

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32024> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Grewal, Nimrat

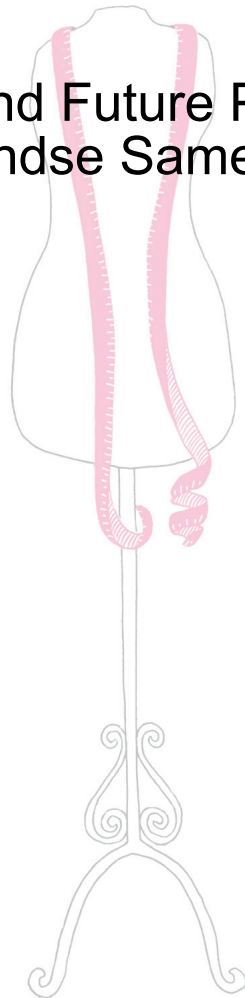
Title: Aortopathy in patients with a bicuspid aortic valve : determining susceptibility for aortic complications

Issue Date: 2015-02-19

CHAPTER

8

Summary and Future Perspectives
Nederlandse Samenvatting



SUMMARY AND FUTURE PERSPECTIVES

The prevalence of aortic dilation and related complications as rupture and dissection is higher in patients with a bicuspid aortic valve (BAV) as compared to patients with a tricuspid aortic valve (TAV), although not every individual carries an increased risk. It is therefore essential to identify those patients who are less susceptible for aortic wall pathology, as preventive ascending aortic surgery would not be necessary in this group. Since aortic diameter as a criterion for surgery is only decisive at population level, it would be very valuable to have tailored risk stratification at patient level.

The purpose of this thesis was therefore to investigate the possibility to identify patients with BAV, without apparent dilation, with an increased susceptibility for future complications as aortic dilation and dissection. Furthermore the biological mechanism underlying aortic wall pathology in BAV was compared to a known genetically determined syndrome with an increased risk of aortopathy being Marfan syndrome.

In **Chapter 1** the development of BAV is described. An overview is provided of commonly observed complications in patients with a BAV. Also, the aim of this thesis is presented and an outline of the chapters is given.

In **Chapter 2** histological and molecular genetic aspects of the normal and abnormal development of the aortic wall and semilunar valves are discussed. In this review we describe how a defect during early embryogenesis can distort the contribution of neural crest cells and second heart field derived cells in the valvulogenesis and development of the ascending aortic wall. The genetic origin of syndromes associated with aortic dilation (including Marfan syndrome, Ehlers-Danlos syndrome, Smad3 mutations and Loeys-Dietz syndrome) are discussed. The central role of transforming growth factor β (TGF β) is presented and linked to the embryonic development.

We concluded that aortic wall pathology associated with BAV could be the result of a developmental defect during embryogenesis. These contributions alone, however, are not sufficient to explain the clinical heterogeneity seen in BAV patients, as not all individuals with BAV develop aortic complications during their life. To identify the patients susceptible for dilation, we first aimed for a more in-depth understanding of the pathobiology leading to aortopathy in BAV as compared to TAV, which is discussed in the next chapter.

In **Chapter 3** differences in the histopathology of the aortic wall of patients with a BAV and TAV are described. Uniquely, not only dilated aortic wall specimen were investigated but also non-dilated specimen of both groups, representative for early lesions rather than of end-stage disease. The expression of vascular smooth muscle cell maturation markers, lamin A/C, which plays a pivotal role in vascular smooth muscle cell differentiation, and its splicing variant progerin indicative of aging, were studied. The results of this study show that the structure of the non-dilated and dilated aortic wall in bicuspidy and tricuspidy are intrinsically different. In bicuspidy lower lamin A/C expression is possibly linked with a defective smooth muscle cell differentiation, seen in these patients. This vessel wall immaturity, which can account for the increased weakness of the aortic wall, is encountered in all patients with BAV, including those who are less susceptible for future aortic complications. To identify the subset of patients which has an increased susceptibility for aortic complications we subsequently searched for markers, both clinical and immunohistochemical, predictive for aortic wall pathology in the non-dilated BAV patients.

