Aus dem CharitéCentrum
für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und
Humangenetik
Institut für Medizinische Genetik
Direktor: Prof. Dr. Stefan Mundlos

Habilitationsschrift

Molekulare und klinische Untersuchungen beim Marfan-Syndrom und verwandten Erkrankungen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Humangenetik

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin-Berlin

von

Dr. med. Peter N. Robinson

geboren am 12.04.1963 in Philadelphia

Eingereicht: März 2009
Dekan: Frau Prof. Dr. med. A. Grüters
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Schmidtke/Hannover
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. O. Rieß/Tübingen.

Felix qui potuit rerum cognoscere causas ...

-Vergil

For my father

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung **2**

1.1 Fibrillin-1, fibrillinhaltige Mikrofibrillen und elastische Fasern 2

1.2 Die Fibrillin-LTBP-Genfamilie 4

1.3 Mutationen in *FBN1*: Genotyp-Phänotyp-Korrelationen 6

1.4 *FBN2*-Mutationen und Beals-Hecht-Syndrom 9

1.5 *TGFBR1*- und *TGFBR2*-Mutationen und Loeys-Dietz-Syndrom 10

1.6 Andere genetische Ursachen der thorakalen Aortendissektion 10

1.7 Die bikuspide Aortenklappe 12

1.8 Die molekulare Pathophysiologie des Marfan-Syndroms 13

2 Originalarbeiten **17**

2.1 TGGE-Analyse 17

2.2 Differentielle Auswirkung von *FBN1*-Mutationen 19

2.3 Ein GxxPG-Motiv enthaltendes Fibrillin-1-Fragment 21

2.4 Induktion der Makrophagenchemotaxis 23

2.5 Shprintzen–Goldberg-Syndrom: 14 neue Patienten und eine klinische Analyse . . 24

2.6 Eine kurze ultrakonservierte Sequenz in *FBN1* 26

3 Diskussion **28**

3.1 TGGE-Analyse 29

3.1.1 cbEGF-Mutationen: Zysteinsubstitutionen und die Kalziumbindungskonsensussequenz betreffende Austausche 29

3.1.2 Mutationsdetektionsrate je nach klinischer Diagnose 30

3.2 Differentielle Auswirkung von *FBN1*-Mutationen 31

3.3 Ein GxxPG-Motiv enthaltendes Fibrillin-1-Fragment 32

3.4 Induktion der Makrophagenchemotaxis 33

3.5 Shprintzen–Goldberg-Syndrom: 14 neue Patienten und eine klinische Analyse . . 35
3.6 Eine kurze ultrakonservierte Sequenz in *FBN1* 35

4 Zusammenfassung **37**

Literaturverzeichnis **40**

Abkürzungen

AAA	Abdominelles Aortenaneurysma
AD	Autosomal dominant
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATS	Arterielle-Tortuositas-Syndrom
BAV	Bicuspid aortic valve (bikuspide Aortenklappe)
cbEGF	Kalziumbindendes EGF-Modul
CCA	Congenital contractural arachnodactyly (kongenitale Kontrakturen und Arachnodaktylie)
CMN	Erdheim-Gsell cystic media necrosis (zystische Medianekrose Erdheim-Gsell)
DPE	Downstream-promoter element
ECM	Extrazellulärmatrix
EDP	Elastin-derived peptides (von Elastin abgeleitete Peptide)
EGF	Epidermal growth factor module (Epidermal-Wachstums-Faktor-Like-Modul)
Inr	Initiatorelement
LAP	Latenz-assoziiertes Peptid
LDS	Loeys-Dietz-Syndrom
LLC	Large latent complex ('großer latenter Komplex')
LTBP	Latentes TGFβ-bindendes Protein
MIM	Mendelian Inheritance in Man (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim)
MFS	Marfan-Syndrom
MMP	Matrixmetalloproteinase
NMD	Nonsense-mediated decay (Nonsense-vermittelter Abbau)
nMFS	Neonatales Marfan-Syndrom
PDA	Ductus arteriosus apertus,
SGS	Shprintzen–Goldberg-Syndrom
SMC	Smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
TAAD	Thorakale Aortenaneurysmen und -dissektionen
TGFβ	Transforming growth factor beta
TGFBR1	TGFβ-Rezeptor Typ 1
TGFBR2	TGFβ-Rezeptor Typ 2
UCE	Ultrakonserviertes Element

Kapitel 1

Einführung

Das Marfan-Syndrom (MFS; MIM 154700) ist eine autosomal dominant vererbte hereditäre Erkrankung des Bindegewebes, welche in erster Linie durch Manifestationen im Skelett, Auge und Herzkreislaufsystem gekennzeichnet ist und eine Prävalenz von etwa 1–2 von 10.000 Personen hat. Das MFS wird durch Mutationen im Gen für Fibrillin-1 (*FBN1*) verursacht. Viele betroffene Personen weisen einen charakteristischen Habitus mit Großwuchs, langen und schmalen Gliedmaßen (Dolichostenomelie), langen und schmalen Fingern und Zehen (Arachnodaktylie), Skoliose und Trichterbrust (Pectus excavatum) oder Kielbrust (Pectus carinatum) auf. Ectopia lentis (»Linsenschlottern«) tritt bei bis zu 80% der Personen mit MFS auf und ist so gut wie immer beidseitig. Die häufigste Todesursache bei unbehandelten Patienten ist die die akute Aortendissektion, die meist nach einer über Jahre langsam fortschreitenden Aortenwurzelerweiterung (Aortendilatation) auftritt.

In dieser Habilitationsschrift werden Arbeiten zur Charakterisierung von *FBN1*-Mutationen und Genotype-Phänotyp-Korrelationen beim MFS, zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der Pathophysiologie des MFS, zur klinischen Charakterisierung der mit dem MFS verwandten Erkrankung Shprintzen-Goldberg-Syndrom sowie zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Genexpression des *FBN1* vorgestellt.

1.1 Fibrillin-1, fibrillinhaltige Mikrofibrillen und elastische Fasern

Das **Fibrillin-1** ist ein großes (∼320 kD) Glykoprotein, das aus mehreren wiederholt vorkommenden Sekundärstrukturmotiven besteht, wovon das **Epidermal-Wachstums-Faktor-Like-**

Modul (EGF) am häufigsten vertreten ist. ***FBN1*** (MIM 134797) findet sich auf Chromosom 15q21, besitzt 65 kodierende sowie drei nicht kodierende 5' gelegene Exons und umspannt etwa 235 kB genomische DNA. Das *FBN1*-Transkript hat eine Länge von nahezu 10 kb (1, 2). Fibrillin-1 ist eine Hauptkomponente einer Klasse von extrazellulären **Mikrofibrillen**, die einen Durchmesser von etwa 8–12 nm aufweisen und in vielen Geweben vorkommen. Die Mikrofibrillen können entweder zusammen mit elastischen Fasern in Geweben wie der Aorta oder in elastinfreien Bündeln in Geweben wie den Zonulafasern vorkommen (3).

Das Zusammenfügen (»assembly«) mehrerer Fibrillinmonomere zu Fibrillindimeren und der weitere Aufbau dieser und anderer Proteinmoleküle zu den hochpolymeren Mikrofibrillen erfolgt durch komplexe, nur teils verstandene Prozesse, die auch durch *FBN1*-Mutationen beeinträchtigt werden können. Mindestens sechs weitere Proteine, MAGP-1, MAGP-2, AAAP-40, MFAP-1, MFAP-3 und MFAP-4 sind zumindest in bestimmten Entwicklungsstadien oder Geweben integrale Bestandteile der Mikrofibrillen und üben zahlreiche Funktionen wie Bindung an Tropoelastin oder Biglycan, Zelladhäsion oder Unterstützung der Elastogenese aus. Neben diesen sechs Proteinen können Proteine wie LTBP1, LTPB2, LTBP4, Decorin, Fibulin-2 und Fibulin-5 sowie BMP7 an die Mikrofibrillen binden (Referenzen in Tabelle 1 und 2 von (4)).

Die elastische Faser ist eine komplexe Struktur, die aus Elastin, fibrillinhaltigen Mikrofibrillen, Lysyloxidase und Proteoglykanen besteht. Elektronenmikroskopisch stellen sich zwei morphologisch unterschiedliche Komponenten der Mikrofibrillen dar: ein aus Elastin bestehender, amorpher Kern, welcher etwa 90% der reifen Faser ausmacht und ein mikrofibrillärer Mantel. Elastin erzeugende Zellen sezernieren Tropoelastin, den 70-kD großen Vorläufer des Elastins, in den Extrazellulärraum, wo das Tropoelastin sich schnell an die Oberfläche bestehender elastischen Fasern anheftet und durch die Aktivität der Lysyloxidase durch Quervernetzungen kovalent an die elastische Faser gebunden wird. Das so entstandene reife Elastin verleiht den elastischen Fasern die Elastizität, die für dehnfähige Gewebe wie Aorta, Lunge und Haut unerlässlich ist (5). Während die Rolle des Elastins in der reversiblen Dehnbarkeit bestimmter Gewebe mittlerweile gut fundiert ist, sind die Funktionen des Fibrillins und der fibrillinhaltigen Mikrofibrillen weniger gut verstanden. Bislang konnten jedoch mehrere funktionelle Rollen für die fibrillinhaltigen Mikrofibrillen nachgewiesen werden. Erstens bilden sie eine Art Gerüst, auf das Tropoelastinmonomere während der Elastogenese deponiert werden (6). Zweitens sind die fibrillinhaltigen Mikrofibrillen selber dehnbar, tragen zur Elastizität bei und können die mechanischen Eigenschaften reifer elastischen Gewebe durch Umverteilung mechanischer Belastungen günstig beeinflussen (7, 8). Drittens dienen elastinfreie Mikrofibrillen als »Anker«

in bestimmten Geweben wie z.B. dem Auge, wo die aus Mikrofibrillen bestehenden Zonulafasern die Linse halten (9). Viertens können Mikrofibrillen durch Zelladhäsionsmotive wie das Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv Endothel- oder Epithelzellen an die Extrazellulärmatrix (ECM) verankern (10). Neuere Erkenntnisse legen eine Rolle für die Mikrofibrillen in der Steuerung der TGFβ-Aktivität, und vielleicht von anderen Wachstumsfaktoren wie BMP-7, nahe, wobei die molekularen Mechanismen noch nicht klar sind. Diese Themen werden weiter unten im Abschnitt 1.8 besprochen.

1.2 Die Fibrillin-LTBP-Genfamilie

Die Fibrilline und die latenten TGFβ-bindenden Proteine (LTBP) bilden zwei eng verwandten Proteinfamilien mit strukturellen und nicht strukturellen Funktionen in der ECM. Beide Familien sind durch eine moduläre Struktur mit zysteinreichen Struktureinheiten (»repeats«) gekennzeichnet.

Drei eng verwandte Fibrilline sind beim Menschen beschrieben worden. Fibrillin-2 und Fibrillin-3 weisen dieselbe Domänenstruktur auf wie Fibrillin-1, und die Aminosäurensequenzen der drei Fibrilline zeigen eine Sequenzidentität von zwischen 61% und 69% miteinander (11, 12). Vieles weist darauf hin, dass die drei Fibrilline sowohl überlappende als auch unterschiedliche Funktionen haben. Alle drei Fibrilline sind Bestandteile der extrazellulären, 10–12nm Mikrofibrillen, jedoch werden Fibrillin-2 und -3 vorwiegend in embryonalen Entwicklungsstadien und Fibrillin-1 vom Gastrulastadium bis ins Erwachsenenleben exprimiert (13, 14).

Beim Menschen sind vier LTBPs bekannt, wovon drei auf Grund von alternativem Spleißen mehrere Isoformen besitzen. Die LTBPs besitzen eine duale Funktion. Einerseits bilden sie strukturelle Bestandteile der ECM und andererseits steuern sie die Bioverfügbarkeit von TGFβ. Das TGFβ wird als homodimeres Proprotein erzeugt, wobei das Propeptid intrazellulär abgespalten wird, nichtkovalent an das reife TGFβ bindet und mit ihm einen Komplex bildet. Das Propeptid wird »Latenz-assoziiertes Peptid« (LAP) genannt, weil das TGFβ an Rezeptoren der Zelloberfläche nicht binden kann, solange es durch das LAP gebunden wird. Das LAP bindet extrazellulär über eine kovalente Disulfidbindung an ein LTBP, was dann als »großer latenter Komplex« (LLC) bezeichnet wird (15).

