bei MFS auf die erkrankte Aorta ascendens beschränkt ist, aber nicht die Widerstandsarterien, die für die Blutdruckregulation verantwortlich sind, betrifft.

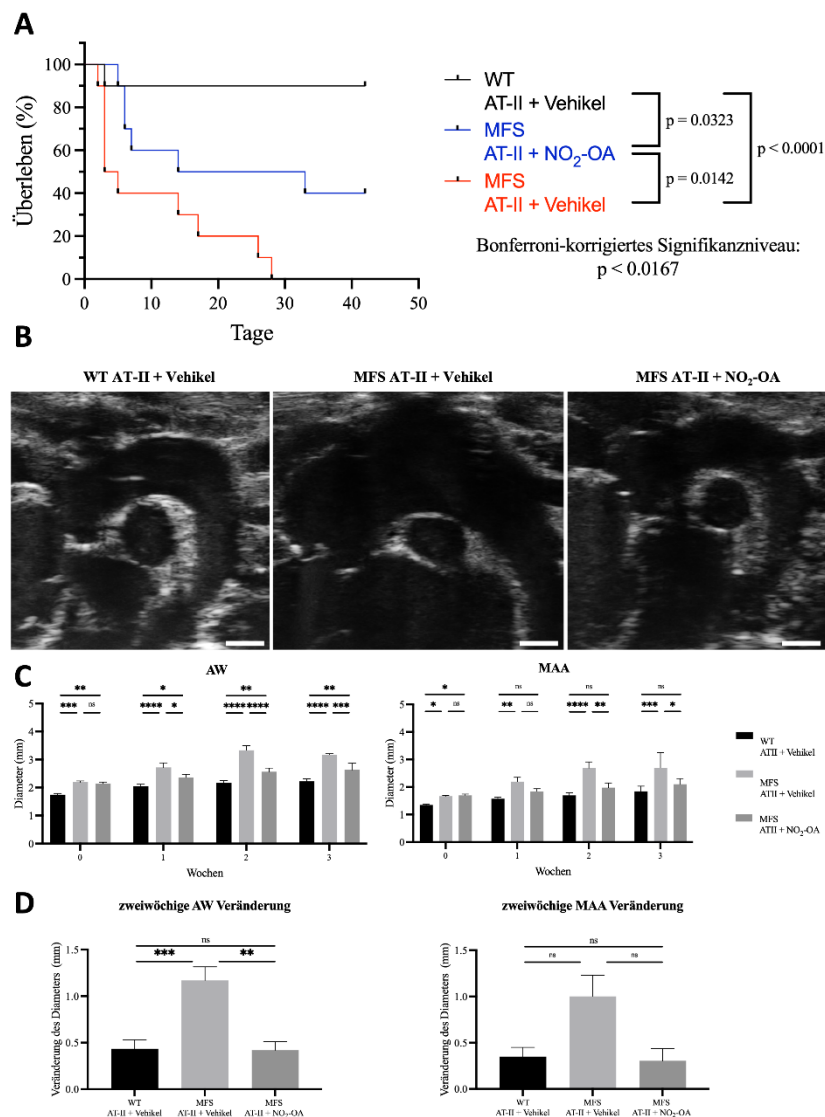


**Abbildung 9:** NO<sub>2</sub>-OA vermindert die NOS2-Expression und NO-Produktion in MFS-Aorten durch Hemmung von NF-κB. (A) mRNA-Expression von NOS1, NOS2 und NOS3 in der Aorta. (n = 5-7 pro Gruppe). (B) Repräsentative NOS2- und α-SMA-Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Schnitten der Aorta ascendens. Erste Spalte: Überblick über den gesamten Aortenquerschnitt. Zweite Spalte: DAPI-gefärbte Zellkerne (blau). Dritte Spalte: NOS2 (rot) und α-SMA (grün) Färbungen. Vierte Spalte: zusammengeführte Bilder (DAPI, NOS2 und α-SMA). Das grünen α-SMA-Signals erforderte nur sehr kurze Belichtungszeiten, so dass die Autofluoreszenz von Elastin in diesen Färbungen nicht sichtbar ist. Maßstabsbalken zeigt 50 μm. (C) Quantifizierung der NOS2-Proteinkonzentration in der Aorta durch Immunfluoreszenzfärbung (NOS2-positive Fläche als Prozentsatz der Aortenmedia). (n = 6-8 pro Gruppe). (D und F) Repräsentative Immunoblots von NOS2 (D) und phospho(p)/total p65 (F) in Gewebeproben der Aorta ascendens und entsprechende Quantifizierung der Proteinexpression. (n = 6 pro Gruppe). p65 ist eine wesentliche Untereinheit von NF-κB. (E) Nitrat/Nitrit-Konzentrationen in der Aorta als indirekte Indikator der NO-Gewebespiegel (gemessen mit einem kolorimetrischen Nitrat/Nitrit-Assay-Kit). (n = 5-6 pro Gruppe). (G) Mittlerer Blutdruck. Die Messungen wurden kontinuierlich vor Beginn der Vehikel/NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung (Ausgangswert: Tag -2 - Tag 0) und zu zwei Zeitpunkten danach (Tag 1 - Tag 3 und Tag 4 - Tag 6 nach Behandlungsbeginn) jeweils über einen Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt. (n = 5-7; aufgrund von Senderdislokationen nach der Implantation der Minipumpe mussten die nachfolgenden Messungen von drei Mäusen ausgeschlossen werden). (A, C, D, E, F, G) Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch einseitige ANOVA (E, F) oder Mixed-Effects-Modell-Analyse (G) mit Tukey's multiplum Vergleichstest, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiplum Vergleichstest (A: NOS1 und NOS3) oder Welch ANOVA mit Dunnett's T3 multiplum Vergleichstest (A: NOS2, C, D) bestimmt. ns = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. In G konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.



## 4.6 NO<sub>2</sub>-OA verbessert das Überleben in einem beschleunigten Modell der MFS-bedingten Aortenerkrankung

Um die Fähigkeit von NO<sub>2</sub>-OA zur Verbesserung der klinischen Ergebnisse bei MFS zu untersuchen, wurde ein beschleunigtes Modell der MFS-bedingten Aortenerkrankung, bei dem Fbn1<sup>C1041G/+</sup> Mäuse mit AT-II behandelt wurden, verwendet<sup>102</sup>. Die Verabreichung von AT-II aggravierte die Bildung von Aortenaneurysmen erheblich und führte zu einer drastischen Sterblichkeit aufgrund von Aortenrupturen bei Fbn1<sup>C1041G/+</sup> Mäusen, was bei WT-Kontrollen nicht beobachtet wurde. Entscheidend ist, dass die Behandlung mit NO<sub>2</sub>-OA die Aortendilatation deutlich verringerte und das Überleben signifikant verbesserte, was die therapeutische Wirksamkeit unterstreicht (Abbildung 10A-D).



**Abbildung 10:** NO<sub>2</sub>-OA verbessert das Überleben in einem AT-II-beschleunigten Modell der Marfan-bedingten Aortenerkrankung. (A) Überlebenskurven von MFS-Mäusen, die mit AT-II plus Vehikel oder NO<sub>2</sub>-OA behandelt wurden, und WT-Kontrollen, die mit AT-II plus Vehikel behandelt wurden. (n = 10 pro Gruppe). Die statistische Signifikanz wurde mittels Log-Rank-Test (Mantel-Cox) mit post-hoc Bonferroni-Korrektur bestimmt, was ein bereinigtes Signifikanzniveau von P < 0,0167 ergab. (B) Repräsentative 2D-echokardiographische Bilder, aufgenommen nach dreiwöchiger AT-II-Behandlung. Der Maßstabsbalken zeigt 1 mm. (C) AW- und MAA-Durchmesser zu Beginn (im Alter von 12 Wochen) und während der ersten drei Wochen der Behandlung. Da keine MFS-Mäuse, die mit AT-II plus Vehikel behandelt wurden, vier Wochen überlebten, wurden spätere Zeitpunkte von der Analyse ausgeschlossen. (n = 10 pro Gruppe bei Studienbeginn). (D) Zweiwöchige Änderungsrate der AW- und MAA-Durchmesser innerhalb

eines Tieres. (n = 4-9 pro Gruppe; die Unterschiede in den Gruppengrößen sind auf die unterschiedlichen Überlebensraten nach zwei Wochen zurückzuführen). (C, D) Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch Mixed-Effects-Modellanalyse (C) und einseitige ANOVA (D: AR) mit Tukey's multiplem Vergleichstest oder Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiplem Vergleichstest (D: MAA) ermittelt. ns = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte der protektive Effekt von nitrierten Fettsäuren auf die Entstehung von Aortenaneurysmen im Rahmen des Marfan-Syndroms gezeigt werden. Somit war es möglich die in der Einleitung formulierten Hypothesen zu bestätigen. Es zeigte sich nicht nur eine Reduktion des Aortendiameters und der Wandsteifigkeit, sondern auch eine signifikante Verbesserung des Überlebens im akzelerierten Marfan-Syndrom Mausmodell. Der protektive Effekt von NO<sub>2</sub>-OA wurde durch eine Inhibition von ERK1/2, Smad2 und NF-κB und einer daraus resultierenden reduzierten MMP-abhängigen Spaltung elastischer Fasern sowie einer reduzierten aortalen Apoptose vermittelt

### 5.1 Effekte von nitrierten Fettsäuren auf den Phänotyp des Marfan-Syndroms

Es konnte gezeigt werden, dass NO<sub>2</sub>-OA auf phänotypischer Ebene nicht nur das Wachstum des Aortenaneurysmas reduziert, sondern ebenfalls die Wandsteifigkeit verringert. Der protektive Effekt beruht auf einer Inhibition des ERK Signalings sowie der verminderten Expression von NOS2. Aus der erhöhten Wandsteifigkeit, einhergehend mit der erhöhten PWG, resultiert eine vermehrte Belastung der Gefäßwand in Form von Scherkräften, welche den Progress des TAAs weiter vorantreiben<sup>103</sup>.

Neben dem nicht-kanonischen TGF-β Signalweg wird durch NO<sub>2</sub>-OA ebenfalls, wie bereits in-vivo demonstriert, eine verminderte Signalübertragung des kanonischen Signalwegs, einhergehend mit reduzierter Fibrose und Kollagenbildung, vermittelt<sup>79</sup>.

Zwischen NO<sub>2</sub>-OA behandelten Wildtypen und einer Vehicle behandelten Kontrollgruppe konnten keine relevanten phänotypischen Unterschiede gezeigt werden, weder hinsichtlich der aortalen Diameter noch der PWG. Daraus kann gefolgert werden, dass NO<sub>2</sub>-OA keinen Effekt auf WT-Mäuse sowie nicht pathologisch verändertes aortales Gewebe hat.

### 5.2 Einfluss von NO<sub>2</sub>-OA auf das dysregulierte TGF-β Signaling

Mechanistisch konnte der Reduktion des dysregulierten TGF-β Signalwegs eine zentrale Rolle zugeordnet werden. Hier ist sowohl die kanonische als auch die nicht-kanonische Signalkaskade von Bedeutung. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass in-vitro durch NO<sub>2</sub>-OA sowohl die Phosphorylierung von Smad2 als auch ERK1/2 vermindert wird, woraus eine geringere Aktivität und reduzierte Signalweiterleitung der Signalkaskade resultiert<sup>79,88</sup>.

