

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

Untersuchung der Bedeutung von Myeloperoxidase für die Entstehung von Aneurysmen der Aorta im Rahmen des Marfan- Syndroms

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

vorgelegt von
Johannes Karl Dohr
aus Eschweiler

promoviert am 22. Mai 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2023

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin oder Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. S. Baldus
2. Gutachterin oder Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G.F. 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.¹

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

Frau Priv.-Doz. Dr. Anna Klinke
Herr Dr. Dennis Mehrkens
Herr Priv.-Doz. Dr. Matti Adam
Herr Univ.-Prof. Dr. Stephan Baldus

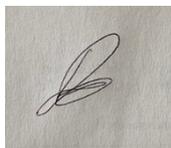
Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang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

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

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

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

Köln, den 22.05.2023

A square image showing a handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is stylized and appears to be the initials 'S.B.'.

Unterschrift:

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

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mir auf dem Weg zur Promotion geholfen haben. Ich hatte eine wunderbare Zeit und schaue auf viele schöne Erinnerungen zurück.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Eure grenzenlose Unterstützung und liebevolle Begleitung auf meinem gesamten bisherigen Weg haben mich zu der Person reifen lassen, die ich heute bin. Hierfür bin ich Euch unendlich dankbar. Ebenfalls danke ich meinen beiden Brüdern Franz und Philipp, die mich immer unterstützt haben und für mich ein wichtiger Rückhalt sind!

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Baldus für die nun bereits langjährige Unterstützung. Sie haben mich in meinem ersten Bewerbungsgespräch bei Ihnen für die Grundlagenwissenschaft begeistert und seither meinen Weg begleitet. Ihre Hingabe für die Kardiologie sowohl auf wissenschaftlicher als auch auf klinischer Ebene haben mich dazu inspiriert, Teil Ihres klinischen Teams zu werden und unter Ihrer Leitung weiterhin wissenschaftlich in der kardiologischen Grundlagenforschung aktiv zu sein.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Adam und Herrn Dr. Mehrkens. Ihr habt mich nicht nur bei meinen Versuchen unterstützt und beratend zur Seite gestanden, sondern auch Spaß an der wissenschaftlichen Arbeit vermittelt. Euer grenzenloser Optimismus für das Projekt sowie Eure sympathische Art als Persönlichkeiten abseits der Labortätigkeit habe ich sehr genossen und bedanke mich bei Euch für Eure Hilfe!

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Klinke bedanken, die mich ebenfalls sehr bei meiner Arbeit unterstützt hat. Ich bewundere Deine Geduld und Dein unglaubliches Wissen, das mir in vielen Situationen weitergeholfen hat. Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Mollenhauer sowie allen Mitarbeitern der AG Baldus, mit denen ich eine wunderbare produktive und auch lustige Zeit hatte.

Ich widme diese Arbeit meinen Großeltern Inge und Karl Wiegard.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	9
2.1 Historischer Überblick	9
2.2 Symptome/Klinik	10
2.2.1. Orthopädisches System	10
2.2.2. Okuläres System	11
2.2.3. Kardiovaskuläres System	11
2.3 Diagnostik	13
2.4 Pathophysiologie	15
2.4.1. Bestandteile und Aufbau der Aortenwand	15
2.4.2. Fibrillin-1	16
2.4.3. Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen	17
2.4.4. TGF- β -Signal-Aktivität	18
2.4.5. Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies	19
2.4.6. Rolle der glatten Muskelzellen	20
2.4.7. Fragmentierung der Extrazellulärmatrix	21
2.4.8. Inflammatorische Prozesse	21
2.5 Myeloperoxidase	23
2.5.1. Struktur	23
2.5.2. Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr	24
2.5.3. Transzytose und posttranslationale Proteinmodifikationen	25
2.5.4. Reduzierung der NO-Bioverfügbarkeit	26
2.5.5. Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen	26
2.5.6. MPO und Aneurysmen	27
2.6 Hypothese und Fragestellung	29
3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1 Material	31
3.1.1. Antikörper	31
3.1.2. Reaktionspuffer	32
	5

3.1.3.	Reaktionskit	32
3.1.4.	Mauslinien	32
3.2	Methoden	33
3.2.1.	Tierexperimentelles Modell	33
3.2.2.	Organentnahme	34
3.2.3.	Immunfluoreszenz	34
3.2.4.	Trichrom-Masson-Färbung	35
3.2.5.	In-situ-Zymographie	35
3.2.6.	Dihydroethidin-Färbung	36
3.2.7.	MPO-Plasma-ELISA	36
4.	ERGEBNISSE	38
3.3	Nitrotyrosin-Immunfluoreszenz-Analyse	38
3.4	DHE-Fluoreszenz-Analyse	39
3.5	Cleaved-Caspase-3-Immunfluoreszenz-Analyse	40
3.6	In-situ-Zymographie	42
3.7	Trichrom-Masson-Färbung	44
3.8	In-vivo-Analyse des Aortendurchmessers	45
3.9	MPO-Plasmaspiegel-Analyse	46
4.	DISKUSSION	47
4.1	Angriffspunkt von MPO	47
4.1.1.	EZM als potenzieller Angriffspunkt für MPO	47
4.1.2.	MPO als Aktivator von MMPs	49
4.1.3.	MPO und ROS	50
4.2	MPO – Relevanz für die Pathogenese des humanen Marfan-Syndroms	50
4.3	Ausblick für die Zukunft	51
5.	LITERATURVERZEICHNIS	53
6.	ANHANG	63
6.1	Abbildungsverzeichnis	63

6.2	Tabellenverzeichnis	63
6.3	Diagrammverzeichnis	63

Abkürzungsverzeichnis

A. ascendens	Aorta ascendens
AAA	Abdominelles Aortenaneurysma
ApoE	Apolipoprotein E
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
Bcl-1	B-cell-lymphoma-1 protein
Br ⁻	Bromid
Cl ⁻	Chlorid
CMD	Cystic medial degeneration
EGF	Epidermal-Growth-Factor
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EZM	Extrazelluläre Matrix
HOBr	Hypobromige Säure
HOCl	Hypochlorige Säure
HOSCN	Thiocyansäure
IL-6	Interleukin-6
kDa	Kilo Dalton
LTBP	Latent TGF-β binding protein
Mcl-1	Myeloid leukemia cell differentiation protein-1
mg ^R /mg ^R	Mausmodell mit hypomorphem Fibrillin
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MPO	Myeloperoxidase
nm	Nano-Meter
NO ₂	Nitrogendioxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NOX	NADPH-Oxidasen
O ₂ ⁻	Superoxid
ROS	Reactive oxygen species
SCN ⁻	Thiocyanat
TAA	Thorakales Aortenaneurysma
TGF-β	Transforming growth factor-β

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Myeloperoxidase (MPO) für die Entstehung von Aortenaneurysmen im Rahmen des Marfan-Syndroms untersucht. Das Marfan-Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, deren Ursache eine Mutation in einem Genabschnitt ist, der für das extrazelluläre Protein Fibrillin-1 kodiert. Die genaue Pathophysiologie der Entstehung des Aortenaneurysmas im ascendierenden Teil ist bislang weitgehend unklar. Es gibt jedoch einige Hinweise, dass inflammatorische Prozesse eine entscheidende Rolle spielen und zur Entstehung des Aneurysmas beitragen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie die bisher noch unbekannte Bedeutung des Häm-Enzyms MPO für die Entwicklung von Aortenaneurysmen beim Marfan-Syndrom untersucht. MPO ist ein Katalysator von inflammatorisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen und entscheidend am strukturellen Remodeling von Myokard und Gefäßwänden beteiligt. Durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kann MPO phänotypische Veränderungen bei glatten Muskelzellen und somit eine vaskuläre Hypertrophie, die Sekretion von Proteasen und eine Kalzifizierung der Gefäßwand bewirken. MPO aktiviert Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) durch die Oxidation von inaktiven pro-MMP-Formen. Es potenziert das pathophysiologische Remodeling der endothelialen Glykokalix bzw. der Strukturproteine Fibronectin und Kollagen.

In dieser Studie wurde mithilfe von transgenen Mäusen der Effekt einer MPO-Defizienz in Anwesenheit einer Fibrillin-1-Mutation evaluiert. Hierbei zeigte sich bei 12 Wochen alten Mäusen, dass eine MPO-Defizienz die Entstehung von Aortenaneurysmen verhindert. Die histologische Analyse der Aortenschnitte ergab, dass eine MPO-Defizienz posttranslationale Modifikationen wie Nitrotyrosinierungen und oxidativen Stress in der Aortenwand stark abmildert. Zusätzlich war die Aktivität proteolytischer Enzyme, wie den MMPs, deutlich geringer ausgeprägt und dementsprechend fanden sich weniger fragmentierte elastische Fasern in der Aortenwand. Insgesamt wirkt eine MPO-Defizienz bei Mäusen mit Fibrillin-1-Mutation protektiv hinsichtlich pathologischer Umbauprozesse innerhalb der Aortenwand und der damit verbundenen Entstehung von Aneurysmen in der Aorta ascendens. Somit ist die Idee einer pharmakologischen Behandlung mittels MPO-Inhibitoren eine aussichtsreiche zukünftige Therapieoption in der konservativen Behandlung des Marfan-Syndroms.

2. Einleitung

2.1 Historischer Überblick

Die Bezeichnung „Marfan-Syndrom“ gründet sich aus den Entdeckungen eines Pariser Pädiaters, der 1896 im Rahmen einer Konferenz ein fünfjähriges Mädchen vorstellte, das sehr

lange und schmale Finger besaß. Marfan bezeichnete diese Finger als „Spinnenfinger“, ein Merkmal, das auch noch heute ein klassisches phänotypisches Charakteristikum des Marfan-Syndroms ist (De Paepe, Devereux, Dietz, Hennekam, & Pyeritz, 1996). Das heterogene Erscheinungsbild der verschiedenen Marfan-Patienten sorgte dafür, dass der Krankheit zunächst unterschiedliche Namen gegeben wurden wie Arachnodaktylie, Chondrohypertrophie oder partieller Gigantismus. Im Laufe des 20. Jahrhunderts setzte sich allerdings zunehmend die Bezeichnung „Marfan-Syndrom“ durch. Anfangs standen noch primär die orthopädischen bzw. skelettalen Manifestationen im Vordergrund, jedoch wurde 1943 erstmals eine Aortenbeteiligung beschrieben. Es dauerte weitere 12 Jahre, bis man herausfand, dass das gesamte Herz-Kreislauf-System beteiligt war und die Erkrankung in Form eines autosomal-dominanten Erbganges vererbt wurde. 1972 wurde erstmals beschrieben, dass die akute Aortendissektion den entscheidenden lebenslimitierenden Faktor für diese Erkrankung darstellt. Weitere 13 Jahre stellte der Humangenetiker Dietz die Ursache der Bindegewebserkrankung fest. Er fand einen Gendefekt auf Chromosom 15, der für das extrazelluläre Glykoprotein Fibrillin-1 kodiert. Dieser Gendefekt wird als ursächlich für das klassische Marfan-Syndrom angesehen (Pereira et al., 1999).

Im Jahre 1986 wurde erstmals eine einheitliche Klassifikation, die „Berlin-Nosologie“, aufgestellt, die die Symptomatik der einzelnen betroffenen Organe ganzheitlich erfasste. Sie wurde 10 Jahre später durch die auch heute noch gültige Gent-Nosologie ersetzt, die die Klassifikation um die Komponente der humangenetischen Testung erweitert (B. L. Loeys et al., 2010).

2.2 Symptome/Klinik

2.2.1. Orthopädisches System

Da die Skelettauffälligkeiten bereits sehr früh schon sichtbar und eindrücklich sind, dachte man anfangs, dass sich das Marfan-Syndrom auch nur auf dieses System beschränkt. Charakteristisch für den sog. „marfanoiden Habitus“ ist ein verstärktes Längenwachstum der Röhrenknochen (Erkula, Jones, Sponseller, Dietz, & Pyeritz, 2002).

Durch den Hochwuchs kann es zu Malformitäten und Asymmetrien der Rippen kommen, die dadurch die Lage des Sternums verändern. Das klinische Erscheinungsbild kann als eine Pectus carinatum (Sternum unphysiologisch weit nach ventral) oder Pectus excavatum imponieren (Sternum unphysiologisch weit nach dorsal) (Fraser, Child, & Hunt, 2017).

Auch die Hände sind beim Marfan-Syndrom einigen charakteristischen Auffälligkeiten unterworfen. Durch das abnorme Längenwachstum haben die Patienten sehr lange und

schmale Finger. Dieses charakteristische Bild wird auch als Arachnodaktylie bezeichnet (Giampietro, Raggio, & Davis, 2002). Typische diagnostische Zeichen sind hierbei das Steinberg- und das Murdoch-Zeichen. Beim Steinberg-Zeichen ist bei geschlossener Faust der Daumen in Oppositionshaltung länger als der ulnare Rand des Handtellers. Beim Murdoch-Zeichen bedeckt der Daumen den Fingernagel des kleinen Fingers, wenn man das gegenüberliegende Handgelenk umfasst (B. L. Loeys et al., 2010).

Aufgrund der durch die Mutation bedingten Bindegewebschwäche ist der Bandapparat im Rückenbereich defekt und es kommt bereits im Kindesalter zu einer schweren Skoliose. Diese tritt bei ca. 60% der Patienten auf. Dabei ist der häufigste Manifestationsort der thorakale bzw. thorakolumbale Teil der Wirbelsäule. Falls eine thorakale Lordose auftritt in Kombination mit einem Pectus excavatum, kann es zu einer Kompression großer Atemwege oder einem Pneumothorax kommen. Zusätzlich prädisponiert die Verlegung der oberem Atemwege rezidivierende Infektionen der Lunge (Heur et al., 2008). Leider funktioniert die konservative Therapie in Form von Korsetts deutlich schlechter im Vergleich zu Patienten mit idiopathischer Skoliose. Auch die operative Versorgung ist aufgrund der Verformung der Wirbel erschwert, da beispielsweise die Pedikel sehr eng sind und die Knochendichte deutlich vermindert ist (Heur et al., 2008). Eine weitere orthopädische Auffälligkeit ist die Protrusio acetabuli. Hierbei existiert eine Vorwölbung der Hüftpfanne bzw. des Hüftkopfes in das kleine Becken. Häufig ist dieses Phänomen zunächst asymptomatisch. Ein Spätsymptom kann infolge von Abnutzungserscheinungen eine Coxarthrose sein (Giampietro et al., 2002).

2.2.2. Okuläres System

Auch das Auge ist beim Marfan-Syndrom betroffen. Häufigste okuläre Manifestationen sind Myopie, Ectopia Lentis (Luxation der Linse) und Netzhautablösung. Die durch die Mutation verursachte Bindegewebschwäche führt zu einer Schwächung der Zonulafasern. Dies resultiert in einer Luxation der Linse. Eine Subluxation der Linse ist meistens bilateral und symmetrisch. Falls die Subluxation nach anterior geschehen sollte, kann es dazu führen, dass die Abflusswege für die Kammerflüssigkeit blockiert sind. Dies kann infolge des intraokulären Druckanstieges zu einem Glaukom und schließlich zu einer Netzhautablösung führen (Maumenee, 1981).

Weiterhin ist aufgrund einer sehr langen Bulbuslänge eine Myopie typisch. Außerdem verursacht der Fibrillin-Defekt eine dünne abgeflachte Kornea. Daher wird von Operationen im Korneabereich streng abgeraten (Halpert & BenEzra, 1996).

2.2.3. Kardiovaskuläres System

Kardiovaskuläre Manifestationen findet man bei 90% der am Marfan-Syndrom erkrankten Patienten. Die Hauptmanifestation und prognostisch limitierender Faktor ist die Entwicklung eines Aortenaneurysmas in der Aorta ascendens (A. ascendens), welches im Laufe des Lebens zu einer akuten Aortendissektion bzw. einer -ruptur führen kann. Weiterhin kann auch eine Pulmonalektasie und eine Insuffizienz der Aorten- bzw. der AV-Klappen auftreten. Außerdem ist die Erkrankung auch mit peripheren Aneurysmen, Koronaranomalien sowie einem Mitralklappenprolaps assoziiert.

Bei unbehandelten Patienten tritt eine Aortendissektion schon nach ca. 20 Jahren auf. Hinsichtlich der Symptomatik ist wichtig zu erwähnen, dass der charakteristische Vernichtungsschmerz fehlen kann und somit die Prognose dieser Patienten sich deutlich verschlechtert. Prädiktive Faktoren für eine Dissektion sind eine progrediente Zunahme des Aortendurchmessers und eine positive Familienanamnese in Bezug auf eine Aortendissektion oder unerwartete Todesfälle (Journal, 1993).

Die akute Aortendissektion, resultierend aus der Entwicklung eines Aortenaneurysmas, stellt die Hauptgruppe der Todesursachen bei betroffenen Patienten dar. Weiterhin typische Charakteristika sind Klappenanomalien wie ein Mitralklappenprolaps sowie eine Mitralklappen- und Aortenklappeninsuffizienz.

Im Alter von 60 Jahren besitzen ca. 95% der Patienten eine Dilatation der Aorta, von denen 75% von einer akuten Aortendissektion bedroht sind, falls sie sich nicht einem prophylaktischen chirurgischen Eingriff unterziehen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die akute Aortendissektion auch bei Menschen <30 Jahre auftritt.

Die Prognose eines an Marfan-Syndrom erkrankten Patienten wird maßgeblich bestimmt von der Ausdehnung des Aortenaneurysmas, das entweder in Form von einer akuten Dissektion oder Ruptur einen plötzlichen Tod verursachen kann. Eine Dilatation der Aorta findet man bei 60-80% der Patienten. Das Risiko einer Typ A Dissektion korreliert mit der Größe des Aortenaneurysmas, jedoch kann auch eine Dissektion bei einer vorher nur moderaten Dilatation der Aorta auftreten (Baumgartner et al., 2010).

Patienten mit einer Aortendilatation sind normalerweise asymptomatisch. Die Symptomatik entsteht in der Regel durch Insuffizienz der Aorten- bzw. Mitralklappe. Diese können zu einer Volumenbelastung des linken Ventrikels führen, wobei eine Erkrankung des linken Ventrikels auch eigenständig ohne Klappenbeteiligung auftreten kann. Ein Herzinfarkt kann auftreten, wenn bei einer Dissektion der Aortenwurzel die Koronarostien verlegt werden. (Radke & Baumgartner, 2014)

Sowohl die konservative als auch die operative Therapie haben sich in den letzten Jahren deutlich verbessert, sodass die Lebenserwartung von betroffenen Patienten mittlerweile bei 60-70 Jahren liegt. Aufgrund der negativ inotropen bzw. chronotropen Wirkung von β -Blockern wird der hämodynamische Stress im Bereich der Aortenwurzel reduziert und somit eine

Dilatation der Aortenwurzel bzw. der Aorta ascendens verlangsamt. Daher empfiehlt die europäische Gesellschaft für Kardiologie die Benutzung von β -Blockern als First-Line-Prophylaxe im Rahmen des Marfan-Syndroms (Baumgartner et al., 2010).

