

## Abstract

Fibrillins (fibrillin-1, -2, and -3) constitute a family of 350 kDa extracellular matrix glycoproteins which share a conserved multidomain structure mainly consisting of calcium binding epidermal growth factor (cbEGF) like domains interspersed by 8-cysteine modules. In tissues, fibrillin monomers assemble into supramolecular, beads-on-a-string *fibrillin microfibrils* (FMF). FMF target and sequester growth factors of the TGF- $\beta$  superfamily within the *extracellular matrix* (ECM). Deficiency in fibrillin-1 affects the structural integrity of FMF being causative for a range of congenital connective tissue disorders, with Marfan syndrome (MFS) having the highest prevalence (1 in 5000). The most life-threatening feature of Marfan patients is *thoracic aortic aneurysm* (TAA) formation and dissection. The predominant concept behind cardiovascular features observed in MFS patients is that non-sequestered TGF- $\beta$  triggers the onset of aneurysm formation. However, recent findings suggest that aortic disease in MFS precedes aberrantly increased TGF- $\beta$  activity.

To investigate how fibrillin-1 deficiency leads to aortic aneurysm formation, the already characterized Marfan knock-in mouse model GT8 was employed. At birth aortas from *Fbn1*<sup>+/<sup>GT8</sup>, *Fbn1*<sup>GT8/<sup>GT8</sup> mice appeared grossly normal by histology. After P7 progressive degradation of adventitial collagen and elastic lamellae was found. *Fbn1*<sup>+/<sup>GT8</sup>, *Fbn1*<sup>GT8/<sup>GT8</sup> mice showed significant aortic root enlargement at P11 by echocardiography which correlated with the onset of increased BMP signaling and MMP-13 expression. BMP stimulation upregulated MMP-13 expression in isolated primary VSMCs. Breeding the GT8 allele onto a *Mmp13* null background rescued aortic root enlargement implying a negative role of MMP-13 in the pathology of MFS.</sup></sup></sup></sup>

Previously, it was shown that fibrillin-1 binding to BMP prodomain-growth factor (PD-GF) complexes induces a conformational change in the PD which renders the GF latent. However so far, no studies have provided a mechanism of how BMPs can be activated and released from FMF-bound pools. By conducting an *in vitro* PD cleavage screen a general MMP cleavage motif could be identified within BMP PDs. Cleavage at this site by MMP-13 leads to release of bioactive BMP-7 GF when BMP-7 CPLX bound to fibrillin fibers was provided as substrate.

Based on the findings in this study a new model for the mechanisms of aneurysm formation in MFS can be proposed. Failed BMP sequestration to structurally impaired FMF leads to increased BMP signaling when structural compensation by fibrillin-2 ceases. Non-sequestered BMPs trigger a destructive feed-forward cycle by turning on MMP-13 activity which activates more fibrillin-bound BMPs but also other MMPs leading to gross destruction of the aortic wall architecture including collagen and elastin networks.

## Zusammenfassung

Fibrilline (Fibrillin-1, -2 und -3) bilden eine Familie von 350 kDa großen Glykoproteinen der extrazellulären Matrix (ECM). Sie besitzen eine konservierte Domänenstruktur, die mehrheitlich aus Kalzium-bindenden, epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Domänen mit eingestreuten 8-Cystein-Modulen besteht. In Geweben lagern sich Fibrillin-Monomere zu supramolekularen, perlenschnurförmigen Fibrillin-Mikrofibrillen (FMF) zusammen. FMF binden und sequestrieren Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie innerhalb der ECM. Fibrillin-1-Defizienz beeinträchtigt die strukturelle Integrität von FMF, was als molekulare Ursache von mehreren Bindegewebserkrankungen angesehen werden kann. Dabei ist das Marfan-Syndrom (MFS) die häufigste Erkrankung (1 in 5000). Das lebensbedrohendste klinische Merkmal von MFS-Patienten ist die Ausbildung von thorakalen Aortenaneurysmen (TAA), welche unbehandelt zu plötzlicher Ruptur und zum Tode führen können. Nach bisher vorherrschender Meinung galt dysreguliertes TGF- $\beta$  als Auslöser der Aneurysmenbildung beim MFS. Jüngste Ergebnisse lassen vermuten, dass erhöhte TGF- $\beta$ -Aktivität als Folge der Aortenwanddestruktion beim MFS anzusehen ist und nicht als deren primäre Ursache.

Um die Entstehung von Aortenaneurysmen beim MFS zu untersuchen, wurde das bereits charakterisierte MFS-Knock-In-Mausmodell GT8 eingesetzt. Bei Geburt zeigte sich in der histologischen Analyse von *Fbn1*<sup>+/*GT8*</sup>, *Fbn1*<sup>*GT8*/*GT8*</sup> Mausarten noch keine großen Auffälligkeiten. Nach P7 wurde jedoch ein progressiver Abbau von Kollagenfasern in der Adventitia und den elastischen Lamellen der Aortenwand beobachtet. Echokardiographie von *Fbn1*<sup>+/*GT8*</sup> und *Fbn1*<sup>*GT8*/*GT8*</sup> Mäusen zeigte eine signifikante Aortenwurzelerweiterung bei P10, die mit erhöhter BMP-Aktivität und MMP-13-Expression korrelierte. BMP Stimulation erhöhte die Expression von MMP-13 in isolierten primären VSMCs. Genetische Ablation von *Mmp13* in GT8-Mäusen führte zu einer Normalisierung der Aortenwurzelerweiterung, was eine negative Rolle von MMP-13 in der Pathologie von MFS impliziert.

Zuvor konnte gezeigt werden, dass Bindung an BMP-Prodomänen-Wachstumsfaktor (PD-GF) – Komplexen an Fibrillin-1 zu einer Konformationsänderung in der PD führt und Inhibierung des GF zur Folge hat. Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, wie an FMF gebundene BMPs aktiviert und freigesetzt werden können. In *in-vitro* PD Spaltungsscreens konnte ein allgemeines MMP-Spaltungsmotiv innerhalb von BMP PD identifiziert werden. Spaltung der BMP-7 PD an dieser Stelle durch MMP-13 führte zur Freisetzung von bioaktivem BMP-7 GF, wenn an Fibrillinfasern gebundener BMP-7-Komplex als Substrat bereitgestellt wurde.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann ein neues Modell zur Aneurysmaentstehung in MFS vorgeschlagen werden. Eine nicht funktionierende BMP-Sequestrierung durch strukturell beeinträchtigte FMF führt zu erhöhter BMP-Aktivität in dem Moment, in dem die strukturelle Kompensation durch Fibrillin-2 wegfällt. Nicht sequestrierte BMPs induzieren einen zerstörerischen Feed-Forward-Zyklus, in dessen Verlauf MMP-13 aktiviert wird, welches noch mehr BMPs aus der ECM freisetzt, aber auch den Abbau von stabilisierenden Kollagen- und Elastin-Netzwerken der Aortenwandarchitektur zur Folge hat.