Die Fibrilline und die LTBPs zeigen eine bemerkenswert ähnliche Domänenstruktur und enthalten beide wiederholt vorkommende, zysteinreiche Strukturmodule wie das Epidermal-Wachstumsfaktor-ähnliches Modul (EGF) und ein 8-Zystein Modul, das nur bei den Fibrillinen

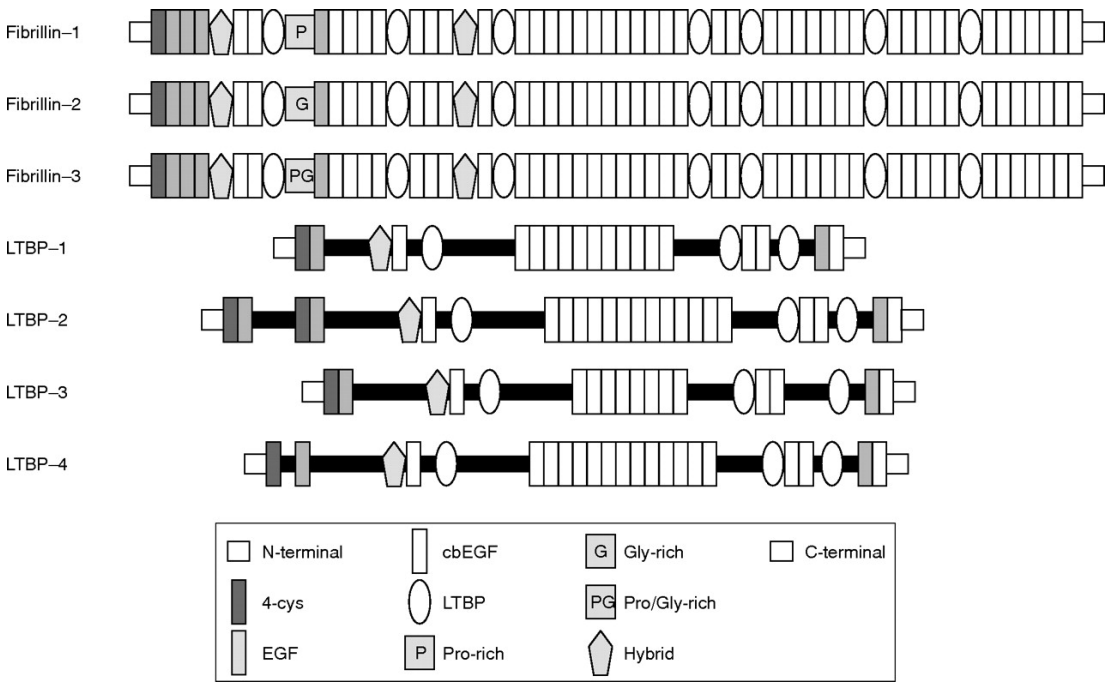

Abbildung 1.1: Das Gen für Fibrillin-1, *FBN1*, umspannt etwa 235 kb genomische DNA auf Chromosom 15q21.1, wobei die kodierende Sequenz in 65 Exons unterteilt ist. Abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen kodiert ein Exon für ein Strukturmodul wie hier dargestellt. Abbildung entnommen aus Robinson et al., 2006 (4).

und LTBPs vorkommt (8-cys) (Abb. 1.1). EGF-Module haben eine Länge von etwa 45 Aminosäuren und haben sechs absolut konservierte Zysteinreste, welche unter sich drei Disulfidbrücken bilden. 43 der 47 EGF-Module in Fibrillin-1 und viele der in den LTBPs vorkommenden EGF-Module weisen darüber hinaus eine Aminosäuresequenz auf, welche mit der Konsensussequenz für Kalziumbindung, (D/N)-X-(D/N)(E/Q)-X_m(D/N)*X_n(Y/F), übereinstimmt (m und n sind variabel und $*$ bezeichnet eine β-Hydroxylierungsstelle) (16). Solche Module werden als **kalziumbindende EGF-Module (cbEGF)** bezeichnet. Das 8-cys-Modul bildet eine durch vier Disulfidbrücken stabilisierte Struktur. Einige 8-cys-Module können an den LAP-TGFβ-Komplex binden (17). Nicht alle 8-cys-Module haben diese Funktion; zum Beispiel konnte ausgeschlossen werden, dass Fibrillin-1, das sieben 8-cys-Module enthält, an TGFβ bindet (18).

1.3 Mutationen in *FBN1*: Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

FBN1-Mutationen wurden 1991 bei Personen mit MFS entdeckt (19). Inzwischen sind über 803 *FBN1*-Mutationen bei 1013 Probanden (einschließlich 114 mehrmals vorkommende Mutationen bei 324 Probanden) publiziert worden (20). Missense-, Nonsense-, Frameshift- und Inframe-Insertions/Deletionsmutationen sind identifiziert worden (Abb. 1.2).

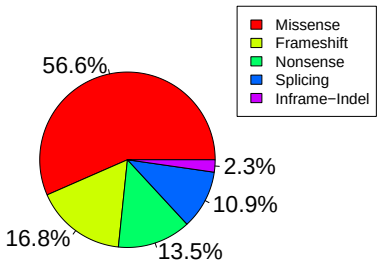

Abbildung 1.2: Verteilung der Mutationstypen bei 803 publizierten *FBN1*-Mutationen bei 1013 Personen mit MFS. Modifiziert nach (20).

Die meisten Missense-Mutationen betreffen eines der 43 cbEGF-Module des Fibrillin-1, und die zweithäufigste Klasse von Missense-Mutation betrifft Reste der Kalziumbindungskonsensussequenz (Abb. 1.3). Wie im Abschnitt 2.2 erklärt wird, hat die Kalziumbindung des Fibrillins eine Strukturfunktion, indem sie die Region zwischen benachbarten cbEGF-Module versteift und das Fibrillin gegen proteolytischen Abbau schützt (21, 22, 23).

Mutationen in *FBN1* sind bei Personen mit mehreren Krankheiten identifiziert worden, die sich in wichtigen Punkten vom klassischen Marfan-Syndrom unterscheiden. Im Prinzip könnte sowohl die Positionen einer Mutation innerhalb eines Strukturmotivs als auch die Stellung des Motivs innerhalb des Fibrillin-Polypeptids eine Rolle bei möglichen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen spielen (25). Es erscheint sicher, dass andere Faktoren, seien sie modifizierende Gene, Umwelteinflüsse, oder der Zufall, eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps spielen, zumal ein hoher Grad an klinischer Variabilität auch unter den betroffenen Mitgliedern einer Familie, die alle dieselbe Mutation tragen, häufig beobachtet wird (26). In einigen Fällen wurde dieselbe Mutation einmal bei einer Person mit dem schwerwiegenden neonatalen Marfan-Syndrom und einmal bei einer Person mit einem klassischen MFS beobachtet (27).

Als Beispiel für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei *FBN1* soll an dieser Stelle **das neonatale Marfan-Syndrom (nMFS)** beschrieben werden. Es handelt sich hierbei um eine Son-

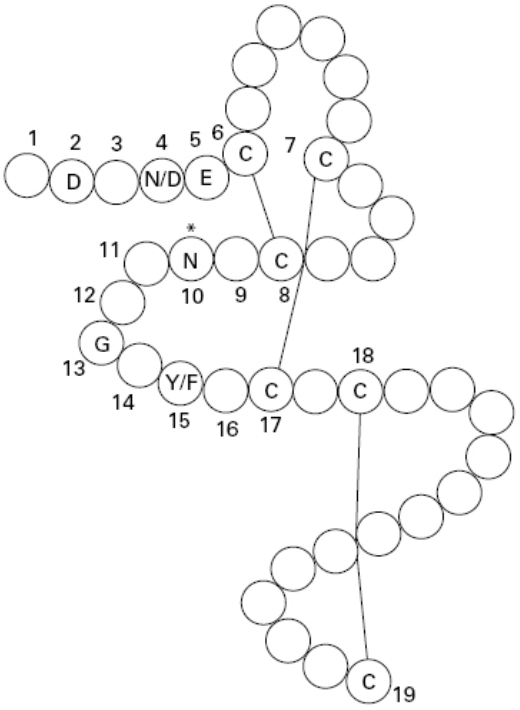

Abbildung 1.3: Ein kalziumbindendes Epidermiswachstumsfaktor-Modul (cbEGF). Die mit den Ziffern 1–19 markierten Aminosäurenreste umfassen die sechs absolut konservierte Zysteinreste sowie Reste der Kalziumbindungskonsensussequenz, welche eine Konsensussequenz für die β-Hydroxylierung aufweist (*). Abbildung von (24) entnommen.

derform des Marfan-Syndroms mit schwerwiegenden klinischen Manifestationen des klassischen MFS sowie Symptomen, die beim klassischen MFS nicht vorkommen. Merkmale wie Knautschohren (»crumpled ears«), Gelenkkontrakturen, Lungenemphysem und erschlaffte, starke Falten aufweisende Haut (Cutis laxa) sind für das nMFS typisch, kommen aber beim klassischen MFS nicht vor. Die Haupttodesursache beim nMFS ist eine durch Mitral- und Trikuspidalklappeninsuffizienz bedingte Herzinsuffizienz. Patienten mit nMFS versterben in der Regel in den ersten Lebensmonaten und überleben selten die ersten Lebensjahre (Tab. 1.1).

Alle bislang publizierten Mutationen, die bei Probanden mit einem nMFS im strengen Sinne (28) identifiziert worden sind, kommen in den Exons 24 bis 32 vor. Mutationen in diesem Bereich sind auch überdurchschnittlich häufig vertreten bei Personen mit ungewöhnlichen schweren klinischen Verläufen beim klassischen MFS (27, 29).

Die Gründe für die Ausprägung eines schwer- bis schwerstwiegenden Phänotyps bei einigen Mutationen in den Exons 24–32 sind bis heute weitestgehend unklar geblieben. Dies gilt auch

Merkmal	klassisches MFS	nMFS
	Herzkreislauf	
Mitralklappenprolaps	100%	59%
Mitralinsuffizienz	95%	$\geq 13\%$
Aortenwurzeldilatation	100%	Häufig
	Skelett	
Arachnodaktylie	95%	Häufig
Skoliose	22%	Häufig
Kontrakturen	91%	nein
	Augen	
Ectopia lentis	32%	79 %
	Andere Manifestationen	
Knautschohren	55%	nein
Cutis laxa	94%	nein
Haupttodesursache	Herzinsuffizienz	Aortendissektion

Tabelle 1.1: Klinische Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen nMFS und klassischem MFS. Daten von (28).

für andere, viel seltener beschriebene Sonderformen des Marfan-Syndroms, so genannte Typ-1-Fibrillinopathien (Tab. 1.2).

Syndrom	Klinische Merkmale	Referenz
MFS	siehe Text	siehe Text
nMFS	schwerste klinische Manifestationen	(28)
Atypisch schwerwiegende MFS	Schwerwiegende und früh auftretende kardiovaskuläre Manifestationen	(29)
Ectopia lentis	Isolierte okuläre Manifestationen	(30)
Kyphoskoliose	Progrediente Kyphoskoliose	(31)
Familiäre Arachnodaktylie	Dolichostenomelie und Arachnodaktylie	(32)
TAAD	Aortendilatation und -dissektion	(33)
Shprintzen-Goldberg-Syndrom	s. Abschnitt 2.5	(34)
Weill-Marchesani-Syndrom (AD)	Kurzwuchs, Brachydaktylie, Gelenksteifheit, okuläre Abnormalitäten	(35)

Tabelle 1.2: Typ-1-Fibrillinopathien. *FBN1*-Mutationen finden sich allerdings nur bei einer Minderheit der Patienten mit Shprintzen-Goldberg-Syndrom (s. Abschnitt 2.5). Abkürzungen: TAAD: Thorakale Aortenaneurysmen und -dissektion. AD: autosomal dominant. Tabelle entnommen von (4).

In der Gruppe der Patienten mit einem klassischen MFS besteht eine Korrelation zwischen Ectopia lentis und einer Mutation eines Zysteinrestes in einem beliebigen Abschnitt des Polypeptids. Nonsense- und Leserasterverschiebungsmutationen auf der anderen Seite sind mit schwereren Manifestationen im Skelett und in der Haut assoziiert. Diese Beobachtungen könnten auf unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen hindeuten (z.B. dominant negative Effekte gegen Haploinsuffizienz bzw. eine Störung der strukturellen Funktionen des Fibrillins gegen eine Veränderung von dessen Funktion in der Steuerung der TGFβ-Signalwege) (20).

1.4 *FBN2*-Mutationen und Beals-Hecht-Syndrom

Mutationen in dem Gen für Fibrillin-2, *FBN2*, sind die Ursache des **Beals-Hechts-Syndroms**, auch ***Congenital Contractural Arachnodactyly* (CCA)** genannt. Die CCA ist durch einen marfanoiden Habitus, Knautschohren, Gelenkkontrakturen, schwerwiegende Kyphoskoliose und Muskelhypoplasie gekennzeichnet (36). Bei den meisten Betroffenen sind Kontrakturen der großen Gelenke zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden. Die Kontrakturen bessern sich in der Regel spontan während der Kindheit. Eine progrediente und schwerwiegende Kyphoskoliose ist bei etwa der Hälfte der Betroffenen zu beobachten. Die meisten Personen mit einer CCA zeigen keine Aortenanomalien, jedoch wurde eine Aortenwurzelerweiterung bei CCA-Patienten gelegentlich beobachtet, so dass echokardiographische Vorsorgeuntersuchungen bei CCA-Patienten zu empfehlen sind (37).

Im Gegensatz zur Verteilung der beim MFS beobachteten *FBN1*-Mutationen über alle Bereiche des *FBN1*-Gens, sind nahezu alle bislang identifizierten *FBN2*-Mutationen in der Mitte des *FBN2*-Gens (Exons 23–34) gelegen (Referenzen in (4), S. 777).

Das *FBN2*-Gen wird während früher Entwicklungsstadien exprimiert, was zur Hypothese Anlass gab, dass das Fibrillin-2 eine Rolle bei der Steuerung der Dehnkräfte spielt, welche bei der Ausgestaltung des frühen Embryos mitwirken (38). Es konnte gezeigt werden, dass Fibrillin-2 an der Lungenmorphogenese beteiligt ist (39). *Fbn2*-Knockout-Mäuse weisen eine Syndaktylie auf (40), was einen weiteren Hinweis auf die Rolle des Fibrillin-2 als Entwicklungsmodulator liefert. Diese Beobachtungen legen die Spekulation nahe, dass Mutationen in *FBN2*, die in Bereichen des Gens außerhalb der Exons 23–34 gelegen sind, mit anderen Phänotypen als CCA wie z.B. Syndaktylie assoziiert sein könnten, was allerdings bis dato nicht gezeigt werden konnte.

1.5 *TGFBR1*- und *TGFBR2*-Mutationen und Loeys-Dietz-Syndrom

Bereits 1993, zwei Jahre nach der Entdeckung des Fibrillin-1-Gens (*FBN1*), wurde ein zweites Gen für Marfan-Syndrom vermutet, nachdem eine Kopplung an *FBN1* in einer großen französischen Familie mit skelettalen und kardiovaskulären Manifestationen des MFS ausgeschlossen wurde (41). 2004 wurde eine Mutation im Gen für den TGF-β-Rezeptor Typ II (*TGFBR2*) bei den betroffenen Familienangehörigen identifiziert. Das TGFβ ist an der Steuerung des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Produktion der extrazellulären Matrix beteiligt. 2005 wurden Mutationen in *TGFBR1* und *TGFBR2* beim nach den Erstbeschreibern genannten **Loeys-Dietz-Syndrom (LDS)** gesichert (42). Das LDS teilt eine Reihe von Merkmalen mit dem MFS, weist aber zahlreiche Merkmale wie Hypertelorismus auf, die beim MFS nicht vorkommen und in der Regel eine klinische Differenzierung vom MFS erlauben (Tab. 1.3). Eine korrekte Diagnosestellung ist aufgrund des unterschiedlichen klinischen Verlaufes unerlässlich (43). Das LDS Typ II weist Ähnlichkeiten mit dem Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) des Gefäßtyps (ehemals Typ IV) auf, so dass eine *TGFBR1*- oder *TGFBR2*-Mutationsanalyse bei Personen mit Verdacht auf EDS des Gefäß-Typs beim negativen *COL3A1*-Mutationsnachweis sinnvoll ist (Tab. 1.3).