In experimentellen Versuchen bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass der AT1-Rezeptor-Antagonist (ARB) Losartan eine Dilatation der Aorta deutlich besser verhindert als die Kontrollgruppe, die mit Propanolol behandelt wurde (Habashi et al., 2006). Aus diesem Grund wurden daraufhin verschiedene klinische Studien mit unterschiedlichen Designs gestartet, um die potenzielle Überlegenheit von ARB gegenüber β -Blockern zu untersuchen. Ein systematischer Review und eine Metaanalyse aus dem Jahr 2018 der bisherigen klinischen Studien zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen der β -Blocker-Therapie und der ARB-Therapie existieren. Auch eine Kombination beider Wirkstoffe brachte keinen Vorteil gegenüber der herkömmlichen β -Blocker-Therapie im Hinblick auf die Dilatation der Aorta bzw. dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen. Jedoch ist die Gesamtanzahl der bisher in Studien eingeschlossenen Patienten relativ gering und die Studiendesigns waren gerade im Hinblick auf die Einschlusskriterien zu ungenau, sodass in Zukunft mehr einheitlich RCTs durchgeführt werden sollten, sodass man die genauen Effekte zwischen ARB und β -Blockern exakt evaluieren kann und somit die pharmakologischen Therapieoptionen beim Marfan-Syndrom verbessert (Kang, Chi, Wu, & Chiu, 2019). Die bisherige medikamentöse Therapie hat jedoch keinen kausalen Ansatz, sondern sie beschränkt sich darauf, das Wachstum des Aortenaneurysmas zu verlangsamen bzw. den Zeitpunkt einer Operation in einen späteren Lebensabschnitt zu verschieben. Die bisher beste therapeutische Option ist eine elektive prophylaktische Operation, bevor eine Aortendissektion auftritt. Relevante Faktoren für die OP-Indikation sind der Durchmesser des Aneurysmas, die Dynamik der Progression der Aortendilatation sowie die Familienanamnese bezüglich einer Aortendissektion (Journal, 1993). Falls der Durchmesser der Aorta $>50\text{mm}$ ist oder um $0,5\text{-}1\text{ cm}$ pro Jahr zunimmt, wird ein operativer Ersatz der A. ascendens empfohlen. Aufgrund der deutlich verbesserten Operationstechniken in den vergangenen Jahren liegt die 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate bei 84% bzw. 75% (Gott et al., 1999). Da das Risiko eines erneuten Aneurysmas bzw. einer erneuten Dissektion im Vergleich zu Patienten mit sporadischen thorakalen Aortenaneurysmen (TAA) erhöht ist, wird eine lebenslange medikamentöse Therapie mit β -Blockern empfohlen (Baumgartner et al., 2010).

2.3 Diagnostik

Um die Diagnose „Marfan-Syndrom“ stellen zu können ist heutzutage ein Zusammenspiel der Symptomatik und der humangenetischen Testung notwendig. Die charakteristischen Symptome sind das vermehrte Längenwachstum der Röhrenknochen, dislozierte Linsen in den Augen und die Entwicklung eines Aortenaneurysmas. Im Jahre 1991 wurde die Fibrillin-

1-Mutation als zugrunde liegende Ursache für die beschriebene Symptomatik gefunden (Dietz et al., 1991). Deshalb wurden 1996 humangenetische und klinische Kriterien in der Gent-Nosologie zusammengefasst, die bei der Sicherung der Diagnose helfen sollten (De Paepe et al., 1996). Ein Jahrzehnt später wurde die Gent-Nosologie modifiziert und ist seitdem bis heute gültig. Bezogen auf die Symptomatik wurden körperliche Manifestationen wie die Ectopia lentis und das Aortenaneurysma in den Kriterien stärker gewichtet, während andere unspezifische Kriterien nicht mehr berücksichtigt wurden. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der genetischen Testung betont, die eine Spezifität von 97% für die Stellung der Diagnose hat (B. Loeys, Nuytinck, Delvaux, De Bie, & De Paepe, 2001). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Symptomatik zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Leben manifestiert, beinhaltet die Gent-Nosologie ein Scoring-System, welches als Hilfsmittel zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins des Marfan-Syndroms bei betroffenen Patienten dienen kann (B. L. Loeys et al., 2010).

Im Folgenden sind die Kriterien der Gent-Nosologie (Stand 2010) aufgeführt (Diagnose & Marfan-syndrom, 2010). Die Diagnose des Marfan-Syndroms muss eine der folgenden sieben Bedingungen erfüllen:

1. Aortenaneurysma bzw. Aortendissektion gemeinsam mit einer Ectopia lentis
2. Aortendilatation oder -dissektion gemeinsam mit einer krankheitsrelevanten *FBN1*-Mutation (*FBN1* = Fibrillin1)
3. Aortendilatation und systemische Beteiligung mit ≥ 7 Punkten (siehe Liste „Bewertungssystem der systemischen Beteiligung“)
4. Linsenverschiebung (Ectopia lentis) und Vorliegen einer *FBN1*-Mutation, bei der ein Zusammenhang mit einer Aortenerkrankung nachgewiesen wurde.
5. Linsenverschiebung verbunden mit einem gesicherten Marfan-Syndrom in der Familie des Betroffenen (definiert durch die Punkte 1 bis 4)
6. Gesichertes Marfan-Syndrom in der Familie des Betroffenen und systemische Beteiligung mit ≥ 7 Punkten
7. Aortenerweiterung verbunden mit einem gesicherten Marfan-Syndrom in der Familie des Betroffenen (definiert durch die Punkte 1 bis 4)

Bewertungssystem der systemischen Beteiligung (Punktesystem für weitere Krankheitszeichen). Eine systemische Beteiligung liegt vor, wenn 7 oder mehr Punkte erreicht werden:

Handgelenk- und Daumenzeichen positiv

(3 Punkte)

Handgelenk- oder Daumenzeichen positiv	(1 Punkt)
Trichterbrust oder asymmetrischer Brustkorb	(1 Punkt)
Kielbrust	(2 Punkte)
Hinterfuß-Deformation (Knickfuß)	(2 Punkte)
Plattfüße	(1 Punkt)
Zusammenfall der Lunge (Pneumothorax)	(2 Punkte)
Erweiterung der Hirnhaut im Bereich der Lendenwirbel (Dura-Ektasie)	(2 Punkte)
Vorwölbung der Hüftpfanne (Protrusio acetabuli)	(2 Punkte)
Armspannweite größer als Körperlänge und herabgesetztes Verhältnis von Oberlänge zu Unterlänge ohne schwere Skoliose	(1 Punkt)
Skoliose oder Kyphose	(1 Punkt)
Streckdefizit der Ellenbogen	(1 Punkt)
<u>Mindestens 3 von 5 möglichen Gesichtsmerkmalen:</u>	(1 Punkt)
- schmaler, langer Schädel	
- nach unten abgeschrägte Lidachse	
- eingefallene Augen	
- Unterkiefer-Rücklage	
- Unterentwicklung der Wangenknochen	
Hautstreifen (Striae)	(1 Punkt)
Kurzsichtigkeit (Myopie) > 3 Dioptrien	(1 Punkt)
Mitralklappenprolaps	(1 Punkt)

2.4 Pathophysiologie

2.4.1. Bestandteile und Aufbau der Aortenwand

Die thorakale Aorta wird von innen nach außen in 3 Teile gegliedert: Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia. Innerhalb der Tunica Intima bildet eine dünne Endothelschicht die Abgrenzung zum Gefäßlumen. Darunter befindet sich die subendotheliale Schicht mit einem komplexen Netzwerk aus Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagen Typ IV, Fibronectin, Perlecan, Laminin etc. In der Tunica Media befinden sich elastische Fasern, die in ca. 60 Lamellen angeordnet sind. Zwischen den Lamellen sind glatte Muskelzellen, die sowohl für die Kontraktion als auch für die Produktion der EZM zuständig sind. Über ein Kollagen-Fibrillin-Mikrofibrillen-Netzwerk in der EZM sind die glatten Muskelzellen mit den elastischen Fasern verbunden und bilden somit eine kontraktile Einheit (Richards et al., 2018).

Diese enge Verzahnung der glatten Muskelzellen mit dem elastischen Fasernetzwerk ermöglicht der Aorta die sog. Windkesselfunktion. Dies bedeutet, dass sich die Aorta während der Systole durch das ausgeworfene Herzschlagvolumen ausdehnt und in der Diastole bedingt durch die Rückstellkräfte der elastischen Fasern wieder zusammenzieht. Somit ist die Integrität der kontraktilen Einheiten innerhalb der Aortenwand wichtig für die Entstehung des systolischen und diastolischen Blutdrucks (Emmott et al., 2016).

Die Entstehung thorakaler Aortenaneurysmen beruht meistens auf der Schwächung der kontraktilen Einheiten der Tunica Media. Charakteristische Zeichen dabei sind eine Fragmentierung, Disruption und Degradierung elastischer Fasern (Emmott et al., 2016). Aufgrund dieser empfindlichen Störung der kontraktilen Einheiten kommt es zu einer Beeinträchtigung der Windkesselfunktion der Aorta. Als Reaktion auf die progrediente Zerstörung der Architektur der Gefäßwand sezernieren die glatten Muskelzellen vermehrt Proteine wie MMPs für die EZM, die allerdings ihrerseits selbst die proteolytische Spaltung der elastischen Fasern katalysieren (Emmott et al., 2016).

Beim Marfan-Syndrom existiert defektes Fibrillin-1 in der EZM, sodass es zu einer defekten und instabilen Anordnung von Mikrofibrillen kommt. Dies aktiviert pathologische Signalkaskaden, die zu einer pathologischen Umstrukturierung der EZM führen und die Aortenwand dabei weiter schwächen. Genauere Untersuchungen der Pathogenese des Marfan-Syndroms deuten darauf hin, dass die Entstehung der Aortenaneurysmen durch ein komplexes interaktives Zusammenspiel von verschiedenen Phänomenen wie Inflammation, Apoptose, einem gestörten Remodeling der EZM und pathologischer Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) entstehen.

2.4.2. Fibrillin-1

Fibrillin-1 ist ein 350 kDa schweres Glykoprotein, das maßgeblich an der Organisation der extrazellulären Matrix beteiligt ist. Es wird kodiert von einem 65 Exons langen Genabschnitt auf dem langen Arm im Bereich 15q21.1 (Lemaire et al., 2011). Die Aufgabe von Fibrillin-1 besteht darin, im extrazellulären Bereich 10-12 nm lange Fibrillen zu bilden und damit dem jeweiligen Gewebe Stabilität zu verleihen (Robinson et al., 2006). Außerdem bindet das Protein Integrin-like-Rezeptoren von glatten Muskelzellen und ermöglicht damit die Zell-Matrix-Kommunikation (D'Arrigo et al., 1998).

Fibrillin-1 hat eine modular aufgebaute Struktur und umfasst 47 Epidermal growth factor-Domänen (EGF), 7 Transforming Growth Factor- β -Bindungsstellen (TGF- β), eine Prolin-reiche Region und jeweils eine C- bzw. N-terminale Region. Die jeweiligen EGF-Domänen beinhalten ca. 45 Protein- und 6 Cysteinreste, die miteinander als 3 Disulfidbrücken verbunden sind. Bei Mutationen im Fibrillin-1-Gen kommt es zu einer gestörten Anordnung der Mikrofibrillen,

sodass kein funktionierendes stabiles Fibrillennetzwerk in der EZM existiert. Das wiederum sorgt für eine gestörte Anordnung von Elastinfilamenten und führt letztendlich zu einer strukturellen Schwächung der Aortenwand.(Eldadah, Brenn, Furthmayr, & Dietz, 1995)

Die Fibrillin-1-Mutationsdatenbank beinhaltet ca. 3000 Mutationen. Diese umfassen sowohl Punktmutationen als auch große strukturelle Mutationen. Mutationen in der ersten Hybriddomäne bewirken keine relevante Beeinträchtigung der Anordnung von Mikrofibrillen (Charbonneau et al., 2010). Jedoch sind Mutationen in den EGF-Domänen deutlich gravierender, da hier die Anordnung des Fibrillennetzwerks erheblich beeinträchtigt wird (Arbustini et al., 2005).

Prinzipiell kann die genaue Stelle der Mutation im Gen eine Vorhersage über die Symptomatik treffen. Beispielsweise haben Mutationen in den Exons 24-32 eine sehr schlechte Prognose. Hier ist die Mutation derart stark ausgeprägt, sodass die klinische Symptomatik sich bereits beim Neugeborenen bemerkbar macht und als neonatales Marfan-Syndrom bezeichnet wird. Die betroffenen Patienten haben bereits kurz nach der Geburt schwerwiegende Klappenfehler, ein Lungenemphysem und eine massive Aortendilatation und sterben in der Regel nach 2 Jahren aufgrund von schwerer Herzinsuffizienz (Revenu et al., 2004).

Aufgrund der unterschiedlichen Mutationen ist die klinische Symptomatik beim Marfan-Syndrom sehr heterogen. Außerdem gibt es weitere genetisch bedingte Erkrankungen mit Mutationen im Fibrillin-1-Gen wie das familiäre Ectopia-Lentis-Syndrom oder das Weill-Marchesani Syndrom. Aufgrund der teilweise klinischen Überlappung der Krankheiten ist eine genaue genetische Untersuchung erforderlich.

2.4.3. Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind wichtige Enzyme des Körpers für eine Vielzahl an Prozessen wie der Embryonalentwicklung, inflammatorischen Prozessen und auch der Gewebdefektheilung. Im Rahmen des Marfan-Syndroms ist die Aktivität von MMPs deutlich erhöht, somit haben sie eine wichtige Funktion bei der Entstehung des Marfan-Syndroms. Untersuchungen von Aorten- und Herzklappengewebe aus OP-Resektaten von Marfan-Patienten belegen, dass eine vermehrte Expression von MMP 2&9 in der Aortenwand existiert und ein direkter Zusammenhang zu einer vermehrten Fragmentierung von elastischen Fasern und damit einer Schwächung des Gewebes besteht (Ada W.Y. Chung et al., 2007). Des Weiteren konnte in kultivierten glatten Muskelzellen von Marfan-Patienten eine erhöhte Expression von MMP-2 gefunden werden, die in Zusammenhang mit einer verstärkten Apoptose der glatten Muskelzellen stehen soll (Nataatmadja et al., 2003).

Als Mechanismus für die vermehrte Fragmentierung von elastischen Fasern ist gezeigt worden, dass MMPs elastische Fasern durch Proteolyse spalten können und dadurch ein

enormes vaskuläres Remodeling provozieren, das langfristig sowohl die glatten Muskelzellen als auch die EZM zerstört (Nataatmadja et al., 2003).

Außerdem konnte auch in murinen Marfan-Modellen wie dem $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Modell als auch dem mg^R/mg^R -Modell gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von MMP 2&9 vorhanden ist. Diese erhöhte Expression stand im Zusammenhang mit vermehrten Strangbrüchen der elastischen Fasern und einem reduzierten Elastingehalt in der Aortenwand. (Ada W.Y. Chung et al., 2007)

Die Bedeutung der MMPs für die Entstehung von Aortenaneurysmen wurde bekräftigt durch die pharmakologische Behandlung von Marfan-Mäusen mit Doxzyklin, das unter anderem ein unspezifischer Inhibitor von MMPs ist. Hier konnte eine signifikant verlängerte Überlebensrate und deutlich spätere Entwicklung des Aneurysmas bei den behandelten mutierten Mäusen im Vergleich zu deren Kontrollgruppe beobachtet werden (Ada W.Y. Chung, Clarice Yang, Radomski, & Van Breemen, 2008) (Pylayeva-Gupta, 2011).

2.4.4. TGF- β -Signal-Aktivität

Die Rolle des Zytokins TGF- β in Bezug auf die Pathomechanismen der Aortenaneurysmen beim Marfan-Syndrom war in der Vergangenheit Gegenstand intensiver Recherchen. TGF- β ist ein enorm wichtiges Zytokin für die vaskuläre Homöostase und an verschiedenen Prozessen wie der Embryogenese, der Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie an der Umstrukturierung der EZM beteiligt (Massague, 2000). Nach der Herstellung von TGF- β wird es mit seinem N-Terminus an das sog. „fibrillin-like latent TGF- β binding protein“ (LTBP) gebunden und gespeichert. Ohne die Bindung an LTBP kann TGF- β nicht biologisch aktiv werden (Mazzieri et al., 2005). LTBP wiederum ist an Fibrillin-1 gebunden, sodass intaktes Fibrillin-Mikrofibrillen nötig sind, um die Bindung von TGF- β an LTBP aufrecht zu erhalten und damit eine Aktivierung von TGF- β zu verhindern (Saharinen, Taipale, Monni, & Keski-Oja, 1998).

Beim Marfan-Syndrom wird aufgrund der Fibrillin-1-Mutation die Bindung von TGF- β an LTBP aufgelöst und TGF- β unkontrolliert in seiner biologisch aktiven Form in die EZM freigesetzt (Dietz, 2007). Dort kann es auf verschiedene Weise eine Zerstörung der EZM bewirken. Zum einen aktiviert es MMPs, die ihrerseits elastische Fasern proteolytisch spalten und damit die Aortenwand schwächen (Eunsung Mouradian, 2008). Zum anderen bewirkt es eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die wiederum eine weitere Freisetzung von aktivem TGF- β vom LTBP begünstigen (Barcellos-Hoff & Dix, 1996).

In mg^R/mg^R -Mäusen wurde eine Korrelation zwischen einer erhöhten Konzentration von TGF- β und der Zerstörung elastischer Fasern in der Aortenwand festgestellt (Howell, Popovic, Metz, & Wilson, 2014). Zur Prüfung der Hypothese, dass TGF- β maßgeblich an der Spaltung

elastischer Fasern beteiligt ist, wurde in einem weiteren mg^R/mg^R -Mausmodell zusätzlich LTBP deletiert, um eine Aktivierung von TGF- β zu verhindern.

Hier zeigte sich trotz der mg^R/mg^R -Mutation eine deutlich verminderte Disruption elastischer Fasern, keine Ausbildung von Aneurysmen und eine deutlich verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zu den mg^R/mg^R -Wurfgeschwistern, die keine Mutation für LTBP enthielten.

In $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mäusen wurden Lungenemphyseme festgestellt, die mit einer erhöhten Apoptoserate und einer vermehrten TGF- β -Aktivität korrelieren. Bei perinataler Antagonisierung von TGF- β durch einen neutralisierenden Antikörper zeigten die $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mäuse eine deutlich geringere Apoptoserate und eine normale Lungenentwicklung (Uriarte et al., 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch TGF- β -neutralisierende Antikörper die Entstehung von thorakalen Aortenaneurysmen (Habashi et al., 2006) und die Entwicklung eines Mitralklappenprolaps (Ng et al., 2004) verhindert werden kann.