Chapter 4 concerns the recognition of BAV patients with an increased vulnerability for aortic wall pathology, based on clinical characteristics. A study population of 255 patients was evaluated. Analysis of patient characteristics, clinical course and echocardiographic parameters including valve morphology led to the identification of predictors for future complications. In this study a clinical risk stratification model is presented to detect patients with an increased susceptibility. This working model shows that males with a BAV with fusion of the right and left coronary cusp, a complete raphe, hypertension and no statin use exhibit the highest risk of complications and should be monitored more closely.

Chapter 5 details the search for molecular biologic markers in identifying patients with an increased vulnerability for aortic complications, which can aid in patient selection for surgery. The aortic wall in patients with BAV and TAV, both dilated and non-dilated were studied. We studied a signaling pathway characteristic for cellular dedifferentiation, including the markers c-Kit, a marker for dedifferentiated vascular smooth muscle cells, and its phosphorylated state phosphorylated c-Kit (pc-Kit) triggered by the presence of matrix metalloproteinase-9 (MMP9), as well as the Hypoxia-Inducible-Factor-1alpha (HIF1 α) and endothelial nitric oxide (eNOS). We

found that this pathway was markedly expressed in the dilated BAV group and expression was completely comparable to only a subgroup of the non-dilated BAV group. Whereas the remainder of the non-dilated BAV group was significantly distinct. This difference between the dilated BAV group and the susceptible non-dilated BAV group was further confirmed in the expression of TGF β and phosphorylated Smad2. Next to the expression pattern, similarity in the dilated and the susceptible non-dilated BAV group was also noted clinically in the most common variant of commissure position and conjoined raphe of the BAV, being fusion of the right and left coronary cusp. This was in line with our findings described in **Chapter 4**. Based on these observations we considered the susceptible non-dilated BAV group a likely candidate for future dilation as opposed to the non-susceptible non-dilated BAV group. In this paper we also discussed the role of haemodynamic influences on development of aortic wall pathology in BAV by comparing expression of haemodynamic related markers in specimen obtained from the convex and concave side of the ascending aortic wall. A significant effect of shear stress on aortic complications in BAV was not observed.

In **Chapter 6** we compared the aortic wall in BAV and TAV to a syndrome which is highly prone for aortic wall pathology, being Marfan syndrome. Mutations in the *fibrillin-1* gene are found in 90-95% of all Marfan syndrome cases. In this study we investigated whether histopathological similarities are present between the aortic wall of BAV, TAV and Marfan syndrome, despite important clinical differences. We sought to identify an immunohistochemical explanation for the increased susceptibility for aortic dissections in Marfan syndrome, even in a non-dilated aortic wall, and at a younger age as compared to the BAV and TAV. The aortic media in Marfan syndrome showed a similar immature state of the vascular smooth muscle cells as in BAV. In both patient groups the level of expression of fibrillin-1 was also found decreased together with an altered distribution and localization of the protein as compared to the TAV. As fibrillin-1 is produced by vascular smooth muscle cells, a significant decrease of fibrillin-1 is plausible, also without apparent *fibrillin-1* gene mutations, due to the less well differentiated vascular smooth muscle cells.

The media in Marfan syndrome however also showed some histopathological resemblance with the dilated TAV group being significant cytolytic necrosis also referred to as medial necrosis, vascular smooth muscle cell apoptosis (programmed cell death) and degradation of the elastic lamellae. Vascular

smooth muscle cell apoptosis, which leads to cytolytic necrosis, however seems to occur due to a different pathogenetic mechanism in Marfan syndrome as compared to the dilated TAV group. In the dilated TAV ageing, accompanied by an increased progerin expression, and atherosclerosis causes vascular smooth muscle cell apoptosis, whereas these features were not apparent in the Marfan syndrome. In Marfan syndrome, vascular smooth cell apoptosis and subsequent cytolytic necrosis can occur as a direct consequence of the *fibrillin-1* gene mutation which leads to an increased Angiotensin II receptor signaling in Marfan syndrome. This combination of immaturity of the aortic media and cytolytic necrosis, renders the aortic wall very weak. These observations could explain why angiotensin-receptor-blockers as losartan, which reduce signaling through Angiotensin II receptor, have been identified as a potentially therapeutic agent to prevent progressive dilation of the aorta in Marfan syndrome. In BAV such medical treatment is not as effective because the pathology in the aortic wall in BAVs is not characterized by cytolytic necrosis.