Die Frage, ob es einen durch *TGFBR2*-Mutationen verursachte und von Loeys-Dietz-Syndrom abgrenzbare Marfan-Syndrom Typ II gibt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (42). Sicher erscheint jedoch, dass *TGFBR1*- oder *TGFBR2*-Mutationen auch mit MFS-ähnlichen Phänotypen verbunden sein können (44).

1.6 Andere genetische Ursachen der thorakalen Aortendissektion

Die zystische Medianekrose Erdheim-Gsell (CMN) findet sich nicht nur beim Marfan-Syndrom sondern auch bei Personen ohne assoziierte äußerliche phänotypische Auffälligkeiten. Die Identifikation von Familien, bei denen thorakale Aortenaneurysmen mit Typ A-Dissektionen (TAAD) und CMN einem autosomal dominanten Erbgang folgen, deutete auf genetisch bedingte, mehr oder weniger isolierte Störungen der Aorta hin. Mehrere Genloci konnten inzwischen kartiert werden. Bestimmte Mutationen im *TGFBR2*-Gen sind mit dem TAAD2 assoziiert. Mutationen in *TGFBR2* sollen bis zu 5% aller Fälle von autosomal dominant vererbter TAAD ausmachen.

	Auge	
MFS und LDS – Netzhautablösung	*MFS* – Hohe Myopie – Ectopia lentis	*LDS* – Blaue Skleren
	Skelett	
MFS und LDS – Thoraxdeformität – Skoliose – Arachnodaktylie	*MFS* – Dolichostenomelie	*LDS* – Klumpfuß
	Herzkreislaufsystem	
MFS und LDS – Aneurysma oder Dissektion der Aortenwurzel	*MFS* – Mitralklappenprolaps	*LDS* –Andere primäre Aneurysmen und Dissektionen – Arterielle Tortuositas – PDA – ASD
	Schädel und Gesicht	
MFS und LDS – Mittelgesichtshypoplasie – Hoher, schmaler Gaumen – Mikrognathie – Antimongoloide Lidachsenstellung – Dolichozephalie	*MFS*	*LDS* – Hypertelorismus – Kraniosynostose – Uvula bifida – Gaumenspalte
	Haut	
MFS und LDS – Striae distensae	*MFS*	*LDS* – dystrophe Narben – durchscheinende Venen – Hämatomneigung – Weiche Hautbeschaffenheit

Tabelle 1.3: Klinische Merkmale des MFS und Loeys-Dietz-Syndroms. **MFS und LDS**: klinische Merkmale, die bei beiden Störungen häufig vorkommen. **MFS**: klinische Merkmale, die häufig beim MFS, selten oder gar nicht bei LDS vorkommen. **LDS**: klinische Merkmale, die häufig beim LDS, selten oder gar nicht bei MFS vorkommen. Abkürzungen: PDA: Ductus arteriosus apertus (offener Ductus Botalli); ASD: Vorhofseptumdefekt. Eine Entwicklungsverzögerung tritt gelegentlich bei LDS auf, ist aber für MFS nicht charakteristisch. Eine lumbosakrale Duraektasie kann bei beiden Störungen auftreten. Daten aus (42, 43) zusammengefasst.

Mehrere Genloci für nichtsyndromale Aortendilatation und -dissektion sind inzwischen kartiert worden, einschließlich 11q23.2-24 und 5q13-14. Die betroffenen Gene sind bislang nicht identifiziert worden, und es erscheint wahrscheinlich, dass weitere mit Aortenaneurysmen assoziierte Loci noch unentdeckt sind. Das heißt, dass momentan kein Gentest zur Verfügung steht, womit man alle in Frage kommenden hereditären Ursachen von Aortenaneurysmen erfassen könnte. Zusätzlich zu den verschiedenen Loci für TAAD wurden in letzter Zeit weitere Gene für vermutlich sehr seltene Störungen der Aorta entdeckt. Tabelle 1.4 gibt eine Übersicht über monogene Syndrome, bei denen Aortendilatation und -dissektion häufig vorkommen. Erweiterung oder Dissektion der aufsteigenden Aorta können gelegentlich auch bei anderen genetisch bedingten Störungen wie Turner-Syndrom, Noonan-Syndrom, Alagille-Syndrom und der polyzystischen Nierenerkrankung vorkommen.

Gen/Locus	Syndrom	Referenz
FBN1	Marfan-Syndrom, Shprintzen-Goldberg-Syndrome, andere Typ-1-Fibrillinopathien	Überblick in (4)
FBN2	CCA (selten Aortendilatation)	(37)
TGFBR1	Loeys-Dietz-Syndrom	(42)
TGFBR2	Loeys-Dietz-Syndrom, TAAD	(42, 45)
COL3A1	Ehlers-Danlos-Syndrom des Gefäß-Typs	(46)
FBLN4	Cutis-laxa-Syndrom	(47)
5q13–14	FAA2	(48)
11q23.2-24	FAA1	(49)
MYH11	TAAD und PDA	(50)
GLUT10	ATS	(51)

Tabelle 1.4: Genetisch bedingte (monogene) Erkrankungen, die durch Aneurysmen oder Dissektion der aufsteigenden Aorta gekennzeichnet sind. Abkürzungen: TAAD: isolierte thorakale Aortenaneurysmen mit Typ A-Dissektionen, PDA: Ductus arteriosus apertus, ATS: Arterielle-Tortuositas-Syndrom. CCA: kongenitale Kontrakturen und Arachnodaktylie (Beals-Hecht-Syndrom).

1.7 Die bikuspide Aortenklappe

Eine isolierte bikuspide Aortenklappe ist als Ursache der Aortendissektion fast so häufig wie monogene Störungen wie MFS (52). Bikuspide Aortenklappen bestehen aus zwei Taschenklappen (valvulae semilunares) und zwei Sinus valsalvae statt aus drei bei der normalen trikuspiden

Aortenklappe. Die bikuspide Aortenklappe (BAV) gehört mit einer Prävalenz von ca. 1-2% zu den häufigsten kardiovaskulären Malformationen. Personen mit BAV haben ein erhöhtes Risiko für Aortenstenose und oder Aortenregurgitation, infektiöse Endokarditis und Aortendissektion. Obwohl angenommen wird, dass genetische Faktoren das Risiko für die Entstehung einer BAV wesentlich mit beeinflussen, konnten bislang erst in einem geringen Anteil der betroffenen Familien die assoziierten Gene identifiziert werden, und zwar wurden *NOTCH1*-Mutationen bei mehreren Familien mit bikuspiden, kalzifizierten Aortenklappen und anderen kardiovaskulären Fehlbildungen gefunden (53). Weitere Genloci sind identifiziert worden (54), aber die Bedeutung von Mutationen in einzelnen Genen als Ursache der meisten Fälle von BAV bleibt zu klären.

1.8 Die molekulare Pathophysiologie des Marfan-Syndroms

Das klassische Beispiel eines dominant negativen Pathomechanismus ist die Osteogenesis imperfecta, d.h. eine hereditäre Störung der Biosynthese von Kollagen meist auf Grund von *COL1A1*- oder *COL1A2*-Mutationen. Nonsense-Mutationen in diesen Genen können auf Grund des Nonsense-vermittelten Abbaus (NMD) zur Haploinsuffizienz für das betreffende Kollagen führen, so dass nur noch eine verminderte Synthese von Kollagen Typ I erfolgt. Missense-Mutationen (am häufigsten Substitution der Glyzinreste, die für die Ausbildung der Trippelhelix des Kollagens wichtig sind) führen auf der anderen Seite zur Synthese von überwiegend defektem und instabilen Kollagen Typ I.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde 1993 ebenfalls für das MFS angenommen (Abb. 1.4), da die damals identifizierten Missense-Mutationen mit eher schwerwiegenden klinischen Manifestationen und die Nonsense- bzw. Leserasterverschiebungsmutationen mit leichteren Manifestationen assoziiert waren (56). Dieser Vorstellung widersprach jedoch die Beobachtung, dass Mäuse mit einer hypomorphen *Fbn1*-Mutation, wodurch normales Fibrillin-1 in etwa 15% der normalen Menge produziert wurde, typische Manifestationen eines MFS aufwies (57). Spätere Untersuchungen zeigten, dass transgene Mäuse, die zwei normale *Fbn1*-Allele zusammen mit einem überexprimierten, transgenen mutanten Allel (C1663R) keine kardiovaskulären Manifestationen eines MFS aufwiesen. Ein anderer Mausstamm, der eine heterozygote, für das MFS typische *Fbn1*-Mutation trug (C1039G) zeigte wiederum typische kardiovaskuläre Manifestationen des MFS, die jedoch durch die Einführung eines Wildtyp-*FBN1*-Transgens korrigiert werden konnten (58). Diese Ergebnisse deuten auf ein pathogenetisches Modell hin, wonach Haploinsuffizienz für Wildtyp-Fibrillin-1 die primäre Ursache des MFS sei und nicht etwa die Produktion

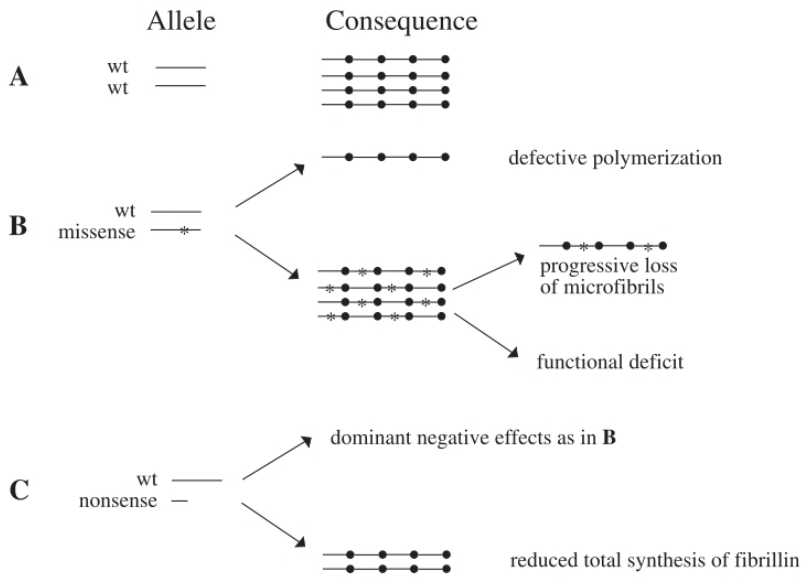

Abbildung 1.4: Denkbare Auswirkung eines dominant negativen Pathomechanismus beim MFS. (A) Wildtyp-Fibrillin-Monomere bilden zusammen mit anderen Protein hochpolymere Mikrofibrillen, die eine Perlenschnurstruktur aufweisen. (B) Missense-Mutationen. Die Bildung größerer Fibrillin-Aggregate hängt wahrscheinlich von der richtigen Konformation der Fibrillinmonomere ab, so dass zumindest bestimmte *FBN1*-Mutationen die Polymerisierungsschritte beeinträchtigen könnten. Es ist auch denkbar, dass mutante und Wildtypmonomere nahezu normale Mengen an Mikrofibrillen bilden, die jedoch durch die enthaltenen Mutationen funktionelle Defekte aufweisen oder instabil sind. (C) Nonsense- und Leserasterverschiebungsmutationen. Mutationen, die mit einem vorzeitigen Stopp-Codon assoziiert sind (PTC-Mutationen) lösen in der Regel den Nonsense-vermittelten Abbau aus, so dass die Gesamtsynthese an Fibrillin-1 reduziert wäre. Alternativ könnten auch kleinere Mengen an verkürzten Fibrillin-Monomeren dominant negativ Effekte auslösen. Die gemeinsame Endstrecke der verschiedenen Mutationstypen könnten daher eine Reduktion der Menge und der Funktionstüchtigkeit der fibrillinhaltigen Mikrofibrillen sein. Abbildung von (55) entnommen.

eines mutanten Fibrillin-1 mit dominant negativen Effekten. Diese Hypothese konnte durch die Beobachtung von zwei größeren, zwangsläufig mit *FBN1*-Haploinsuffizienz assoziierten *FBN1*-Deletionen bei humanen MFS-Patienten weitere Unterstützung finden (59). Demnach erschiene eine Erhöhung der *FBN1*-Expression als eine bessere therapeutische Option als eine Reduktion der Expression des mutanten Allels. Allerdings gibt es heute keine praktikable Methode, um auch nur eines dieser Ziele bei Patienten zu erreichen.

Ein wie in Abb. 1.4 dargestellter dominant negativer Pathomechanismus könnte zu einem fehlerhaften Aufbau der Mikrofibrillen führen. Die Ergebnisse mehrerer Versuche mit Mausmo-

dellen für das MFS zeigten jedoch, dass die fibrillinhaltigen Mikrofibrillen eher eine Rolle in der Gewebshomöostase besitzen und dass *Fbn1*-Mutationen die Bildung der elastischen Matrix während der Embryogenese nicht verhindern (57, 60). Die strukturelle und funktionelle Integrität der Aortenwand wird durch eine normale elastische Lamina aufrechterhalten, welche über fibrillinhaltige verbindende Fasern (»connecting filaments«) an die Intima und die glatten Muskelzellen (SMC) der Aortenmedia verbunden ist. Eine hypomorphe *Fbn1*-Mutation (mgR) tragende Mäuse zeigten einen Verlust dieser verbindenden Fasern, was mit einer phänotypischen Veränderung der SMC verbunden ist. Die SMCs produzierten erhöhte Mengen an Matrixproteinen und Mediatoren der Elastolyse einschließlich der Matrixmetalloproteinasen MMP2 und MMP9, was zu einer fortschreitenden Degradation der ECM führen könnte (61). Ein Hauptthema dieser Habilitationsschrift ist die Untersuchung der sekundären Wirkungen von Fibrillin- und Elastinfragmenten, die durch eine solche Matrixdegradation produziert werden könnte. Es konnte gezeigt werden, dass Fibrillin-Fragment selber die Matrixmetalloproteinaseproduktion erhöhen können. Versuche mit der mgR-Maus zeigten zudem, dass Fibrillin- und Elastinfragmente einen chemotaktischen Reiz für Makrophagen darstellen können, was eine Erklärung für die erhöhte Makrophagenzahlen in der Aortenwand von Mausmodellen und humanen MFS-Patienten darstellen könnte (s. Abschnitte 2.3 und 2.4). Der vaskuläre Phänotyp des MFS entwickelt sich daher allmählich über Jahre, was verbesserte Perspektiven für therapeutische Eingriffe bietet (62).