Trotz dieser vielversprechenden Erkenntnisse, die für eine entscheidende Rolle der TGF- β -Signalaktivität in der Pathogenese des Marfan-Syndroms sprechen, gibt es Limitationen für diese Annahme. Während eine TGF- β -Hemmung mit einem neutralisierenden Antikörper an Tag 16 die Entstehung eines Aortenaneurysmas sogar beschleunigt, zeigte sich bei einer Hemmung an Tag 45 eine deutliche Abschwächung der Dilatation der Aorta. Dies lässt vermuten, dass die biologische Aktivität von TGF- β in verschiedenen Entwicklungsstadien eine unterschiedliche Auswirkung auf das Remodeling in der EZM hat (Cook et al., 2015).

In einer anderen Studie wurde an Mäusen der Einfluss von TGF- β untersucht, indem betroffene Mäuse eine TGF- β -Rezeptor II-Defizienz aufwiesen, sodass TGF- β seine Wirkung nicht entfalten konnte. Interessanterweise zeigten diese Mäuse eine noch stärkere Entwicklung des Aneurysmas im Vergleich zu den herkömmlichen $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mäusen. Dies zeigt, dass die Mäuse auch ohne Einfluss von TGF- β Aortenaneurysmen entwickeln und lässt die Vermutung zu, dass TGF- β nicht der alleinige Mediator der Pathogenese von Aortenaneurysmen beim Marfan-Syndrom ist.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse kann man resümieren, dass die exakte Rolle von TGF- β für die Entstehung von Aortenaneurysmen im Rahmen des Marfan-Syndroms nicht abschließend geklärt ist. Es erscheint jedoch sehr wahrscheinlich, dass TGF- β nicht alleine als Antwort auf den Fibrillin-1-Gendefekt für die progrediente Schwächung der Aortenwand verantwortlich ist, sondern mehrere Faktoren Einfluss auf die strukturellen Umbauprozesse in der Aorta nehmen.

2.4.5. Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies

Ein ebenfalls wichtiger Einflussfaktor in der Pathophysiologie der Entstehung eines Aneurysmas ist die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). In intaktem Gewebe ist die Produktion von ROS und deren Abbau ausgeglichen, während ein Übergewicht der ROS-Produktion zu massivem oxidativem Stress führt und schädlich für die DNA und Proteine ist (Niki, 2018). Der größte Anteil der ROS entsteht als Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien, während der restliche Teil durch membranständige NADPH-Oxidasen (NOX) generiert wird, die Elektronen über die Membran transportieren und dann Sauerstoff zu Superoxid-Radikalen reduzieren (O_2^-). O_2^- reagiert anschließend entweder spontan oder durch die Katalyse von Superoxid-Dismutasen zum weniger reaktionsfreudigem Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches daraufhin selbst mit der Umgebung reagiert.

Beim Marfan-Syndrom findet sich typischerweise ein erhöhter ROS-Gehalt in der Aortenwand (Jiménez-Altayó et al., 2018). Dabei korreliert die erhöhte ROS-Konzentration mit einer endothelialen Dysfunktion und einer verschlechterten Kontraktilität der Gefäßwand (Yang, van Breemen, & Chung, 2010). Eine Depletion von NOX-4 in einem $Fbn1^{C1039G/+}$ -Mausmodell führt zu einer verbesserten Funktion des Endothels, einer geringeren Fragmentierung elastischer Fasern und einer deutlich abgeschwächten Dilatation der Aorta (Jiménez-Altayó et al., 2018).

2.4.6. Rolle der glatten Muskelzellen

Die Entstehung des Aneurysmas beim Marfan-Syndrom ist nicht nur assoziiert mit der Zerteilung elastischer Fasern und dem pathologischen Remodeling der extrazellulären Matrix. Vielmehr spielt auch die endotheliale Dysfunktion und reduzierte Kontraktilität der glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle (Ada W.Y. Chung et al., 2007).

In der histopathologischen Analyse von Aortenresektaten von Patienten mit Marfan-Syndrom finden sich sog. „cystic medial degeneration“ (CMD). Dies sind Areale in der Aortenwand, die geprägt sind von zystischen Läsionen, Zerstörung der EZM, Apoptosen von glatten Muskelzellen und Zerstörung der lamellaren Organisation der elastischen Fasern (Yuan & Jing, 2011).

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die vermehrte Expression von MMP2&9 zu einer vermehrten Apoptose von glatten Muskelzellen führt (Emrich et al., 2015).

Aufgrund der Mutation im Fibrillin-1-Gen verändert sich die Quartärstruktur des Fibrillin-1-Moleküls und dadurch existiert eine veränderte Zell-Matrix-Kommunikation zwischen den glatten Muskelzellen und der EZM. Aufgrund dieser gestörten Kommunikation existiert offenbar eine Aktivierung der proapoptotischen Proteine Caspase 3&9. Parallel dazu findet man eine geringere Expression der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-2.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich Caspasen auf der Zelloberfläche von glatten Muskelzellen in der Aorta ascendens befinden. Des Weiteren zeigte eine Behandlung von

Mäusen mit einem Pan-Caspase-Inhibitor ein deutlich kleineres Aortenaneurysma als in der Kontrollgruppe. Histopathologisch zeigte sich in den Aorten von behandelten Mäusen eine geringere Rate apoptotischer Prozesse der glatten Muskelzellen, eine geringere Aktivierung der MMP 2&9 und daher auch eine geringere Fragmentierung von elastischen Fasern (Emrich et al., 2015). Diese Befunde zeigen, dass die glatten Muskelzellen eine Assoziation und womöglich ein Faktor für die Entstehung von Aortenaneurysmen im Rahmen des Marfan-Syndroms spielen.

2.4.7. Fragmentierung der Extrazellulärmatrix

Im Rahmen des Marfan-Syndroms liegt Fibrillin-1 als ein fragmentiertes und damit funktionloses Protein in der EZM vor. Beispielsweise zeigte sich in humanen glatten Muskelzellen von Patienten mit Marfan-Syndrom, dass Fibrillin-1 in der EZM nicht nur reduziert, sondern auch fragmentiert und damit zum Teil funktionslos ist (Nataatmadja et al., 2003). Weiterhin konnte man auch in humanem Aortengewebe eine deutliche Fragmentierung von Fibrillin-1 finden (Fleischer, Nousari, Anhalt, Stone, & Laschinger, 1997).

Durch die posttranslationale Modifikation eines Proteins verändert sich dessen Quartärstruktur und damit auch dessen Funktion. Dies bedeutet, dass eine posttranslational modifizierte EZM Signalkaskaden aktiviert, die eine nicht modifizierte EZM mit intakten Proteinen nicht aktivieren würde (Homandberg, 1999). Bezogen auf die Pathogenese des Marfan-Syndroms ergeben sich für Fibrillin-1 mehrere Mechanismen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass rekombinante Fibrillin-1-Fragmente die MMPs 1&13 in kultivierten Fibroblasten aktivieren (Booms et al., 2005). Außerdem blockieren rekombinante Fibrillin-1-Fragmente, die die Exons 44-49 enthalten, die Bindung von LTBP-1 an den N-Terminus von Fibrillin-1. Dadurch wird aktives TGF- β frei und kann seinerseits seine Wirkung entfalten (Chaudhry et al., 2007).

In einem mg^R/mg^R -Modell konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Fibrillin-1 und Elastin-Abbauprodukte bei einer Degradierung elastischer Fasern eine chemotaktisch stimulatorische Wirkung auf die Migration von Makrophagen in die Aortenwand haben (G. Guo et al., 2006). Daher scheint es möglich, dass bereits das defekte Fibrillin-1 direkt eine Immunantwort provoziert und somit inflammatorische Prozesse schon sehr früh in der Pathogenese des Aortenaneurysmas beteiligt sind.

2.4.8. Inflammatorische Prozesse

Es gibt Hinweise darauf, dass eine inflammatorische Komponente im Rahmen von Aortenaneurysmen beim Marfan-Syndrom eine wichtige Bedeutung hat. Jedoch ist noch unklar, ob inflammatorische Zellen bereits im Anfangsstadium die Entstehung des

Aneurysmas katalysieren oder in einem späteren Stadium als Folgeerscheinung der Umbauprozesse in die Aortenwand sekundär migrieren und somit nur eine Folgeerscheinung der Entstehung des Aneurysmas sind.

Immunhistochemische Untersuchungen von Aortenextrakten von Patienten mit Marfan-Syndrom und Patienten mit familiären oder sporadischen thorakalen Aortenaneurysmen (TAA) zeigten eine vermehrte Akkumulation von T-Zellen (CD3+) und Makrophagen (CD68+) in der direkten Umgebung von CMDs, der Adventitia und in den Vasa vasorum. Außerdem war die Gesamtzahl der CD3+- und CD68+- Zellen in den Gewebeproben Marfan-Patienten deutlich erhöht im Vergleich zu den korrespondierenden Aortenresektaten der Patienten mit sporadischen TAA (He et al., 2006). Weiterhin zeigte sich, dass sich die Immunzellen gehäuft in der Nähe von CMD befinden. Diese CMDs sind typisch für TAAs und werden als sog. „noninflammatorische“ Läsionen beschrieben. An diesen Stellen findet eine starke Fragmentierung von elastischen Fasern, eine enorme fokale Fibrose und eine vermehrte Apoptose von glatten Muskelzellen statt (He et al., 2006).

Jedoch beruhen diese Ergebnisse auf der Analyse von Aortengewebe von Marfan-Patienten, die sich einer chirurgischen Therapie unterzogen haben und sich damit bereits im Endstadium der Aneurysmaformation befanden.

Eine moderate Infiltration von Monozyten/Makrophagen findet sich auch in murinen Marfan-Syndrom-Modellen. In $FBN1^{C1039G+/-}$ -Mäusen konnte eine vermehrte Akkumulation von Makrophagen primär in der Adventitia und den Vasa vasorum, jedoch auch in der Tunica Media, beobachtet werden (Lygia Pereira et al., 1999).

In dem für Fibrillin-1 hypomorphem Mausmodell mg^R/mg^R infiltrieren Makrophagen bereits ab einem Alter von 8 Wochen, wobei eine Dilatation der Aorta ascendens erst nach ca. 12 Wochen erkennbar ist (Lygia Pereira et al., 1999). Außerdem ist hier die Konzentration der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Macrophage Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Schlüsselenzyme für die Migration und Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen, stark erhöht. Dabei korrelierte die Konzentration von IL-6 und MCP-1 mit der Degradierung elastischer Fasern und der Inflammation in der Adventitia (Hibender et al., 2019)(Ju et al., 2014).

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass IL-6 und MCP-1 eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und somit für die Entstehung des Aneurysmas besitzen.

Des Weiteren konnte ebenfalls in einem mg^R/mg^R -Modell gezeigt werden, dass die durch Spaltung von elastischen Fasern frei werdenden Elastinspaltprodukte eine chemotaktisch stimulatorische Wirkung auf Makrophagen haben (G. Guo et al., 2006).

Dies belegt, dass die Fragmentierung von elastischen Fasern eine direkte inflammatorische Antwort provoziert. Dadurch entsteht ein Circulus vitiosus und damit eine progrediente

Elastinfragmentierung. Die im mg^R/mg^R -Modell beschriebene chemotaktische Eigenschaft von Elastinspaltprodukten konnte ebenfalls in Aortenresektaten von betroffenen Patienten bestätigt werden (Gao Guo et al., 2011).

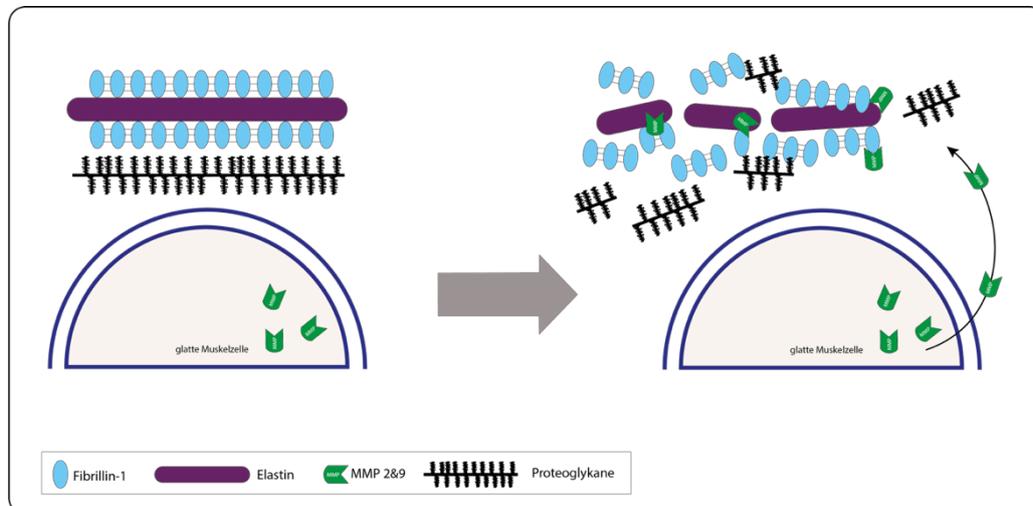


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese des Marfan-Syndroms. links: intakte Aortenwand mit strukturierter und gleichmäßiger Anordnung der EZM repräsentativ für eine intakte Gefäßwand; rechts: desorganisierte EZM mit Zerteilung extrazellulärer Proteine

2.5 Myeloperoxidase

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym der Superfamilie der mammalianen Hämperoxidasen. Erstmals beschrieben wurde dieses Enzym im Jahre 1958 in einer Forschungsarbeit von Kjell Agner. Aufgrund seiner grünen Farbe wurde es zunächst als Verdoperoxidase bezeichnet, später erkannte man jedoch, dass es der myeloischen Zellreihe entspringt und daher wurde dem Enzym der Name „Myeloperoxidase“ (MPO) gegeben. MPO ist ein bedeutsames Enzym zur Abwehr von Pathogenitätsfaktoren und gleichzeitig aber auch ein wichtiger Mediator von kardiovaskulär-inflammatorischen Erkrankungen (Lau & Baldus, 2006).

2.5.1. Struktur

Das Hämprotein ist ca. 150 kDa schwer und hat eine homodimere Struktur. Die einzelnen Monomere sind aus einer schweren und einer leichten Untereinheit zusammengesetzt. An die schwere Kette ist ein Häm-Molekül gebunden, welches dem Protein eine intensiv grüne Farbe verleiht. Die Hauptlokalisationen von MPO sind in der azurophilen Granula des neutrophilen Granulozyten, in der das Protein bis zu 5% der Gesamttrockenmasse der Zellen ausmacht. Darüber hinaus findet man MPO auch zu einem deutlich geringeren Anteil in Monozyten,

hepatischen Kupfer-Zellen sowie in Mikroglia-Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) (Lau & Baldus, 2006).

MPO hat eine entscheidende Bedeutung für die Migration neutrophiler Granulozyten aus dem intravasalen Bereich in den extravasalen Raum. Aufgrund des hohen Anteils von Arginin in der Aminosäurezusammensetzung besitzt MPO eine hochkationische Oberfläche (isoelektrischer Punkt >10). Dadurch kann es die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen dem neutrophilen Granulozyten und der Endothelzelle egalisieren und somit die Transzytose des neutrophilen Granulozyten durch das Endothel ermöglichen (Klinke et al., 2011).

2.5.2. Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr

MPO entfaltet seine Wirkung durch den Halogenierungszyklus und den Peroxidasezyklus. Beiden Reaktionstypen liegt ein gemeinsames System bestehend aus dem Enzym MPO, H_2O_2 und weiteren oxidierbaren Kofaktoren zugrunde. H_2O_2 entsteht primär durch die Dismutation von Superoxid, das wiederum als Produkt von NOX aktivierter Zellen generiert wird. Bei einer Reaktion mit H_2O_2 wird MPO durch die Aufnahme von 2 Elektronen zum hoch reaktiven Compound I oxidiert. Dieser oxidiert ein breites Spektrum an oxidierbaren Stoffen wie Halogene (Cl^- , Br^- oder SCN^-) zu deren korrespondierenden Säuren (HOCl, HOBr, HOSCN). Während dieses Reaktionsschritts gibt Compound I 2 Elektronen ab und stellt somit wieder seine ursprüngliche Grundform her, die dann einen erneuten Reaktionszyklus erlaubt. Diesen Reaktionsablauf (Grundform \rightarrow Compound I \rightarrow Grundform) nennt man Halogenierungszyklus (Bakkenist, De Boer, Plat, & Wever, 1980). Aufgrund der hohen Verfügbarkeit von Cl^- im Körper ist dieses Anion auch das häufigste Substrat unter physiologischen Bedingungen. Die durch MPO katalysierte Reaktion von Cl^- zu hypochloriger Säure (HOCl) unter Anwesenheit von H_2O_2 ist hoch reaktiv und bewirkt Chlorinierungen und Oxidationen von anderen biologischen Substraten. Beispielsweise ermöglicht es neutrophilen Granulozyten unter Beihilfe von HOCl auf diesem Wege mikrobizide Reaktionen durchzuführen (Fliss, 1988).

Der zweite Reaktionszyklus ist der Peroxidasezyklus. Dabei wird Compound I durch Oxidierung von verschiedenen anorganischen und organischen Substraten unter Abgabe von einem Elektron zu Compound II reduziert. Compound II wird unter der Abgabe von einem weiteren Elektron wieder in die Grundform zurück reduziert (Marquez, Dunford, & Van Wart, 1990). Im Rahmen des Peroxidasezyklus entsteht unter anderem durch Oxidierung von Nitrit (NO_2^-) das hoch instabile Nitrogendioxid (NO_2) (Eiserich et al., 2002). NO_2 ist eine hoch instabile Verbindung und führt umgehend zu einer Nitrierung von Proteinresten und einer Lipidperoxidation. Bei einer Reaktion von NO_2 mit Tyrosinresten von Proteinen entsteht

Nitrotyrosin, eine posttranslationale Modifikation, und Indikator für oxidativen Stress und inflammatorische Aktivität in entzündetem Gewebe (Baldus et al., 2002).

2.5.3. Transzytose und posttranslationale Proteinmodifikationen

Nach der Sekretion von MPO aus neutrophilen Granulozyten bindet MPO an die Oberfläche des Endothels. Die Bindung wird hauptsächlich ermöglicht durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem stark kationisch geladenen MPO und den negativ geladenen Heparan-Glykosaminoglykan-Ketten. MPO wird von der Endothelzelle per Transzytose auf die basolaterale Membran transportiert und gelangt dadurch in den subendothelialen Raum, wo es mit Stickstoffmonoxid (NO) reagieren kann (Baldus et al., 2001). Im subendothelialen Raum kolokalisiert MPO mit Fibronectin, einem Protein der EZM. Daher ist dieses Protein ein präferiertes Ziel für posttranslationale Modifikationen (Baldus et al., 2001). Das hierfür benötigte Oxidans ist neben HOCL auch NO₂, das durch die Oxidation von NO entsteht und letztendlich in Form von Chloro- bzw. Nitrotyrosin die Quartärstruktur von Fibronectin alterniert (Baldus et al., 2002).

Posttranslationale Modifikationen sind nicht nur Marker inflammatorischer Prozesse, sondern sie bewirken auch durch die Veränderung der Quartärstruktur eine veränderte bzw. beeinträchtigte biologische Funktion (Vissers & Thomas, 1997).