In **Chapter 7** we investigated the expression of Wilms tumor suppressor protein (Wt1), which has been found to become active in response to pathologic conditions in epicardial cells covering the myocardium of the heart. We hypothesized that the arterial epicardium might show a similar response in pathologic conditions. Wt1, retinaldehyde dehydrogenase-II (RALDH2), a downstream target of Wt1, and eNOS, which regulates Wt1 expression, were studied in the arterial epicardium in the BAV, TAV and Marfan syndrome. In search of the missing link between eNOS and matrix metalloproteinase (MMP9) in the phosphorylated c-Kit cascade described in Chapter 5, Wt1, RALDH2 and eNOS were also studied in the endothelial cells and medial vascular smooth muscle cells. From this study we could conclude that in all non-dilated patients, a baseline activity of Wt1 is present in epicardial and vascular smooth muscle cells. In the dilated TAV group features of cardiovascular ageing as inflammation and increased progerin expression, which are not present in the dilated BAV group, lead to an increased Wt1 activity.

We have shown earlier (Chapter 5) that within the non-dilated BAV group a subset of patients can be distinguished with an increased susceptibility for future aortic wall pathology on basis of the expression pattern of a panel of markers. The 'susceptible group' showed an increased expression of phosphorylated c-Kit, HIF1 α , eNOS and MMP9. In this study we found that the Wt1 expression in the susceptible group is also significantly higher as

compared to the remainder of the non-dilated BAV group. Wt1 is a transcription factor that acts as a gene repressor, which can participate in transcriptional regulation of MMP9 too. It has been reported earlier that eNOS stimulates the shuttle of Wt1 from the nucleus (where it is active) to the cytoplasm (where it loses its repressor activity). It is therefore plausible that the increased eNOS expression in the susceptible group leads to an enhanced MMP9 expression in this group, which subsequently stimulates the phosphorylation of c-Kit.

In this thesis we have added some new perspectives to the problem of decision making regarding patients with BAV and associated aortic wall pathology. The recommending guidelines for surgery are up till now mainly based on aortic diameter, although already some exceptions for patients with BAV are made in practice (1). In this guideline a distinction between BAV patients with and without risk factors is made, eluding to the fact that not all BAV patients are equal. Our studies underline that exclusive use of aortic wall dimensions is not sufficient in selecting patients vulnerable for future aortic wall complications. It is however not possible as yet to make a direct extrapolation from our histopathology observations in a patient to the clinical practice. We should therefore, in future research, focus on the translation of the histopathology findings to 1) blood borne markers, 2) on site biopsy evaluation during surgery, as performed in research of malignancies, 3) refinement of imaging techniques, which can be applied in the clinical practice, to distinguish the susceptible from the non-susceptible cases with BAV.

8

An important aspect which has not received sufficient attention in our current work is the follow up of patients after the aortic valve surgery. Several studies have indicated that in cases of an isolated aortic valve replacement the risk of postoperative ascending aortic dilation is minimized (2-5). Whereas Yasuda et al. indicated in their study that the aorta grows faster in BAV patients even after an aortic valve replacement has been performed (6).

Recent publications take the discussion on the role of haemodynamics in BAV patients in the development of aortic wall dilation to another level. This report focusses on a difference in dilation progress dependent on whether the diseased aortic valve was stenotic or regurgitant with concomitant root dilation (7) in the latter. It is argued that the aortic dilation in the “stenotic phenotype” is a functional haemodynamic induced problem, while the aortic wall problem in the “root phenotype” is genetically determined. We, however, do not completely agree on this differentiation into two main groups, as this cannot

be supported from a developmental point of view. All BAVs are intrinsically a congenital malformation and we have shown that this developmental disorder most probably also involves the wall of the ascending aorta independent of a stenotic or a root phenotype. From our studies we could also not divide our cases in pure stenotic and regurgitant phenotypes as in many cases both phenomena are encountered. In future, besides a prospective clinical follow up of the study population after aortic valve replacement, it would thus also be valuable to expand the histopathology research subdivided on clinically well-defined stenotic and root phenotype patients. Thereby investigating in more detail the influence of the jet stream site using the opposite site of the aortic wall as a control. Most importantly this should include patients without an overt dilation as this category is not mentioned in the literature as yet. Haemodynamic markers should include shear stress responsive factors such as Krüppel like factor 4 (KLF4) (8).