Eine Rolle der fibrillinhaltigen Mikrofibrillen bei der Steuerung der TGFβ-Aktivität konnte in den letzten Jahren vor allem durch die Arbeit von Harry C. Dietz an der Johns Hopkins University gezeigt werden. TGFβ ist ein Wachstumsfaktor, der u.a. Zellproliferation, den Zellzyklus, die Differenzierung, Apoptose und Matrixsynthese steuert. Wie oben erwähnt wird das TGFβ als Teil eines latenten Komplexes in den Extrazellulärraum sezerniert, wo es durch LTBPs gebunden wird. Da die LTBPs wiederum an fibrillinhaltige Mikrofibrillen binden, kann ein Fibrillindefekt zur fehlerhaften Lagerung des TGFβ und somit zur erhöhten TGFβ-Aktivität führen. In Mausmodellen manifestiert sich die erhöhte TGFβ-Aktivität als angeborene Vergrößerung der distalen Alveoli und myxomatöse Veränderungen der Herzklappen. Beide Merkmale konnten durch Gabe von TGFβ-neutralisierenden Antikörpern verhindert werden (63, 64). Beim Menschen konnte eine wichtige Rolle von Veränderungen der TGFβ-Signalwege bei hereditären Aortenerkrankungen durch den Nachweis von Mutationen in den TGFβ-Rezeptoren I und II beim Loeys-Dietz-Syndrom weiter gesichert werden (42). Eine pharmakologische Inhibition der

TGFβ-Aktivität durch den AT1-Rezeptorantagonisten Losartan führte zur annähernden Normalisierung der Aortenerweiterung bei einem Mausmodell für das MFS (65) und eine klinische Studie zur Anwendung von Losartan bei MFS-Patienten läuft seit Anfang 2008 (66).

Kapitel 2

Originalarbeiten

2.1 TGGE-Analyse der gesamten kodierenden Sequenz des *FBN1*-Gens bei 126 Personen mit Marfan-Syndrom und verwandten Fibrillinopathien

Stefanie Katzke, Patrick Booms, Frank Tiecke, Monika Palz, Angelika Pletschacher, Seval Türkmen, Luitgard M. Neumann, Reinhard Pregla, Christa Leitner, Cornelia Schramm,Peter Lorenz, Christian Hagemeier, Josefine Fuchs, Flemming Skovby, Thomas Rosenberg und Peter N. Robinson

Human Mutation (2002) 20:197–208

Mutationen in dem Gen für Fibrillin-1 (*FBN1*) sind die Ursache des Marfan-Syndroms (MFS), einer autosomal dominant vererbten Erkrankung des Bindegewebes mit bedeutenden Manifestationen im Skelett, Auge und Herzkreislaufsystem. *FBN1*-Mutationen sind ebenfalls bei einer Reihe von verwandten Bindegewebserkrankungen identifiziert worden, die als Typ-1-Fibrillinopathien bezeichnet werden. Wir haben Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)-Assays für alle 65 *FBN1*-Exons entwickelt und damit 126 Personen mit MFS, anderen Typ-1-Fibrillinopathien und anderen möglicherweise verwandten Bindegewebsanomalien auf *FBN1*-Mutationen untersucht. Wir identifizierten insgesamt 53 Mutationen, wovon 33

hier zum ersten Mal beschrieben werden. Einige Mutationen sind bei Personen mit Typ-1-Fibrillinopathien außer MFS identifiziert worden wie z.B. bei einer Person mit isoliertem Aneurysma der aufsteigenden Aorta mit mild ausgeprägten Skelettanomalien und mehreren Personen mit lediglich Skelett- und okulärer Beteiligung. Die Mutationsdetektionsrate in dieser Studie war insgesamt 42%, betrug jedoch lediglich 12% bei Personen, deren Symptome die Kriterien der Gent-Nosologie nicht erfüllten. Diese Beobachtung legt nahe, dass klinische Überdiagnose einen wichtigen Grund für die geringe Mutationsdetektionsrate der *FBN1*-Mutationsanalyse in dieser und anderen Studien darstellt.

[Link zur Originalarbeit in Pubmed]

2.2 Differentielle Auswirkung von *FBN1*-Mutationen auf die in vitro-Proteolyse rekombinanter Fibrillin-1-Fragmente

Patrick Booms, Frank Tiecke, Thomas Rosenberg, Christian Hagemeier und Peter N. Robinson

Human Genetics (2000) 107:216–224

Das Fibrillin-1 enthält 47 EGF-Module, wovon 43 eine Konsensussequenz für Kalziumbindung aufweisen (cbEGF). Kalziumbindung durch cbEGF-Module ist für die Konformation und Stabilität des Fibrillin-1 wesentlich. Missense-Mutationen in cbEGF-Modulen sind die am häufigsten zu beobachtenden Mutationen beim MFS und betreffen in der Regel einen der sechs absolut konservierten Zysteinreste oder Reste der Konsensussequenz für Kalziumbindung.

Wir erzeugten eine Reihe rekombinanter Fibrillin-1-Fragmente, welche sechs cbEGF-Module (cbEGF Nr. 15–20) umfassen, und führten mittels *in vitro* Mutagenese unterschiedliche Mutationen an unterschiedlichen Positionen vom cbEGF-Modul Nr. 17 ein. Dieses Modul enthält eine kryptische Spaltstelle für Trypsin. Eine einen Rest der Kalziumbindungskonsensussequenz betreffende Mutation (K1300E) wurde bei einem Patienten mit verhältnismäßig milden klinischen Manifestationen identifiziert. Bei den *in vitro* Versuchen war diese Mutation mit einem relativ gering erhöhten Grad an *in vitro* Proteolyse durch Trypsin assoziiert. Eine den sechsten Zysteinrest des cbEGF-Moduls Nr. 17 betreffende Mutation (C1230S) wurde bei einem Patienten mit schwerwiegenden Manifestationen des MFS identifiziert. Die Mutation war bei den *in vitro* Versuchen mit einer dramatischen Erhöhung der *in vitro* Proteolyse durch Trypsin assoziiert. Eine Mutation der kryptischen Trypsinspaltstelle hob die Anfälligkeit der Wildtyp und mutanten Fragmente für *in vitro* Proteolyse vollkommen auf.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass bestimmte Mutationen in cbEGF-Modulen unterschiedliche biochemische Auswirkungen haben können und liefern eine mögliche Erklärung für einige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beim MFS. Der Nachweis, dass *FBN1*-Mutationen rekombinante Fibrillin-1-Fragmente destabilisieren können, wurde im selben Jahr durch zwei weitere

Arbeitsgruppen erbracht (67, 68). Dies legte nahe, dass Fibrillinfragmente während der Entwicklung der Krankheitsmanifestationen des MFS entstehen könnten, zumal immunhistologische Untersuchungen Hinweise auf Fibrillinfragmentierung in Herzklappen von MFS erbracht hatten (69). Da Fragmente von Matrixproteinen in anderen Kontexten bekanntermaßen selber schädliche sekundäre Eigenschaften haben können (s. Diskussion der nachfolgenden Arbeit), entwickelten wir die Hypothese, dass auf Grund von *FBN1*-Mutationen entstandene proteolytische Abbauprodukte der Mikrofibrillen selber zur erhöhten Produktion proteolytischer Enzyme führen könnten, was wiederum im Sinne eines *Circulus vitiosus* zur Produktion von weiteren Fibrillin-Fragmenten führen könnte (s. Abbildung 6 der nachfolgenden Originalarbeit). Diese Hypothese bildete dann den Ausgangspunkt für die in Abschnitten 2.3 und 2.4 vorgestellten Versuche.

[Link zur Originalarbeit in Pubmed]

2.3 Ein das Elastin-Bindungsprotein-Motiv GxxPG enthaltendes Fibrillin-1-Fragment führt zur Hochregulation der Matrixmetalloproteinase-1: Biochemische und bioinformatische Analysen

Patrick Booms, Andreas Ney, Frank Barthel, Gautier Moroy, Damian Counsell, Christoph Gille, Gao Guo, Reinhard Pregla, Stefan Mundlos, Alain J.P. Alix und Peter N. Robinson

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2006) 40:234–246

Eine mögliche Bedeutung der Proteolyse, der erhöhten Matrixmetalloproteinase-Aktivität und der Fragmentierung fibrillinhaltiger Mikrofibrillen für die Pathogenese des MFS wurde durch mehrere vorausgegangene Arbeiten nahegelegt. Die Aminosäurenfolge Glyzin-Xxx-Xxx-Prolin-Glyzin (GxxPG), wo Xxx eine beliebige Aminosäure außer Prolin darstellt, ist ein bekanntes Motiv, das über 25mal in Elastin vorkommt und an das Elastin-Bindungsprotein binden kann. In dieser Studie zeigen wir, das ein das Elastin-Bindungsprotein-Motiv GxxPG enthaltendes Fibrillin-1-Fragment die Expression und Produktion von Matrixmetalloproteinase 1 (MMP1) in einem Zellkultursystem bis auf das Neunfache hochreguliert. Eine Mutation der GxxPG-Sequenz hob diese Wirkung auf. Es handelt sich um den ersten Nachweis einer bioaktiven Wirkung eines GxxPG-Motivs in einem Protein außer Elastin. Eine Analyse mittels molekularer Dynamiksimulationen von Wildtyp- und mutanten Oligopeptiden unterstützte unsere biochemischen Ergebnisse dadurch, dass sich wesentliche Unterschiede der strukturellen Charakteristika für mutante und Wildtypoligopeptide vorhersagen ließen. Insbesondere war das Potential, eine β-Windung des Typs VIII (»type VIII β-turn«) beim mutanten Oligopeptid stark herabgesetzt. β-Windungen des Typs VIII sind für die Bindung der GxxPG-Motive in Elastin an das Elastinbindungsprotein wesentlich.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Fibrillin-1-Fragmente MMP-1-Expression regulieren können, und legen nahe, dass eine gestörte Regulation von MMP-Aktivität zur Pathogenese des MFS

beitragen könnte. Wir führten mit unserem Programm dem Ontologizer (70, 71) eine Gene-Ontology (GO)-Analyse des humanen Proteoms durch und konnten zeigen, dass Proteine mit mehrfachen GxxPG-Motiven an GO-Terms für die ECM hoch signifikant angereichert sind. Matrixproteine mit mehrfachen GxxPG-Motive sind z.B. Fibrillin-1, -2 und -3, Elastin, Fibronektin, Laminin und mehrere Tenascine und Kollagene. Einige von diesen Proteinen sind mit Erkrankungen assoziiert, bei denen erhöhte MMP-Aktivitäten beobachtet worden sind, und unsere Ergebnisse liefern einen möglichen Mechanismus für diese Beobachtungen.

Unsere Arbeitsgruppe hat ein weiteres Projekt über die Auswirkungen eines ein RGD-Integrin-Erkennungsmotiv enthaltenden Fibrillin-Fragments publiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zusammen mit denjenigen des Projektes über das GxxPG-Motiv des Fibrillin-1, dass Fibrillin-1 mindestens drei bioaktive Motive enthält, die die MMP-Aktivität beeinflussen können (72).

[Link zur Originalarbeit in Pubmed]

2.4 Induktion der Makrophagenchemotaxis durch Aortenextrakte der mgR-Marfanmaus und ein GxxPG enthaltendes Fibrillin-1-Fragment

Gao Guo, Patrick Booms, Marc Halushka, Harry C. Dietz, Andreas Ney, Sigmar Stricker, Jochen Hecht, Stefan Mundlos, Peter N. Robinson

Circulation (2006) 114:1855–1862

Hier untersuchten wir, ob Extrakte der aufsteigenden Aorta aus dem das Fibrillin-1 unterexprimierenden mgR-Mausmodell für Marfan-Syndrom oder ein rekombinantes, ein Elastin bindendes Protein (EBP)-Erkennungssequenz enthaltendes Fibrillin-1-Fragment als chemotaktischer Reiz für Makrophagen wirken können. Sowohl die Aortenextrakte als auch das Fibrillin-1-Fragment führten zu einer signifikanten Erhöhung der Makrophagenchemotaxis verglichen mit Extrakten von Wildtypmäusen oder Pufferkontrollen. Die chemotaktische Antwort wurde durch eine Vorbehandlung der Makrophagen mit Laktose oder mit dem von Elastin abgeleiteten Peptid VGVAPG oder durch Vorbehandlung der Proben mit einem gegen das EBP-Erkennungsmotiv gerichteten monoklonalen Antikörper signifikant reduziert. Eine Mutation der EBP-Erkennungssequenz im Fibrillin-1-Fragment hob die chemotaktische Wirkung auf. Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung des EBP bei der chemotaktischen Aktivität hin. Eine Untersuchung von Aortenproben von humanen MFS-Patienten zeigte zudem eine Makrophageninfiltration in der Tunica media der Aorta.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Aortenextrakte der mgR-Maus über Wechselwirkungen mit dem EBP die Makrophagenchemotaxis stimulieren können und dass ein Fibrillin-1-Fragment eine derjenigen von Elastinabbaupeptiden ähnliche chemotaktische stimulatorische Aktivität besitzt. Die Ergebnisse liefern eine plausible molekulare Erklärung für die bei der mgR-Maus zu beobachtenden inflammatorischen Infiltrate und legen nahe, dass die Entzündung eine Komponente der komplexen Pathogenese des MFS darstellen könnte.

[Link zur Originalarbeit in Pubmed]

2.5 Shprintzen–Goldberg-Syndrom: 14 neue Patienten und eine klinische Analyse

Peter N. Robinson, Luitgard M. Neumann, Stephanie Demuth, Herbert Anders, Ursula Jung, Rainer König, Beate Mitulla, Dietmar Müller, Petra Muschke, Lutz Pfeiffer, Bettina Prager, Mirja Somer und Sigrid Tinschert

American Journal of Medical Genetics (2005) 135A:251–262

Das Shprintzen–Goldberg-Syndrom (SGS) zeigt phänotypische Ähnlichkeiten mit dem MFS und Loeys-Dietz-Syndrom. *FBN1*-Mutationen (34, 73) sowie *TGFBR1*-Mutationen (74) sind bei einigen Personen mit SGS gefunden worden. Bei der Mehrheit dieser Patienten konnte die molekulare Ursache jedoch bis heute nicht geklärt werden, weshalb es wichtig ist, die klinischen Manifestationen des SGS zu beschreiben und vorläufig die klinischen Kriterien für die Diagnosestellung eines SGS zu kodifizieren, was Zweck der nachfolgenden Arbeit ist.