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass MPO L-Arginin durch eine Chlorinierung verändert und somit dies nicht mehr als Substrat für die NO-Synthase fungieren kann. Dadurch wird die NO-Bioverfügbarkeit gesenkt, wodurch eine endotheliale Dysfunktion auf Dauer verstärkt wird.

Auch das endotheliale Protein Perlecan ist eine potenzielle Zielstruktur von MPO. Hier zeigte sich, dass unter Einfluss von MPO-spezifischen Reaktionsprodukten wie HOCl und hypobromige Säure (HOBr) Perlecan oxidativen Veränderungen ausgesetzt ist. Dadurch wird eine Erhöhung der Permeabilität der subendothelialen Matrix ermöglicht, die Zell-Zell-Interaktionen stark beeinträchtigt und eine veränderte Proliferation der Gefäßzellen bewirkt. Diese Prozesse sind von enormer Bedeutung in chronischen inflammatorischen Prozessen wie Arteriosklerose (Rees et al., 2010).

Das endotheliale Protein Laminin-111 unterliegt ebenfalls dem Einfluss von MPO, da es sehr stark oxidativ verändert wird. Diese durch MPO induzierten Modifikationen sind von enormer Bedeutung, da durch eine alternierte Funktion von Laminin das Endothel geschwächt und die Zell-Matrix-Interaktion gestört wird. Auf diese Weise wird die Ablösung arteriosklerotischer Plaques von den Gefäßwänden begünstigt und hämodynamisch relevante Folgeschäden für den Kreislauf wahrscheinlicher. (Nybo et al., 2019).

2.5.4. Reduzierung der NO-Bioverfügbarkeit

Neben direkten posttranslationalen Proteinmodifikationen nimmt MPO auch über eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit Einfluss auf die vaskuläre Homöostase. Diese Erkenntnis wird durch die Tatsache gestützt, dass in MPO-defizienten Mäusen im Rahmen von akut inflammatorischen Prozessen eine verbesserte endotheliale Funktion und eine höhere NO-Bioverfügbarkeit vorhanden ist (C. Zhang et al., 2001). Außerdem konnte bei Patienten mit einem Myokardinfarkt und anschließender Reperfusion eine Korrelation zwischen erhöhten MPO-Plasmaspiegeln und einer vermehrten H_2O_2 -Konsumption gemessen werden.

NO wird auf verschiedenen Wegen zu NO_2^- oxidiert (Eiserich et al., 2002). Zum einen kann dies durch MPO-unabhängige Faktoren wie beispielsweise Superoxid geschehen. Zum anderen kann es im Peroxidasezyklus durch Compound I oder II zu NO_2^- oxidiert werden. Diese Reaktion ist jedoch unter physiologischen Bedingungen eher unwahrscheinlich, da konkurrierende Reduktionsmittel wie Tyrosin oder Ascorbinsäure eine ca. um den Faktor 1000 erhöhte Konzentration haben und somit deutlich wahrscheinlichere Reaktionspartner darstellen. NO_2^- stellt wiederum ein Substrat für MPO dar. MPO oxidiert dabei NO_2^- zu NO_2 , das aufgrund seiner hohen Instabilität mit Proteinketten oder anderen Stoffen reagiert (The, Nitrification, Delhi, & Nitrification, 1998).

Neben einer direkten Interaktion mit NO kann MPO auch über eine Reduzierung der Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) die NO-Bioverfügbarkeit senken. Beispielsweise kommt es durch MPO zu einer Chlorinierung von L-Arginin, sodass dies nicht mehr als Substrat für die eNOS zur Verfügung steht. Darüber hinaus senken durch MPO modifizierte Lipoproteine die Expression der eNOS und verringern somit die NO-Bioverfügbarkeit.

2.5.5. Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen

Auf der einen Seite sind die katalytischen Eigenschaften von MPO wichtig für die Pathogenabwehr im Rahmen des angeborenen Immunsystems, jedoch gibt es Beweise dafür, dass die durch MPO vermittelten oxidativen Modifikationen im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen sich gegen das körpereigene Gewebe richten und damit schädlich für den Organismus sind. Dazu zählen beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen, Nierenerkrankungen, inflammatorische Prozesse in der Lunge und in der Haut sowie neurologische Erkrankungen wie Multiple Sklerose.

Bei klinischen Untersuchungen von Patienten konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten eines chronischen Koronarsyndroms und erhöhten MPO-Plasmaspiegeln im Blut festgestellt werden (R. Zhang et al., 2001). In weiter gehenden Untersuchungen zeigte sich sogar, dass erhöhte MPO-Plasmaspiegel bei Patienten mit einem chronischem Koronarsyndrom mit einer

erhöhten kardiovaskulären Mortalität einhergehen (Scharnagl et al., 2014). Darüber hinaus eignet sich bei gesunden Patienten MPO als prädiktiver Parameter für das spätere Auftreten eines chronischen Koronarsyndroms (Meuwese et al., 2007), da die inflammatorisch bedingten Umbauprozesse in der Gefäßwand lange vor der Manifestation der Symptomatik auftreten. Des Weiteren spielt MPO auch eine wichtige Rolle beim akuten Koronarsyndrom. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die MPO-Plasmaspiegel bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt deutlich erhöht sind im Vergleich zu Patienten mit einer Angina Pectoris (Khan, Sharif, & Khan, 2011) oder Patienten mit stabilem chronischem Koronarsyndrom (Goldmann et al., 2009). Zudem migriert MPO durch die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Infarktareal und spielt daher eine wichtige Rolle beim Remodeling. In Versuchen an Mäusen konnte nach Ischämie und Reperfusion durch eine pharmakologische Inhibition von MPO eine verbesserte Ejektionsfraktion, ein verbessertes endsystolisches bzw. enddiastolisches Volumen und eine geringere Hypertrophie des linken Ventrikels gemessen werden im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen (Ali et al., 2016). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von MPO im Rahmen von strukturellen Umbauprozessen nach Myokardinfarkt.

Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt MPO eine wichtige Rolle zu. Bei betroffenen Patienten sind erhöhte MPO-Plasmaspiegel zu finden (Rudolph et al., 2007). In experimentellen Untersuchungen der Herzinsuffizienz bei Mäusen zeigt sich bei MPO-defizienten Mäusen eine geringere Hypertrophie des linken Ventrikels und eine geringere Immigration inflammatorischer Zellen in die Herzmuskelwand (Deuschl et al., 2014). Zusätzlich bewirkt MPO durch eine vermehrte Konsumption von NO eine endotheliale Dysfunktion, wodurch generell pathologische Prozesse innerhalb des Herzens aggraviert werden (Baldus et al., 2004).

2.5.6. MPO und Aneurysmen

Bisher gibt es Belege für eine Assoziation von MPO mit intrakraniellen Aneurysmen und abdominellen Aortenaneurysmen (AAA), während die Bedeutung von MPO im Rahmen von TAAs weitestgehend unklar ist.

Bei Patienten mit zerebralen Aneurysmen wurde nicht nur ein erhöhter MPO-Plasmaspiegel gemessen, sondern auch MPO in aneurysmatischem Gewebe nachgewiesen. In einem zugehörigem Mausmodell zeigten MPO-defiziente Mäuse eine signifikant geringe Inzidenz zerebraler Aneurysmen und hämorrhagischer Blutungsereignisse (Yi et al., 2015). Pathophysiologisch besteht bei zerebralen Aneurysmen eine Assoziation von MPO mit der Infiltration neutrophiler Granulozyten, dem strukturellem Umbau der Arterienwände und letztendlich mit der Ruptur der Aneurysmen (Ollikainen et al., 2018).

Bei AAAs gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass MPO eine wichtige Rolle einnimmt. In einem ApoE-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit Angiotensin II eine MPO-Defizienz vor der Entstehung eines Aortenaneurysmas schützen kann. Dabei wurde in den MPO-defizienten Mäusen eine deutlich geringere Makrophageninfiltration beobachtet. Die Aktivität der MMPs 2&9 in der Tunica Media von Gefäßwänden war herabgesetzt und es fand eine geringere Fragmentierung von elastischen Fasern statt (Kim et al., 2017). Bei Patienten mit AAA sind die MPO-Plasmaspiegel bereits schon ab einer geringen Dilatation der Aorta abdominalis zu beobachten (Ramos-Mozo et al., 2011) und MPO wurde sowohl in der Intima als auch in der Tunica Media nachgewiesen (Sherrah et al., 2017). Außerdem wurden zirkulierende neutrophile Granulozyten von AAA-Patienten entnommen und untersucht. Hierbei zeigte sich eine vermehrte Produktion von H₂O₂ und eine stärkere Ausschüttung von MPO im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ramos-Mozo et al., 2011).

Die Rolle von MPO bei TAAs ist bisher weitestgehend unklar. Bei Patienten mit TAAs konnte in aneurysmatischem Gewebe sowohl in der Intima als auch in der Tunica Media MPO nachgewiesen werden (Sherrah et al., 2017), wobei der Plasmaspiegel von MPO nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war (Sherrah et al., 2017). Insbesondere in Anwesenheit von strukturellen Gewebserkrankungen wie dem Marfan-Syndrom, ist die Bedeutung von MPO für die Entstehung bzw. den Progress von Aortenaneurysmen bisher nicht untersucht worden und daher bedarf es weiterer Zuwendung der Forschung, um die genaue Rolle von MPO zu eruieren.

2.6 Hypothese und Fragestellung

Die Pathophysiologie des Marfan-Syndroms ist bislang inkomplett verstanden. Es gibt einige Hinweise, dass inflammatorische Prozesse entscheidend an der Entstehung bzw. der Progression des Aortenaneurysmas beteiligt sind. Aus diesem Grund wird in der folgenden Studie die Rolle des Häm-Enzyms MPO analysiert. Durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kann MPO phänotypische Veränderungen bei glatten Muskelzellen und somit eine vaskuläre Hypertrophie, die Sekretion von Proteasen und eine Kalzifizierung der Gefäßwand bewirken. MPO aktiviert MMPs durch die Oxidation von inaktiven pro-MMP-Formen. Es potenziert das pathophysiologische Remodeling der endothelialen Glykokalix und gilt als positiver prädiktiver Indikator für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen.

In der vorliegenden Studie soll untersucht werden, inwiefern MPO eine entscheidende Rolle für den morphologischen und funktionellen Phänotyp der Aorta im Rahmen des Marfan-Syndroms spielt. Dabei wird vermutet, dass MPO durch seine oxidativen bzw. katalytischen Eigenschaften die Signalaktivität innerhalb der kontraktilen Einheiten zerstört und damit die Gefäßwand schwächt. Um die Hypothese zu prüfen, sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welche Funktion besitzt MPO in der Pathogenese des Aortenaneurysmas im Rahmen des Marfan-Syndroms?
- Führt ein Fehlen von MPO zu funktionellen kardiovaskulären Veränderungen im Marfan-Mausmodell?
- Welche pathogenetischen Mechanismen werden möglicherweise durch MPO induziert, sodass es zur Entstehung eines Aneurysmas kommt?

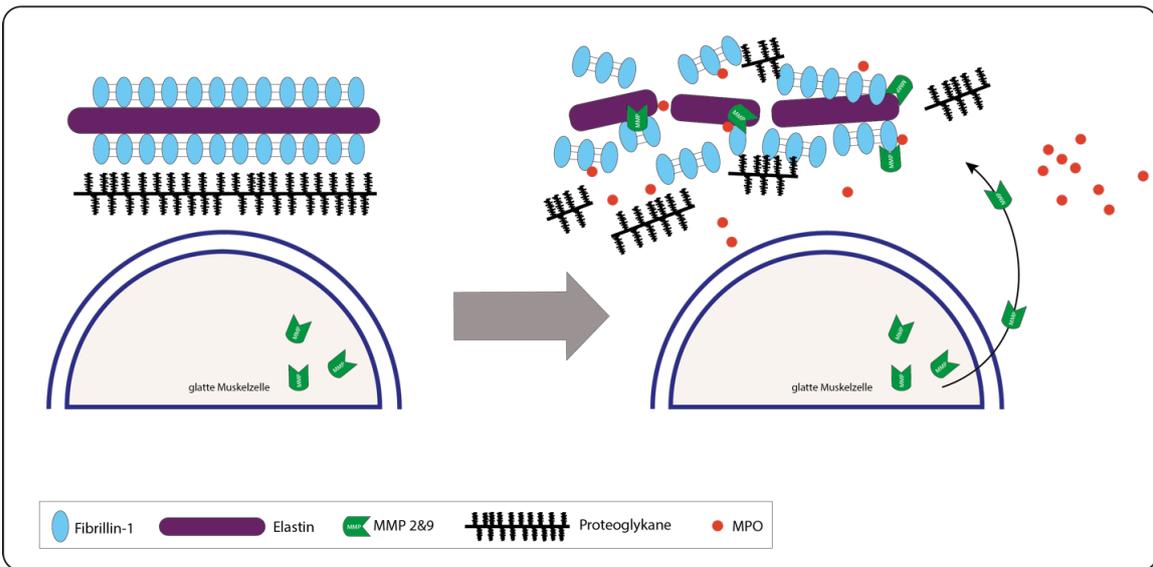


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pathogenese des Marfan-Syndroms und einem möglichen Einfluss durch MPO. links: intakte Aortenwand mit strukturierter und gleichmäßiger Anordnung der EZM repräsentativ für eine intakte Gefäßwand; rechts: desorganisierte EZM

3. Material und Methoden

3.1 Material

Bezeichnung	Hersteller
Formaldehyd 3,7%	Thermo Scientific (16%-ige Lösung)
PBS	Life Technologies Limited
Triton X-100	Sigma Life Sciences
Dapi	Sigma
Goat Serum	Sigma
Rotihistol	Carl Roth
Alkohol 70%/80%/90%	Th. Geyer
Dapi	Sigma
Resorcin-Fuchsin	Waldeck
Weigert A+B	Waldeck
HCl (37,5%)	Carl Roth
NaCl	Roth
CaCl	Merck
NaN ₃	Roth
HBSS	Thermo Fisher
DHE/DMSO	Thermo Fisher
Isofluran	Linde (CONOXIA GO ₂ X)
Eindeckmittel	Eukitt
Eindeckmittel für Fluoreszenzfärbungen	Dako Fluorescence Mounting Medium

Tabelle 1: Material

3.1.1. Antikörper

Primärer Antikörper	Spezifität	Spezies des Spendertiers	Hersteller
Anti-Cleaved-Caspase-3	monoklonal	Rabbit	Cell Signaling Technology
Anti-Nitrotyrosin	polyklonal	Rabbit	Sigma-Aldrich
Sekundärer Antikörper	Konjugat	Spezies des Spendertiers	Hersteller

Alexa Fluor 594 anti-Rabbit	Alexa Fluor 594	Ziege	BioLegend
-----------------------------	-----------------	-------	-----------

Tabelle 2: Antikörper

3.1.2. Reaktionspuffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
DHE-Reaktionspuffer	DHE/DMSO 1:2000
Gelatinase Reaktionspuffer	150 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,2 mM NaN ₃ , 50 mM Tris/HCl pH 7,6
Gelatinase Reaktionspuffer +EDTA	150 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,2 mM NaN ₃ , 50 mM Tris/HCl pH 7,6

Tabelle 3: Reaktionspuffer

3.1.3. Reaktionskit

Bezeichnung	Hersteller
MPO Elisa, mouse	HyCult Biotechnology

Tabelle 4: Reaktionskit

3.1.4. Mauslinien

Bezeichnung	Hersteller
C57BL6/J	The Jackson Laboratory (Maine, USA)
MPO ^{tm1lus/J}	The Jackson Laboratory
FBN1 ^{C1039G+/-}	The Jackson Laboratory

Tabelle 5: Mauslinien

3.2 Methoden

3.2.1. Tierexperimentelles Modell

Zur möglichst genauen Analyse des Pathomechanismus benutzt man transgenetisch veränderte Mäuse, die die Pathophysiologie des Marfan-Syndroms in einem tierexperimentellen Modell imitieren. Dabei wurde zunächst das sog. $mg\Delta$ - Mausmodell benutzt. Hier fand eine Deletion der Exons 19-24 statt, sodass betroffene Mäuse nur ca. 10% des Wild-Typ-Fibrillin-1 exprimieren. Während bei einer heterozygoten $mg\Delta$ -Mutation die Mäuse kaum von Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden sind, sterben bei einer homozygoten $mg\Delta$ -Mutation die betroffenen Tiere aufgrund schwerer kardiovaskulärer Manifestationen bereits in einem Alter von 3 Wochen.

Eine weitere Gruppe ist die mgR/mgR -Mauslinie. Hier findet eine Insertion von einer Neomycin-Kassette im Intron zwischen den beiden Exons 18 und 19 statt. Bei einer homozygoten Mutation haben betroffene Tiere eine ca. 5-fach geringere Expression des Wildtyp-Fibrillin-1. Sowohl homozygote als auch heterozygote Mäuse mit einer mgR -Mutation werden gesund geboren, jedoch sterben sie in einem Alter von ca. 4 Monaten aufgrund kardialer und pulmonaler Insuffizienz (Lygia Pereira et al., 1999).

Beide bereits genannten Mausmodelle zeigen drastische Verläufe der Fibrillin-Mutation, jedoch sind sie nicht repräsentativ für den menschlichen Verlauf des Marfan-Syndroms. Aus diesem Grund finden sie keine Berücksichtigung für die Versuche in dieser Studie. Stattdessen wurde das $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Modell (MFS-Mäuse) zur Repräsentation des Marfan-Syndroms in einem murinen Modell benutzt. Hier existiert eine Punktmutation im Fibrillin-1-Gen an Stelle 1039 der EGF-Domäne, sodass die Aminosäure Cystein durch Glycin ersetzt wird. Heterozygote Mäuse haben sowohl skelettale Manifestationen wie eine Wirbelsäulenskoliose als auch kardiovaskuläre Auffälligkeiten wie die Entwicklung eines Aortenaneurysmas. Nach ca. 12 Monaten sterben die Mäuse aufgrund einer akuten Aortendissektion. Aufgrund der sehr ähnlichen körperlichen Manifestationen eignet sich diese Mauslinie sehr gut als repräsentatives Modell für die Pathophysiologie beim Menschen (Judge et al., 2004).

Da ein zentraler Bestandteil dieser Studie der Vergleich einer MPO-Defizienz in Anwesenheit einer $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mutation ist, wurde die $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mauslinie mit der knockout Mauslinie $MPO^{tm1lus/J}$ ($Mpo^{-/-}$) gekreuzt. Diese Mauslinie wurde an der „University of California“ generiert und ist kommerziell in „The Jackson Laboratory“ erhältlich. Die Mutation für MPO ist homozygot und es wird daher kein Genprodukt für MPO generiert. Daher weisen die Leukozyten keine Peroxidaseaktivität auf und produzieren folglich keine hypochlorige Säure.

Bei Kreuzung der $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mauslinie mit der $MPO^{tm1lus/J}$ -Mauslinie entstand ein Mausphänotyp, der sowohl eine $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mutation aufweist, als auch eine MPO-Defizienz ($MPO^{-/-}$). Diese de-novo-Kreuzung ermöglichte nun den Vergleich des Einflusses einer MPO-Defizienz auf die $Fbn1^{C1039G+/-}$ -Mutation. Als repräsentatives Mausmodell für einen gesunden Menschen ohne eine Mutation im Fibrillin-Gen wurde eine C57BL6-Wildtyp-Mauslinie gewählt.