These detailed studies might also shed more light on our consistent observation of diminished expression of maturation markers including alpha smooth actin both in the dilated and the non-dilated BAV aortic walls. This can confirm or exclude the possibility that shear stress, which is the frictional force acting in the direction of blood flow on the inner surface of blood vessels, is the cause of an inhibition of the expression of maturation vascular smooth muscle cell markers as has been observed in *in vitro* studies (9).

The localization of aortic wall dilation is typically different between patients with Marfan syndrome and BAV patients (10). Molecular biological research has shown that in Marfan syndrome *fibrillin-1* mutations, typical for Marfan patients, lead to an increased Angiotensin II receptor signaling and subsequent induction of TGF β signaling (11). In BAV patients a reduction of fibrillin-1 protein expression and rarely a mutation in the *fibrillin-1* gene has also been described (Chapter 6, (12;13)). We, however, showed in our study that the expression level of TGF β is significantly lower in the dilated BAVs as compared to controls, thus differentiating them from the Marfan patient with a *fibrillin-1* mutation. It is therefore interesting to investigate whether the reported Angiotensin receptor increase in Marfan patients is also found in the wall of BAV patients or that this phenomenon is purely linked to the mutation and not to the observed diminished expression of fibrillin-1 protein as seen in both Marfan and BAV. The results might be relevant for the understanding of the difference in treatment results between Marfan and BAV patients after use of Angiotensin receptor blockers.

REFERENCES

- (1) Erbel R, Aboyans V, Boileau C, Bossone E, Di BR, Eggebrecht H, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2014.
- (2) Charitos EI, Stierle U, Petersen M, Mohamed SA, Hanke T, Schmidtke C, et al. The fate of the bicuspid valve aortopathy after aortic valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;45(5):e128-e135.
- (3) Abdulkareem N, Soppa G, Jones S, Valencia O, Smelt J, Jahangiri M. Dilatation of the remaining aorta after aortic valve or aortic root replacement in patients with bicuspid aortic valve: a 5-year follow-up. *Ann Thorac Surg* 2013;96(1):43-9.
- (4) Ali A, Patel A, Ali ZA, Abu-Omar Y, Freed D, Sheikh AY, et al. Stentless aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve disease: clinical outcome and aortic diameter changes during follow-up. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;38(2):134-40.
- (5) Dayan V, Cura L, Munoz L, Areco D, Ferreiro A, Pizzano N. Risk of subsequent aortic dilatation is low in patients with bicuspid aortic valve and normal aortic root diameter at the time of aortic valve replacement. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010;10(4):535-8.
- (6) Yasuda H, Nakatani S, Stugaard M, Tsujita-Kuroda Y, Bando K, Kobayashi J, et al. Failure to prevent progressive dilation of ascending aorta by aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve: comparison with tricuspid aortic valve. *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II291-II294.
- (7) Girdauskas E, Disha K, Secknus M, Borger M, Kuntze T. Increased risk of late aortic events after isolated aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve insufficiency versus stenosis. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2013;54(5):653-9.
- (8) Egorova AD, Khedoe PP, Goumans MJ, Yoder BK, Nauli SM, ten DP, et al. Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Circ Res* 2011;108(9):1093-101.
- (9) Sterpetti AV, Cucina A, D'Angelo LS, Cardillo B, Cavallaro A. Shear stress modulates the proliferation rate, protein synthesis, and mitogenic activity of arterial smooth muscle cells. *Surgery* 1993;113(6):691-9.
- (10) Brown OR, DeMots H, Kloster FE, Roberts A, Menashe VD, Beals RK. Aortic root dilatation and mitral valve prolapse in Marfan's syndrome: an ECHOCARDIOgraphic study. *Circulation* 197;52(4):651-7.
- (11) Nagashima H, Sakomura Y, Aoka Y, Uto K, Kameyama K, Ogawa M, et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis in cystic medial degeneration associated with Marfan's syndrome. *Circulation*

2001;104(12 Suppl 1):I282-I287.