Einer der wichtigsten Signalwege, der in großen Teilen zur Entwicklung des TAAs im Rahmen des MFS beiträgt und eine zentrale Rolle im Progress einnimmt, ist der nicht-kanonische TGF-β Signalweg<sup>26</sup>. Bisher war bekannt, dass NO<sub>2</sub>-OA die Phosphorylierung von ERK1/2 in-vitro in VSMCs reduziert<sup>88</sup>. Dieser Effekt konnte nun zum ersten Mal in-vivo, in einem murinen MFS Modell, nachgewiesen werden. Dies stellt einen zentralen Mechanismus im Wirkungsprinzip

von Nitroalkenen in der Aortenpathologie des MFS dar. Derzeit ist der konkrete Wirkmechanismus von NO<sub>2</sub>-OA auf ERK1/2 noch nicht abschließend geklärt und wird weiterhin diskutiert. Vermutet wird aufgrund der vorliegenden Daten eine kovalente Bindung von Nitroalkenen an einen Cystein Rest (Cys166) in der ATP Bindungsstelle von ERK1/2<sup>104</sup>. Aus dem verminderten ERK Signaling resultiert eine verminderte Expression von NOX und damit einhergehend eine Reduktion der NOX-abhängigen ROS-Produktion<sup>25,79</sup>. Da ROS wiederum MMPs aktivieren, konnte übereinstimmend mit diesen Ergebnissen eine verminderte MMP-Aktivität in MFS-Aorten nachgewiesen werden<sup>79,100</sup>. So kann durch die verminderte MMP-Aktivität entscheidender Weise das dysregulierte TGF-β Signaling reduziert werden und der zuvor in Kapitel 2.1.5 aufgezeigte Teufelskreis der MMP Aktivierung durchbrochen werden. Zusätzlich hat die aktivierte ERK Signalkaskade auch einen direkten, transkriptionellen Einfluss auf die Expression von MMPs<sup>29</sup>. Dieser Einfluss kann direkt und durch reduzierte Phosphorylierung durch NO<sub>2</sub>-OA von ERK1/2 inhibiert werden<sup>30,76</sup>. Dies trägt maßgeblich dazu bei, dass das strukturelle Remodeling durch Spaltung elastischer Fasern der Aorta reduziert wird.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass durch NO<sub>2</sub>-OA Behandlung die Menge an aktivem TGF-β nicht beeinflusst wird. Auch in Bezug auf die mRNA Expression und das Proteinlevel des Tgfr1 und Tgfr2 zeigte sich keine wesentliche Veränderung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Wirkung von NO<sub>2</sub>-OA auf das inhibierte ERK Signaling konzentriert.

Es ist bekannt, dass das gesteigerte TGF-β Signaling beim MFS über den kanonischen Signalweg zu einem verstärkten profibrotischen Remodeling einhergehend mit einer erhöhten Wandsteifigkeit führt<sup>32</sup>. Für NO<sub>2</sub>-OA ist ein Effekt auf diese Signalkaskade bekannt. Rudolph et al. konnten zeigen, dass Nitroalkene durch eine reduzierte Phosphorylierung von Smad2 das profibrotische Remodeling reduzieren, indem die Smad2 abhängige Kollagenexpression reduziert wird<sup>79</sup>. Diese Ergebnisse wurden in unserem Modell ebenfalls bestätigt. MFS-Mäuse zeigten erhöhte Smad2 Aktivität sowie vermehrte Kollagen Expression und eine erhöhte PWG, welche sich nach 4-wöchiger Therapie mit NO<sub>2</sub>-OA nahezu auf Wildtyplevel reduzierten. Nicht nur der molekularbiologische Effekt, sondern ebenfalls die daraus resultierenden Veränderungen des Phänotyps sind von großer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass aus einer erhöhten Wandsteifigkeit Stress auf die Gefäßwand in Form von Scherkräften resultiert<sup>103</sup>. Auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass durch die vermehrte Synthese von Kollagen in Folge des erhöhten Smad2 Signaling die PWG gesteigert wird. Diese erhöhte PWG in Folge der steiferen Gefäßwand kann dabei als ein prognostischer Faktor für das Wachstum des TAAs gewertet werden<sup>105</sup>.

### 5.3 NF-κB Überaktivität als weiterer Progressionsfaktor des TAAs

Eine Schlüsselfunktion von NO<sub>2</sub>-OA stellt die Inhibition des NF-κB-Signalwegs dar. Da diese Signalkaskade ebenfalls im MFS fehlreguliert ist, ist dies ein weiterer Angriffspunkt in der Pathophysiologie des TAAs im Rahmen des MFS.

Cui et al. konnten für den Effekt von NO<sub>2</sub>-OA auf eine verminderte transkriptionelle Aktivität von NF-κB eine kovalente Bindung in Form von Nitroalkylation und einer damit einhergehenden reduzierten DNA-Bindungsaffinität nachweisen<sup>45</sup>. Aus den von uns erhobenen Daten konnte ein NF-κB-vermittelter Effekt auch beim MFS abgeleitet werden. Es wurde eine erhöhte Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF-κB im MFS-Aorten nachgewiesen, welche durch NO<sub>2</sub>-OA reduziert wurde.

Durch Oller et al. konnte 2017 gezeigt werden, dass im Rahmen des MFS eine NF-κB getriggerte NOS2-Überexpression entsteht. In diesem Zusammenhang kommt es zu einer massiv erhöhten NO-Produktion, welche in einer vasomotorischen Dysfunktion resultiert<sup>46</sup>. Ein weiterer Aspekt der NOS2-Überproduktion ist die Tatsache, dass es durch die vermehrte Aktivität zu einer vermehrten NOS2-Entkopplung kommt<sup>77</sup>, woraus eine erhöhte Produktion von Superoxiden resultiert<sup>106</sup>. Diese Superoxide können, wiederum durch Reaktionen mit NO zu Peroxinitrit reagieren, welche durch Nitrotyrosin und oxidative Modifikationen wieder potenziell MMPs aktivieren können<sup>107</sup>.

Durch die vorliegende Studie konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es im MFS zu einer NOS2 Überexpression kommt, welche durch eine Therapie mit NO<sub>2</sub>-OA reduziert werden kann. Auch die Nitrat / Nitrit Spiegel, welche ein indirekter Marker für die NO-Produktion sind, waren im MFS erhöht. Interessanterweise konnte kein Effekt auf NOS3 nachgewiesen werden, jedoch eine leicht verminderte Expression der NOS1. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt, es lässt sich allerdings eine kompensatorisch verminderte Expression der NOS1 aufgrund der stark vermehrten Expression der NOS2 vermuten.

Der Mechanismus hinter der erhöhten NF-κB Aktivität im MFS scheint auf eine gestörte Interaktion zwischen der Metalloproteinase ADAMTS1 und dem Fibrillin zurückzuführen zu sein<sup>46</sup>. So kommt es zu einer Instabilität der Metalloproteinase und einer damit einhergehenden Akkumulation seiner Substrate, wodurch es wiederum zu einer Aktivierung von NF-κB kommen kann<sup>46</sup>. Neben der MFS-bedingten Dysfunktion von ADAMTS1 kann NF-κB ebenfalls durch eine erhöhte Produktion von ROS aktiviert werden<sup>48</sup>. Da die vermehrte Expression der NOS2 zu einer erhöhten ROS-Produktion durch Entkopplung führen kann<sup>106</sup>, kann es im Sinne eines Teufelskreises zu einer Auto-Aktivierung von NF-κB durch ROS kommen.

Da NO<sub>2</sub>-OA durch seine hemmende Wirkung auf NF-κB in verschiedenen präklinischen Krankheitsmodellen starke entzündungshemmende Eigenschaften gezeigt hat<sup>62</sup>, wurde in diesem

Zusammenhang ebenfalls der Einfluss von NO<sub>2</sub>-OA auf die Expression von systemisch zirkulierenden Chemo- und Zytokinen, als Indikator für eine Inflammation, untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass keines der von uns untersuchten Chemo- und Zytokine im MFS reguliert war oder durch NO<sub>2</sub>-OA beeinflusst wurde. Daher wird vermutet, dass dieser Effekt von NO<sub>2</sub>-OA nicht protektiv zur Entwicklung des TAAs beiträgt. In einem nächsten Schritt konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Applikation von NO<sub>2</sub>-OA die NO Produktion beeinflusst wird. Hier konnte die vermehrte Bildung von NO durch NO<sub>2</sub>-OA reduziert werden. Um zu überprüfen, ob die durch NO<sub>2</sub>-OA reduzierte Expression von NOS2 Auswirkungen auf die systemische Zirkulation hat, wurde eine invasive Blutdruckmessungen durchgeführt. Hier zeigte sich, wie in einer anderen Studie bereits beschrieben, initial kein Unterschied zwischen WT und MFS Mäusen<sup>101</sup>. Deshalb kann aus den nach NO<sub>2</sub>-OA Applikation zu mehreren Zeitpunkten gemessenen ebenfalls gleichen Werten geschlussfolgert werden, dass sich die NO-Überproduktion auf die pathologisch veränderte Aorta beschränkt und keinen systemischen Effekt hat. Diese Ergebnisse werden noch einmal dadurch bestätigt, dass NF-κB ein bekannter Induktor der NOS2 ist<sup>83</sup> und es so zu einer vermehrten Expression im Rahmen aortaler Pathologien kommt<sup>46</sup>.

Ein zusätzlicher NF-κB unabhängiger Mechanismus zur Induktion von MMP ist die Leukozyteninfiltration. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass in abdominalen Aortenaneurysmen Leukozyten, vor allem Makrophagen, in die Gefäßwand einwandern<sup>43</sup>. Da NF-κB bekanntermaßen proinflammatorisch wirkt<sup>44</sup>, könnte dieser Mechanismus der inflammatorischen Leukozyteninfiltration ebenfalls Angriffsfläche für NO<sub>2</sub>-OA bieten. Im Gegensatz dazu konnte in unseren murinen MFS Modell kaum Leukozyteninfiltration beobachtet werden, woraus geschlussfolgert werden kann, dass dieser Mechanismus nicht zum protektiven Effekt von NO<sub>2</sub>-OA beiträgt. Dies ist interessant, da nitrierte Fettsäuren durch ihre antiinflammatorische Wirkweise beispielsweise auch die Migration von Leukozyten durch verminderte Expression des Adhäsionsmoleküle ICAM-1 reduzieren<sup>91</sup> und so prinzipiell Potenzial für eine Modulation dieses Mechanismus aufweisen.

Abschließend lässt sich daher sagen, dass das dysregulierte nicht-kanonische TGF-β Signaling und die vermehrte NF-κB Aktivität miteinander einhergehen. Durch die NOS2 Überaktivität können NO und Superoxide gebildet werden, welche wiederum in der Lage dazu sind, MMPs zu aktivieren<sup>46</sup>. Hierdurch kommt es wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von TGF-β durch Degradierung der EZM durch MMPs<sup>29</sup>. Dies treibt wiederum den nicht-kanonischen Signalweg an und kann über ERK1/2 vermittelte Aktivierung von NOX und damit einhergehender NOX-bedingter ROS-Produktion zu einer Aktivierung von NF-κB führen<sup>31,48</sup>.

#### **5.4 Reduktion der ROS-Produktion durch NO<sub>2</sub>-OA**

Die Ergebnisse zeigen, dass durch NO<sub>2</sub>-OA die Produktion von ROS in MFS-Aorten gesenkt werden kann. Dieser Effekt scheint multifaktoriell und durch mehr verschiedene Mediatoren

vermittelt zu werden. ROS nehmen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des MFS ein, da sie eine Art Verbindungsstelle zwischen den zuvor beschriebenen ERK1/2- und NF- $\kappa$ B Signalkaskaden darstellen sowie potente Aktivatoren und Induktoren von Apoptose sind.