Das SGS ist durch Kraniosynostose, einen marfanoiden Habitus, Anomalien des Skelettes, neurologische Auffälligkeiten, sowie Herzkreislaufabnormalitäten gekennzeichnet. Es gibt keine für das SGS pathognomischen Zeichen, vielmehr beruht die Diagnose auf einer charakteristischen Kombination von Befunden. In dieser Arbeit beschreiben wir 14 Personen mit SGS und vergleichen ihre klinischen Befunde mit denen von 23 früher publizierten Individuen. Unsere Analyse zeigt eine charakteristische Gestalt des Gesichts, wobei über drei Drittel der Betroffenen Hypertelorismus, eine antimongoloide Lidachsenstellung, einen hohen und schmalen Gaumen, Mikrognathie und tief ansetzende und nach hinten rotierte Ohren haben. Andere häufig zu beobachtende Manifestationen sind Hypotonie in der Neugeborenenzeit oder länger, Entwicklungsverzögerung und Bauchnabel- oder Leistenbrüche. Der Grad an intellektueller Leistungsminderung reicht von mild bis schwerwiegend. Die häufigsten Skelettmanifestationen beim SGS sind Arachnodaktylie, Pektusdeformität, Camptodaktylie, Skoliose und Gelenkhypermobilität. Keines der Skelettzeichen ist für sich genommen richtungweisend für SGS. Unsere Studie umfasst 14 in Deutschland ansässige Personen mit SGS, die über einen Zeitraum von 10 Jahren in unseren Sprechstunden vorgestellt wurden. Bis zu unserer Studie sind lediglich 23 andere

Fälle von SGS weltweit publiziert worden. Daher erscheint es möglich, dass SGS häufiger ist als bislang angenommen.

[Link zur Originalarbeit in Pubmed]

2.6 Eine kurze ultrakonservierte Sequenz steuert die Transkription von einem alternativen *FBN1*-Promoter

Gao Guo, Sebastian Bauer, Jochen Hecht, Marcel H. Schulz, Andreas Busche und Peter N. Robinson

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2008) 40:638–650

Die Expression des *FBN1*-Gens ist einer der Faktoren, der für die Ausprägung klinischer Symptome beim MFS von Bedeutung sein könnte (75). Daher haben wir in diesem Projekt die Regulation der *FBN1*-Expression untersucht.

Das humane *FBN1* besitzt drei nichttranslatierte stromaufwärts gelegene Exons, denen homologe Exons in anderen Säugern gegenüberstehen. In dieser Arbeit haben wir funktionelle Assays verwendet, um die stromaufwärts gelegenen Regionen von *FBN1* zu charakterisieren. Vor dem Exon 1 gelegene Sequenzen sowie vor mindestens zwei der drei nichtkodierenden 5' Exons gelegene Sequenzen haben Promoteraktivität *in vitro*, wie wir durch Luciferasereporterassays zeigen konnten. Die stärkste Aktivität konnte für vor dem Exon A gelegene Sequenzen gezeigt werden. Eine vergleichende Sequenzanalyse dieser Sequenzen beim Menschen und sechs anderen Säugern zeigte einige hochkonservierte potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen sowie eine 66 bp lange ultrakonservierte Sequenz mit fast kompletter Identität in den sieben Spezies. Die ultrakonservierte Sequenz enthält ein Initiatorelement (Inr), ein Downstream-Promoter-Element (DPE) und ein 10 bp langes palindromisches Element. Eine Analyse mittels in vitro Mutagenese zeigte, dass sowohl das Inr als auch das DPE für die volle Promoteraktivität unerlässlich sind. Eine Mutation in dem 10-bp langen palindromischen Element hob die basale Promoteraktivität vollkommen auf. Es konnte mittels eines elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assays gezeigt werden, dass das Element an ein (unbekanntes) Kernprotein bindet.

Ultrakonservierung innerhalb eines alternativen Promoters wurde bislang nicht beschrieben. Wir spekulieren, dass die Ultrakonservierung die Bedeutsamkeit einer fein gesteuerten Regulation der alternativen Transkription des *FBN1*-Gens widerspiegelt und dass die beteiligten

Sequenzen seit mindestens 180 Millionen Jahren Säugerevolution unter einem negativen Selektionsdruck stehen.

[Link zur Originalarbeit in Pubmed]

Kapitel 3

Diskussion

In den fast zwei Jahrzehnten seit der Entdeckung des Gens für Fibrillin-1 (19) haben klinische und wissenschaftliche Gruppen aus mehreren Ländern unser Bild des MFS grundlegend verändert. Auf der einen Seite konnte durch Studien über die Beziehung zwischen *FBN1*-Mutationen und mit dem MFS verwandten Phänotypen nachgewiesen werden, dass nicht nur MFS sondern auch eine Reihe von Typ-1-Fibrillinopathien durch Mutationen im *FBN1*-Gen verursacht werden können, was wichtige Konsequenzen für die genetische Beratung und medizinische Betreuung hat. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass das Marfan-Syndrom nicht allein Folge einer passiven Bindegewebsschwäche ist. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass der vaskuläre Phänotyp des MFS sich allmählich auf Grund von aktiven zellulären Prozesse über Jahre entwickelt. Viele Arbeitsgruppen haben unterschiedliche neue Aspekte des komplexen, auch heute nur teils verstandenen molekularen Pathomechanismus des MFS nachgewiesen. Diese Ergebnisse bieten verbesserte Perspektiven für therapeutische Eingriffe.

Die in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten lieferten Beiträge zur Beschreibung von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei den Typ-1-Fibrillinopathien, zur klinischen Charakterisierung des heterogenen, in manchen Fällen durch *FBN1*-Mutationen verursachten Krankheitsbildes Shprintzen-Goldberg-Syndrom, zur ersten Analyse der regulatorischen Mechanismen des *FBN1*-Gens sowie zur Identifizierung und Charakterisierung der Rolle von Fibrillin- und Elastin-Fragmenten bei der molekularen Pathogenese des MFS.

3.1 TGGE-Analyse der gesamten kodierenden Sequenz des *FBN1*-Gens bei 126 Personen mit Marfan-Syndrom und verwandten Fibrillinopathien

In dieser Studie wurden PCR-Primer und Assaybedingungen für jedes der 65 Exons des *FBN1*-Gens vorgestellt. Als das Manuskript publiziert wurde, war es die zweitgrößte Untersuchung weltweit zur Mutationsanalyse bei Personen mit MFS oder verwandten Störungen. Die Technologie der Mutationsanalyse hat sich in den letzten Jahren rasant weiterentwickelt. Mittlerweile ist die direkte Sequenzierung die Methode der Wahl, womit bei gut selektionierten Patientenkollektiven eine Detektionsrate von bis zu etwa 95% erreicht werden kann (76). Von den Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe zur Mutationsanalyse beim MFS (25, 28, 29, 77, 78, 79) erscheinen insbesondere die Aussagen zur Korrelation zwischen bestimmten Mutationen in Exons 24–32 mit dem nMFS oder mit atypisch schwerwiegenden Formen des MFS (28, 29) sowie die Aussagen über die charakteristischerweise beim MFS betroffenen Aminosäurenreste der cbEGF- und LTBP-Module (78) auch angesichts aktueller Publikationen (20, 27) ihre Validität beibehalten zu haben.

3.1.1 cbEGF-Mutationen: Zysteinsubstitutionen und die Kalziumbindungskonsensussequenz betreffende Austausche

Das Fibrillin-1 besitzt 43 cbEGF-Module, die teils tandemartige Strecken von bis zu 12 Modulen bilden. Die Kalziumbindung ist wichtig für die Konformation dieser Domänen und stabilisiert cbEGF-Module der Proteolyse gegenüber, was bislang für zahlreiche Proteine der ECM wie Fibrillin-1, Fibulin-1 und -2 sowie LTBP-1 und -2 gezeigt worden ist (Referenzen auf S. 18 von (24)). Die am häufigsten zu beobachtenden Mutationen beim MFS betreffen einen der absolut konservierten Zysteinreste der cbEGF-Module. Solche Mutationen führen wahrscheinlich zur fehlerhaften Faltung des Moduls mit schädlichen Folgen für die Gesamtkonformation des Polypeptids. Veränderungen in der Kalziumbindungskonsensussequenz können die Kalziumbindungsaffinität herabsetzen, was die Berührungsfläche zwischen zwei angrenzenden cbEGF-Modulen destabilisieren und folglich das mutierte Protein für den proteolytischen Abbau anfällig machen könnte (21). Zysteinsubstitutionen könnten zudem die Bildung von nichtnativen intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken begünstigen.

Über 1% aller Missense-Mutationen beim Menschen sollen neue *N*-Glykosylierungssequenzen (N-X-T/S, wo X eine beliebige Aminosäure außer Prolin bezeichnet) kreieren (80). Solche Mu-

tationen wurden mindestens siebenmal beim MFS berichtet und scheinen keine besonderen phänotypischen Folgen zu haben (81). Eine weitere Klasse von Mutationen beim MFS stellt Substitutionen von Glyzin- oder Prolinresten dar. Glyzin besitzt die höchste und Prolin die geringste konformationelle Freiheit unter den Aminosäuren, weshalb solche Mutationen mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit die korrekte Domänenfaltung beeinträchtigen (21). Die Abbildung 3.1 bietet einen Überblick über Mutationen an den weniger konservierten Positionen der cbEGF-Module.

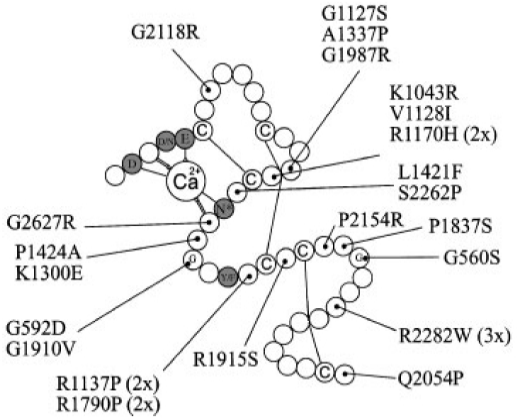

Abbildung 3.1: cbEGF-Missense-Mutationen in Fibrillin-1, welche Positionen außerhalb der hochkonservierten sechs Zysteinreste bzw. die Reste der Kalziumbindungskonsensussequenz betreffen (78).

3.1.2 Mutationsdetektionsrate je nach klinischer Diagnose

In den zwischen 1993 und 2002 publizierten Studien zur *FBN1*-Mutationsanalyse wurden größere Patientenkollektive untersucht, worin auch Personen mit einigen wenigen Merkmalen eines MFS erfasst wurden, die jedoch die strengen diagnostischen Kriterien der Gent-Nosologie nicht erfüllten. Bei den 15 in Tabelle 5 von (78) aufgeführten Studien konnte eine Detektionsrate von 43% (217/500) bei Personen mit der Diagnose eines klassischen MFS und 36% bei allen untersuchten Patienten (264/739) erreicht werden.

In einer neulich publiziert Studie an 279 Personen, die sich in einer Spezialsprechstunde für Marfan-Syndrom in Hamburg vorgestellt hatten, konnte nach eingehender Diagnostik ein Marfan-Syndrom bei 138 Personen (51%) bestätigt werden. Bei 72 der 279 (27%) Personen wurden keine Hinweise auf ein übergeordnetes Krankheitsbild gefunden, jedoch hatten auch

diese Personen bis zu mehrere Manifestationen wie Skoliose oder Trichterbrust, die häufig beim MFS begegnen (82).

Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung einer eingehenden klinischen Untersuchung bei der Entscheidungsfindung in der klinischen Genetik, wobei die Mutationsanalyse in vielen Situationen nützliche Befunde erbringen kann (83).

3.2 Differentielle Auswirkung von *FBN1*-Mutationen auf die *in vitro* Proteolyse rekombinanter Fibrillin-1 Fragmente

Die Kalziumbindung durch cbEGF-Module ist eine wesentliche Voraussetzung für die Organisation und Stabilität der fibrillinhaltigen Mikrofibrillen (84). Kalziumbindung führt dazu, dass die tandemartig angeordneten cbEGF-Module eine stabilisierte, ausgedehnte und steife Konformation annehmen (85). Einschließlich der zwei in (86) beschriebenen Mutationen konnte durch mehrere Gruppen für insgesamt zwölf Mutationen in cbEGF-Modulen des Fibrillin-1 eine erhöhte Anfälligkeit für in vitro Proteolyse gezeigt werden (Tab. 3.1).

Mutation	cbEGF-Modul	Referenz
N548I	cbEGF4	(67)
R672C	cbEGF6	(87)
C750G	cbEGF7	(87)
E1073K	cbEGF12	(67)
G1127S	cbEGF13	(88)
K1300E	cbEGF17	(86)
C1320S	cbEGF17	(86)
D1406G	cbEGF20	(55)
C1408F	cbEGF20	(55)
C1977R	cbEGF30	(89)
C1977Y	cbEGF30	(89)
N2183S	cbEGF33	(89)

Tabelle 3.1: *FBN1*-Mutationen, die eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der in vitro Proteolyse verursachen. Tabelle aus (4) entnommen.

Es konnte für einige der in Tabelle 3.1 aufgeführten Mutationen gezeigt werden, dass die Mutationen mit lokalen und globalen Veränderungen der Fibrillinstruktur assoziiert sind (88).

Die Beobachtung, dass *FBN1*-Mutationen sonst verborgene proteolytische Spaltstelle zugänglich machen, kann dadurch erklärt werden, dass entweder das Fehlen des Kalziumions oder aber andere Konformationsveränderung des Fibrillin-1 eine reduzierte sterische Behinderung für Proteasen bedingen. Die molekularen Auswirkungen dieser Mutationen könnte durch die variable Kalziumaffinität der einzelnen cbEGF-Module (90) sowie durch die Lokalisation der cbEGF-Module innerhalb des Fibrillin-1-Monomers beeinflusst werden. Unsere Beobachtung, dass unterschiedliche Mutationen innerhalb desselben cbEGF-Moduls eine unterschiedliche Erhöhung der proteolytischen Anfälligkeit bedingen, legten daher nahe, dass solche Effekte eine potentielle Erklärung für Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beim MFS darstellen könnte, wobei momentan viel zu wenig Daten vorliegen, um eine gesicherte Aussage hierzu zu machen.