- (12) Pepe G, Nistri S, Giusti B, Sticchi E, Attanasio M, Porciani C, et al. Identification of fibrillin 1 gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Med Genet* 2014;15(1):23.
- (13) Fedak PW, de Sa MP, Verma S, Nili N, Kazemian P, Butany J, et al. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126(3):797-806.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bij patiënten met een bicuspide aortaklep (BAV), bestaat de klep uit twee klepblaadjes in plaats van drie (tricuspide aortaklep, TAV). Patiënten met BAV hebben vergeleken met TAV patiënten een verhoogd risico op complicaties van de aortaklep en van de grote lichaamsslagader, de aorta. Een veel voorkomende complicatie is een verwijding van het eerste deel van de aorta, de aorta ascendens, met bijbehorende vaak lethale problemen als een ruptuur of een dissectie (een scheur van de binnenste laag van de vaatwand). Bij een deel van de BAV patiënten wordt echter nooit pathologie van de aorta gezien. Het is daarom van essentieel belang om de patiënten die minder gevoelig zijn voor aorta pathologie te identificeren, aangezien een preventieve ingreep om de aorta te vervangen in deze groep patiënten niet noodzakelijk is. Tot op heden is de besluitvorming voor aortachirurgie gebaseerd op de maximale doorsnede van de aorta ascendens. Uit eerder onderzoek is echter gebleken dat alleen de diameter onvoldoende is om patiënten met een verhoogd risico te selecteren voor chirurgie. Het zou dus waardevol zijn als er patiënt specifieke criteria opgesteld kunnen worden voor de selectie van patiënten voor een (preventieve) operatieve ingreep van de aorta.

Het doel van deze studie is het onderzoeken van klinische, morfologische en moleculair biologische factoren die BAV patiënten kunnen identificeren, met op dit moment een niet-gedilateerde aorta maar wel een verhoogd risico op aorta dilatatie in de toekomst.

Daarnaast wordt het pathobiologische mechanisme dat leidt tot complicaties van de aorta vergeleken tussen BAV patiënten en patiënten met het Marfan syndroom (MFS), die ook een verhoogde kans hebben op aorta pathologie.

In **Hoofdstuk 1** wordt de ontwikkeling van BAV beschreven en een overzicht gegeven van veel voorkomende complicaties. Het doel van deze studie wordt verder toegelicht en de indeling van de hoofdstukken wordt weergegeven.

In **Hoofdstuk 2** worden histologische en moleculair genetische aspecten van de normale en abnormale ontwikkeling van de aortawand en de aortaklep bediscussieerd. In dit review beschrijven we hoe een defect in de vroege ontwikkeling kan leiden tot een verstoring van de bijdrage van twee belangrijke embryonale cel populaties, namelijk de neurale lijst cellen

en cellen van het “second heart field”, aan de zich ontwikkelende klep en aortawand.

De genetische oorsprong van syndromen die geassocieerd zijn met aorta dilatatie (waaronder MFS, Ehlers-Danlos, Smad3 mutaties en Loeys-Dietz) wordt verder besproken. De centrale rol van TGF β hierin wordt bediscussieerd en gekoppeld aan de embryonale ontwikkeling. In dit review concluderen we dat BAV en de aorta pathologie die met deze klepafwijking geassocieerd is het gevolg kan zijn van een defect tijdens de embryonale ontwikkeling. Deze ontwikkelingsbiologische verklaring is echter niet voldoende om de klinische heterogeniteit in BAV te verklaren, aangezien niet alle BAV patiënten aorta complicaties ontwikkelen gedurende hun leven. Om de patiënten te kunnen identificeren die een verhoogd risico lopen op aortadilatatie, moeten we eerst de pathobiologie van de vaatwand die alle BAV patiënten gemeen hebben onderzoeken en vergelijken met de TAV patiënten. Dit wordt beschreven in het volgende hoofdstuk.

In **Hoofdstuk 3** worden verschillen in de aortawand beschreven tussen BAV en TAV patiënten. Biopsies van de aortawand zijn onderzocht van zowel gedilateerde (BAD en TAD respectievelijk) als niet-gedilateerde (BA en TA respectievelijk) vaten. De vaatwanden werden onderzocht op de expressie van gedifferentieerde gladde spiercelmarkers, lamin A/C, dat een belangrijke rol speelt in de gladde spiercel differentiatie, en progerin, een marker indicatief voor cardiovasculaire veroudering. Uit dit onderzoek bleek dat de structuur van zowel de gedilateerde als de niet-gedilateerde aortawand intrinsiek anders is in de BAV vergeleken met de TAV. In de BAV is de gevonden lagere lamin A/C expressie mogelijk geassocieerd met een defecte gladde spierceldifferentiatie. Deze vaatwand immaturiteit, die de aortawand kan verzwakken, wordt dus in alle BAV patiënten gezien, inclusief de patiënten die minder gevoelig zijn voor aorta complicaties. Om de patiënten te kunnen identificeren die verhoogd kwetsbaar zijn voor pathologie van de aortawand, zijn we verder gaan zoeken naar voorspellende klinische en immunohistochemische markers.