Auf der einen Seite ist bekannt, dass MMPs durch ROS aktiviert werden können<sup>100</sup>. Durch die vermehrte Aktivität von MMPs wird wiederum die Spaltung elastischer Fasern in der EZM vorangetrieben<sup>20</sup> und in ihr gespeichertes TGF- $\beta$  wird freigesetzt<sup>8</sup> und aktiviert. Daraus resultiert eine gesteigerte Aktivierung des nicht-kanonischen TGF- $\beta$  Signalwegs, was wiederum zu einer weiteren erhöhten ROS-Produktion durch NOX Induktion führt<sup>79</sup>. Da auf der anderen Seite bekannt ist, dass ROS ebenfalls NF- $\kappa$ B aktivieren können<sup>47</sup>, stellt sich hier zusätzlich ein weiterer Signalweg dar, der im Sinne eines Kreislaufs über die NF- $\kappa$ B Aktivierung zu einer gesteigerten ROS-Produktion führt<sup>48</sup>. Da NF- $\kappa$ B ein kritischer Regulator der NOS2 ist<sup>83</sup>, führt die Inhibition von NF- $\kappa$ B zu einer Reduktion der Expression dieses Enzyms. Durch die aus der NOS2-Überaktivität entstehende Entkopplung dieses Enzyms können wiederum ROS generiert werden<sup>106</sup>. So entsteht ein weiterer Kreislauf der Autoregulation, der die Produktion von ROS im Rahmen des MFS weiter vorantreibt.

Neben dem Einfluss auf die NO-Produktion besitzen nitrierte Fettsäuren noch weitere Möglichkeiten, sich auf die ROS-Produktion auszuwirken. Es ist bekannt, dass NO<sub>2</sub>-OA kovalent an die XO bindet und somit entscheidend die ROS-Produktion senkt<sup>80</sup>. Übereinstimmend mit diesen Daten, konnte gezeigt werden, dass im murinen MFS Modell die ROS-Produktion gesenkt werden konnte. Dies war multifaktoriell bedingt, da auf der einen Seite ein reduziertes ERK Signaling und auf der anderen Seite eine verminderte Aktivität von NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise konnte auch eine Reduktion der Aktivität der XO durch NO<sub>2</sub>-OA, wie bereits in der Literatur in-vitro vorbeschrieben<sup>80</sup>, in MFS-Aorten detektiert werden. Dies scheint ein weiterer Mechanismus zu sein, durch den NO<sub>2</sub>-OA die Bildung von ROS reduziert und somit den oxidativen Stress senkt. Obwohl dieser Signalweg nur eine untergeordnete Rolle im Rahmen der Aortenerkrankung des MFS zu spielen scheint, welche erst in einem späteren Krankheitsstadium an Bedeutung gewinnt<sup>37</sup>, könnte dies einen weiteren Mechanismus darstellen, über den NO<sub>2</sub>-OA die MMP Aktivierung<sup>100</sup> sowie VSMC Apoptose<sup>38</sup> verringert.

Zusätzlich zu den beschriebenen bereits im MFS etablierten Signalwegen zur Generation von ROS können diese ebenfalls durch antioxidative Mechanismen abgefangen werden<sup>77</sup>. Hier stellt die Superoxid-Dismutase einen der wichtigsten Mechanismen dar<sup>78</sup>. Da bekannt ist, dass durch Nrf2 eine Induktion dieses Enzyms generiert werden kann und NO<sub>2</sub>-OA nachweislich die Aktivität von Nrf2 steigert<sup>70</sup>, stellt dies einen weiteren potenziellen Mechanismus dar, der einen protektiven Effekt von NO<sub>2</sub>-OA via Reduktion von ROS Levels vermittelt. Dieser Aspekt des antioxidativen Stoffwechsels wurde nicht untersucht und stellt damit eine weitere Option und eine Perspektive für zukünftige Studien dar.

## 5.5 Effekt von NO<sub>2</sub>-OA auf das akzelerierte Marfan-Syndrom Modell

Fbn1<sup>C1041G/+</sup> Mäuse weisen insgesamt ein relativ langsames Aneurysma-Wachstum auf und bieten spontan keine aortalen Komplikationen, wie Dissektion oder Ruptur. Um zu untersuchen, ob die NO<sub>2</sub>-OA-Behandlung auch solche klinisch relevanten Endpunkte reduzieren kann, wurde ein akzeleriertes MFS-Mausmodell genutzt, in welchem Fbn1<sup>C1041G/+</sup> Mäuse durch hochdosierte Dauerinfusion von Angiotensin-II zusätzlich gestresst wurden<sup>102</sup>. In diesem Modell konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Mortalität durch aortale Rupturen zwischen NO<sub>2</sub>-OA-behandelten Mäusen und ihren Vehikel-behandelten Wurfgeschwistern gezeigt werden.

Es ist bekannt, dass NO<sub>2</sub>-OA bei Mäusen bei einer AT-II induzierten Hypertonie positive Effekte über eine Wirkung am Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 haben und die Kontraktion von VSMCs reduzieren, ohne dabei die Bindung von Angiotensin-II am Rezeptor zu verhindern<sup>85</sup>. Vor diesem Hintergrund lässt sich vermuten, dass es sich um einen kombinierten Effekt aus einer Reduzierung des Blutdrucks im Rahmen des veränderten Ca<sup>2+</sup> Haushaltes durch NO<sub>2</sub>-OA, als auch aus dem veränderten maladaptiven Remodeling der Aorta durch Inhibierung von ERK1/2, Smad2 und NF-κB handelt, was mit einer reduzierten ROS-Produktion und VSMC Apoptose vergesellschaftet ist. Zu welchen Anteilen welcher Mechanismus den positiven beobachteten Effekt allerdings vermittelt, bleibt unklar und stellt eine Fragestellung für zukünftige Arbeiten dar. Aufgrund der überzeugenden Effekte von NO<sub>2</sub>-OA auf das maladaptive Remodeling im Rahmen des MFS und der Tatsache, dass nach Applikation von NO<sub>2</sub>-OA kein Unterschied in den systemisch gemessenen Blutdrücken von MFS- und WT Mäusen verursacht wurde, ist davon auszugehen, dass der Effekt auf das maladaptive Remodeling den Effekt auf die Blutdruckregulation überwiegt.

## 5.6 NO<sub>2</sub>-OA als potenzieller therapeutischer Ansatz

Trotz des wissenschaftlichen Fortschrittes und der sich stetig weiterentwickelnden Möglichkeiten ist die genaue Pathophysiologie des Marfan-Syndroms noch nicht bis ins Detail entschlüsselt. Nach Diagnose dieses Syndroms sind die therapeutischen Optionen, die diese Patient\*innen haben, noch stark limitiert<sup>55</sup>. In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition mehrerer der im Vorfeld genannten Signalkaskaden den Progress des Aortenaneurysmas reduziert.

Habashi et al. zeigten 2006, dass sich durch die Gabe eines TGF-β neutralisierenden Antikörpers der Progress des Aortenaneurysmas auf Wildtyp-Level reduzieren lässt<sup>99</sup>. Auch die Inhibition des TGF-β Signalings durch Gabe des Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 Inhibitors Losartan konnte im Mausmodell eine signifikante Reduktion des TAAs erzielen<sup>99</sup>. Für einen positiven Effekt auf das Aortenaneurysma zeigten Holm et al. 2011, dass sich durch eine Inhibition von ERK1/2 durch den spezifischen MEK Inhibitor RDEA119, die Aktivität des nicht-kanonischen, nicht aber des kanonischen TGF-β Signalwegs reduzieren lässt und daraus ein verminderter



Progress des Aortenaneurysmas resultierte<sup>26</sup>. In Bezug auf NOX zeigten Emrich et al. 2019, dass durch die Therapie von Mäusen mit dem unspezifischen NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin der Progress des Aortenaneurysmas auf Wildtyp-Niveau reduziert werden kann<sup>25</sup>. Auch für die Inhibition von MMPs konnte gezeigt werden, dass durch eine Inhibition mittels Doxycyclin, einen unspezifischen MMP Inhibitor mit besonderer Auswirkung auf MMP-2 und -9, das Aneurysma-Wachstum reduziert werden kann. Durch die verminderte MMP Aktivität konnte in einem weiteren Schritt gezeigt werden, dass durch die reduzierte Spaltung von elastischen Fasern, die Freisetzung von aktivem TGF- $\beta$  und so vor allem der nicht-kanonische TGF- $\beta$  Signalweg reduziert werden kann<sup>29</sup>. Wie bereits erwähnt, konnten Oller et al. 2017 zeigen, dass durch eine Inhibition der NOS2 mittels des spezifischen Inhibitors 1400W die Produktion von NO massiv gesenkt werden konnte. Dieser Effekt zeigte sich sowohl in-vitro in VSMCs, als auch in-vivo in Form einer signifikanten Reduktion des TAAs in MFS Mäusen<sup>46</sup>. Da die Apoptose von VSMCs in der Aortenwand zusätzlich eine treibende Kraft in der Entwicklung des TAAs im Rahmen des MFS darstellt, ist dies ebenfalls ein möglicher Ansatzpunkt für eine spezifische Therapie. In-vivo konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate im TAA beim MFS erhöht ist. Durch eine spezifische Therapie mit dem Pan-Caspase Inhibitor Q-VD-OPh konnte in-vivo eine signifikante Reduktion des TAAs in MFS Mäusen erzielt werden<sup>34</sup>.

Von all den aufgezählten Inhibitoren stellte die Inhibition des TGF- $\beta$  Signalings durch Blockade des Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 durch Losartan die vielversprechendste therapeutische Option dar. Trotz dieser vielversprechenden Resultate aus den Tierversuchen, konnte in mehreren randomisierten, doppelt verblindeten Studien kein oder nur ein geringer Unterschied zur Standardtherapie mit Beta-Blockern nachgewiesen werden. In einer 2014 im New England Journal of Medicine veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Therapie mit Atenolol, einem Beta-Blocker, und Losartan, einem AT-II-Rezeptor 1 Antagonisten, gab – weder in Bezug auf den Progress des Aortenaneurysmas noch auf das Überleben in Bezug auf eine Operation an der Aorta, Tod oder Dissektion, innerhalb von 3 Jahren<sup>108</sup>. Ein ähnliches Ergebnis konnten Milleron et al. 2015 zeigen. Durch eine Therapie mit Losartan konnte zwar der Blutdruck der Patient\*innen gesenkt werden, dies wirkte sich aber nicht positiv auf die Entwicklung des Aortenaneurysmas aus. Daraus schlussfolgern die Autoren, dass die Standardtherapie mit Beta-Blockern weiterhin beibehalten werden sollte<sup>109</sup>. Zu etwas anderen Ergebnissen kamen Mullen et al., welche die Auswirkungen von Irbesartan, einem langwirksamen AT-II-Rezeptor 1 Inhibitor, untersuchten. Hier konnte vor allem bei jungen Patient\*innen eine Reduktion des TAAs im Vergleich zur Standardtherapie gezeigt werden<sup>110</sup>. Eine Metaanalyse, welche den Nutzen von AT-II Rezeptorblockern untersuchte, kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass AT-II Rezeptorblocker als zusätzliche Therapie zum Betablocker gegeben werden sollten, um so einen maximalen Effekt der Verlangsamung

des Progresses des TAAs zu erzielen. Jedoch konnte kein Benefit für die Patient\*innen in Bezug auf die Entstehung von Komplikationen oder Operationen festgestellt werden<sup>57</sup>.

Bis heute existiert keine Substanz, für die nachgewiesen wurde, dass sie einen spezifischen Effekt auf den Progress des TAAs im MFS hat und von klinischer Relevanz ist. Daher stellt NO<sub>2</sub>-OA einen vielversprechenden, multimodalen Therapieansatz dar. Es wird vermutet, dass ein klinisch wirksames Medikament, welches einen spezifischen Effekt hat, auf viele, in die Pathophysiologie des MFS involvierte Signalwege, einwirken sollte<sup>55</sup>.