Für die durchgeführten Versuche wurden folgende Abkürzungen für die jeweiligen Gruppen gewählt:

MFS = $Fbn1^{C1039G+/-}$ und $MPO^{+/+}$

WT = $Fbn1^{C1039G+/+}$ und $MPO^{+/+}$

MFS/ $Mpo^{-/-}$ = $Fbn1^{C1039G+/-}$ und $MPO^{-/-}$

3.2.2. Organentnahme

Im Alter von 10 Wochen wurde bei den Mäusen die Organentnahme gemäß des Tierversuchsantrages getätigt. Zunächst wurde die Maus mit einer subkutanen Injektion von Buprenorphin anästhetisiert und anschließend mit Isofluran 4% narkotisiert. In einem ersten Schritt wurde dann durch einen Haut- und danach Bauchfellschnitt der Peritonealraum eröffnet. Dann wurde mit einer 27G-Kanüle der linke Ventrikel punktiert und das Blut (ca. 1ml) entnommen. Das Blut wurde anschließend zentrifugiert und das dadurch gewonnene Plasma bei -80 Grad Celsius bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Nach der Blutentnahme wurde das Zwerchfell durchtrennt und der rechte Vorhof eröffnet. Danach wurde der gesamte Blutkreislauf mit 10 ml NaCl-Flüssigkeit gespült. Im folgenden Schritt wurde dann die A. ascendens vom Aortenbogen getrennt und zusammen mit dem Herzen entnommen. Das entnommene Präparat wurde nun für 24 Stunden bei 4 Grad Celsius in 4% Formalin fixiert und danach in Paraffin gegossen.

Der Aortenbogen wurde ebenfalls entnommen und mit TissueTec eingebettet und sofort als Cryo-Block in flüssigem Stickstoff gefroren. Für die weitere Nutzung wurden die Cryo-Blöcke bei -80 Grad Celsius gelagert.

3.2.3. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden 4 qm dicke Schnitte angefertigt und anschließend nach folgendem Protokoll gefärbt:

Zunächst wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für ca. 5 Minuten aufgetaut und anschließend mit 3,7% Formaldehydlösung fixiert. Dann wurden die Schnitte mit PBS drei Mal

für 5 Minuten gewaschen und daraufhin wurde das Gewebe für 20 Minuten mit 0,1% Triton X-100/PBS permeabilisiert. Als nächstes wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10% Ziegenerum in einer 0,1% Triton X-100/PBS- Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern bezüglich Cleaved-Caspase 3 oder Nitrotyrosin bei 4 Grad Celsius über Nacht. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Schnitt auf jedem Objektträger mit einem IgG-Isotypantikörper behandelt. Am nächsten Tag wurden die Proben nach dreimaligem Waschen mit PBS mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln behandelt. Erneut wurden die Proben einem dreimaligen Waschgang unterzogen und daraufhin zur Kernfärbung für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI (1 µg/ml) inkubiert. Zum Schluss wurde erneut mit PBS zweimalig gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Dako-Medium eingebettet und mittels Keyence-Imaging-Software ausgewertet.

3.2.4. Trichrom-Masson-Färbung

Die Trichrom-Masson-Färbung dient der Darstellung von elastischen Fasern. Dabei wurden Paraffinschnitte zunächst ca. 15 Minuten in Rotihistol entparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte einer Dehydratation unterzogen, indem sie jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) eingetaucht wurden. Dann wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und daraufhin mit Resorcin-Fuchsin für 15 Minuten gefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte kurz in 7%-HCL eingetaucht und dann für ca. 10 Minuten gebläut. Danach wurden die Schnitte jeweils 5 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und zum Schluss 15 Minuten in Rotihistol inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt und mithilfe der Keyence Imaging Software ausgewertet.

3.2.5. In-situ-Zymographie

Die in-situ-Zymographie dient der Darstellung der Aktivität der MMPs 2&9. Hierbei wurde ein Gelatin-haltiges Proteinkonjugat, das einen fluoreszierenden Farbstoff enthält, auf die Schnitte gegeben. Dieses Gemisch ist spezifisch für MMP 2&9 und ermöglicht optimale Aktivitätsbedingungen. Bei einer erhöhten Proteolyse durch MMPs 2&9 entsteht eine verstärkte Fluoreszenz.

Als Basis zur Analyse wurden dafür ein Reaktionspuffer und eine EDTA-Reaktionspuffer hergestellt. Der Reaktionspuffer ermöglicht dabei die optimalen Bedingungen für eine maximale Aktivität der MMPs 2&9. Der EDTA-Puffer enthält zusätzlich EDTA, welches die Aktivität der MMPs 2&9 blockiert. Im ersten Schritt wurde zunächst 10 µg/ml DQ-Gelatin

sowohl im Gelatinase-Reaktionspuffer als auch im Gelatinase-EDTA-Puffer gelöst. In letzterem Puffer dient EDTA dazu, die spezifische Aktivität der MMPs 2&9 zu blockieren. Dann wurden 4 µm dicke Kryoschnitte bei Raumtemperatur 5 Minuten aufgetaut und anschließend mit der DQ-Gelatin-Gelatinase-Reaktionspuffer-Lösung bedeckt. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt auf jedem Objektträger mit dem DQ-Gelatin-EDTA-Puffer belegt. Anschließend wurden die Schnitte bei 37 Grad Celsius für 3 Stunden inkubiert. Danach wurden sie zunächst drei Mal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und dann mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingebettet.

3.2.6. Dihydroethidin-Färbung

DHE ist ein zellpermeabler Stoff, der mit Superoxid-Anionen zu den Reaktionsprodukten 2-Hydroxyethidium bzw. Ethidium reagiert. Diese beiden Substanzen interkalieren mit der DNA und reichern sich im Zellkern an. Dabei emittieren sie eine rote Fluoreszenz, die mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie gemessen werden kann.

Für die Färbung lag DHE gelöst in DMSO als 10 mM Lösung bei -20 Grad Celsius vor. Als Färbelösung wurde DHE/DMSO mit HBSS in einer Konzentration von 1:2000 verdünnt. Dann wurden 4 µm dicke Kryoschnitte bei Raumtemperatur 5 Minuten aufgetaut und anschließend mit PBS 5 Minuten gewaschen. Dann wurden zur Kernfärbung die Schnitte mit DAPI (1:1000) für 15 Minuten inkubiert und anschließend erneut drei Mal jeweils für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nun wurde die DHE-Färbelösung auf die Schnitte gegeben und anschließend wurden die Schnitte mit jeweils einem Deckglas bedeckt. Die nun bedeckten Schnitte wurden im Anschluss daran in einem Inkubator bei 37 Grad Celsius für 30 Minuten aufbewahrt und direkt danach in einer Eisbox aufbewahrt, bis sie ca. 1 Stunde nach der Färbung analysiert wurden.

3.2.7. MPO-Plasma-ELISA

Das während der Organentnahme entnommene Plasma wurde mittels ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay-Kit) analysiert. Für die ELISA-Untersuchung wurden vorher die Plasma-Proben mit 1:20 verdünnt. Die für die Untersuchung notwendige Mikrotiterplatte enthielt verschiedene Kammern, die jeweils am Boden mit einem Antikörper gegen MPO beschichtet waren. In die jeweiligen Kammern wurden die verdünnten Probenlösungen bzw. die Standardlösungen aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei fand eine Bindung von MPO und dem Antikörper statt, sodass MPO nicht mehr frei zirkulierend in der Probe, sondern am Boden der Kammern befestigt war. Nach der Inkubation fand ein Waschschritt statt und anschließend wurden die Proben mit der Tracer-Lösung, einem

biotinylierten Antikörper gegen MPO, wieder bei 1 Stunde Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte wieder ein Waschvorgang. Im Anschluss daran wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat den Proben hinzugegeben. Die Mischung wurde erneut für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, sodass Streptavidin an Biotin des Antikörpers binden konnte. Danach fand die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) statt, welches als Substrat für die Oxidase diente. Diese Reaktion wurde nach 30 Minuten durch die Hinzugabe von Zitronensäure gestoppt. Zur Analyse des Ergebnisses wurden die Proben bei 450 nm gemessen und die MPO-Konzentration in den einzelnen Proben in Relation zur Standardkurve bestimmt.

4. Ergebnisse

3.3 Nitrotyrosin-Immunfluoreszenz-Analyse

Es ist bekannt, dass Nitrotyrosinierungen Indikatoren für posttranslationale Modifikationen von Proteinen sind und beispielsweise bei MPO-abhängiger Reaktion mit Proteinen der EZM entstehen. (Baldus et al., 2001). Beim Marfan-Syndrom ist sowohl in-vitro in glatten Muskelzellen als auch in humanem Gewebe von betroffenen Patienten vermehrt Nitrotyrosin im Vergleich zu normalem Aortengewebe vorhanden (Jiménez-Altayó et al., 2018). Daher wurde in dieser Studie untersucht, ob eine MPO-Defizienz die Nitrotyrosinierungen trotz der Fibrillin-1-Mutation verhindern kann. Dafür wurde bei 10 Wochen alten Mäusen der Nitrotyrosin-Gehalt der Aortenschnitte mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte 3-Nitrotyrosin-Menge in der Media bei den MFS-Mäusen im Vergleich zur MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe ($p < 0,0045$) und zur WT-Gruppe ($p < 0,0021$). Zwischen den MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen und den WT befand sich kein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen den MFS- und den MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen demonstriert eindrücklich, dass es bei einer MPO-Defizienz zu deutlich weniger Nitrotyrosinierungen innerhalb der Aortenwand kommt.

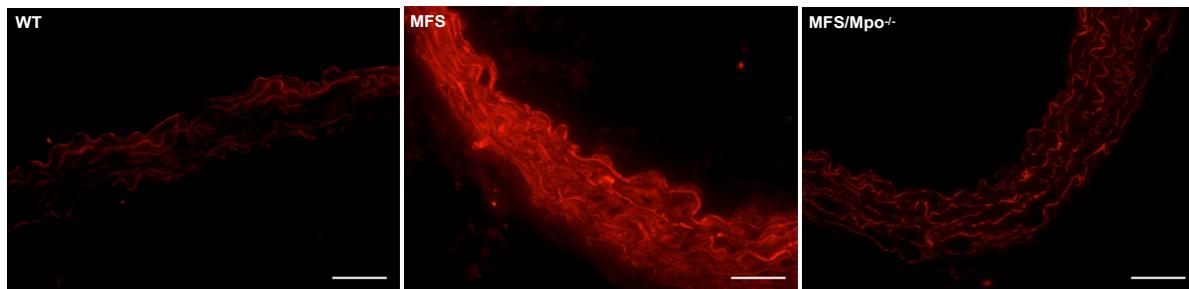


Abbildung 3: Immunfluoreszenz-Analyse der 3-Nitrotyrosin-Konzentration in der Gefäßwand der A.ascendens. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; rot: 3-Nitrotyrosin; Maßstab, 50 μ m

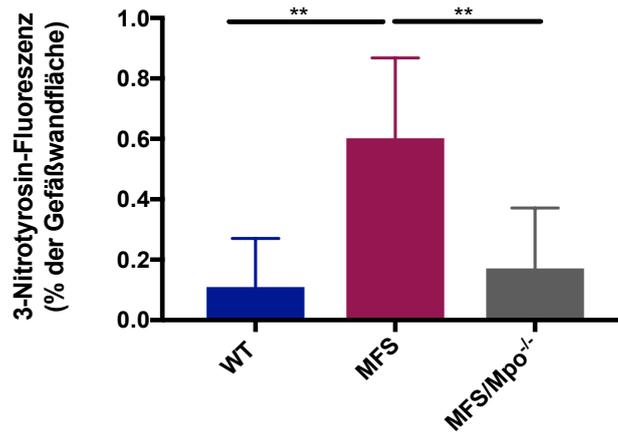


Diagramm 1: Quantifizierung des Immunfluoreszenz-Signals von 3-Nitrotyrosin in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A.ascendens. N: 6,7,7; **P<0.01. Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen

3.4 DHE-Fluoreszenz-Analyse

Aufgrund der Tatsache, dass beim Marfan-Syndrom die erhöhte Konzentration an Nitrotyrosin mit dem Vorhandensein von ROS assoziiert ist (Jiménez-Altayó et al., 2018), wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob es bei einer MPO-Defizienz ebenfalls zu einer geringeren ROS-Produktion kommt. Diese Vermutung wurde mittels einer DHE-Fluoreszenz-Analyse auf Aortenschnitten von 10 Wochen alten Mäusen überprüft. Die Fluoreszenzanalyse bestätigt zum einen den signifikanten Unterschied zwischen der MFS- und der WT-Gruppe ($p < 0,0284$), der bereits in der Literatur vorbeschrieben ist. Zum anderen war auch der Signalunterschied zwischen der MFS- und der MFS/Mpo^{-/-}-Kohorte ($p < 0,0261$) statistisch signifikant. Da das detektierte DHE-Signal ein Marker für das Vorhandensein von ROS ist, kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass eine MPO-Defizienz eine Produktion von ROS über das physiologische Maß (WT) hinaus verhindert.

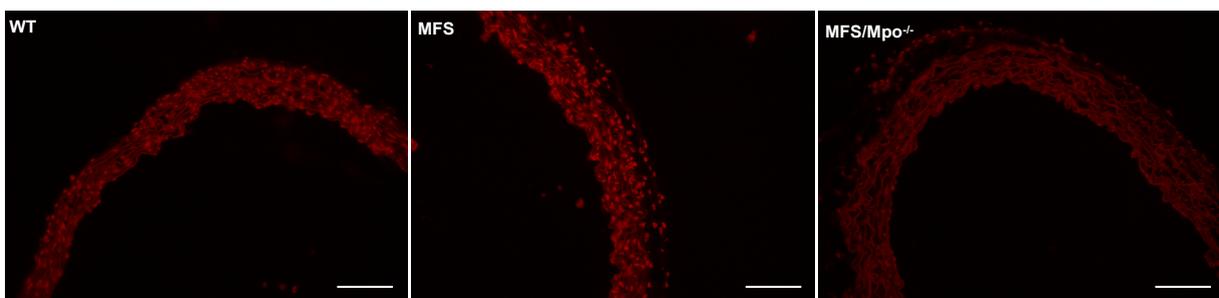


Abbildung 4: DHE-Fluoreszenz-Analyse der Gefäßwand der A. ascendens nach 3 Inkubation mit DHE/DMSO. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; rot: DHE-Signal; Maßstab, 50 µm.

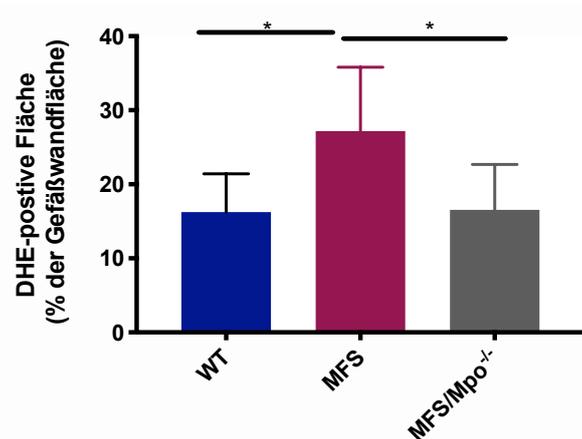


Diagramm 2: Quantifizierung des DHE-Fluoreszenz-Signals in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; *P<0.05. Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen

3.5 Cleaved-Caspase-3-Immunfluoreszenz-Analyse

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des Marfan-Syndroms ist der Untergang der glatten Muskelzellen. Als Konsequenz wird das Zusammenspiel der glatten Muskelzellen mit dem extrazellulären Fibrillin-Elastin-Faser-Netzwerk in Form der kontraktile Einheiten zerstört und die Entstehung des Aneurysmas sogar beschleunigt. Im Rahmen des apoptotischen Zellunterganges wird das proapoptotische Enzym Cleaved-Caspase-3 auf der Zelloberfläche präsentiert. Eine Behandlung mit einem Pan-Caspase-Inhibitor verzögert die Ausbildung eines Aneurysmas (Emrich et al., 2015).

Aufgrund der Tatsache, dass eine MPO-Defizienz bei 10 Wochen alten Mäusen mit einer signifikant geringeren Anzahl an Nitrotyrosinierungen und einer deutlich verminderten Produktion von ROS verbunden ist, wurde im folgenden Schritt untersucht, ob dadurch auch eine geringere Apoptoserate in der Gefäßwand existiert. Deshalb wurde diese Vermutung mithilfe einer Immunfluoreszenz-Analyse auf das proapoptotische Enzym Cleaved-Caspase-3 geprüft.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung der Aortenschnitte von 10 Wochen alten Mäusen zeigte sich in der MFS-Gruppe eine deutlich erhöhte Expression von Cleaved-Caspase-3 im Vergleich zur MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe (p< 0,0004) und zur WT-Gruppe (p< 0,0004). Die vermehrte Expression von Cleaved-Caspase-3 deutet auf eine verstärkte Apoptose in den glatten Muskelzellen der Aortenwand hin. Die diametralen Unterschiede zwischen den MFS- und den MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen verdeutlichen, dass eine MPO-Defizienz eine vermehrte Apoptose in der Gefäßwand unterbinden kann.

Auch bei 6 Wochen alten Mäusen zeigt sich in der MFS-Gruppe eine vermehrte Expression von Cleaved-Caspase-3 im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, wobei diese Unterschiede nicht statistisch signifikant waren. Diese Beobachtung zeigt jedoch, dass bereits schon sehr früh in der Pathogenese des Aneurysmas eine vermehrte Apoptose stattfindet, die potenziell durch eine MPO-Defizienz aufgehoben werden kann.