Die oben beschriebenen Daten liefern keinen formalen Beweis, dass die Proteolyse eine Rolle bei der Pathogenese des MFS spielt, es handelt sich um in vitro Experimente. Nimmt man jedoch an, dass *FBN1*-Mutationen auch in vivo eine erhöhte Proteolyse des Fibrillin-1 bewirken, gibt es mindestens zwei pathophysiologische Szenarien, die zu erwägen sind. Ein proteolytischer Abbau könnte nach der Proteinsynthese aber vor dem Einbau des mutierten Monomers in die Mikrofibrillen stattfinden, was eine Reduktion der Gesamtmenge an fibrillinhaltigen Mikrofibrillen zur Folge haben dürfte. Alternativ könnten die mutierten Monomere in die Mikrofibrillen eingebaut werden und dort eine Art Achilles' Sehne darstellen, welche die Anfälligkeit der polymeren Mikrofibrillen für Proteolyse erhöhen würde. Hinweise, dass das zweite Szenario zumindest möglich ist, lieferte die Beobachtung, dass mutantes Fibrillin-1 tatsächlich in reife Mikrofibrillen eingebaut werden kann (58).

3.3 Ein das Elastin-Bindungsprotein-Motiv GxxPG enthaltendes Fibrillin-1-Fragment führt zur Hochregulation der Matrixmetalloproteinase-1: Biochemische und bioinformatische Analysen

Klinische Studien haben Hinweise auf erhöhte MMP-Konzentrationen (91, 92) und Fragmentierung (69) in Geweben von Personen mit MFS erbracht (91, 92). Es gibt mehrere plausible Erklärungen für erhöhte MMP-Aktivität beim MFS, einschließlich phänotypischer Veränderung vaskulärer glatter Muskelzellen (61) und Veränderungen im TGFβ-Stoffwechsel (93). In dieser Arbeit haben wir eine dritte Möglichkeit untersucht: den Einfluss von Fibrillin-Fragmenten selber. Die Vokabeln **Matrikin** und **Matrikryptin** sind gemünzt worden, um Subdomänen

verschiedener ECM-Proteine zu bezeichnen, welche Signale aus dem Extrazellulärraum an die in die ECM eingebetteten Zellen melden können. Hierbei unterscheidet man zwischen den 'natürlichen' Matrikinen, welche direkt aus dem extrazellulären Mileau signalisieren und den kryptischen Matrikinen (Matrikryptinen), welche die proteolytische Abspaltung benötigen, um sonst verborgene Bindungssequenzen freizulegen (94). Beispiele für Letzteres sind Elastin, Fibronektin und Laminin (95, 96, 97).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen (72, 98) legen daher nahe, dass Mutationen in *FBN1* zur erhöhten Produktion von Matrikryptinen führen können. Im Gegensatz zu physiologischen Situationen wie Wundheilung, in denen Matrikryptine z.B. aus Laminin vorübergehend wirksam sind (94), ist die *FBN1*-Mutation beim Marfan-Syndrom gleichsam eine Wunde, die nie heilt, was eine Erklärung für die chronisch erhöhte MMP-Aktivität beim Marfan-Syndrom darstellen könnte.

Die Gene-Ontology (GO) liefert ein dynamisches, kontrolliertes Vokabular, um Gene und Genprodukte in beliebigen Organismen zu beschreiben. GO beinhaltet drei Subontologien, um die »molekulare Funktion« (die biochemische Aktivität), den »biologischen Prozess« (die biologischen Ziele) und die »zelluläre Komponente« (die Lokalisation) zu beschreiben (99). Die Überrepräsentationsanalyse für GO-Terms ist zu einem festen Bestandteil genomischer Analysen geworden. Wir führten eine GO-Analyse des humanen Proteoms mit unserem Programm dem Ontologizer (70, 71) durch und konnten zeigen, dass Proteine mit mehrfachen GxxPG-Motiven an GO-Terms für die ECM hoch signifikant angereichert sind. Viele der ECM-Proteine mit mehreren GxxPG-Motiven sind auch mit Erkrankungen assoziiert, bei denen erhöhte MMP-Konzentrationen zu beobachten sind. Zum Beispiel kann Tenascin-9 die Expression von MMP-9 erhöhen (100, 101) und ist mit einer erhöhten MMP-2-Aktivität bei der kalzifizierten Aortenstenose assoziiert (102). Ähnliche Beobachtungen wurden mit Aggrekan und Kollagen Typ VIIα1 gemacht (Referenzen in (98)). Dies legt nahe, dass GxxPG-Motive möglicherweise eine wichtigere Rolle bei der Physiologie und Pathologie der ECM haben als bislang angenommen.

3.4 Induktion der Makrophagenchemotaxis durch Aortenextrakte der mgR-Marfanmaus und ein GxxPG enthaltendes Fibrillin-1-Fragment

Die Beobachtung, dass Fibrillin-1 ein bioaktives GxxPG-Motiv enthält (s. letzten Abschnitt) gab zur Hypothese Anlass, dass auch weitere Effekte der von Elastin abgeleiteten Peptide

(**elastin-derived peptides (EDP)**) wie die Induktion von Chemotaxis (103) für die Pathogenese des MFS wichtig sein könnten. In (104) zeigten wir, dass Aortenextrakte sowie ein ein GxxPG-Motiv enthaltendes Fibrillin-1-Fragment die Makrophagenchemotaxis induzieren können. Makrophageninfiltration und Entzündung spielen eine sehr gut bekannte Rolle bei abdominellen Aortenaneurysmen (AAA), wurden jedoch bislang beim MFS nicht untersucht. Beim AAA können aus dem Aortengewebe freigesetzte lösliche Elastinfragmente einen chemotaktischen Reiz für mononukleäre Phagozyten darstellen, was zum Teil die stark ausgeprägten entzündlichen Veränderungen beim AAA erklären könnte (105, 106).

Obwohl stark ausgeprägte entzündliche Veränderungen beim MFS nicht beobachtet werden, sind ein Verlust an Elastin, Desorganisation der Gewebsarchitektur der Aorta und Fragmentierung der fibrillinhaltigen Mikrofibrillen bekannte Charakteristika dieser Erkrankung (69, 107, 108). Fragmentierung und Unordnung der elastischen Fasern ist ein fokales und erworbenes Phänomen, das in Verbindung mit einer abnormalen Produktion von matrixabbauenden proteolytischen Enzymen durch vaskuläre glatte Muskelzellen und einer Gefäßwandentzündung in der mgR-Marfan-Maus auftritt (57, 61). Wie im Abschnitt 3.3 besprochen, können Fragmente verschiedener Matrixproteine neue Funktionen als Matrikryptine gewinnen und dadurch Rückkopplungs- und Signalkreise ungünstig beeinflussen und somit zum fortschreitenden Gewebsschaden beitragen. Es erscheint daher möglich, dass Elastin- und Fibrillinfragmente, die früh im Krankheitsverlauf auf Grund von *FBN1*-Mutationen vermehrt entstehen, Makrophagen in die Aortenmedia anlocken. Setzen diese Makrophagen selber proteolytische Enzyme frei, kann es zur weiteren und verstärkten Fragmentierung der elastischen Fasern und Mikrofibrillen kommen. Ein ähnliches pathogenetisches Modell wurde für Zigarettenrauch-induziertes Lungenemphysem vorgeschlagen (109) und könnte auch eine Rolle beim AAA spielen (110, 111). Dies legt nahe, dass die Rekrutierung (Anlockung) von Makrophagen und vielleicht anderen entzündlichen Zellen zur komplexen Pathogenese des MFS beitragen könnte. Das Antibiotikum Doxyzyklin hat eine breite MMP-inhibitorische Wirkung. Seit der Publikation unserer Arbeit wurde durch zwei Gruppen gezeigt, dass die Behandlung von Marfan-Mausmodellen mit Doxyzyklin eine wirksame Therapie darstellt, die die Gewebsfragmentierung in der Aorta reduziert und die Lebenserwartung erhöht (112, 113). In unserer Arbeitsgruppe wurde vor kurzem eine Studie begonnen, worin eine Behandlung der mgR-Marfanmaus mit einem monoklonalen Antikörper gegen das GxxPG-Motiv geprüft werden soll, was einen direkten Beweis für die Beteiligung von Elastinfragmenten und das EBP bei der Pathogenese liefern würde. Eine Be-

handlung mit dem selben Antikörper wurde bei einem Mausmodell für Lungenemphysem von einer anderen Arbeitsgruppe bereits erfolgreich eingesetzt (109).

3.5 Shprintzen–Goldberg-Syndrom: 14 neue Patienten und eine klinische Analyse

Das SGS zeigt eine große klinische Überlappung mit dem MFS und dem Loeys-Dietz-Syndrom. Auf Grund der unterschiedlichen Prognosen und Therapiemöglichkeiten ist eine zeitige und korrekte Diagnosestellung für eine optimale klinische Betreuung Grundvoraussetzung. Bis heute bleibt unklar, inwieweit das SGS eine eigenständige Entität darstellt. Einige wenige Fälle von SGS scheinen auf Mutationen in *FBN1* zurückzugehen (34, 73). Obwohl Berichte in der Literatur über *TGFBR2*-Mutationen beim SGS vorliegen, erscheint uns nach Durchsicht der Artikel Loeys-Dietz-Syndrom die passende Diagnose für die beschriebenen Patienten zu sein (73, 114). Obwohl ein Bericht über eine *TGFBR1*-Mutation bei einer Person mit SGS vorliegt (74), sind Mutationen in diesem Gen bei keinem anderen SGS-Patienten identifiziert worden.

Diese Verwirrungen unterstreichen die Notwendigkeit von klinischen Kriterien für die Diagnose eines SGS. Obwohl eine volle Nosologie etwa im Sinne der Gent-Nosologie für MFS (115) auf die Entdeckung der molekularen Ursache(n) des SGS warten muss, erlaubt unsere Analyse einen umfassenden Überblick über die klinischen und radiographischen Abnormalitäten beim SGS. Wir schlagen vor, dass bei Personen mit einer Kombination der häufigen kraniofazialen, skelettalen, neurologischen und radiologischen Zeichen in Tabelle V von (116) die Diagnose eines SGS erwogen werden sollte. Andere Diagnosen sollten gesucht werden, falls ein Proband nicht mindestens ein häufiges Merkmal aus jeder Kategorie in dieser Tabelle zeigt. Die zahlreichen, weniger häufigen Merkmale können herangezogen werden, um die Diagnose eines SGS zu unterstützen, reichen jedoch für sich nicht aus, um die Diagnose zu rechtfertigen.

3.6 Eine kurze ultrakonservierte Sequenz steuert die Transkription von einem alternativen *FBN1*-Promoter

Die Ultrakonservierung von DNA-Sequenzen bezeichnet homologe Sequenzen, die über lange evolutionäre Zeiträume identisch oder fast identisch geblieben sind und zwar zu einem höheren Grad, als man durch den mit proteinkodierenden Sequenzen, Spleißstellen oder Transkriptionsfaktorbindungssequenzen assoziierten Selektionsdruck erklären könnte. Die meisten inter-

genischen ultrakonservierten Elemente (UCEs) scheinen gewebsspezifische Enhancer zu sein, während eine weitere Klasse von intragenischen UCEs an der Regulation der Genexpression durch alternatives Spleißen beteiligt ist (117).

In diesem Werk haben wir einen kurzen ultrakonservierten Block im Bereich des Kernpromoters eines alternativ gespleißten 5'-gelegenen Exons des *FBN1*-Gens charakterisiert. Die Sequenz enthält mindestens drei transkriptionell aktive Elemente, und zwar ein Inr-Element, ein *downstream-promoter element* (DPE) und ein 10 bp langes palindromisches Element. Unsere Analyse zeigt, dass dieser Promoterbereich einen ungewöhnlich hohen Grad an Konservierung aufweist auch im Vergleich zu Sequenzen, die auf Grund von Transkriptionsfaktorbindungssequenzen unter einer negativen Selektion stehen. Der Begriff »ultrakonserviert« wurde zunächst von Bejerano und Kollegen gemünzt, um Sequenzen zu bezeichen, die über mindestens 200 Nukleotide eine exakte Übereinstimmung zwischen Mensch, Maus und Ratte zeigen (117). Jedoch können auch kürzere ultrakonservierte Elemente identifiziert werden, wovon viele lediglich unter den Säugern ultrakonserviert sind (117). Es gibt keine exakte Definition von Ultrakonservierung. Angesichts der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schlagen wir vor, dass der Kernpromoter des alternativ gespleißten Exons A von *FBN1* ultrakonserviert ist. Diese Sequenz unterscheidet sich von bislang bekannten ultrakonservierten Sequenzen dadurch, dass sie in einem Promoterbereich lokalisiert ist. Wir verwendeten ein multiples Alignment von sieben Spezies, um die Ultrakonservierung zu charakterisieren (Mensch, Maus, Ratte, Schimpanse, Rhesusaffe, Kuh und Opossum). Der letzte gemeinsame Vorfahre des Menschen und des entferntesten evolutionären Verwandten, des Opossums lebte vor etwa 180 Millionen Jahren. Daher scheint ein ungewöhnlich hoher Grad an negativem Selektionsdruck auf diese Sequenz für mindestens 360 Millionen Jahre gewirkt zu haben. Da die meisten menschlichen Promotoren keinen so hohen Grad an Konservierung aufweisen, können wir spekulieren, dass die Ultrakonservierung die Notwendigkeit einer genauen Austarierung der vier verschiedenen *FBN1*-Isoformen während der Entwicklung widerspiegelt.