Aus einigen bereits erhobenen Daten ist bekannt, dass NO<sub>2</sub>-OA Einfluss auf drei Schlüsselsignalwege in der Pathophysiologie des MFS nimmt. Auf der einen Seite wird die ERK Phosphorylierung reduziert<sup>88</sup> sowie auch der kanonische TGF- $\beta$  Signalweg durch eine Reduzierung der Smad2 Phosphorylierung<sup>79</sup>. Zusätzlich wird die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B reduziert<sup>45</sup>. Durch die Bestätigung der Inhibition der zuvor erwähnten Signalwege in-vivo in einem MFS-Mausmodell ist anzunehmen, dass NO<sub>2</sub>-OA großes Potenzial besitzt in dieser Erkrankung ein wirksames Therapeutikum darzustellen.

Neben den überzeugenden molekularen Mechanismen kommt dieser Substanz ebenfalls zugute, dass sie durch eine einfache orale Einnahme, ähnlich wie die bisherige Standardtherapie, verabreicht werden kann und so klinisch wirksame Konzentrationen erreicht werden können<sup>63</sup>.

## **5.7 Limitation des Modelles und Ausblick**

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse weist das vorliegende Projekt einige Limitationen auf. Selbstverständlich muss in diesem Zusammenhang betont werden, dass es sich bei den Ergebnissen um ein murines Modell handelt, und obwohl dieses die humane Pathologie des TAAs gut widerspiegelt, eine sichere Übertragung auf den Menschen nicht gegeben ist.

Wie bereits im Vorfeld erwähnt, wurde nur der phänotypische Aspekt der WT NO<sub>2</sub>-OA Kohorte untersucht und daraus geschlossen, dass sich aufgrund der nicht pathologisch regulierten Signalkaskaden im Gesunden, keine Veränderungen durch die Therapie mit NO<sub>2</sub>-OA zeigen. Um dies weiter zu verifizieren und die Qualität des Projektes weiter zu steigern, könnten die untersuchten Signalwege um eine die Gruppe der WT NO<sub>2</sub>-OA Tiere ergänzt werden.

Eine weitere Limitation des Modells ist die Form der subkutanen Applikation. Obwohl diese Form eine sichere und zuverlässige Art der Applikation ist, bleibt die Pumprate der osmotischen Pumpen bis ins letzte Detail ungenau. Die daraus resultierenden schwankenden Plasmakonzentrationen könnten zu unterschiedlichen Effekten führen. Eine Kontrolle in Form von Messungen der Plasmakonzentrationen von NO<sub>2</sub>-OA und Beurteilungen der interindividuellen Unterschiede stellt eine weitere Perspektive für zukünftige Projekte dar. Zusätzlich kann die orale Anwendung auch im Mausmodell etabliert werden, um eine weitere, beim Menschen besser anwendbare, Applikationsform zu generieren. So würde eine weitere potentielle Fehlerquelle sowie Abweichungen zu anderen Studien<sup>63</sup> eliminiert werden.

Eine der Fragestellungen ist die nach dem zentralen Wirkmechanismus von NO<sub>2</sub>-OA. Da NO<sub>2</sub>-OA allerdings seine Wirkung über pleiotrope Effekte verursacht<sup>62</sup>, ist es schwierig den Effekt auf einen einzelnen Mechanismus zu beschränken. Leider ist nicht abschließend geklärt, ob die hier ausgesuchten zentralen Mechanismen im MFS wirklich zu dieser Reduktion des Phänotyps führen oder ob dieser Effekt auf einen oder mehrere neue und andere, bisher unbekannte Mechanismen zurückgeführt werden kann. NO<sub>2</sub>-OA vermittelt seine Wirkung hauptsächlich durch Reaktionen mit Cystein-Resten, was ihnen ein weites Spektrum an möglichen Zielstrukturen bietet. Neben allgemeinen Wirkungen, wie auf NF-κB oder Nrf2, haben NO<sub>2</sub>-OA ebenfalls zell- und organspezifische Zielstrukturen, auf die sie wirken<sup>62</sup>. In einem in-vitro Versuch mit humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss von NO<sub>2</sub>-OA ca. 450 Gene reguliert wurden, sowohl positiv als auch negativ<sup>111</sup>. Dies verdeutlicht noch einmal wie vielfältig NO<sub>2</sub>-OA wirkt, da diese Vielzahl an regulierten Genen nur in einer Zelllinie beobachtet wurde, sodass sich eine noch größere Zahl an regulierten Genen im gesamten Organismus vermuten lässt. Um weitere mögliche Signalwege zu identifizieren, wurden neben gängigen Signalwegen, die im Marfan-Syndrom dysreguliert sind, auch Signalkaskaden, für welche eine Modulation durch nitrierte Fettsäuren (STAT3, PPARγ, p38, JNK<sup>76,79,87</sup>) bekannt sind, auf eine Veränderung hin untersucht. Hierbei konnten jedoch keine Regulationen festgestellt werden.

## 5.8 Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich sagen, dass durch Gabe von NO<sub>2</sub>-OA der Progress des TAAs in einem murinen Modell des MFS signifikant reduziert werden konnte. Zusätzlich konnte eine Reduktion aortaler Komplikationen in einem akzelerierten MFS-Modell gezeigt werden.

Der therapeutische Effekt von NO<sub>2</sub>-OA war hier vor allem auf eine Inhibition von ERK1/2, Smad2 und NF-κB zurückzuführen. Durch die Inhibition dieser überaktivierten Signalwege konnte das daraus resultierende Remodeling einhergehend mit einer gesteigerten aortalen Apoptoserate, einer vermehrten MMP-katalysierten Fragmentierung von elastischen Fasern sowie einer verstärkten profibrotischen Kollagenexpression signifikant verringert werden.

Zum heutigen Zeitpunkt existiert keine kausale spezifische pharmakologische Therapie für diese Erkrankung. Pharmakologische Inhibition einzelner Signalwege hat in bisherigen Studien nur zu einem unzureichenden Effekt geführt. Da NO<sub>2</sub>-OA auf unterschiedliche Signalmoleküle wirkt, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese des MFS spielen, dadurch substantielle therapeutische Effekte erzielt und oral eingenommen werden kann, stellt diese Substanz eine neue, vielversprechende Therapiemöglichkeit für die Behandlung des MFS dar.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Larena-Avellaneda A. Vom Häufigen des Seltenen – das Marfan-Syndrom. *Gefässchirurgie* 2016; **21**: 394–95. <https://doi.org/10.1007/s00772-016-0191-1>.
- 2 Gott VL. Antoine Marfan and his syndrome. One hundred years later. *Md Med J* 1998; **47**: 247–52.
- 3 Dietz H. Marfan Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. GeneReviews(®). Seattle (WA), 1993.
- 4 Campens L, Demulier L, Groote K de, et al. Reference values for echocardiographic assessment of the diameter of the aortic root and ascending aorta spanning all age categories. *Am J Cardiol* 2014; **114**: 914–20. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2014.06.024>.
- 5 Halme T, Savunen T, Aho H, Vihersaari T, Penttinen R. Elastin and collagen in the aortic wall. Changes in the Marfan syndrome and annuloaortic ectasia. *Exp Mol Pathol* 1985; **43**: 1–12. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(85\)90050-4](https://doi.org/10.1016/0014-4800(85)90050-4).
- 6 Milewicz DM, Dietz HC, Miller DC. Treatment of aortic disease in patients with Marfan syndrome. *Circulation* 2005; **111**: e150-7. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155243.70456.F4>.
- 7 Groth KA, Stochholm K, Hove H, Andersen NH, Gravholt CH. Causes of Mortality in the Marfan Syndrome(from a Nationwide Register Study). *Am J Cardiol* 2018; **122**: 1231–35. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2018.06.034>.
- 8 Ramachandra CJA, Mehta A, Guo KWQ, Wong P, Le Tan J, Shim W. Molecular pathogenesis of Marfan syndrome. *Int J Cardiol* 2015; **187**: 585–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.423>.
- 9 Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *The Lancet* 2005; **366**: 1965–76. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67789-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67789-6).
- 10 Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991; **352**: 337–39. <https://doi.org/10.1038/352337a0>.
- 11 Cocciolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, Johnson EO, Murshed M, Wagenseil JE. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; **315**: H189-H205. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00087.2018>.
- 12 Sakai LY, Keene DR, Renard M, Backer J de. FBN1. The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene* 2016; **591**: 279–91. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.033>.
- 13 Wanga S, Hibender S, Ridwan Y, et al. Aortic microcalcification is associated with elastin fragmentation in Marfan syndrome. *J Pathol* 2017; **243**: 294–306. <https://doi.org/10.1002/path.4949>.
- 14 Franken R, Heesterbeek TJ, Waard V de, et al. Diagnosis and genetics of Marfan syndrome. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 2014; **2**: 1049–62. <https://doi.org/10.1517/21678707.2014.950223>.
- 15 Franken R, den Hartog AW, Radonic T, et al. Beneficial Outcome of Losartan Therapy Depends on Type of FBN1 Mutation in Marfan Syndrome. *Circ Cardiovasc Genet* 2015; **8**: 383–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000950>.
- 16 Segura AM, Luna RE, Horiba K, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation* 1998; **98**: II331-7; discussion II337-8.
- 17 Lemaître V, D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006; **78**: 1–10. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20065>.

- 18 Ra H-J, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007; **26**: 587–96. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.07.001>.
- 19 Booms P, Pregla R, Ney A, et al. RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture. A potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome. *Hum Genet* 2005; **116**: 51–61. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1194-7>.
- 20 Chung AWY, Au Yeung K, Sandor GGS, Judge DP, Dietz HC, van Breemen C. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res* 2007; **101**: 512–22. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.157776>.
- 21 Takeda N, Hara H, Fujiwara T, Kanaya T, Maemura S, Komuro I. TGF- $\beta$  Signaling-Related Genes and Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. <https://doi.org/10.3390/ijms19072125>.
- 22 Perrucci GL, Rurali E, Gowran A, et al. Vascular smooth muscle cells in Marfan syndrome aneurysm. The broken bricks in the aortic wall. *Cell Mol Life Sci* 2017; **74**: 267–77. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2324-9>.
- 23 Benke K, Ágg B, Szilveszter B, et al. The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol J* 2013; **20**: 227–34. <https://doi.org/10.5603/CJ.2013.0066>.
- 24 Gomez D, Coyet A, Ollivier V, et al. Epigenetic control of vascular smooth muscle cells in Marfan and non-Marfan thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc Res* 2011; **89**: 446–56. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq291>.
- 25 Emrich F, Penov K, Arakawa M, et al. Anatomically specific reactive oxygen species production participates in Marfan syndrome aneurysm formation. *J Cell Mol Med* 2019; **23**: 7000–09. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14587>.
- 26 Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, et al. Noncanonical TGF $\beta$  signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* 2011; **332**: 358–61. <https://doi.org/10.1126/science.1192149>.
- 27 Clayton SW, Ban GI, Liu C, Serra R. Canonical and noncanonical TGF- $\beta$  signaling regulate fibrous tissue differentiation in the axial skeleton. *Sci Rep* 2020; **10**: 21364. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78206-4>.
- 28 Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009; **19**: 128–39. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>.
- 29 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**: e92-e101. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268268>.
- 30 Sato T, Arakawa M, Tashima Y, et al. Statins Reduce Thoracic Aortic Aneurysm Growth in Marfan Syndrome Mice via Inhibition of the Ras-Induced ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) Signaling Pathway. *J Am Heart Assoc* 2018; **7**: e008543. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.008543>.
- 31 Laplante M-A, Wu R, El Midaoui A, Champlain J de. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2003; **21**: 927–36. <https://doi.org/10.1097/00004872-200305000-00017>.