Hoofdstuk 4 richt zich op klinische kenmerken die kunnen bijdragen aan het identificeren van BAV patiënten met een verhoogde gevoeligheid voor pathologie van de aorta. Een studiepopulatie van 255 patiënten werd onderzocht op demografische kenmerken, het klinisch beloop en

echografische parameters, waaronder de morfologie van de aortaklep. In dit hoofdstuk wordt een klinisch risicomodel gepresenteerd om patiënten met een verhoogde gevoeligheid op complicaties te identificeren. Dit werkmodel laat zien dat mannen met een complete fusie van het rechter en linker coronaire klepblad, met een hoge bloeddruk en zonder gebruik van cholesterolremmers het hoogste risico lopen en frequenter gemonitord moeten worden.

Hoofdstuk 5 beschrijft de zoektocht naar moleculair biologische markers die gebruikt kunnen worden om patiënten met een verhoogde kans op aortacomplicaties te identificeren. Hiervoor werden niet- en gedilateerde ascenderende aortawand bipten van BAV en TAV patiënten onderzocht. De markers die geïdentificeerd werden konden gekoppeld worden in een signaleringcascade die kenmerkend is voor cellulaire de-differentiatie. De markers zijn: c-Kit, een marker voor ongedifferentieerde gladde spiercellen en de gefosforyleerde vorm gefosforyleerde-c-Kit (pc-Kit). De fosforylatie van c-Kit wordt aangedreven door de aanwezigheid van matrix metalloprotease-9 (MMP9). Pc-Kit stuurt vervolgens de expressie van Hypoxia-Inducible-Factor-1alpha (HIF1 α) en endothelial nitric oxide (eNOS) aan. Deze cascade was geactiveerd in de gedilateerde BAV groep en de expressie was volledig vergelijkbaar met slechts een subgroep van de BA groep. Terwijl de rest van de BA groep een significant afwijkende expressiepatroon toonde. Dit verschil was ook te zien in de expressie van TGF- β en gefosforyleerde Smad2. Naast het expressiepatroon, waren overeenkomsten tussen de gedilateerde BAV groep en de subgroep van de niet-gedilateerde BAV groep ook duidelijk te zien in commissuur positie en de plaats van de raphe, namelijk een fusie tussen het rechter en linker coronair klepblad. Dit kwam overeen met onze bevindingen in **Hoofdstuk 4**. Op grond van deze observaties beschouwen we de BAb groep in tegenstelling tot de BAa groep als mogelijke kandidaat voor aortadilatatie in de toekomst.

In dit hoofdstuk beschrijven we ook de rol van hemodynamiek in de ontwikkeling van aorta pathologie. Hiervoor zijn bipten van de vaatwand onderzocht en vergeleken die verkregen waren van de convexe en concave zijde van de aorta. We hebben in de BAV patiënten geen significant effect van een veranderde hemodynamiek gevonden op het ontwikkelen van aortacomplicaties.