Kapitel 4

Zusammenfassung

Das Marfan-Syndrom ist eine relativ häufige hereditäre Erkrankung des Bindegewebes mit wichtigen Manifestationen im Skelett, Auge und Herzkreislaufsystem. Das Marfan-Syndrom wird autosomal dominant vererbt und durch Mutationen im Gen für Fibrillin-1, *FBN1*, verursacht. Die erhöhte Sterblichkeit bei unbehandelten Personen beruht zum größten Teil auf kardiovaskulären Komplikationen wie Aortendissektion und -ruptur. Das Marfan-Syndrom kann als Erfolgsgeschichte der molekularen Medizin der letzten zwei Jahrzehnte betrachtet werden, nachdem die Charakterisierung der biochemischen Funktionen des Fibrillin-1 und der Grundlagen der molekularen Pathophysiologie des Marfan-Syndroms in Mausmodellen in Form von Losartan und Doxyzyklin zur Einführung von zwei wirksamen Therapien in Mausmodellen geführt hat. Die vorliegende Habilitationsschrift befasst sich mit *FBN1*-Mutationen und Genotype-Phänotyp-Korrelationen, Untersuchungen über die Rolle von Fibrillin-1-Fragmenten bei der Pathogenese des Marfan-Syndroms, einer klinischen Charakterisierung der mit dem MFS verwandten Erkrankung Shprintzen-Goldberg-Syndrom sowie Untersuchungen über die molekularen Mechanismen der Genexpression des *FBN1*.

Mutationen im *FBN1*-Gen verursachen nicht nur das klassische Marfan-Syndrom, sondern auch eine Reihe von verwandten Bindegewebserkrankungen, die als Typ-1-Fibrillinopathien bezeichnet werden.

Das neonatale Marfan-Syndrom ist durch eine Reihe von außergewöhnlich schweren klinischen Manifestationen gekennzeichnet und weist eine hochsignifikante Korrelation mit Mutationen im mittleren Bereich des *FBN1*-Gens auf. Bei vielen Personen, die Spezialsprechstunden für Marfan-Syndrom aufsuchen, kann ein Marfan-Syndrom ausgeschlossen bzw. kein übergeordnetes Syndrom identifiziert werden. Die sich aus der Überlappung zwischen Personen aus

der Allgemeinbevölkerung mit einigen Bindegwebsanomalien und Personen mit einem oligosymptomatischen Marfan-Syndrom ergebende klinische Grauzone und die damit einhergehende klinische Überdiagnose des Marfan-Syndroms scheint ein Grund für die relativ niedrige Mutationsdetektionsrate in vielen größeren Studien zur *FBN1*-Mutationsanalyse zu sein.

Missense-Mutationen in cbEGF-Modulen sind die am häufigsten zu beobachtenden Mutationen beim MFS und betreffen in der Regel einen der sechs absolut konservierten Zysteinreste oder Reste der Konsensussequenz für Kalziumbindung. Mutationen dieser Reste in cbEGF-Module führten bei in vitro Versuchen dazu, dass rekombinante Fibrillin-1-Konstrukten destabilisiert werden. Dies könnte bedeuten, dass mutierte Monomere eine Schwachstelle in den hochpolymeren fibrillinhaltigen Mikrofibrillen bilden, die zur Entstehung von Fibrillin-1-Fragmenten führen könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche rekombinante Fibrillin-1-Fragmente zur Hochregulation der Matrixmetalloproteinase-Expression führen, was beim ersten Fragment auf ein integrinbindendes RGD-Motiv, beim anderen Fragment auf ein Elastinbindendes-Protein-Erkennungsmotiv zurückzuführen ist. Zusammengenommen legen unsere Ergebnisse daher nahe, dass Mutationen in *FBN1* zur erhöhten Produktion von Matrikryptinen führen können.

Ferner konnte gezeigt werden, dass Aortenextrakte des mgR-Marfan-Mausmodells über Wechselwirkungen mit dem elastinbindenden Protein die Makrophagenchemotaxis stimulieren können und dass ein Fibrillin-1-Fragment eine derjenigen von Elastinabbaupeptiden ähnliche chemotaktische stimulatorische Aktivität besitzt. Die Ergebnisse liefern eine plausible molekulare Erklärung für die bei der mgR-Maus zu beobachtenden inflammatorischen Infiltrate und legen nahe, dass die Entzündung eine Komponente der komplexen Pathogenese des MFS darstellen könnte.

Des weiteren wurde eine klinische Charakterisierung des Shprintzen-Goldberg-Syndroms vorgestellt. Es handelt sich um eine mit dem Marfan-Syndrom phänotypisch verwandten Erkrankung. Die in den nächsten Jahren zu erwartende Klärung der molekularen Ursachen des Shprintzen-Goldberg-Syndroms wird zum Verständnis der molekularen Netzwerke beitragen, die mit marfanoiden phänotypischen Merkmalen assoziiert sind.

Verschiedene Ergebnisse haben nahegelegt, dass die Expression des normalen *FBN1*-Allels einen modifizierenden Faktor für die klinische Ausprägung des Marfan-Syndrom darstellen könnte, weshalb es wichtig ist, die molekularen Grundlagen der *FBN1*-Genregulation besser zu verstehen. Wir konnten zeigen, dass ein ultrakonservierter Sequenzblock mit vorhergesagten Bindungsstellen für SP1, Inr, DPE und ein 10 Nukleotide umfassendes palindromisches Element

die Expression des am stärksten exprimierten alternativen Transkripts des *FBN1* steuert. Dies liefert eine Basis für künftige Studien über die Bedeutung der *FBN1*-Genregulation bei der Ausprägung des Phänotyps des Marfan-Syndroms.

Literaturverzeichnis

[1] L. Pereira, M. D'Alessio, F. Ramirez, J. R. Lynch, B. Sykes, T. Pangilinan, and J. Bonadio. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet*, 2(7):961–968, Jul 1993.

[2] N. J. Biery, Z. A. Eldadah, C. S. Moore, G. Stetten, F. Spencer, and H. C. Dietz. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics*, 56(1):70–77, Feb 1999.

[3] L. Y. Sakai, D. R. Keene, and E. Engvall. Fibrillin, a new 350-kd glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 1):2499–2509, Dec 1986.

[4] Peter N Robinson, Emilio Arteaga-Solis, Clair Baldock, Gwenaëlle Collod-Béroud, Patrick Booms, Anne De Paepe, Harry C Dietz, Gao Guo, Penny A Handford, Daniel P Judge, Cay M Kielty, Bart Loeys, Dianna M Milewicz, Andreas Ney, Francesco Ramirez, Dieter P Reinhardt, Kerstin Tiedemann, Pat Whiteman, and Maurice Godfrey. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet*, 43:769–787, Mar 2006.

[5] J. Rosenbloom, W. R. Abrams, and R. Mecham. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J*, 7(13):1208–1218, Oct 1993.

[6] M. Raghunath, T. Bächi, M. Meuli, S. Altermatt, R. Gobet, L. Bruckner-Tuderman, and B. Steinmann. Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation. *J Invest Dermatol*, 106(5):1090–1095, May 1996.

[7] D. R. Keene, B. K. Maddox, H. J. Kuo, L. Y. Sakai, and R. W. Glanville. Extraction of extendable beaded structures and their identification as fibrillin-containing extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem*, 39(4):441–449, Apr 1991.

[8] M. A. Lillie and J. M. Gosline. Mechanical properties of elastin along the thoracic aorta in the pig. *J Biomech*, 40(10):2214–2221, 2007.

[9] H. M. Wheatley, E. I. Traboulsi, B. E. Flowers, I. H. Maumenee, D. Azar, R. E. Pyeritz, and J. A. Whittum-Hudson. Immunohistochemical localization of fibrillin in human ocular tissues. relevance to the Marfan syndrome. *Arch Ophthalmol*, 113(1):103–109, Jan 1995.

[10] H. Sakamoto, T. Broekelmann, D. A. Cheresh, F. Ramirez, J. Rosenbloom, and R. P. Mecham. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem*, 271(9):4916–4922, Mar 1996.

[11] H. Zhang, S. D. Apfelroth, W. Hu, E. C. Davis, C. Sanguineti, J. Bonadio, R. P. Mecham, and F. Ramirez. Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol*, 124(5):855–863, Mar 1994.

[12] Glen M Corson, Noe L Charbonneau, Douglas R Keene, and Lynn Y Sakai. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics*, 83(3):461–472, Mar 2004.

[13] Luca Carta, Lygia Pereira, Emilio Arteaga-Solis, Sui Y Lee-Arteaga, Brett Lenart, Barry Starcher, Christian A Merkel, Marina Sukoyan, Alexander Kerkis, Noriko Hazeki, Douglas R Keene, Lynn Y Sakai, and Francesco Ramirez. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem*, 281(12):8016–8023, Mar 2006.

[14] Noe L Charbonneau, Bette J Dzamba, Robert N Ono, Douglas R Keene, Glen M Corson, Dieter P Reinhardt, and Lynn Y Sakai. Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences. *J Biol Chem*, 278(4):2740–2749, Jan 2003.

[15] Daniel B Rifkin. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem*, 280(9):7409–7412, Mar 2005.

[16] P. A. Handford, M. Mayhew, M. Baron, P. R. Winship, I. D. Campbell, and G. G. Brownlee. Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains. *Nature*, 351(6322):164–167, May 1991.

[17] P. E. Gleizes, R. C. Beavis, R. Mazzieri, B. Shen, and D. B. Rifkin. Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem*, 271(47):29891–29896, Nov 1996.

[18] J. Saharinen and J. Keski-Oja. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell*, 11(8):2691–2704, Aug 2000.

[19] H. C. Dietz, G. R. Cutting, R. E. Pyeritz, C. L. Maslen, L. Y. Sakai, G. M. Corson, E. G. Puffenberger, A. Hamosh, E. J. Nanthakumar, and S. M. Curristin. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*, 352(6333):337–339, Jul 1991.

[20] L. Faivre, G. Collod-Beroud, B. L. Loeys, A. Child, C. Binquet, E. Gautier, B. Callewaert, E. Arbustini, K. Mayer, M. Arslan-Kirchner, A. Kiotsekoglou, P. Comeglio, N. Marziliano, H. C. Dietz, D. Halliday, C. Beroud, C. Bonithon-Kopp, M. Claustres, C. Muti, H. Plauchu, P. N. Robinson, L. C. Adés, A. Biggin, B. Benetts, M. Brett, K. J. Holman, J. De Backer, P. Coucke, U. Francke, A. De Paepe, G. Jondeau, and C. Boileau. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *Am J Hum Genet*, 81(3):454–466, Sep 2007.

[21] A. K. Downing, V. Knott, J. M. Werner, C. M. Cardy, I. D. Campbell, and P. A. Handford. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell*, 85(4):597–605, May 1996.

[22] V. Knott, A. K. Downing, C. M. Cardy, and P. Handford. Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain pair from human fibrillin-1. *J Mol Biol*, 255(1):22–27, Jan 1996.

[23] D. P. Reinhardt, R. N. Ono, and L. Y. Sakai. Calcium stabilizes fibrillin-1 against proteolytic degradation. *J Biol Chem*, 272(2):1231–1236, Jan 1997.

[24] P. N. Robinson and M. Godfrey. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. *J Med Genet*, 37(1):9–25, Jan 2000.

[25] M. Palz, F. Tiecke, P. Booms, B. Göldner, T. Rosenberg, J. Fuchs, F. Skovby, H. Schumacher, U. C. Kaufmann, Y. von Kodolitsch, C. A. Nienaber, C. Leitner, S. Katzke, B. Vetter, C. Hagemeier, and P. N. Robinson. Clustering of mutations associated with mild Marfan-like phenotypes in the 3' region of FBN1 suggests a potential genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet*, 91(3):212–221, Mar 2000.

[26] L. Pereira, O. Levran, F. Ramirez, J. R. Lynch, B. Sykes, R. E. Pyeritz, and H. C. Dietz. A molecular approach to the stratification of cardiovascular risk in families with Marfan's syndrome. *N Engl J Med*, 331(3):148–153, Jul 1994.

[27] L. Faivre, G. Collod-Beroud, B. Callewaert, A. Child, C. Binquet, E. Gautier, B. L. Loeys, E. Arbustini, K. Mayer, M. Arslan-Kirchner, C. Stheneur, A. Kiotsekoglou, P. Comeglio, N. Marziliano, J. E. Wolf, O. Bouchot, P. Khau-Van-Kien, C. Beroud, M. Claustres, C. Bonithon-Kopp, P. N. Robinson, L. Ades, J. De Backer, P. Coucke, U. Francke, A. De Paepe, G. Jondeau, and C. Boileau. Clinical and mutation-type analysis from an international series of 198 probands with a pathogenic FBN1 exons 24-32 mutation. *Eur J Hum Genet*, Nov 2008.

[28] P. Booms, J. Cisler, K. R. Mathews, M. Godfrey, F. Tiecke, U. C. Kaufmann, U. Vetter, C. Hagemeier, and P. N. Robinson. Novel exon skipping mutation in the fibrillin-1 gene: two 'hot spots' for the neonatal Marfan syndrome. *Clin Genet*, 55(2):110–117, Feb 1999.

[29] F. Tiecke, S. Katzke, P. Booms, P. N. Robinson, L. Neumann, M. Godfrey, K. R. Mathews, M. Scheuner, G. K. Hinkel, R. E. Brenner, H. H. Hövels-Gürich, C. Hagemeier, J. Fuchs, F. Skovby, and T. Rosenberg. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40. *Eur J Hum Genet*, 9(1):13–21, Jan 2001.

[30] L. Lönnqvist, D. Reinhardt, L. Sakai, and L. Peltonen. Evidence for furin-type activity-mediated C-terminal processing of profibrillin-1 and interference in the processing by certain mutations. *Hum Mol Genet*, 7(13):2039–2044, Dec 1998.

[31] Lesley C Ades, Katherine J Holman, Maggie S Brett, Matthew J Edwards, and Bruce Bennetts. Ectopia lentis phenotypes and the FBN1 gene. *Am J Med Genet A*, 126(3):284–289, Apr 2004.

[32] C. Hayward, M. E. Porteous, and D. J. Brock. A novel mutation in the fibrillin gene (FBN1) in familial arachnodactyly. *Mol Cell Probes*, 8(4):325–327, Aug 1994.

[33] D. M. Milewicz, K. Michael, N. Fisher, J. S. Coselli, T. Markello, and A. Biddinger. Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. *Circulation*, 94(11):2708–2711, Dec 1996.

[34] S. Sood, Z. A. Eldadah, W. L. Krause, I. McIntosh, and H. C. Dietz. Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nat Genet*, 12(2):209–211, Feb 1996.

[35] L. Faivre, R.J. Gorlin, M.K. Wirtz, M. Godfrey, N. Dagoneau, J.R. Samples, M. Le Merrer, G. Collod-Beroud, C. Boileau, A. Munnich, and V. Cormier-Daire. In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. *J Med Genet*, 40:34–36, 2003.