- 32 Crosas-Molist E, Meirelles T, López-Luque J, et al. Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; **35**: 960–72. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304412>.
- 33 Humphrey JD, Tellides G. Central artery stiffness and thoracic aortopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; **316**: H169-H182. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00205.2018>.
- 34 Emrich FC, Okamura H, Dalal AR, et al. Enhanced caspase activity contributes to aortic wall remodeling and early aneurysm development in a murine model of Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; **35**: 146–54. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304364>.
- 35 Lucas ML, Carraro CC, Belló-Klein A, et al. Oxidative Stress in Aortas of Patients with Advanced Occlusive and Aneurysmal Diseases. *Ann Vasc Surg* 2018; **52**: 216–24. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2018.02.027>.
- 36 Chen Q, Wang Q, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species. Key regulators in vascular health and diseases. *Br J Pharmacol* 2018; **175**: 1279–92. <https://doi.org/10.1111/bph.13828>.
- 37 Yang HHC, van Breemen C, Chung AWY. Vasomotor dysfunction in the thoracic aorta of Marfan syndrome is associated with accumulation of oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2010; **52**: 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2009.10.005>.
- 38 Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1863**: 2977–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.
- 39 Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 2015; **22**: 526–39. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>.
- 40 Radonic T, Witte P de, Groenink M, et al. Inflammation aggravates disease severity in Marfan syndrome patients. *PLoS One* 2012; **7**: e32963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032963>.
- 41 Guo G, Booms P, Halushka M, et al. Induction of macrophage chemotaxis by aortic extracts of the mgR Marfan mouse model and a GxxPG-containing fibrillin-1 fragment. *Circulation* 2006; **114**: 1855–62. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.601674>.
- 42 He R, Guo D-C, 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**: 922-9, 929.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.12.063>.
- 43 Wang X, Zhang H, Cao L, He Y, Ma A, Guo W. The Role of Macrophages in Aortic Dissection. *Front Physiol* 2020; **11**: 54. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00054>.
- 44 Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, et al. Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc Res* 2013; **98**: 116–24. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt002>.
- 45 Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, et al. Nitrated Fatty Acids. Endogenous Anti-inflammatory Signaling Mediators\*. *Journal of Biological Chemistry* 2006; **281**: 35686–98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603357200>.
- 46 Oller J, Méndez-Barbero N, Ruiz EJ, et al. Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome. *Nat Med* 2017; **23**: 200–12. <https://doi.org/10.1038/nm.4266>.

- 47 Lingappan K. NF- $\kappa$ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol* 2018; **7**: 81–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.002>.
- 48 You W, Hong Y, He H, et al. TGF- $\beta$  mediates aortic smooth muscle cell senescence in Marfan syndrome. *Aging (Albany NY)* 2019; **11**: 3574–84. <https://doi.org/10.18632/aging.101998>.
- 49 Nguyen AT, Gomez D, Bell RD, et al. Smooth muscle cell plasticity. Fact or fiction? *Circ Res* 2013; **112**: 17–22. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.281048>.
- 50 Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells.
- 51 Shi J, Yang Y, Cheng A, Xu G, He F. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2020; **319**: H613-H631. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00220.2020>.
- 52 Thiesen S. L., et al. Embryonic Lineage of Vascular Smooth Muscle Cells Determines Responses to Collagen Matrices and Integrin Receptor Expression.
- 53 Gadson PF, JR, Dalton ML, Patterson E, et al. Differential response of mesoderm- and neural crest-derived smooth muscle to TGF- $\beta$ 1. Regulation of c-myb and  $\alpha$ 1 (I) procollagen genes. *Exp Cell Res* 1997; **230**: 169–80. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.3398>.
- 54 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. *Circ Res* 2001; **88**: 37–43. <https://doi.org/10.1161/01.res.88.1.37>.
- 55 Milewicz DM, Ramirez F. Therapies for Thoracic Aortic Aneurysms and Acute Aortic Dissections. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; **39**: 126–36. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310956>.
- 56 Shores Jennifer, Berger Kenneth R., Murphy Edmond A., Pyeritz Reed E. Progression of Aortic Dilatation and the Benefit of Long-Term  $\beta$ -Adrenergic Blockade in Marfan's Syndrome.
- 57 Al-Abcha A, Saleh Y, Mujer M, et al. Meta-analysis Examining the Usefulness of Angiotensin Receptor blockers for the Prevention of Aortic Root Dilatation in Patients With the Marfan Syndrome. *Am J Cardiol* 2020; **128**: 101–06. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.04.034>.
- 58 Radke RM, Baumgartner H. Diagnosis and treatment of Marfan syndrome. An update. *Heart* 2014; **100**: 1382–91. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-304709>.
- 59 Rurali E, Perrucci GL, Pilato CA, et al. Precise Therapy for Thoracic Aortic Aneurysm in Marfan Syndrome: A Puzzle Nearing Its Solution. *Prog Cardiovasc Dis* 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.07.020>.
- 60 Gott Vincent L., Greene Peter S., Alejo Diane E., et al. Replacement of the Aortic Root in Patients with Marfan's Syndrome.
- 61 Wagner AH, Zaradzki M, Arif R, Remes A, Müller OJ, Kallenbach K. Marfan syndrome. A therapeutic challenge for long-term care. *Biochem Pharmacol* 2019; **164**: 53–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.03.034>.
- 62 Schopfer FJ, Khoo NKH. Nitro-Fatty Acid Logistics. Formation, Biodistribution, Signaling, and Pharmacology. *Trends Endocrinol Metab* 2019; **30**: 505–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.04.009>.
- 63 Villacorta L, Gao Z, Schopfer FJ, Freeman BA, Chen YE. Nitro-fatty acids in cardiovascular regulation and diseases. Characteristics and molecular mechanisms. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2016; **21**: 873–89. <https://doi.org/10.2741/4425>.

- 64 Mollenhauer M, Mehrkens D, Rudolph V. Nitrated fatty acids in cardiovascular diseases. *Nitric Oxide* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.03.016>.
- 65 Kazlauskas RJ, Bornscheuer UT. 7.22 Enzyme Catalytic Promiscuity. Expanding the Catalytic Action of Enzymes to New Reactions. In: Carreira EM, Yamamoto H, eds. *Comprehensive Chirality*. Amsterdam: Elsevier, 2012: 465–80.
- 66 Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, et al. Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**: 938–45. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201582>.
- 67 Baker PRS, Schopfer FJ, O'Donnell VB, Freeman BA. Convergence of nitric oxide and lipid signaling. Anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* 2009; **46**: 989–1003. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.021>.
- 68 Baker PRS, Lin Y, Schopfer FJ, et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* 2005; **280**: 42464–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504212200>.
- 69 Geisler AC, Rudolph TK. Nitroalkylation--a redox sensitive signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1820**: 777–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.014>.
- 70 Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, et al. Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293**: H770-6. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00261.2007>.
- 71 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins. Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 225–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>.
- 72 Schopfer FJ, Lin Y, Baker PRS, et al. Nitrolinoleic acid. An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; **102**: 2340–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408384102>.
- 73 Li Y, Zhang J, Schopfer FJ, et al. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nat Struct Mol Biol* 2008; **15**: 865–67. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1447>.
- 74 Villacorta L, Schopfer FJ, Zhang J, Freeman BA, Chen YE. PPAR $\gamma$  and its ligands. Therapeutic implications in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2009; **116**: 205–18. <https://doi.org/10.1042/CS20080195>.
- 75 Schopfer FJ, Cole MP, Groeger AL, et al. Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids. Selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J Biol Chem* 2010; **285**: 12321–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091512>.
- 76 Bonacci G, Schopfer FJ, Batthyany CI, et al. Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J Biol Chem* 2011; **286**: 16074–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225029>.
- 77 Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med* 2013; **61**: 473–501. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.001>.



- 78 Faraci FM, Didion SP. Vascular protection. Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 1367–73.  
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133604.20182.cf>.
- 79 Rudolph TK, Ravekes T, Klinke A, et al. Nitrated fatty acids suppress angiotensin II-mediated fibrotic remodelling and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2016; **109**: 174–84.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvv254>.
- 80 Kelley EE, Batthyany CI, Hundley NJ, et al. Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2008; **283**: 36176–84.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M802402200>.
- 81 Sarnesto A, Linder N, Raivio KO. Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab Invest* 1996; **74**: 48–56.
- 82 Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflugers Arch* 2001; **442**: 479–86. <https://doi.org/10.1007/s004240100586>.
- 83 Kleinert H, Schwarz PM, Förstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 2003; **384**: 1343–64. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.152>.
- 84 Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 report. *JAMA* 2003; **289**: 2560–72. <https://doi.org/10.1001/jama.289.19.2560>.
- 85 Zhang J, Villacorta L, Chang L, et al. Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* 2010; **107**: 540–48. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218404>.
- 86 Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res* 2015; **46**: 328–38. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.06.006>.
- 87 Ambrozova G, Martiskova H, Koudelka A, et al. Nitro-oleic acid modulates classical and regulatory activation of macrophages and their involvement in pro-fibrotic responses. *Free Radic Biol Med* 2016; **90**: 252–60. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.026>.
- 88 Klinke A, Möller A, Pekarova M, et al. Protective effects of 10-nitro-oleic acid in a hypoxia-induced murine model of pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; **51**: 155–62.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0063OC>.
- 89 Association DwtscotEHR, Surgery EbtEAfC-T, Members A/TF, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation. The Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2010; **31**: 2369–429.  
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq278>.
- 90 Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 2014; **20**: 1126–67. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.
- 91 Rudolph V, Rudolph TK, Schopfer FJ, et al. Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 2010; **85**: 155–66. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp275>.
- 92 Schopfer FJ, Vitturi DA, Jorkasky DK, Freeman BA. Nitro-fatty acids. New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide* 2018; **79**: 31–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.06.006>.

- 93 Garner RM, Mould DR, Chieffo C, Jorkasky DK. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of Oral CXA-10, a Nitro Fatty Acid, After Single and Multiple Ascending Doses in Healthy and Obese Subjects. *Clin Transl Sci* 2019; **12**: 667–76. <https://doi.org/10.1111/cts.12672>.
- 94 Complexa I. PRIMEx - A Study of 2 Doses of Oral CXA-10 in Pulmonary Arterial Hypertension (PAH). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03449524> (accessed Aug 10, 2021).
- 95 Complexa I. FIRSTx - A Study of Oral CXA-10 in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03422510> (accessed Aug 10, 2021).
- 96 Tashima Y, He H, Cui JZ, et al. Androgens Accentuate TGF- $\beta$  Dependent Erk/Smad Activation During Thoracic Aortic Aneurysm Formation in Marfan Syndrome Male Mice. *J Am Heart Assoc* 2020; **9**: e015773. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.015773>.
- 97 Lee L, Cui JZ, Cua M, et al. Aortic and Cardiac Structure and Function Using High-Resolution Echocardiography and Optical Coherence Tomography in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *PLoS One* 2016; **11**: e0164778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164778>.
- 98 Gkantidis N, Katsaros C, Chiquet M. Detection of gelatinolytic activity in developing basement membranes of the mouse embryo head by combining sensitive in situ zymography with immunolabeling. *Histochem Cell Biol* 2012; **138**: 557–71. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0982-8>.
- 99 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**: 117–21. <https://doi.org/10.1126/science.1124287>.
- 100 Martinez-Lemus LA, Zhao G, Galiñanes EL, Boone M. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **300**: H2005-H2015. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01066.2010>.
- 101 Wisler JW, Harris EM, Raisch M, et al. The role of  $\beta$ -arrestin2-dependent signaling in thoracic aortic aneurysm formation in a murine model of Marfan syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; **309**: H1516-27. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00291.2015>.
- 102 Cavanaugh NB, Qian L, Westergaard NM, Kutschke WJ, Born EJ, Turek JW. A Novel Murine Model of Marfan Syndrome Accelerates Aortopathy and Cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* 2017; **104**: 657–65. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2016.10.077>.
- 103 Raaz U, Zöllner AM, Schellinger IN, et al. Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development. *Circulation* 2015; **131**: 1783–95. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012377>.
- 104 Otori M, Kinoshita T, Yoshimura S, Warizaya M, Nakajima H, Miyake H. Role of a cysteine residue in the active site of ERK and the MAPKK family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; **353**: 633–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.083>.
- 105 Salvi P, Grillo A, Marelli S, et al. Aortic dilatation in Marfan syndrome. Role of arterial stiffness and fibrillin-1 variants. *J Hypertens* 2018; **36**: 77–84. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001512>.
- 106 Liu Y-H, Carretero OA, Cingolani OH, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H2616-23. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00546.2005>.