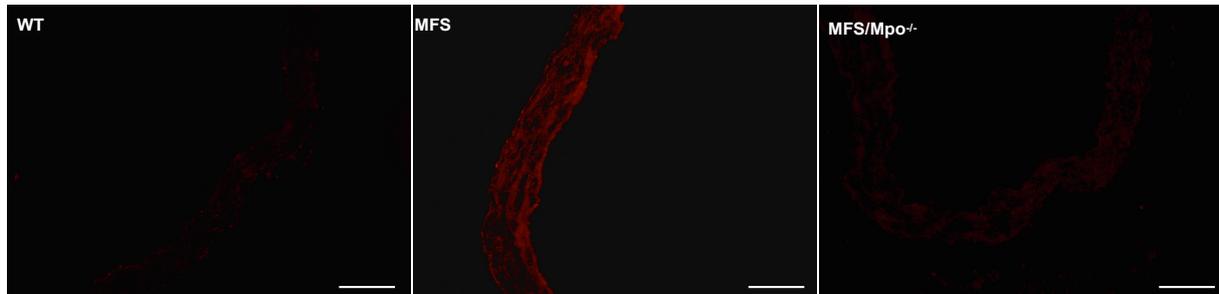


Abbildung 5: Immunfluoreszenz-Analyse der Cleaved-Caspase-3-Konzentration in der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; rot: Cleaved-Caspase-3; Maßstab, 50 μ m

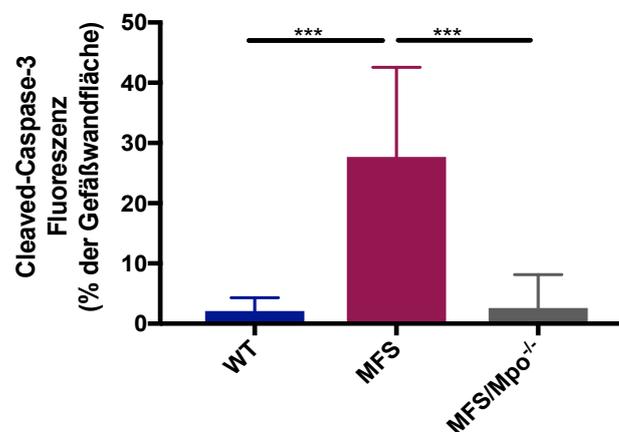


Diagramm 3: Quantifizierung des Immunfluoreszenz-Signals von Cleaved-Caspase-3 in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; ***P<0.001. Mittelwert \pm SEM; Alter:10 Wochen

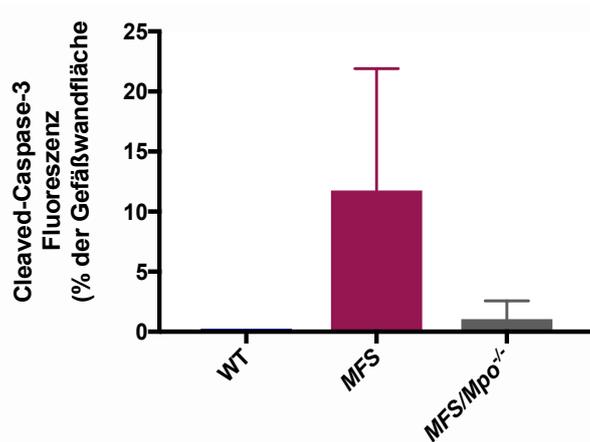


Diagramm 4: Quantifizierung des Immunfluoreszenz-Signals von Cleaved-Caspase-3 in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 5,5,5; Mittelwert \pm SEM; Alter: 6 Wochen

3.6 In-situ-Zymographie

MMP 2&9 sind die Hauptmediatoren der proteolytischen Spaltung elastischer Fasern und der Degradation der EZM-Proteine (Ada W.Y. Chung et al., 2007). Ihre Blockade mittels Doxyzyklin, einem unspezifischem MMP-Inhibitor, mildert die Fragmentierung elastischer Fasern stark ab und verzögert somit die Entstehung eines Aortenaneurysmas deutlich (Ada W.Y. Chung et al., 2008). Vor diesem Hintergrund war es von großem Interesse, inwieweit eine MPO-Defizienz die Aktivität der MMPs 2&9 beeinflusst. Daher führten wir zur Messung der Aktivität der MMPs 2&9 eine in-situ-Zymographie von Aortenschnitten bei 10 bzw. 6 Wochen alten Mäusen durch.

Bei den 10 Wochen alten Tieren zeigt sich bei der MFS-Gruppe eine abnorm erhöhte Aktivität der MMPs 2&9 im Vergleich zur MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe ($p < 0,0017$) und ebenfalls verglichen mit der WT-Gruppe ($p < 0,0019$). Die Aktivität in der MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der Aktivität in der WT-Gruppe. Der Vergleich der MFS- mit der MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe offenbart, dass eine MPO-Defizienz mit einer stark verringerten Aktivität der MMPs 2&9 assoziiert ist.

Die Aktivitätsanalyse bei 6 Wochen alten Mäusen deutet auf dieselbe Erkenntnis hin, wobei der Unterschied zwischen der MFS- und der MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe nicht signifikant war ($p < 0,1393$). Offenbar wirkt eine MPO-Defizienz schon im initialen Stadium der Entstehung des Aneurysmas protektiv auf das Remodeling in der Aortenwand.

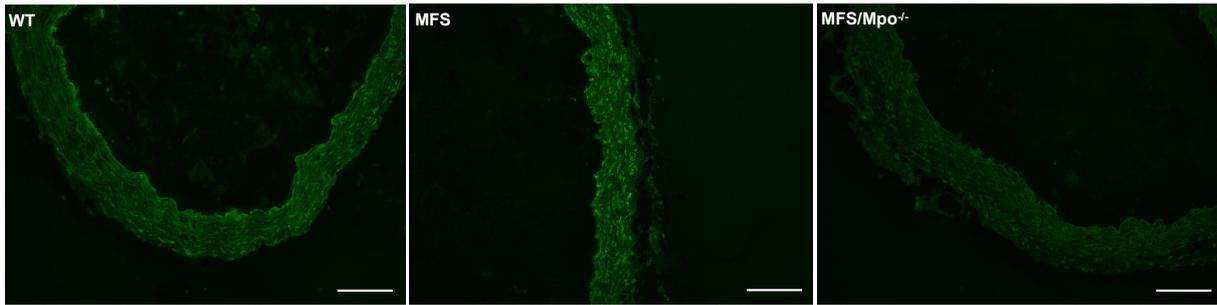


Abbildung 6: In-situ-Zymographie der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; Grün: Signalktivität; Maßstab, 50 µm

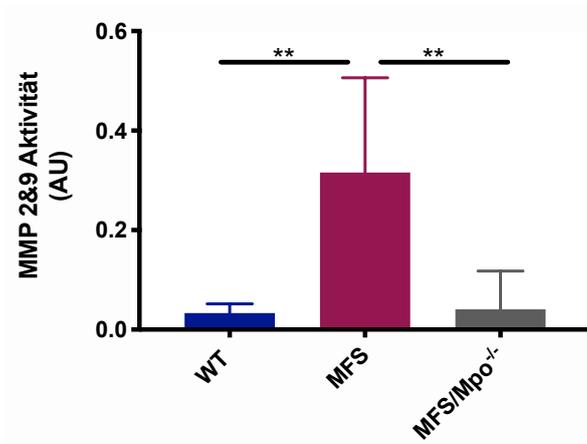


Diagramm 5: Quantifizierung des Fluoreszenz-Signals der MMP 2&9-Aktivität in Abhängigkeit der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; **P<0.01. Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen

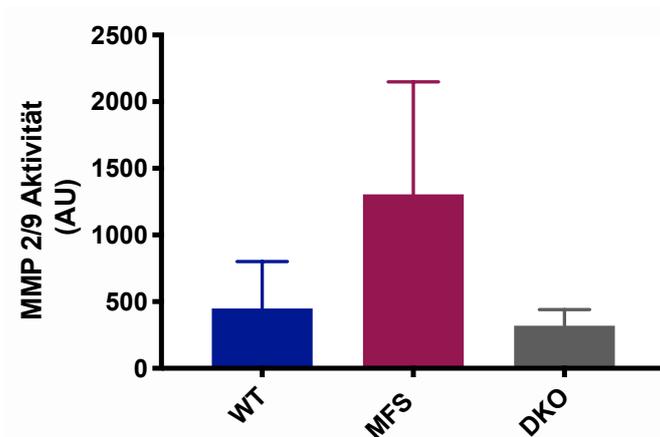


Diagramm 6: Quantifizierung des Fluoreszenzsignals der MMP 2&9-Aktivität in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 5,5,5; Mittelwert ± SEM; Alter: 6 Wochen

3.7 Trichrom-Masson-Färbung

Bisher wurde festgestellt, dass eine MPO-Defizienz nicht nur mit geringeren posttranslationalen Modifikationen und einer verminderten Produktion von ROS einhergeht, sondern auch mit einer deutlich abgeschwächten Apoptoserate und erniedrigten MMP 2&9-Aktivität assoziiert ist. Daher wurde im nächsten Schritt die Hypothese geprüft, dass die bisher gemessenen Phänomene eine biologische Relevanz haben für den vaskulären Phänotyp und in einer erhöhten Fragmentierung von elastischen Fasern in der Tunica Media resultieren.

In der Trichrom-Masson-Färbung bei 10 Wochen alten Mäusen war in der MFS-Kohorte eine massiv erhöhte Anzahl an Strangbrüchen der elastischen Fasern verglichen mit der MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe (p<0,0001) und der WT-Gruppe (p<0,0001) vorhanden. Die MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe hatte etwas mehr Strangbrüche in den elastischen Fasern als die WT-Gruppe, wobei dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war.

Insgesamt konnte daher die Vermutung bestätigt werden, dass eine MPO-Defizienz nicht nur zur einer verminderten MMP 2&9-Aktivität führt, sondern auch vor einer übermäßigen Spaltung elastischer Fasern schützt.

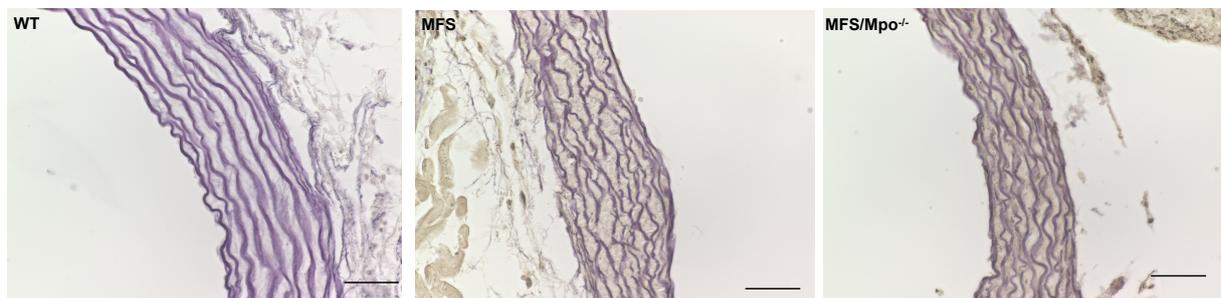


Abbildung 7: Immunohistochemische Färbung (Trichrom-Masson) der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,5,6; Alter:10 Wochen; Maßstab, 50 µm

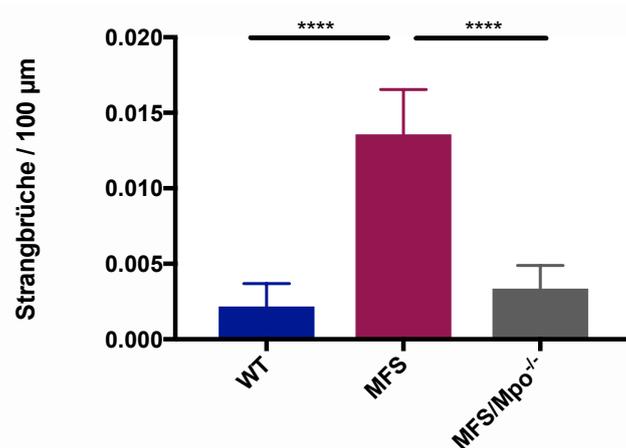


Diagramm 7: Quantifizierung der Strangbrüche der Gefäßwand der A.ascendens. N: 6,5,6; Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen

3.8 In-vivo-Analyse des Aortendurchmessers

Bisher wurde lediglich gezeigt, dass es bei einer MPO-Defizienz nicht zur vermehrten Aktivierung pathophysiologisch relevanter Enzyme kommt, was sich in der verringerten Fragmentierung elastischer Fasern widerspiegelt. Deshalb wurde im folgenden Versuch die sich daraus ableitende Hypothese überprüft, ob eine MPO-Defizienz die Entstehung eines Aneurysmas unterbindet und damit die Dilatation der Aorta verhindert. Deshalb wurde eine in-vivo Ultraschalluntersuchung bei 12 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass in der MFS/Mpo^{-/-}-Gruppe mit einem Durchmesser von 1,69 mm ± 0.10 mm ein deutlich geringerer Durchmesser der Aorta vorhanden war als bei MFS-Tieren, die einen Durchmesser von 2,01 ± 0,09 mm besaßen. Die WT-Gruppe hatte einen mittleren Durchmesser von 1,70 ± 0,13 mm.

Die Analyse des Durchmessers verdeutlicht die biologische Relevanz der bisherigen histologischen Befunde und zeigt, dass eine MPO-Defizienz bei 12 Wochen alten Mäusen die Entstehung eines Aortenaneurysmas verhindert.



Abbildung 8: Echokardiographische Untersuchung der A.ascendens, N: 9,12,11; Alter: 12 Wochen

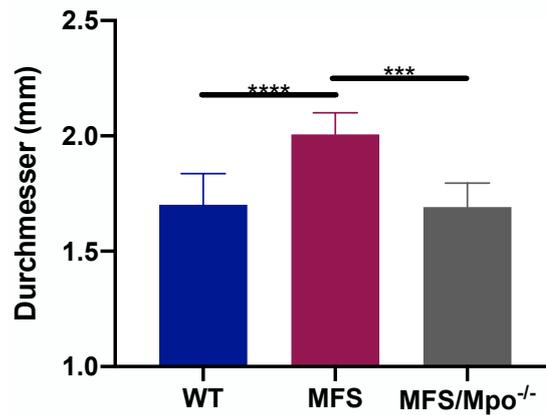


Diagramm 8: Analyse des Durchmessers der A. ascendens, N: 9,12,11; ***P<0.001, ****P<0,0001, Mittelwert ± SEM; Alter: 12 Wochen

3.9 MPO-Plasmaspiegel-Analyse

Nachdem gezeigt wurde, dass eine MPO-Defizienz eine biologische Relevanz hat hinsichtlich der Entstehung von Aortenaneurysmen im Rahmen des Marfan-Syndroms, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob bei entsprechenden MFS-Tieren eine vermehrte Dilatation der Aorta mit einem erhöhten Vorkommen von zirkulierendem MPO assoziiert ist. Dies wurde durch eine Überprüfung des MPO-Plasmaspiegels bei ebenfalls 12 Wochen alten Mäusen mittels eines ELISA-Verfahrens ermittelt. Hier zeigte sich, dass in den MFS-Tieren signifikant erhöhte MPO-Plasmaspiegel vorhanden waren im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe. Dies unterstreicht die enorme Bedeutung von MPO für die Entstehung von Aortenaneurysmen im Rahmen des Marfan-Syndroms.

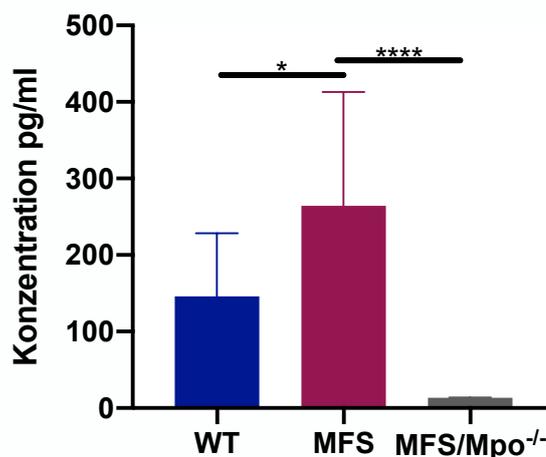


Diagramm 9: Analyse des MPO-Plasmaspiegels, N: 11, 17, 9; *P<0.05, ****P<0,0001, Mittelwert ± SEM; Alter: 12 Wochen

4. Diskussion

Die für diese Arbeit generierten Daten zeigen, dass MPO mit der Entstehung von Aortenaneurysmen in einem Marfan-Syndrom-Mausmodell assoziiert ist. Diese Erkenntnis unterstreicht damit die bisher unterschätzte Bedeutung inflammatorischer Prozesse für die Entstehung von Aortenaneurysmen beim Marfan-Syndrom. Aufgrund der Tatsache, dass eine MPO-Defizienz bei Mäusen im Alter von 12 Wochen trotz einer Fibrillin-1-Mutation eine Dilatation der A. ascendens sogar verhindert, lässt vermuten, dass MPO bereits an der initialen Entstehung des Aortenaneurysmas beteiligt ist.

Pathophysiologisch betrachtet kommt es bei der Entstehung des Marfan-Syndroms zu einer verstärkten Aktivität der MMPs 2&9, einer erhöhten ROS-Produktion und zahlreichen Strangbrüchen der elastischen Fasern. Diese Prozesse resultieren in einer signifikanten Schwächung der Aortenwand, was sich phänotypisch in einer Dilatation bei 12 Wochen alten Mäusen zeigt.

In den MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen unterschied sich sowohl die ROS-Produktion als auch die Aktivität der MMPs nicht wesentlich von den WT-Mäusen und auch die elastischen Fasern wiesen deutlich weniger Strangbrüche auf als die MFS-Mäuse. Dies unterstreicht die These, dass MPO trotz der Anwesenheit einer Fibrillin-1-Mutation eine entscheidende Rolle für die pathologische Signalaktivität in der Aortenwand spielt.

4.1 Angriffspunkt von MPO

Die für diese Arbeit gewonnenen Befunde zeigen eindeutig einen starken Einfluss von MPO in der Entstehung von Aortenaneurysmen beim Marfan-Syndrom. Jedoch zeigt diese Studie nicht den genauen Wirkmechanismus von MPO in der Aortenwand auf. Auf der einen Seite ist es möglich, dass MPO direkt das defekte Fibrillin-1-Protein posttranslational modifiziert und damit sekundär weitere Signalkaskaden wie die Aktivierung von MMPs katalysiert. Auf der anderen Seite könnte auch MPO als Reaktion auf bereits initiale inflammatorische Prozesse in die Aortenwand migrieren und über glatte Muskelzellen die proapoptischen Prozesse und die Aktivierung von MMPs verstärken.

4.1.1. EZM als potenzieller Angriffspunkt für MPO

In dieser Studie konnte in den MFS-Mäusen ein deutlich erhöhter Gehalt an Nitrotyrosin als Indikator für posttranslationale Modifikationen in der Aortenwand im Vergleich zu den

MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass MPO durch die Modifikation von Fibrillin-1 in das Remodeling der Gefäßwand eingreift.

Mutiertes Fibrillin-1 hat aufgrund seiner defekten Struktur in seiner EGF-Domäne freie Cysteinreste, die durch MPO potenziell oxidativ modifiziert werden könnten. Durch eine Reaktion mit MPO kann potenziell die Quartärstruktur von Fibrillin-1 noch stärker verändert und folglich die Architektur der EZM weiter destabilisiert werden. Eine solche Interaktion von MPO mit Fibrillin-1 würde bedeuten, dass MPO extrem früh in die pathophysiologische Signalkaskade eingreift und somit eine zentrale Rolle für die Entstehung des Aneurysmas hat. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass eine MPO-Defizienz in den MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen übermäßige posttranslationale Modifikationen wie Nitrotyrosinierungen verhindert und damit wahrscheinlich sekundär aktivierte Signalkaskaden wie eine erhöhte ROS-Produktion, eine Aktivierung von MMPs 2&9 oder eine vermehrte Apoptose verhindert.