In **Hoofdstuk 6** hebben we de aortawand van BAV en TAV patiënten vergeleken met een syndroom dat een zeer verhoogd risico op aortawand pathologie heeft, namelijk het MFS. Van alle MFS gevallen wordt 90-95% veroorzaakt door mutaties in het *FBN1* (fibrilline-1) gen. In dit hoofdstuk werden de histopathologische overeenkomsten onderzocht tussen de aorta van de BAV, TAV en MFS patiënten. We hebben verder gezocht naar een immunohistochemische verklaring voor de verhoogde gevoeligheid van MFS patiënten voor het ontwikkelen van een aortadissectie, die zelfs gezien wordt in een niet gedilateerde aorta en op een jongere leeftijd vergeleken met de BAV en TAV patiënten. In MFS waren de gladde spiercellen in de media van de aorta, net als in de BAV, immatuur. In beide patiënten groepen was de expressie van fibrillin-1 ook verlaagd samen met een veranderde distributie en lokalisatie van het eiwit in vergelijking tot de TAV. Aangezien fibrillin-1 wordt geproduceerd door gladde spiercellen is het aannemelijk dat een verminderde expressie van fibrillin-1 ook kan voorkomen in minder gedifferentieerde vaten, terwijl er geen *FBN1* mutatie is zoals in de BAV het geval is. De MFS liet echter ook histopathologische overeenkomsten zien met de gedilateerde TAV zoals significante cytolytische necrose (CN) (verlies van gladde spiercelkernen in de media), gladde spiercel apoptose en degradatie van de elastische lamellen. De oorzaak van gladde spiercel apoptose, dat leidt tot CN, is echter anders in de MFS dan in de gedilateerde TAV groep. In de gedilateerde TAV veroorzaakt cardiovasculaire veroudering, met een verhoogde expressie van progerin, atherosclerose en inflammatie, terwijl deze verschijnselen in de MFS niet voorkomen, In MFS veroorzaakt de *FBN1* mutatie direct gladde spiercel apoptose, via een verhoogde signalering van de Angiotensin II receptoren (AGTR). In MFS is er dus een combinatie van immaturiteit van de media en CN die de vaatwand extreem zwak maakt. Deze bevindingen verklaren ook waarom angiotensin-receptor-blokkers (ARBs) zoals losartan, die de signalering via de AGTRs verminderen, in MFS als preventief medicijn werken om dilatatie van de aorta tegen te gaan. In BAV werken deze medicijnen niet of nauwelijks omdat de aortwand in deze groep patiënten geen tekenen van CN laat zien.

In **Hoofdstuk 7** hebben we het expressiepatroon van Wilms tumor suppressor protein (Wt1) onderzocht, waarvan uit eerder onderzoek is gebleken dat het als reactie op pathologische omstandigheden geactiveerd wordt in de epicardcellen die het hart omgeven. Wij hypothetiseren dat de buitenste

cellaag van de ascenderende aorta, het arteriële epicard, een zelfde mechanisme vertoont onder pathologische omstandigheden. We hebben het arteriële epicard in BAV, TAV en MFS onderzocht op de expressie van Wt1, Retinaldehyde dehydrogenase-II (RALDH2), dat onder transcriptionele regulatie staat van Wt1 en eNOS, dat de Wt1 expressie reguleert. De expressie van deze drie markers werd ook in de endotheelcellen en de gladde spiercellen onderzocht, met als doel het kunnen linken van eNOS en MMP9 beschreven in de cascade in Hoofdstuk 5. In deze studie konden we concluderen dat in de epicardcellen en gladde spiercellen van alle niet-gedilateerde vaten een basis Wt1 activiteit aanwezig is. In de gedilateerde TAV leiden kenmerken van cardiovasculaire veroudering zoals inflammatie en een verhoogde progerin expressie, die niet aanwezig zijn in de gedilateerde BAV groep, tot een significant hogere Wt1 activiteit.

We hebben eerder beschreven (Hoofdstuk 5) dat er binnen de niet-gedilateerde BAV groep, op basis van het expressiepatroon van een moleculair biologisch pad, een subgroep geïdentificeerd kan worden met een verhoogde kans op complicaties van de aorta. Deze groep vertoont een verhoogde expressie van pc-Kit, HIF1 α , eNOS en MMP9. In deze studie hebben we aangetoond dat Wt1 expressie in de 'gevoelige patiënten' ook significant hoger is vergeleken met de rest van de niet-gedilateerde BAV groep. Wt1 is een transcriptiefactor dat een belangrijke rol speelt als onderdrukker van genexpressie, waaronder dat van MMP9. Daarnaast is eerder ook beschreven dat eNOS de verplaatsing van Wt1 uit de kern (waar Wt1 actief is) naar het cytoplasma (waar Wt1 de onderdrukkende functie verliest) stimuleert. Het is daarom aannemelijk dat de toegenomen eNOS expressie in de 'gevoelige patiënten' kan leiden tot een verhoogde MMP9 expressie, dat vervolgens de fosforylering stimuleert van c-Kit.