- 107 Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* 2002; **53**: 165–74. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00445-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00445-x).
- 108 Lacro RV, Dietz HC, Sleeper LA, et al. Atenolol versus losartan in children and young adults with Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 2014; **371**: 2061–71. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404731>.
- 109 Milleron O, Arnoult F, Ropers J, et al. Marfan Sartan. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Heart J* 2015; **36**: 2160–66. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv151>.
- 110 Mullen M, Jin XY, Child A, et al. Irbesartan in Marfan syndrome (AIMS). A double-blind, placebo-controlled randomised trial. *The Lancet* 2019; **394**: 2263–70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32518-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32518-8).
- 111 Kansanen E, Jyrkkänen H-K, Volger OL, et al. Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells. Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J Biol Chem* 2009; **284**: 33233–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064873>.
- 112 Nettersheim FS, Lemties J, Braumann S, et al. Nitro-oleic acid reduces thoracic aortic aneurysm progression in a mouse model of Marfan syndrome. *Cardiovasc Res* 2022; **118**: 2211–25. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab256>.

## 6.1 Abbildungsverzeichnis

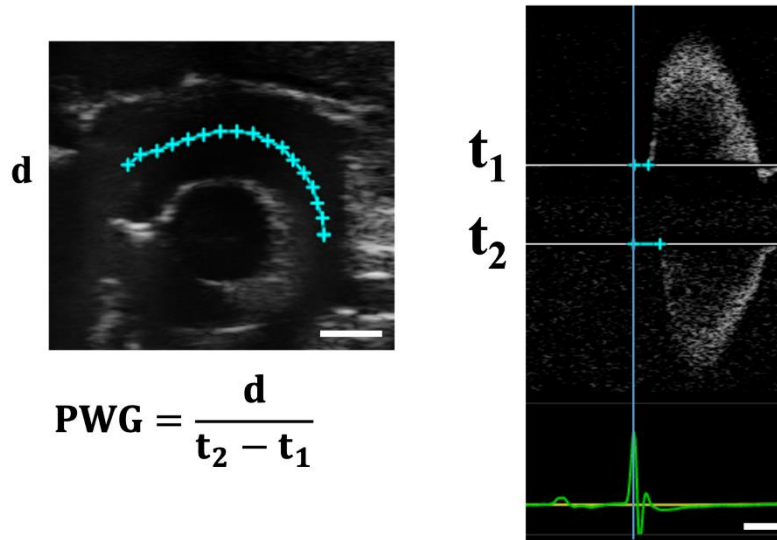
Abbildung 1: schematische Darstellung der Pathophysiologie des Marfan-Syndroms. ....	19
Abbildung 2: chemische Strukturformel der Nitroalkene. ....	21
Abbildung 3: Michael-Akzeptor, -Donor und Mechanismus der Michael-Addition bei Nitroalkenen. ....	23
Abbildung 4: NO <sub>2</sub> -OA mildert die MFS-bedingte Aortendilatation und -versteifung. ....	39
Abbildung 5: NO <sub>2</sub> -OA reduziert die MMP-vermittelte Elastinfragmentierung der Aorta in MFS-Mäusen. ....	40
Abbildung 6: Die Phosphorylierung von ERK1/2, den Schlüsselvermittlern des nicht-kanonischen TGF- $\beta$ -Signalwegs, ist in MFS-Aorten erhöht und wird durch NO <sub>2</sub> -OA gehemmt. ....	42
Abbildung 7: NO <sub>2</sub> -OA vermindert die Smad2-Aktivierung und die Kollagenablagerung in MFS-Aorten. ....	43
Abbildung 8: MFS-bedingte ROS-Überproduktion in der Aorta durch NOX und Apoptose werden durch NO <sub>2</sub> -OA-Behandlung abgeschwächt. ....	45
Abbildung 9: NO <sub>2</sub> -OA vermindert die NOS2-Expression und NO-Produktion in MFS-Aorten durch Hemmung von NF- $\kappa$ B. ....	47
Abbildung 10: NO <sub>2</sub> -OA verbessert das Überleben in einem AT-II-beschleunigten Modell der Marfan-bedingten Aortenerkrankung. ....	48
ergänzende Abbildung 1: Analyse der Pulswellengeschwindigkeit (PWG).....	68
ergänzende Abbildung 2: Echokardiografische Messungen des Aortendurchmessers bei mit NO <sub>2</sub> -OA behandelten Wildtypen. ....	68
ergänzende Abbildung 3: Ungeschnittene Gelatine-Zymographie und vollständige Immunoblots mit Schwerpunkt auf den für die Analyse verwendeten Banden. ....	69
ergänzende Abbildung 4: Leukozyteninfiltration der Aorta ascendens. ....	70
ergänzende Abbildung 5: Zytokinspiegel im Plasma.....	71
ergänzende Abbildung 6: Systolischer und diastolischer Blutdruck.....	72
ergänzende Abbildung 7: Negativkontrollen von Immunfluoreszenzfärbungen und In-situ-Zymographie. ....	73
ergänzende Abbildung 8: Vollständige ungeschnittene Immunoblots (Gele 1-3).....	74
ergänzende Abbildung 9: Vollständige ungeschnittene Immunoblots (Gele 4-7).....	75

## 6.2 Tabellenverzeichnis

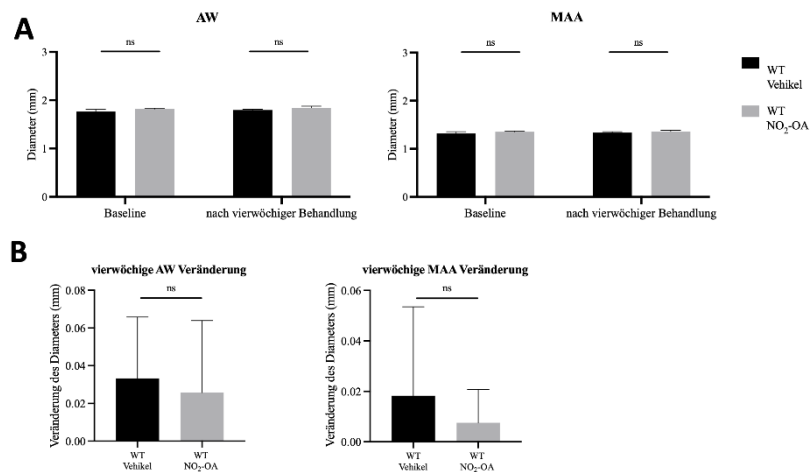
ergänzende Tabelle 1: Antikörper-Liste .....	75
ergänzende Tabelle 2: Primer-Liste.....	76

## 7. Anhang

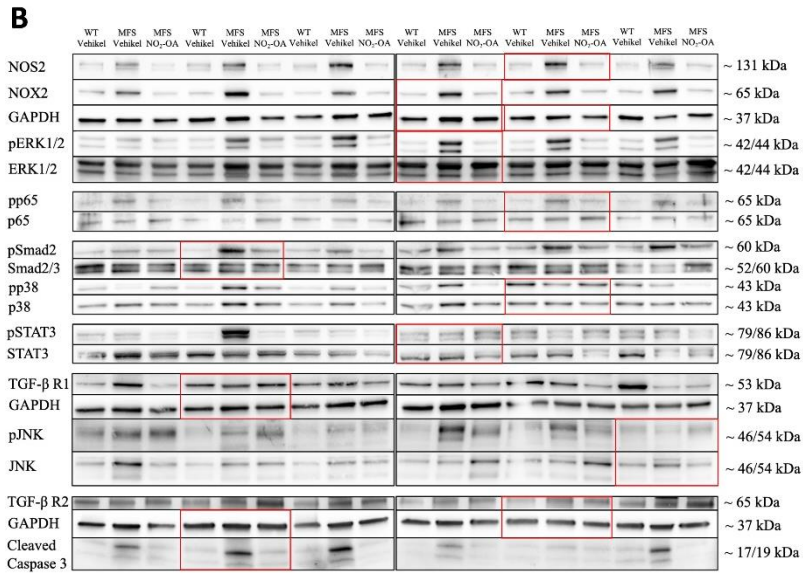
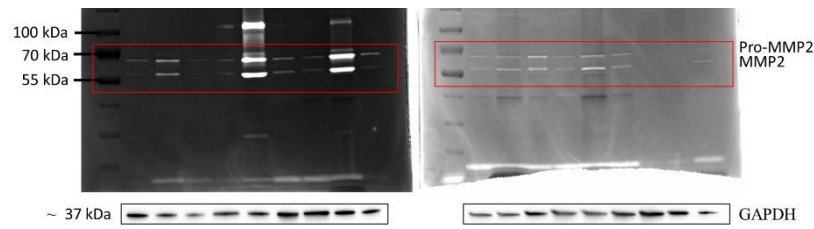
### 7.1 Ergänzende Abbildungen



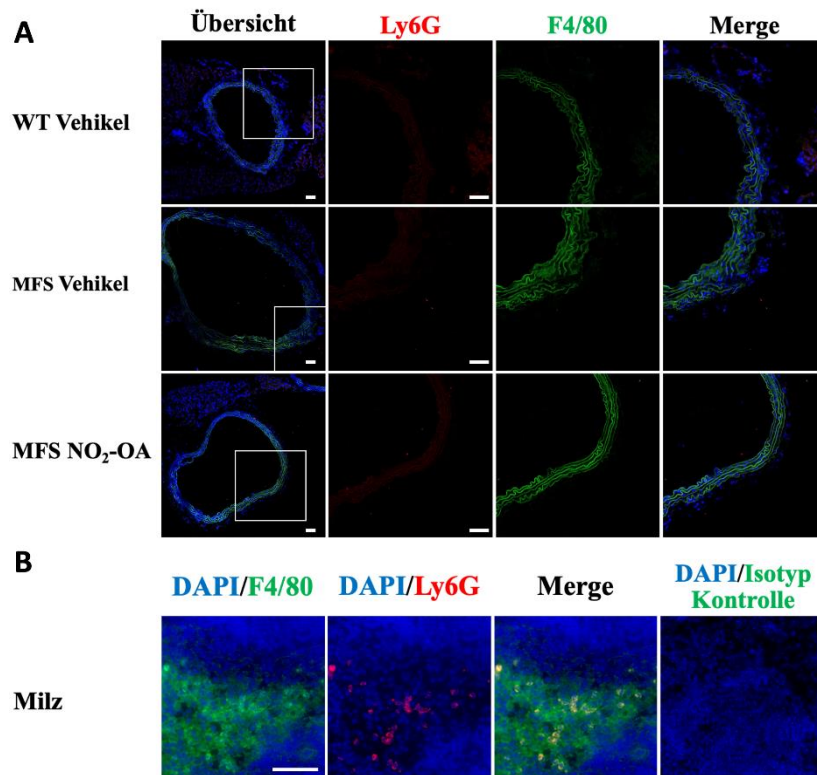
ergänzende Abbildung 1: Analyse der Pulswellengeschwindigkeit (PWG). Der Abstand (d) zwischen den gepulsten Doppler-Signalen, die in der Aortenwurzel und im proximalen Teil der Aorta descendens aufgezeichnet wurden, wird durch die blaue Linie im B-Mode-Bild auf der linken Seite angezeigt. Die entsprechenden Doppler-Bilder sind auf der rechten Seite dargestellt.  $t_1$  und  $t_2$  stellen die Zeiten zwischen der EKG-Spitze der R-Welle und dem Einsetzen der Doppler-Wellenform der Aortenwurzel ( $t_1$ ) und der Aorta descendens ( $t_2$ ) dar, wie durch die blauen Linien angezeigt. Um die PWG des Aortenbogens zu erhalten, wurde der Abstand zwischen den beiden Dopplermessungen (d) durch die Laufzeit der Pulswelle, d. h. die Differenz zwischen  $t_2$  und  $t_1$ , dividiert. Die Skalenbalken zeigen 1 mm (links) und 20 ms (rechts).