Trotz dieser vielversprechenden Theorie gibt es jedoch auch berechtigte Limitationen für diese Annahme. Zum einen zeigt sich auch in den MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen nach 10 Wochen eine leicht erhöhte Anzahl an Strangbrüchen im Vergleich zu den WT-Mäusen. Daher gilt es als eher wahrscheinlich, dass die Aktivierung pathophysiologischer Prozesse nicht allein durch die Anwesenheit von MPO erklärt werden kann. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass in Anwesenheit von defekten Fibrillin-Mikrofibrillen biologisch aktives TGF-β aus seiner Bindung zum LTBP freigesetzt wird und sekundär MMPs aktiviert (Dietz, 2007). Des Weiteren zeigt sich auch im Rahmen von Ultraschall-Follow-Up-Untersuchungen der in dieser Studie benutzten Maustypen zu späteren Zeitpunkten eine zunehmende Dilatation der Aorta bei den MFS/Mpo^{-/-}-Mäusen. Nach 12 Monaten gleicht sich der Durchmesser der MFS/Mpo^{-/-}-Mäuse den MFS-Mäusen an. (unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse bestätigen, dass MPO-unabhängige Prozesse das pathophysiologische Remodeling beeinflussen und langfristig sogar den Effekt einer MPO-Defizienz relativieren.

Insgesamt ist die Vermutung der Interaktion von MPO mit Fibrillin-1 als Eingriff in den pathophysiologischen Prozess des Aortenaneurysmas eine plausible Erklärung für die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse. Es bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen, um diese Vermutung zu erhärten.

Eine weitere Möglichkeit der Entstehung des Aneurysmas ist eine MPO-abhängige Modifikation von anderen extrazellulären Proteinen, die in direktem Kontakt zu Fibrillin-1 stehen, und damit eine zusätzliche Destabilisierung der EZM bewirken können. In humanen Hautfibroblasten konnte in-vitro gezeigt werden, dass intaktes Fibronectin essenziell für die Organisation von Fibrillin-1 in der EZM ist. Bei einer Elimination von Fibronectin kommt es zu einer Desorganisation von Fibrillin-1 (Utani, 2010). Es ist bekannt, dass MPO per Transzytose in die subendotheliale Schicht von Gefäßwänden gelangt und dort Fibronectin

posttranslational modifiziert (Baldus et al., 2001). Insofern ist ebenfalls denkbar, dass MPO indirekt durch eine Reaktion mit Fibronectin eine destabilisierende Wirkung auf Fibrillin-1 ausübt und damit die Aktivierung pathologischer Signalkaskaden beschleunigt.

4.1.2. MPO als Aktivator von MMPs

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass trotz einer Fibrillin-1-Mutation eine MPO-Defizienz die Aktivität der MMPs 2&9 deutlich abmildert. Diese Korrelation wirft Fragen nach dem Mechanismus der MPO-abhängigen Aktivierung der MMPs 2&9 auf. Neben einer sekundären Aktivierung von MMPs durch posttranslationale Modifikationen an Proteinen der EZM ist auch eine direkte Interaktion von MPO mit den MMPs 2&9 eine alternative Erklärung für deren erhöhte Aktivität.

In Bezug auf MMP-7 hat MPO eine ambivalente Rolle. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass MPO durch oxidative Modifikationen an Cysteinresten von pro-MMP-7 eine autolytische Abspaltung des Pro-Peptids bewirkt und damit MMP-7 aktiviert (Fu, Kassim, Parks, & Heinecke, 2001). Paradoxerweise kommt es auf der anderen Seite bei einer Reaktion von HOCl mit aktivem MMP-7 zu einer Modifikation von Tryptophan- und Glycinresten im katalytischen Zentrum von MMP-7, wodurch das Enzym letztlich inaktiviert wird (Fu, Kassim, Parks, & Heinecke, 2003).

In Bezug auf die MMPs 2&9 gibt es zwar in neuroinflammatorischen Modellen Hinweise darauf, dass eine erhöhte Aktivität von MPO mit einer ebenfalls gesteigerten Aktivität von MMP-9 einhergeht (Y. Zhang et al., 2020), jedoch ist eine direkte Modifizierung durch MPO bisher noch nicht beschrieben worden.

Eine weitere Möglichkeit für eine gesteigerte Aktivität der MMPs 2&9 ist eine Inaktivierung der jeweiligen physiologischen Gegenspieler, den sog. TIMPs. Im Aortengewebe von erkrankten Patienten zeigt sich ein Ungleichgewicht hinsichtlich der Aktivität von MMPs und TIMPs im Vergleich zu gesunden Patienten (Ikonomidis et al., 2006). Eine mögliche Erklärung hierfür kann eine Inaktivierung der TIMPs durch MPO sein. Beispielsweise reagiert MPO mit einem Cysteinrest in der N-terminalen Region von TIMP-1 und bewirkt somit eine Inaktivierung dieses Enzyms (Kate Shannon ., 2016). Dadurch fehlt MMP 2&9 eine natürliche Unterdrückung ihrer proteolytischen Aktivität, wodurch die Fragmentierung der elastischen Fasern katalysiert wird. Darüber hinaus erscheint eine indirekte Aktivierung von MMPs durch eine MPO-abhängige Reduzierung der NO-Bioverfügbarkeit ebenfalls möglich. In Endothelzellen von Koronararterien bewirkt eine Reduzierung von NO eine vermehrte Freisetzung von aktivem MMP-2 (Wang, Viappiani, Sawicka, & Schulz, 2005). MPO senkt auf mehrere Weisen die NO-Bioverfügbarkeit. Erstens reagiert es mittels Compound I oder II direkt mit NO und fördert dadurch eine endotheliale Dysfunktion (Cheng et al., 2019). Darüber hinaus reagiert HOCl mit

L-Arginin, dem Substrat für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und verhindert somit die NO-Produktion (C. Zhang et al., 2001). Außerdem kann HOCl auch direkt die Funktion der eNOS hemmen (Xu, Xie, Reece, Pimental, & Zou, 2006). Da beim Marfan-Syndrom eine verminderte Expression der eNOS und eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit (A. W.Y. Chung et al., 2007) vorhanden ist, könnte hier mechanistisch eine MPO-abhängige Reduzierung von NO zu einer erhöhten Aktivierung der MMPs 2&9 führen.

4.1.3. MPO und ROS

Ein weiterer enorm wichtiger Faktor in der Entstehung des Aneurysmas sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS). ROS werden als Nebenprodukt intrazellulär von Mitochondrien produziert durch membranständige NADPH-Oxidasen (NOX). Diese übertragen Elektronen auf Sauerstoffmoleküle, sodass O_2^- entsteht. Das hoch instabile O_2^- wiederum reagiert zum weniger instabilen H_2O_2 .

Es konnte sowohl in-vitro in glatten Muskelzellen als auch im Aortengewebe von Marfan-Patienten eine erhöhte Expression von NOX-4 festgestellt werden. In einem Marfan-Syndrom-Mausmodell ist bei einer Defizienz von NOX-4 eine deutliche geringe Elastinfragmentierung und eine geringe Endotheldysfunktion zu beobachten. Somit scheint die Funktion der kontraktile Einheiten in der Aortenwand zumindest zum Teil durch ROS bedingt zu sein (Onetti et al., 2016).

Im Rahmen der Immunabwehr reagiert MPO mit H_2O_2 der jeweiligen NOXs von Leukozyten. Im Rahmen von arteriosklerotischen Prozessen reagiert MPO auch mit dem aus endothelialen membranständigen NOXs entstandenem H_2O_2 , wodurch HOCl entsteht.

In dieser Studie zeigte sich in der DHE-Färbung, dass in der Aortenwand trotz einer Fibrillin-1-Mutation bei einer MPO-Defizienz keine Erhöhung von ROS im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen zu beobachten ist. Da beim Marfan-Syndrom vermehrt ROS gebildet werden, erscheint es gut möglich, dass diese als Substrat für MPO dienen können und MPO dadurch die pathologischen Prozesse innerhalb der Gefäßwand beschleunigt.

4.2 MPO – Relevanz für die Pathogenese des humanen Marfan-Syndroms

Die in diesem Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse über die Pathophysiologie sind nur bedingt auf den Menschen übertragbar. Zum Beispiel sind im Vergleich zum Menschen bei Mäusen Mutationen an anderer Stelle im Fibrillin-1-Genabschnitt, um einen marfanoiden Phänotyp zu provozieren. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine MPO-Defizienz zwar in einem murinen Marfan-Modell protektiv hinsichtlich einer Dilatation des

Aortendurchmessers wirkt, aber beim Menschen wirkungslos ist. Deshalb ist eine Untersuchung des Einflusses von MPO bei Patienten mit Marfan-Syndrom eine sinnvolle Option, um die Rolle von MPO genauer zu verstehen. Ein möglicher erster Anhalt für eine bedeutsame Rolle könnte der Nachweis von MPO in aneurysmatischem Gewebe von Marfan-Patienten sein. Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass der Nachweis von MPO in der Aortenwand im Frühstadium der Erkrankung methodisch sehr schwierig zu realisieren ist, da meistens im Rahmen von operativen Eingriffen nur aneurysmatisches Gewebe aus einem fortgeschrittenen Stadium benutzt werden kann und hierbei MPO vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt.

In anderen Studien konnte MPO als Marker bzw. als Vorhersagewert für weitere kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert werden. Beispielsweise gilt MPO bei gesunden Patienten als positiver prädiktiver Parameter für das Auftreten eines chronischen Koronarsyndroms (Meuwese et al., 2007). Daher ist die Untersuchung einer eventuellen Korrelation des MPO-Plasmaspiegels mit der Entstehung von Aortenaneurysmen und deren Ruptur bei betroffenen Patienten sinnvoll. Falls der vermutete Zusammenhang positiv korreliert, wäre dies klinisch sehr bedeutsam, da dadurch eventuell MPO ein positiver prädiktiver Marker für die Entstehung bzw. Entwicklung eines Aortenaneurysmas beim Marfan-Syndrom sein kann.

4.3 Ausblick für die Zukunft

Diese Studie zeigt deutlich, dass MPO mit der Entstehung von Aortenaneurysmen beim Marfan-Syndrom assoziiert ist. Es ist daher sehr gut möglich, dass eine pharmakologische Inhibition von MPO einen neuartigen therapeutischen Ansatz in der konservativen Therapie des Marfan-Syndroms darstellt. Zum genauen Verständnis für die exakte Rolle von MPO im pathophysiologischen Prozess sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

Betrachtet man den Pathomechanismus, bleibt eine wichtige Frage nach dem Reaktionspartner in der Gefäßwand, über den MPO seine Wirkung entfalten kann. Beispielsweise könnte man mithilfe von massenspektrometrischen Analysen eventuelle oxidative Modifikationen von Proteinen in der EZM detektieren.

Zudem ist auch noch nicht die Frage geklärt, wie MPO in die Aortenwand gelangt. Bisher konnte zwar eine vermehrte Migration von Makrophagen in den Aneurysmabereich festgestellt werden, jedoch geschieht dies erst nach ca. 8 Wochen (G. Guo et al., 2006). Es ist daher unwahrscheinlich, dass MPO mittels Monozyten in die Aortenwand gelangt, da in dieser Studie eine MPO-Defizienz schon nach 6 Wochen mit einer geringeren Aktivität der MMPs 2&9 assoziiert ist und MPO daher wahrscheinlich schon viel früher seine Wirkung entfaltet. Eine Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Gefäßwand ist bisher nicht dokumentiert

worden. Jedoch kann man mithilfe durchflusszytometrischer Verfahren den Gehalt inflammatorischer Zellen in der Aortenwand bestimmen und quantifizieren.

Im Hinblick auf eine mögliche neue therapeutische Option in der konservativen Behandlung beim Marfan-Syndrom beim Menschen ist es interessant zu erfahren, inwieweit eine MPO-Blockade mittels eines MPO-Inhibitors die Entstehung eines Aortenaneurysmas bei Mäusen verhindern kann. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mittels eines MPO-Inhibitors den Effekt auf kardiovaskuläre Erkrankungen deutlich abmildert (Klinke et al., 2018). Die Ergebnisse dieser Studie lassen die Hypothese zu, dass eine MPO-Blockade bereits postnatal die maximale Wirkung erzielen würde, weil dadurch sämtliche MPO-abhängigen Signalkaskaden inaktiv blieben und die Entstehung des Aneurysmas dadurch deutlich abgeschwächt werden würde.

5. Literaturverzeichnis

- Ali, M., Pulli, B., Courties, G., Tricot, B., Sebas, M., Iwamoto, Y., ... Chen, J. W. (2016). Myeloperoxidase Inhibition Improves Ventricular Function and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction. *JACC: Basic to Translational Science*, 1(7), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.09.004>
- Arbustini, E., Grasso, M., Ansaldi, S., Malattia, C., Pilotto, A., Porcu, E., ... Tavazzi, L. (2005). Identification of sixty-two novel and twelve known FBN1 mutations in eighty-one unrelated probands with Marfan syndrome and other fibrillinopathies. *Human Mutation*, 26(5), 494. <https://doi.org/10.1002/humu.9377>
- Bakkenist, A. R. J., De Boer, J. E. G., Plat, H., & Wever, R. (1980). The halide complexes of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reactions. *BBA - Enzymology*, 613(2), 337–348. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(80\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(80)90088-1)
- Baldus, S., Eiserich, J. P., Brennan, M. L., Jackson, R. M., Alexander, C. B., & Freeman, B. A. (2002). Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(7), 1010–1019. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00993-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00993-0)
- Baldus, S., Eiserich, J. P., Mani, A., Castro, L., Figueroa, M., Chumley, P., ... Freeman, B. A. (2001). Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *Journal of Clinical Investigation*, 108(12), 1759–1770. <https://doi.org/10.1172/JCI200112617>
- Baldus, S., Heitzer, T., Eiserich, J. P., Lau, D., Mollnau, H., Ortak, M., ... Münzel, T. (2004). Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 902–911. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.003>
- Barcellos-Hoff, M. H., & Dix, T. A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- β 1. *Molecular Endocrinology*, 10(9), 1077–1083. <https://doi.org/10.1210/me.10.9.1077>
- Baumgartner, H., Bonhoeffer, P., De Groot, N. M. S., De Haan, F., Deanfield, J. E., Galie, N., ... Westby, J. (2010). ESC Guidelines for the management of grown-up congenital heart disease (new version 2010). *European Heart Journal*, 31(23), 2915–2957. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq249>
- Booms, P., Pregla, R., Ney, A., Barthel, F., Reinhardt, D. P., Pletschacher, A., ... Robinson, P. N. (2005). RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: A potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome. *Human Genetics*, 116(1–2), 51–61. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1194-7>

- Charbonneau, N. L., Carlson, E. J., Tufa, S., Sengle, G., Manalo, E. C., Carlberg, V. M., ... Sakai, L. Y. (2010). In vivo studies of mutant fibrillin-1 microfibrils. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24943–24955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130021>
- Chaudhry, S. S., Cain, S. A., Morgan, A., Dallas, S. L., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2007). Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGF β 1. *Journal of Cell Biology*, 176(3), 355–367. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608167>
- Cheng, D., Talib, J., Stanley, C. P., Rashid, I., Michaëlsson, E., Lindstedt, E. L., ... Stocker, R. (2019). Inhibition of MPO (myeloperoxidase) attenuates endothelial dysfunction in mouse models of vascular inflammation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(7), 1448–1457. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312725>
- Chung, A. W.Y., Au Yeung, K., Cortes, S. F., Sandor, G. G. S., Judge, D. P., Dietz, H. C., & Van Breemen, C. (2007). Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the progression of Marfan syndrome. *British Journal of Pharmacology*, 150(8), 1075–1083. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707181>
- Chung, Ada W.Y., Au Yeung, K., Sandor, G. G. S., Judge, D. P., Dietz, H. C., & Van Breemen, C. (2007). 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. *Circulation Research*, 101(5), 512–522. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.157776>
- Chung, Ada W.Y., Clarice Yang, H. H., Radomski, M. W., & Van Breemen, C. (2008). Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Circulation Research*, 102(8), 73–85. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.174367>
- Cook, J. R., Clayton, N. P., Carta, L., Galatioto, J., Chiu, E., Smaldone, S., ... Ramirez, F. (2015). Dimorphic Effects of Transforming Growth Factor- β Signaling during Aortic Aneurysm Progression in Mice Suggest a Combinatorial Therapy for Marfan Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(4), 911–917. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.305150>
- D'Arrigo, C., Burl, S., Withers, A. P., Dobson, H., Black, C., & Boxer, M. (1998). TGF- β 1 binding protein-like modules of fibrillin-1 and-2 mediate integrin-dependent cell adhesion. *Connective Tissue Research*, 37(1–2), 29–51. <https://doi.org/10.3109/03008209809028898>
- De Paepe, A., Devereux, R. B., Dietz, H. C., Hennekam, R. C. M., & Pyeritz, R. E. (1996). Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 62(4), 417–426. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19960424\)62:4<417::AID-AJMG15>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19960424)62:4<417::AID-AJMG15>3.0.CO;2-R)
- Deuschl, F. G., Klinke, A., Friedrichs, K., Knappe, D., Weinberger, F., Müllerleile, K., ... Baldus,

- S. (2014). Myeloperoxidase is Critically Linked to the Development of Diastolic Heart Failure Following Pressure Overload. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 33(4), S164. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.01.440>
- Diagnose, D., & Marfan-syndrom, G. (2010). Revidierte Gent-Nosologie (2010).
- Dietz, H. C. (2007). Marfan syndrome: From molecules to medicines. *American Journal of Human Genetics*, 81(4), 662–667. <https://doi.org/10.1086/521409>
- Dietz, H. C., Cutting, C. R., Pyeritz, R. E., Maslen, C. L., Sakai, L. Y., Corson, G. M., ... Francomano, C. A. (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*, 352(6333), 337–339. <https://doi.org/10.1038/352337a0>
- Eiserich, J. P., Baldus, S., Brennan, M. L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., ... Freeman, B. A. (2002). Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*, 296(5577), 2391–2394. <https://doi.org/10.1126/science.1106830>
- Eldadah, Z. A., Brenn, T., Furthmayr, H., & Dietz, H. C. (1995). Expression of a mutant human fibrillin allele upon a normal human or murine genetic background recapitulates a Marfan cellular phenotype. *Journal of Clinical Investigation*, 95(2), 874–880. <https://doi.org/10.1172/jci117737>
- Emmott, A., Garcia, J., Chung, J., Lachapelle, K., El-Hamamsy, I., Mongrain, R., ... Leask, R. L. (2016). Biomechanics of the Ascending Thoracic Aorta: A Clinical Perspective on Engineering Data. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(1), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.10.015>
- Emrich, F. C., Okamura, H., Dalal, A. R., Penov, K., Merk, D. R., Raaz, U., ... Fischbein, M. P. (2015). Enhanced caspase activity contributes to aortic wall remodeling and early aneurysm development in a murine model of marfan syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), 146–154. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304364>
- Erkula, G., Jones, K. B., Sponseller, P. D., Dietz, H. C., & Pyeritz, R. E. (2002). Growth and maturation in Marfan syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 109(2), 100–115. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10312>
- Fleischer, K. J., Nousari, H. C., Anhalt, G. J., Stone, C. D., & Laschinger, J. C. (1997). Immunohistochemical Abnormalities of Fibrillin in Cardiovascular Tissues in Marfan's Syndrome. *The Annals of Thoracic Surgery*, 63(4), 1012–1017. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(97\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(97)00061-1)
- Fliss, H. (1988). Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 84(2), 177–188. <https://doi.org/10.1007/BF00421053>
- Fraser, S., Child, A., & Hunt, I. (2017). Pectus updates and special considerations in Marfan

- syndrome. *Pediatric Reports*, 9(4). <https://doi.org/10.4081/pr.2017.7227>
- Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C., & Heinecke, J. W. (2003). Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). An oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28403–28409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304739200>
- Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C., & Heinecke, J. W. (2001). Hypochlorous Acid Oxygenates the Cysteine Switch Domain of Pro-matrilysin (MMP-7): A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41279–41287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106958200>
- Giampietro, P. F., Raggio, C., & Davis, J. G. (2002). Marfan syndrome: Orthopedic and genetic review. *Current Opinion in Pediatrics*, 14(1), 35–41. <https://doi.org/10.1097/00008480-200202000-00006>
- Goldmann, B. U., Rudolph, V., Rudolph, T. K., Holle, A. K., Hillebrandt, M., Meinertz, T., & Baldus, S. (2009). Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.004>
- Gott, V. L., Greene, P. S., Alejo, D. E., Cameron, D. E., Naftel, D. C., Miller, D. C., ... Turina, M. I. (1999). Replacement of the aortic root in patients with Marfan's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 340(17), 1307–1313. <https://doi.org/10.1056/NEJM199904293401702>
- Guo, G., Booms, P., Halushka, M., Dietz, H. C., Ney, A., Stricker, S., ... Robinson, P. N. (2006). Induction of Macrophage Chemotaxis by Aortic Extracts of the mgR Marfan Mouse Model and a GxxPG-Containing Fibrillin-1 Fragment. *Circulation*, 114(17), 1855–1862. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.601674>
- Guo, Gao, Gehle, P., Doelken, S., Martin-Ventura, J. L., von Kodolitsch, Y., Hetzer, R., & Robinson, P. N. (2011). Induction of macrophage chemotaxis by aortic extracts from patients with marfan syndrome is related to elastin binding protein. *PLoS ONE*, 6(5), 3–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020138>
- Habashi, J. P., Judge, D. P., Holm, T. M., Cohn, R. D., Loeys, B. L., Cooper, T. K., ... Dietz, H. C. (2006). Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, 312(5770), 117–121. <https://doi.org/10.1126/science.1124287>
- Halpert, M., & BenEzra, D. (1996). Surgery of the hereditary subluxated lens in children. *Ophthalmology*, 103(4), 681–686. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(96\)30633-7](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(96)30633-7)
- He, R., Guo, D. C., Estrera, A. L., Safi, H. J., Huynh, T. T., Yin, Z., ... Milewicz, D. M. (2006).

- Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 131(3). <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2005.09.018>
- Heur, M., Costin, B., Crowe, S., Grimm, R. A., Moran, R., Svensson, L. G., & Traboulsi, E. I. (2008). The Value of Keratometry and Central Corneal Thickness Measurements in the Clinical Diagnosis of Marfan Syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 145(6), 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.01.028>
- Hibender, S., Wanga, S., van der Made, I., Vos, M., Mulder, B. J., Balm, R., ... de Waard, V. (2019). Renal cystic disease in the Fbn1 C1039G/+ Marfan mouse is associated with enhanced aortic aneurysm formation. *Cardiovascular Pathology*, 38, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2018.10.002>
- Homandberg, G. A. (1999). Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 4.
- Howell, D. W., Popovic, N., Metz, R. P., & Wilson, E. (2014). Regional changes in elastic fiber organization and transforming growth factor β signaling in aortas from a mouse model of marfan syndrome. *Cell and Tissue Research*, 358(3), 807–819. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1993-7>
- Ikonomidis, J. S., Jones, J. A., Barbour, J. R., Stroud, R. E., Clark, L. L., Kaplan, B. S., ... Gorman, R. C. (2006). Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. *Circulation*, 114(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000810>
- Jiménez-Altayó, F., Meirelles, T., Crosas-Molist, E., Sorolla, M. A., del Blanco, D. G., López-Luque, J., ... Egea, G. (2018). Redox stress in Marfan syndrome: Dissecting the role of the NADPH oxidase NOX4 in aortic aneurysm. *Free Radical Biology and Medicine*, 118(February), 44–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.023>
- Journal, A. (1993). *Kardiologie*.
- Ju, X., Ijaz, T., Sun, H., Lejeune, W., Vargas, G., Shilagard, T., ... Tilton, R. G. (2014). IL-6 regulates extracellular matrix remodeling associated with aortic dilation in a fibrillin-1 hypomorphic mgR/mgR mouse model of severe Marfan syndrome. *Journal of the American Heart Association*, 3(1), 1–13. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000476>
- Judge, D. P., Biery, N. J., Keene, D. R., Geubtner, J., Myers, L., Huso, D. L., ... Dietz, H. C. (2004). Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(2), 172–181. <https://doi.org/10.1172/JCI200420641>
- Kang, Y. N., Chi, S. C., Wu, M. H., & Chiu, H. H. (2019). The effects of losartan versus beta-blockers on cardiovascular protection in marfan syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the Formosan Medical Association*, (xxxx), 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2019.03.018>

- Kate Shannon ., G. O. D. P. J. S. J. M. C. F. R. N. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704894200.Myeloperoxidase>
- Khan, D. A., Sharif, M. S., & Khan, F. A. (2011). Diagnostic performance of high-sensitivity troponin T, myeloperoxidase, and pregnancy-associated plasma protein a assays for triage of patients with acute myocardial infarction. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(3), 172–178. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.3.172>
- Kim, H. W., Blomkalns, A. L., Ogbi, M., Thomas, M., Gavrila, D., Neltner, B. S., ... Weintraub, N. L. (2017). Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: Mitigation by taurine. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 313(6), H1168–H1179. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00296.2017>
- Klinke, A., Berghausen, E., Friedrichs, K., Molz, S., Lau, D., Remane, L., ... Baldus, S. (2018). Myeloperoxidase aggravates pulmonary arterial hypertension by activation of vascular Rho-kinase. *JCI Insight*, 3(11). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97530>
- Klinke, A., Nussbaum, C., Kubala, L., Friedrichs, K., Rudolph, T. K., Rudolph, V., ... Baldus, S. (2011). Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood*, 117(4), 1350–1358. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284513>
- Lau, D., & Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 111(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.023>
- Lemaire, S. A., McDonald, M. L. N., Guo, D. C., Russell, L., Miller, C. C., Johnson, R. J., ... Milewicz, D. M. (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21.1. *Nature Genetics*, 43(10), 996–1002. <https://doi.org/10.1038/ng.934>
- Loeys, B. L., Dietz, H. C., Braverman, A. C., Callewaert, B. L., De Backer, J., Devereux, R. B., ... De Paepe, A. M. (2010). The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 47(7), 476–485. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.072785>
- Loeys, B., Nuytinck, L., Delvaux, I., De Bie, S., & De Paepe, A. (2001). Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 161(20), 2447–2454. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.20.2447>
- Marquez, L. A., Dunford, H. B., & Van Wart, H. (1990). Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *Journal of Biological Chemistry*, 265(10), 5666–5670. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)39414-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)39414-1)
- Massague, J. (2000). NEW EMBO MEMBERS REVIEW: Transcriptional control by the TGF-

- beta/Smad signaling system. *The EMBO Journal*, 19(8), 1745–1754. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1745>
- Maumenee, I. H. (1981). The eye in the Marfan syndrome. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 79, 684–733.
- Mazzieri, R., Jurukovski, V., Obata, H., Sung, J., Platt, A., Annes, E., ... Rifkin, D. B. (2005). Expression of truncated latent TGF- β -binding protein modulates TGF- β signaling. *Journal of Cell Science*, 118(10), 2177–2187. <https://doi.org/10.1242/jcs.02352>
- Meuwese, M. C., Stroes, E. S. G., Hazen, S. L., van Miert, J. N., Kuivenhoven, J. A., Schaub, R. G., ... Boekholdt, S. M. (2007). Serum Myeloperoxidase Levels Are Associated With the Future Risk of Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Individuals. The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(2), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.033>
- n, Eunsung Mouradian, M. M. (2008). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268268.MMP-2>
- Nataatmadja, M., West, M., West, J., Summers, K., Walker, P., Nagata, M., & Watanabe, T. (2003). Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in Marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation*, 108(10 SUPPL.). <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000087660.82721.15>
- Ng, C. M., Cheng, A., Myers, L. A., Martinez-Murillo, F., Jie, C., Bedja, D., ... Dietz, H. C. (2004). TGF- β -dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(11), 1586–1592. <https://doi.org/10.1172/JCI200422715>
- Niki, E. (2018). Oxidant-specific biomarkers of oxidative stress. Association with atherosclerosis and implication for antioxidant effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 120(April), 425–440. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.001>
- Nybo, T., Dieterich, S., Gamon, L. F., Chuang, C. Y., Hammer, A., Hoefler, G., ... Davies, M. J. (2019). Chlorination and oxidation of the extracellular matrix protein laminin and basement membrane extracts by hypochlorous acid and myeloperoxidase. *Redox Biology*, 20(September 2018), 496–513. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.10.022>
- Ollikainen, E., Tulamo, R., Lehti, S., Hernesniemi, J., Niemelä, M., Kovanen, P. T., & Frösen, J. (2018). Myeloperoxidase associates with degenerative remodeling and rupture of the saccular intracranial aneurysm wall. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 77(6), 461–468. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly028>
- Onetti, Y., Meirelles, T., Dantas, A. P., Schröder, K., Vila, E., Egea, G., & Francesc Onetti, Y., Meirelles, T., Dantas, A.P., Schröder, K., Vila, E., Egea, G., & Francesc Jiménez-

- Altayó, X. (2016). NADPH oxidase 4 attenuates cerebral artery changes during the progression of Marfan syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00770.2015.-Marfan>
- Pereira, L., Andrikopoulos, K., Tian, J., Lee, S. Y., Keene, D. R., Ono, R., ... Ramirez, F. (1997). Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nature Genetics*, 17(2), 218–222. <https://doi.org/10.1038/ng1097-218>
- Pereira, Lygia, Lee, S. Y., Gayraud, B., Andrikopoulos, K., Shapiro, S. D., Bunton, T., ... Ramirez, F. (1999). Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3819–3823. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.7.3819>
- Pylayeva-Gupta, Y. (2011). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Radke, R. M., & Baumgartner, H. (2014). Education in Heart Diagnosis and treatment of Marfan syndrome : an update, 1382–1391. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-304709>
- Ramos-Mozo, P., Madrigal-Matute, J., Martínez-Pinna, R., Blanco-Colio, L. M., Lopez, J. A., Camafeita, E., ... Martín-Ventura, J. L. (2011). Proteomic analysis of polymorphonuclear neutrophils identifies catalase as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm: Potential implication of oxidative stress in abdominal aortic aneurysm progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), 3011–3019. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237537>
- Rees, M. D., Whitelock, J. M., Malle, E., Chuang, C. Y., Iozzo, R. V., Nilasaroya, A., & Davies, M. J. (2010). Myeloperoxidase-derived oxidants selectively disrupt the protein core of the heparan sulfate proteoglycan perlecan. *Matrix Biology*, 29(1), 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.09.005>
- Revenu, N., Quenum, G., Demaille, T., Verellen, G., De Paepe, A., & Verellen-Dumoulin, C. (2004). Congenital diaphragmatic eventration and bilateral uretero-hydronephrosis in a patient with neonatal Marfan syndrome caused by a mutation in exon 25 of the FBN1 gene and review of the literature. *European Journal of Pediatrics*, 163(1), 33–37. <https://doi.org/10.1007/s00431-003-1330-8>
- Richards et al. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.304936.Role>
- Robinson, P. N., Arteaga-Solis, E., Baldock, C., Collod-Bérout, G., Booms, P., De Paepe, A., ... Godfrey, M. (2006). The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of Medical Genetics*, 43(10), 769–787. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.039669>
- Rudolph, V., Rudolph, T. K., Hennings, J. C., Blankenberg, S., Schnabel, R., Steven, D., ... Baldus, S. (2007). Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(8), 1189–1196.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.016>

- Saharinen, J., Taipale, J., Monni, O., & Keski-Oja, J. (1998). Identification and characterization of a new latent transforming growth factor- β -binding protein, LTBP-4. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18459–18469. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18459>
- Scharnagl, H., Kleber, M. E., Genser, B., Kickmaier, S., Renner, W., Weihrauch, G., ... Malle, E. (2014). Association of myeloperoxidase with total and cardiovascular mortality in individuals undergoing coronary angiography - The LURIC study. *International Journal of Cardiology*, 174(1), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.03.168>
- Sherrah, A., Wilson, M., Thomas, S., Chan, E., Yeung, A., Robertson, E., ... Bannon, P. (2017). Haem-Enzymes Predictive of Coronary Artery Disease Are Present in Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysm. *Heart, Lung and Circulation*, 26(2), S405. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2017.03.147>
- The, M. H., Nitrification, J. P., Delhi, N., & Nitrification, O. C. (1998). Letters To Nature. *Nature*, 394(JULY), 1855–1857.
- Uriarte, J. J., Meirelles, T., Del Blanco, D. G., Nonaka, P. N., Campillo, N., Sarri, E., ... Farré, R. (2016). Early impairment of lung mechanics in a murine model of marfan syndrome. *PLoS ONE*, 11(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152124>
- Utani, A. (2010). Laminin α 3 chain-derived peptide promotes keratinocyte migration and wound closure: Clustering of syndecan-4 and integrin α 1. *Seikagaku*, 82(4), 327–331. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Vissers, M. C. M., & Thomas, C. (1997). Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 401–411. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00619-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00619-3)
- Wang, W., Viappiani, S., Sawicka, J., & Schulz, R. (2005). Inhibition of endogenous nitric oxide in the heart enhances matrix metalloproteinase-2 release. *British Journal of Pharmacology*, 145(1), 43–49. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706144>
- Xu, J., Xie, Z., Reece, R., Pimental, D., & Zou, M. H. (2006). Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: Role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(12), 2688–2695. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000249394.94588.82>
- Yang, H. H. C., van Breemen, C., & Chung, A. W. Y. (2010). Vasomotor dysfunction in the thoracic aorta of Marfan syndrome is associated with accumulation of oxidative stress. *Vascular Pharmacology*, 52(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2009.10.005>
- Yi, C., Katina, W., He, G., Lauren, W.-P., Sarah, A. D., Pierce, G. L., ... Hasan, D. (2015). Myeloperoxidase Is Increased in Human Cerebral Aneurysms and Increases Formation and Rupture of Cerebral Aneurysms in Mice. *Stroke*, 46(6), 1651–1656. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.008589> Myeloperoxidase

- Yuan, S.-M., & Jing, H. (2011). Cystic medial necrosis: pathological findings and clinical implications. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 26(1), 107–115. <https://doi.org/10.1590/s0102-76382011000100019>
- Zhang, C., Pate, R., Eiserich, J. P., Zhou, F., Kelpke, S., Ma, W., ... White, C. R. (2001). Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 281(4 50-4), 1469–1475. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.4.h1469>
- Zhang, R., Brennan, M. L., Fu, X., Aviles, R. J., Pearce, G. L., Penn, M. S., ... Hazen, S. L. (2001). Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Journal of the American Medical Association*, 286(17), 2136–2142. <https://doi.org/10.1001/jama.286.17.2136>
- Zhang, Y., Dong, H., Seeburg, D. P., Wojtkiewicz, R., Waterman, P., Pulli, B., ... Hospital, M. G. (2020). HHS Public Access, 56(2), 954–962. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1137-2.Multimodal>

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese des Marfan-Syndroms. links: intakte Aortenwand mit strukturierter und gleichmäßiger Anordnung der EZM repräsentativ für eine intakte Gefäßwand; rechts: desorganisierte EZM mit Zerteilung extrazellulärer Proteine	23
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pathogenese des Marfan-Syndroms und einem möglichen Einfluss durch MPO. links: intakte Aortenwand mit strukturierter und gleichmäßiger Anordnung der EZM repräsentativ für eine intakte Gefäßwand; rechts: desorganisierte EZM	30
Abbildung 3: Immunfluoreszenz-Analyse der 3-Nitrotyrosin-Konzentration in der Gefäßwand der A.ascendens. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; rot: 3-Nitrotyrosin; Maßstab, 50 µm	38
Abbildung 4: DHE-Fluoreszenz-Analyse der Gefäßwand der A. ascendens nach 3 Inkubation mit DHE/DMSO. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; rot: DHE-Signal; Maßstab, 50 µm.	39
Abbildung 5: Immunfluoreszenz-Analyse der Cleaved-Caspase-3-Konzentration in der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; rot: Cleaved-Caspase-3; Maßstab, 50 µm	41
Abbildung 6: In-situ-Zymographie der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; Alter: 10 Wochen; Grün: Signalktivität; Maßstab, 50 µm	43
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung (Trichrom-Masson) der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,5,6; Alter:10 Wochen; Maßstab, 50 µm	44
Abbildung 8: Echokardiographische Untersuchung der A.ascendens, N: 9,12,11; Alter: 12 Wochen	45

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material	31
Tabelle 2: Antikörper	32
Tabelle 3: Reaktionspuffer	32
Tabelle 4: Reaktionskit	32
Tabelle 5: Mauslinien	32

6.3 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Quantifizierung des Immunfluoreszenz-Signals von 3-Nitrotyrosin in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A.ascendens. N: 6,7,7; **P<0.01. Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen	39
---	----

- Diagramm 2:** Quantifizierung des DHE-Fluoreszenz-Signals in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; *P<0.05. Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen 40
- Diagramm 3:** Quantifizierung des Immunfluoreszenz-Signals von Cleaved-Caspase-3 in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; ***P<0.001. Mittelwert ± SEM; Alter:10 Wochen 41
- Diagramm 4:** Quantifizierung des Immunfluoreszenz-Signals von Cleaved-Caspase-3 in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 5,5,5; Mittelwert ± SEM; Alter: 6 Wochen 42
- Diagramm 5:** Quantifizierung des Fluoreszenz-Signals der MMP 2&9-Aktivität in Abhängigkeit der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 6,7,7; **P<0.01. Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen 43
- Diagramm 6:** Quantifizierung des Fluoreszenzsignals der MMP 2&9-Aktivität in Abhängigkeit von der Gesamtfläche der Gefäßwand der A. ascendens. N: 5,5,5; Mittelwert ± SEM; Alter: 6 Wochen 43
- Diagramm 7:** Quantifizierung der Strangbrüche der Gefäßwand der A.ascendens. N: 6,5,6; Mittelwert ± SEM; Alter: 10 Wochen 45
- Diagramm 8:** Analyse des Durchmessers der A. ascendens, N: 9,12,11; ***P<0.001, ****P<0,0001, Mittelwert ± SEM; Alter: 12 Wochen 46
- Diagramm 9:** Analyse des MPO-Plasmaspiegels, N: 11, 17, 9; *P<0.05, ****P<0,0001, Mittelwert ± SEM; Alter: 12 Wochen 46