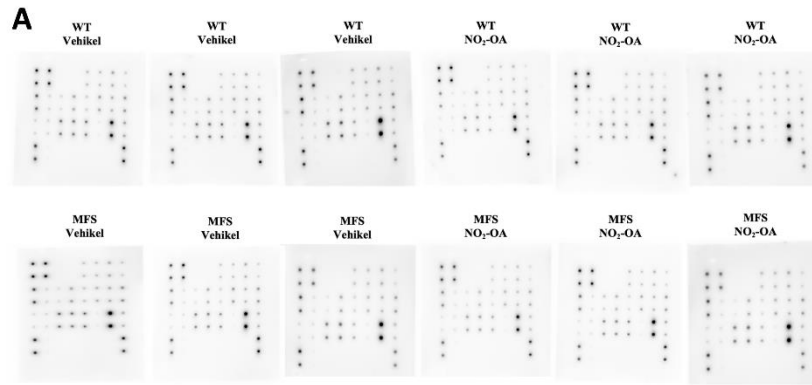
ergänzende Abbildung 2: Echokardiografische Messungen des Aortendurchmessers bei mit NO<sub>2</sub>-OA behandelten Wildtypen. (A) AW- und MAA-Durchmesser zu Beginn (im Alter von 8 Wochen) und nach vierwöchiger Behandlung (im Alter von 12 Wochen). (B) Vierwöchige Veränderungsrate (8-12 Wochen Alter) der jeweiligen Messungen innerhalb eines Tieres. (n = 6 pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch zweifache ANOVA mit wiederholten Messungen und Tukey's multiplen Vergleichstest (A) und ungepaarten t-Test (B) bestimmt. ns = nicht signifikant.



*ergänzende Abbildung 3: Ungeschnittene Gelatine-Zymographie und vollständige Immunoblots mit Schwerpunkt auf den für die Analyse verwendeten Banden. (A) ungeschnittene Gelatine Zymographie: Während die Banden, die die pro-MMP-2- und MMP-2-Aktivität widerspiegeln (durch rote Rechtecke gekennzeichnet), deutlich sichtbar sind, sind die Banden, die der pro-MMP-9- und MMP-9-Aktivität entsprechen (vorhergesagtes Molekulargewicht 92/82 kDa), fast nicht nachweisbar. Die für die Zymographie verwendeten Proben wurden auf ein separates Gel geladen und einer Immunoblot-Analyse der GAPDH-Proteinexpression unterzogen, um eine gleichmäßige Proteinbeladung zu kontrollieren. (B) vollständige Immunoblots mit Schwerpunkt auf den für die Analyse verwendeten Banden: Nach dem Proteintransfer wurden die mit Ponceau gefärbten Membranen geschnitten und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die nebeneinander angeordneten Banden stammen von denselben Membranen. Die im Manuskript dargestellten repräsentativen Spuren sind durch rote Rechtecke gekennzeichnet.*

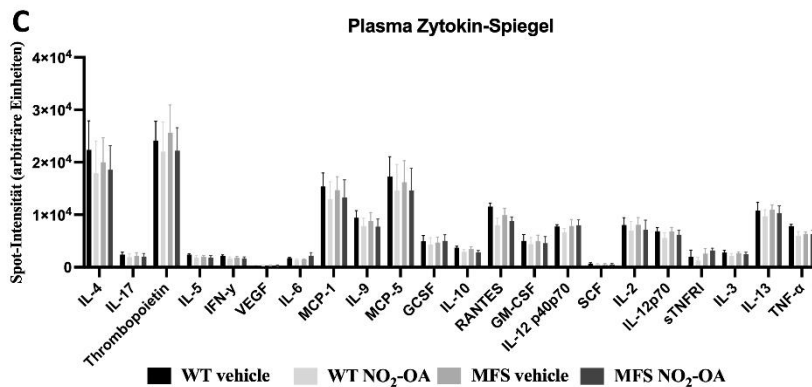


ergänzende Abbildung 4: Leukozyteninfiltration der Aorta ascendens. (A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in Schnitten der Aorta ascendens. Erste Spalte: Überblick über den gesamten Aortenquerschnitt. Zweite Spalte: Ly6G-Färbung (rot). Dritte Spalte: F4/80-Färbung und Elastin-Autofluoreszenz (grün). Vierte Spalte: zusammengeführte Bilder (DAPI-gefärbte Zellkerne in blau, Ly6G in rot, F4/80 und Elastin-Autofluoreszenz in grün). Sowohl Ly6G<sup>+</sup> als auch F4/80<sup>+</sup> Zellen waren in den Schnitten der Aorta ascendens kaum nachweisbar und konnten nicht sinnvoll quantifiziert werden. (B) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen im Milzgewebe (Positivkontrolle). Erstes Bild: F4/80-Färbung in grün und DAPI-gefärbte Zellkerne in blau. Zweites Bild: Ly6G-Färbung in rot und DAPI-gefärbte Zellkerne in blau. Drittes Bild: Zusammengeführtes Bild (F4/80 in grün, Ly6G in rot und DAPI-gefärbte Zellkerne in blau). Viertes Bild: F4/80/Ly6G-Isotypkontrolle des Milzgewebes (Alexa Fluor 488-konjugiertes Ratten-IgG2a und DAPI-gefärbte Zellkerne in blau). (A und B) Maßstabsbalken: 50 µm.



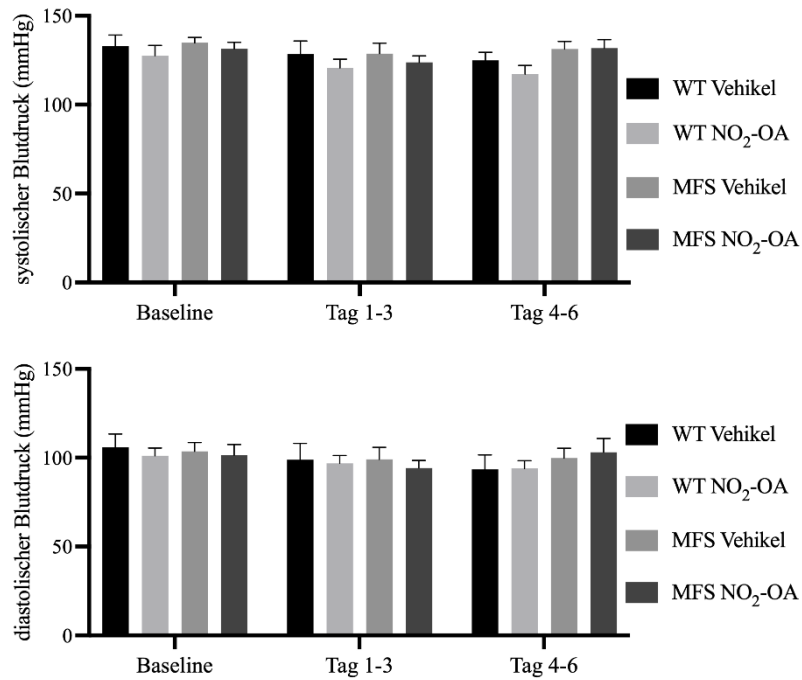
**B**

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	IL-2	IL-3
2	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	IL-2	IL-3
3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40p70	IL-12p70	IL-13
4	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40p70	IL-12p70	IL-13
5	IL-17	IFN- $\gamma$	MCP-1	MCP-5	RANTES	SCF	sTNFR1	TNF- $\alpha$
6	IL-17	IFN- $\gamma$	MCP-1	MCP-5	RANTES	SCF	sTNFR1	TNF- $\alpha$
7	Thrombopoietin	VEGF	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos
8	Thrombopoietin	VEGF	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos

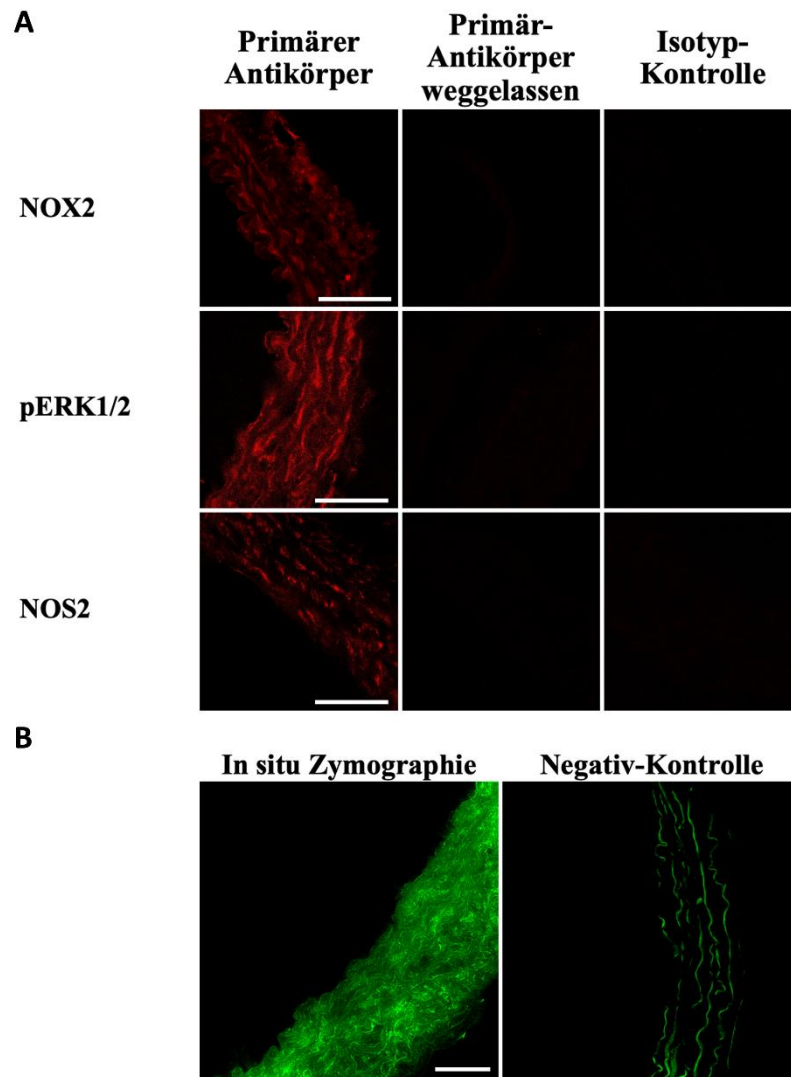


ergänzende Abbildung 5: Zytokinspiegel im Plasma. (A) Bilder von Zytokin-Antikörper-Arrays. Zwei Proben der jeweiligen Gruppen wurden auf jeder Membran gepoolt. (B) Array-Karte. (C) Quantifizierung der Plasmazytokinspiegel (Spot-Signalintensitäten, willkürliche Einheiten, normalisiert auf interne Positivkontrolle). ( $n = 3$  Replikate pro Gruppe; zwei Proben pro Replikat gepoolt). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Eine einseitige ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



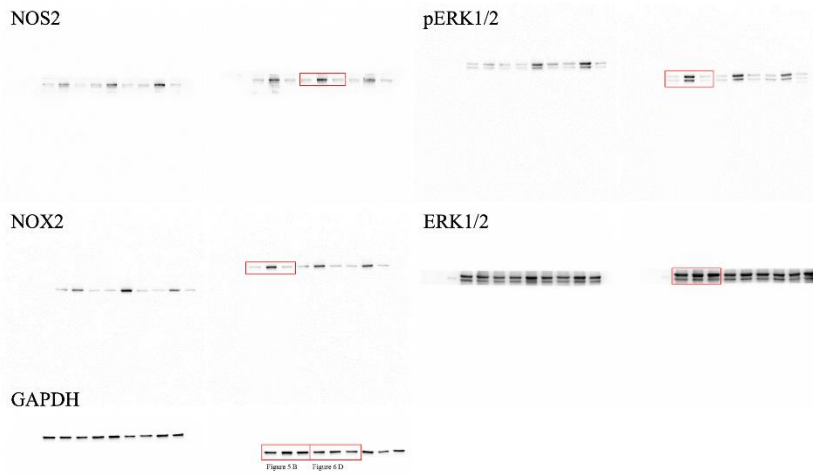


ergänzende Abbildung 6: Systolischer und diastolischer Blutdruck. Die Messungen wurden kontinuierlich vor Beginn der Behandlung mit dem Vehikel/NO<sub>2</sub>-OA (Baseline: Tag -2 - Tag 0) und zu zwei Zeitpunkten danach (Tag 1 - Tag 3 und Tag 4 - Tag 6 nach Behandlungsbeginn) über einen Zeitraum von jeweils 48 Stunden durchgeführt. (n = 5-7; aufgrund von Transmitterdislokationen nach der Implantation der Minipumpe mussten nachfolgende Messungen an einer mit Vehikel behandelten Wildtyp-, einer mit Vehikel behandelten MFS-Maus und einer mit NO<sub>2</sub>-OA behandelten MFS-Maus, d. h. an insgesamt drei Mäusen, ausgeschlossen werden). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Analyse des Mixed-Effects-Modells mit Tukey's multiplern Vergleichstest ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

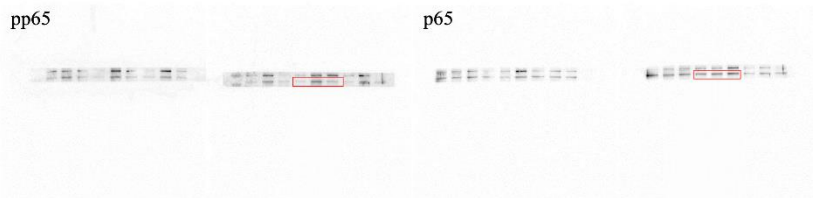


ergänzende Abbildung 7: Negativkontrollen von Immunfluoreszenzfärbungen und In-situ-Zymographie. (A) Negativkontrolle Immunfluoreszenzfärbungen: Erste Spalte: Repräsentative Bilder von NOX2-, pERK1/2- und NOS2-Immunfluoreszenzfärbungen mit Alexa Fluor 594-konjugiertem Ziegen-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (rotes Signal). Zweite Säule: Negativkontrollen, bei denen die primären Antikörper weggelassen wurden. Dritte Spalte: Isotyp-Kontrollen (polyklonales Kaninchen-IgG). (B) Negativkontrolle In-situ-Zymographie: Repräsentative Bilder der In-situ-Zymographie (links) und der entsprechenden Negativkontrolle (rechts), bei der dem Gelatinase-Reaktionspuffer zur Hemmung der MMP-2/-9-Aktivität EDTA zugesetzt wurde. Gelatinolytischer Bereich in hellgrün. (A und B) Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu$ m.

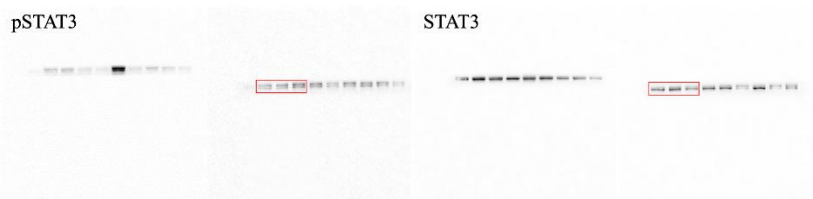
**Gel 1.1 und 1.2**



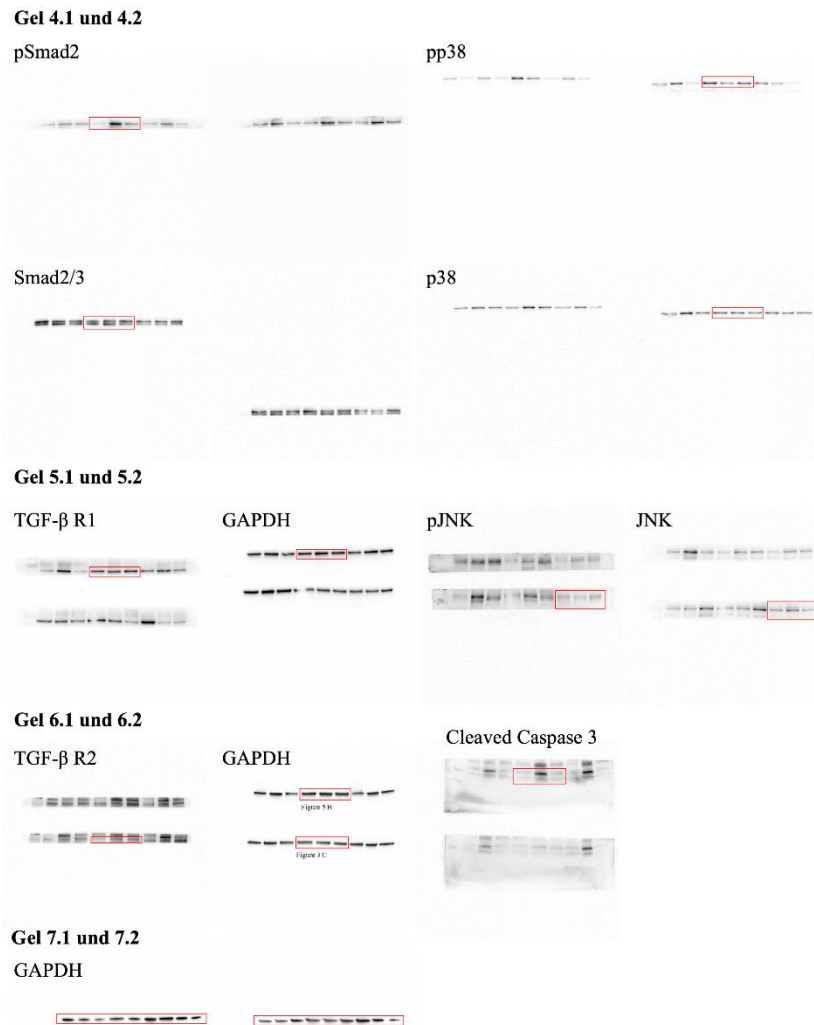
**Gel 2.1 und 2.2**



**Gel 3.1 und 3.2**



*ergänzende Abbildung 8: Vollständige ungeschnittene Immunoblots (Gele 1-3). In allen Fällen wurden 18 Proben (n = 6 pro Gruppe) auf zwei Gele geladen (9 Proben pro Gel; z. B. Gel 1.1 und 1.2). Die im Manuskript gezeigten repräsentativen Lanes sind durch rote Rechtecke gekennzeichnet.*



ergänzende Abbildung 9: Vollständige ungeschnittene Immunoblots (Gele 4-7). In allen Fällen wurden 18 Proben ( $n = 6$  pro Gruppe) auf zwei Gele geladen (9 Proben pro Gel). Die aus den Gelen 5.1/5.2 und 6.1/6.2 stammenden Membranen wurden jeweils gemeinsam abgebildet (erste Membran oben und zweite Membran unten). Die im Manuskript gezeigten repräsentativen Lanes sind durch rote Rechtecke gekennzeichnet.

## 7.2 Ergänzende Tabellen

ergänzende Tabelle 1: Antikörper-Liste

Ziel Protein	Spezies	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdün- nung für Western Blot	Verdün- nung für IF-Fär- bung
pERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling	9101	1/1000	1/250
ERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling	4695	1/1000	-
NOX2	Kaninchen	Abcam	80508	-	1/450
NOX2	Kaninchen	Abcam	129068	1/5000	-
pp65	Kaninchen	Cell Signaling	3033	1/1000	-

p65	Kaninchen	Cell Signaling	7970	1/1000	-
NOS2	Kaninchen	Abcam	ab15323	1/1000	1/200
$\alpha$ -SMA	Kaninchen	Abcam	ab7817	-	1/200
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling	2118	1/7500	-
pp38	Kaninchen	Cell Signaling	9211	1/1000	-
p38	Kaninchen	Cell Signaling	9212	1/1000	-
pSmad2	Kaninchen	Cell Signaling	18338	1/1000	-
Smad2/3	Kaninchen	Cell Signaling	8685	1/1000	-
pSTAT3	Kaninchen	Cell Signaling	9145	1/1000	-
STAT3	Kaninchen	Cell Signaling	30835	1/1000	-
p-JNK	Maus	Cell Signaling	9255	1/1000	-
JNK	Kaninchen	Cell Signaling	9252	1/1000	-
TGF- $\beta$ Re- zeptor 1	Kaninchen	Santa Cruz	sc-399	1/200	-
TGF- $\beta$ Re- zeptor 2	Kaninchen	Abcam	ab186838	1/1000	-
gespaltene Caspase 3	Kaninchen	Cell Signaling	9661	1/1000	-
Ly6G	Ratte	BioLegend	127636	-	1/200
F4/80	Ratte	BioLegend	123120	-	1/200

ergänzende Tabelle 2: Primer-Liste

Ziel	vorwärts Primer	rückwärts Primer
Beta-actin	GCTGTATTCCCCTCCATCG	GGGGTGTGAAGGTCTCAA
TGF- $\beta$ 1	AGCCCGAAGCGGACTACTAT	ACGCCAGGAATTGTTGCTAT
TGF- $\beta$ Rezep- tor 1	TGGTCCAGTCTGCTTCGTCT	GTGGTGCCCTCTGAAATGAA
TGF- $\beta$ Rezep- tor 2	TGCATCCATCCAC- CTAAGCTGT	TCACAGATGGCCGTGATGCT
MMP-2	TGGGGGAGATTCTCACTTTG	CATCACTGCGACCAGTGTCT
MMP-9	GCTGACTACGATAAG- GACGGCA	TAGTGGTGCAGGCAGAG- TAGGA
NOX2	AAAGGTGGTCATCACCAAGG	GCTTATCACAGCCACAAGCA
NOS1	GAGCAGAGCGGCCTTATCCA	TCGACAGCTTTGGTGGGTGT

NOS2	GAGACAGGGAAGTCT- GAAGCAC	CCAGCAGTAGTT- GCTCCTCTTC
NOS3	G TTCCTCCGGCTGTGGTAGT	GAGGTGTCTGGGACTCA- CTGTC
COL1A1	CGACCTCAAGATGTGCCACT	ACTCGAACGGGAATCCATCG
COL3A1	GCCTTCTACACCTGCTCCTG	TTCCTCCCCTCCAGACTTG
PPAR $\gamma$	CTTTATGGAGCCTAAGTTT- GAGTTT	CAGCAGGTTGTCTTGGATGT
BMAL1	GGAAATACGGGT- GAAATCTATG	TTCTGCGAGGTGTCCTATGT
RGS5	TCTAGGCAGGTTTGGGCTGT	TGCGGACAGCAGACACTTTT
RHOBTB1	ACAGTTCCAATGAGCGAGTC	TTGCTGATAAGGAGGGTTGC

## **8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen**

Das dieser Dissertation zugrunde liegende Manuskript wurde bereits am 29.07.2021 in Cardiovascular Research veröffentlicht<sup>112</sup>. (<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab256>)