[36] R. K. Beals and F. Hecht. Congenital contractural arachnodactyly. a heritable disorder of connective tissue. *J Bone Joint Surg Am*, 53(5):987–993, Jul 1971.

[37] P. A. Gupta, D. D. Wallis, T. O. Chin, H. Northrup, V. T. Tran-Fadulu, J. A. Towbin, and D. M. Milewicz. FBN2 mutation associated with manifestations of Marfan syndrome and congenital contractural arachnodactyly. *J Med Genet*, 41(5):e56, May 2004.

[38] B. J. Rongish, C. J. Drake, W. S. Argraves, and C. D. Little. Identification of the developmental marker, JB3-antigen, as fibrillin-2 and its de novo organization into embryonic microfibrous arrays. *Dev Dyn*, 212(3):461–471, Jul 1998.

[39] Q. Yang, K. Ota, Y. Tian, A. Kumar, J. Wada, N. Kashihara, E. Wallner, and Y. S. Kanwar. Cloning of rat fibrillin-2 cDNA and its role in branching morphogenesis of embryonic lung. *Dev Biol*, 212(1):229–242, Aug 1999.

[40] S. S. Chaudhry, J. Gazzard, C. Baldock, J. Dixon, M. J. Rock, G. C. Skinner, K. P. Steel, C. M. Kielty, and M. J. Dixon. Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. *Hum Mol Genet*, 10(8):835–843, Apr 2001.

[41] G. Collod, M. C. Babron, G. Jondeau, M. Coulon, J. Weissenbach, O. Dubourg, J. P. Bourdarias, C. Bonaiti-Pellie, C. Junien, and C. Boileau. A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2-p25. *Nat Genet*, 8(3):264–268, Nov 1994.

[42] Bart L Loeys, Junji Chen, Enid R Neptune, Daniel P Judge, Megan Podowski, Tammy Holm, Jennifer Meyers, Carmen C Leitch, Nicholas Katsanis, Neda Sharifi, F. Lauren Xu, Loretha A Myers, Philip J Spevak, Duke E Cameron, Julie De Backer, Jan Hellemans, Yan Chen, Elaine C Davis, Catherine L Webb, Wolfram Kress, Paul Coucke, Daniel B Rifkin, Anne M De Paepe, and Harry C Dietz. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*, 37(3):275–281, Mar 2005.

[43] Bart L Loeys, Ulrike Schwarze, Tammy Holm, Bert L Callewaert, George H Thomas, Hariyadarshi Pannu, Julie F De Backer, Gretchen L Oswald, Sofie Symoens, Sylvie Manouvrier, Amy E Roberts, Francesca Faravelli, M. Alba Greco, Reed E Pyeritz, Dianna M Milewicz, Paul J Coucke, Duke E Cameron, Alan C Braverman, Peter H Byers, Anne M De Paepe, and Harry C Dietz. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*, 355(8):788–798, Aug 2006.

[44] Krishna Kumar Singh, Kathrin Rommel, Anjali Mishra, Matthias Karck, Axel Haverich, Jörg Schmidtke, and Mine Arslan-Kirchner. TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with features of Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome. *Hum Mutat*, 27(8):770–777, Aug 2006.

[45] Hariyadarshi Pannu, Van Tran Fadulu, Jessica Chang, Andrea Lafont, Sumera N Hasham, Elizabeth Sparks, Philip F Giampietro, Christina Zaleski, Anthony L Estrera, Hazim J Safi, Sanjay Shete, Marcia C Willing, C. S. Raman, and Dianna M Milewicz. Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation*, 112(4):513–520, Jul 2005.

[46] M. Pepin, U. Schwarze, A. Superti-Furga, and P. H. Byers. Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med*, 342(10):673–680, Mar 2000.

[47] Vishwanathan Hucthagowder, Nina Sausgruber, Katherine H Kim, Brad Angle, Lihua Y Marmorstein, and Zsolt Urban. Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am J Hum Genet*, 78(6):1075–1080, Jun 2006.

[48] D. Guo, S. Hasham, S. Q. Kuang, C. J. Vaughan, E. Boerwinkle, H. Chen, D. Abuelo, H. C. Dietz, C. T. Basson, S. S. Shete, and D. M. Milewicz. Familial thoracic aortic aneurysms and dissections: genetic heterogeneity with a major locus mapping to 5q13-14. *Circulation*, 103(20):2461–2468, May 2001.

[49] C. J. Vaughan, M. Casey, J. He, M. Veugelers, K. Henderson, D. Guo, R. Campagna, M. J. Roman, D. M. Milewicz, R. B. Devereux, and C. T. Basson. Identification of a chromosome 11q23.2-q24 locus for familial aortic aneurysm disease, a genetically heterogeneous disorder. *Circulation*, 103(20):2469–2475, May 2001.

[50] Limin Zhu, Roger Vranckx, Philippe Khau Van Kien, Alain Lalande, Nicolas Boisset, Flavie Mathieu, Mark Wegman, Luke Glancy, Jean-Marie Gasc, Francois Brunotte, Patrick Bruneval, Jean-Eric Wolf, Jean-Baptiste Michel, and Xavier Jeunemaitre. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet*, 38(3):343–349, Mar 2006.

[51] Paul J Coucke, Andy Willaert, Marja W Wessels, Bert Callewaert, Nicoletta Zoppi, Julie De Backer, Joyce E Fox, Grazia M S Mancini, Marios Kambouris, Rita Gardella, Fabio Facchetti, Patrick J Willems, Ramses Forsyth, Harry C Dietz, Sergio Barlati, Marina Colombi, Bart Loeys, and Anne De Paepe. Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat Genet*, 38(4):452–457, Apr 2006.

[52] James L Homme, Marie-Christine Aubry, William D Edwards, Stephanie M Bagniewski, Vernon Shane Pankratz, Catherine A Kral, and Henry D Tazelaar. Surgical pathology of the ascending aorta: a clinicopathologic study of 513 cases. *Am J Surg Pathol*, 30(9):1159–1168, Sep 2006.

[53] Vidu Garg, Alecia N Muth, Joshua F Ransom, Marie K Schluterman, Robert Barnes, Isabelle N King, Paul D Grossfeld, and Deepak Srivastava. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*, 437(7056):270–274, Sep 2005.

[54] Lisa J Martin, Vijaya Ramachandran, Linda H Cripe, Robert B Hinton, Gregor Andelfinger, Meredith Tabangin, Kerry Shooner, Mehdi Keddache, and D. Woodrow Benson. Evidence in favor of linkage to human chromosomal regions 18q, 5q and 13q for bicuspid aortic valve and associated cardiovascular malformations. *Hum Genet*, 121(2):275–284, Apr 2007.

[55] P. N. Robinson and P. Booms. The molecular pathogenesis of the Marfan syndrome. *Cell Mol Life Sci*, 58(11):1698–1707, Oct 2001.

[56] H. C. Dietz, I. McIntosh, L. Y. Sakai, G. M. Corson, S. C. Chalberg, R. E. Pyeritz, and C. A. Francomano. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics*, 17(2):468–475, Aug 1993.

[57] L. Pereira, S. Y. Lee, B. Gayraud, K. Andrikopoulos, S. D. Shapiro, T. Bunton, N. J. Biery, H. C. Dietz, L. Y. Sakai, and F. Ramirez. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3819–3823, Mar 1999.

[58] Daniel P Judge, Nancy J Biery, Douglas R Keene, Jessica Geubtner, Loretha Myers, David L Huso, Lynn Y Sakai, and Harry C Dietz. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest*, 114(2):172–181, Jul 2004.

[59] Gábor Mátyás, Sira Alonso, Andrea Patrignani, Myriam Marti, Eliane Arnold, István Magyar, Caroline Henggeler, Thierry Carrel, Beat Steinmann, and Wolfgang Berger. Large genomic fibrillin-1 (FBN1) gene deletions provide evidence for true haploinsufficiency in Marfan syndrome. *Hum Genet*, 122(1):23–32, Aug 2007.

[60] L. Pereira, K. Andrikopoulos, J. Tian, S. Y. Lee, D. R. Keene, R. Ono, D. P. Reinhardt, L. Y. Sakai, N. J. Biery, T. Bunton, H. C. Dietz, and F. Ramirez. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet*, 17(2):218–222, Oct 1997.

[61] T. E. Bunton, N. J. Biery, L. Myers, B. Gayraud, F. Ramirez, and H. C. Dietz. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res*, 88(1):37–43, Jan 2001.

[62] Yskert von Kodolitsch and Peter N Robinson. Marfan syndrome: an update of genetics, medical and surgical management. *Heart*, 93(6):755–760, Jun 2007.

[63] Enid R Neptune, Pamela A Frischmeyer, Dan E Arking, Loretha Myers, Tracie E Bunton, Barbara Gayraud, Francesco Ramirez, Lynn Y Sakai, and Harry C Dietz. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet*, 33(3):407–411, Mar 2003.

[64] Connie M Ng, Alan Cheng, Loretha A Myers, Francisco Martinez-Murillo, Chunfa Jie, Djahida Bedja, Kathleen L Gabrielson, Jennifer M W Hausladen, Robert P Mecham, Daniel P Judge, and Harry C Dietz. TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest*, 114(11):1586–1592, Dec 2004.

[65] Jennifer P Habashi, Daniel P Judge, Tammy M Holm, Ronald D Cohn, Bart L Loeys, Timothy K Cooper, Loretha Myers, Erin C Klein, Guosheng Liu, Carla Calvi, Megan Podowski, Enid R Neptune, Marc K Halushka, Djahida Bedja, Kathleen Gabrielson, Daniel B Rifkin, Luca Carta, Francesco Ramirez, David L

Huso, and Harry C Dietz. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, 312(5770):117–121, Apr 2006.

[66] Peter Matt, Jennifer Habashi, Thierry Carrel, Duke E Cameron, Jennifer E Van Eyk, and Harry C Dietz. Recent advances in understanding Marfan syndrome: should we now treat surgical patients with losartan? *J Thorac Cardiovasc Surg*, 135(2):389–394, Feb 2008.

[67] D. P. Reinhardt, R. N. Ono, H. Notbohm, P. K. Müller, H. P. Bächinger, and L. Y. Sakai. Mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules render fibrillin-1 susceptible to proteolysis. A potential disease-causing mechanism in Marfan syndrome. *J Biol Chem*, 275(16):12339–12345, Apr 2000.

[68] A. J. McGettrick, V. Knott, A. Willis, and P. A. Handford. Molecular effects of calcium binding mutations in Marfan syndrome depend on domain context. *Hum Mol Genet*, 9(13):1987–1994, Aug 2000.

[69] K. J. Fleischer, H. C. Nousari, G. J. Anhalt, C. D. Stone, and J. C. Laschinger. Immunohistochemical abnormalities of fibrillin in cardiovascular tissues in Marfan's syndrome. *Ann Thorac Surg*, 63(4):1012–1017, Apr 1997.

[70] Peter N Robinson, Andreas Wollstein, Ulrike Böhme, and Brad Beattie. Ontologizing gene-expression microarray data: characterizing clusters with Gene Ontology. *Bioinformatics*, 20(6):979–981, Apr 2004.

[71] Sebastian Bauer, Steffen Grossmann, Martin Vingron, and Peter N Robinson. Ontologizer 2.0–a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinformatics*, 24(14):1650–1651, Jul 2008.

[72] Patrick Booms, Reinhard Pregla, Andreas Ney, Frank Barthel, Dieter P Reinhardt, Angelika Pletschacher, Stefan Mundlos, and Peter N Robinson. RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome. *Hum Genet*, 116(1-2):51–61, Jan 2005.

[73] Kenjiro Kosaki, Daisuke Takahashi, Toru Udaka, Rika Kosaki, Morio Matsumoto, Shigeharu Ibe, Takeshi Isobe, Yoko Tanaka, and Takao Takahashi. Molecular pathology of Shprintzen-Goldberg syndrome. *Am J Med Genet A*, 140(1):104–8; author reply 109–10, Jan 2006.

[74] Chantal Stheneur, Gwenaëlle Collod-Béroud, Laurence Faivre, Laurent Gouya, Gilles Sultan, Jean-Marie Le Parc, Bertrand Moura, David Attias, Christine Muti, Marc Sznajder, Mireille Claustres, Claudine Junien, Clarisse Baumann, Valérie Cormier-Daire, Marlene Rio, Stanislas Lyonnet, Henri Plauchu, Didier Lacombe, Bertrand Chevallier, Guillaume Jondeau, and Catherine Boileau. Identification of 23 TGFBR2 and 6 TGFBR1 gene mutations and genotype-phenotype investigations in 457 patients with Marfan syndrome type I and II, Loeys-Dietz syndrome and related disorders. *Hum Mutat*, 29(11):E284–E295, Nov 2008.

[75] Sarah Hutchinson, Andre Furger, Dorothy Halliday, Daniel P Judge, Andrew Jefferson, Harry C Dietz, Helen Firth, and Penny A Handford. Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype? *Hum Mol Genet*, 12(18):2269–2276, Sep 2003.

[76] Paul Coucke, Petra Van Acker, and Anne De Paepe. Mutation analysis of the FBN1 gene in patients with Marfan syndrome. *Methods Mol Med*, 126:81–95, 2006.

[77] P. Booms, A. P. Withers, M. Boxer, U. C. Kaufmann, C. Hagemeier, U. Vetter, and P. N. Robinson. A novel de novo mutation in exon 14 of the fibrillin-1 gene associated with delayed secretion of fibrillin in a patient with a mild Marfan phenotype. *Hum Genet*, 100(2):195–200, Aug 1997.

[78] Stefanie Katzke, Patrick Booms, Frank Tiecke, Monika Palz, Angelika Pletschacher, Seval Türkmen, Luitgard M Neumann, Reinhard Pregla, Christa Leitner, Cornelia Schramm, Peter Lorenz, Christian Hagemeier, Josefine Fuchs, Flemming Skovby, Thomas Rosenberg, and Peter N Robinson. TGGE screening of

the entire FBN1 coding sequence in 126 individuals with Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Hum Mutat*, 20(3):197–208, Sep 2002.

[79] Vanita Vanita, Jai Rup Singh, Daljit Singh, Raymonda Varon, Peter N Robinson, and Karl Sperling. A recurrent FBN1 mutation in an autosomal dominant ectopia lentis family of Indian origin. *Mol Vis*, 13:2035–2040, 2007.

[80] Guillaume Vogt, Ariane Chapgier, Kun Yang, Nadia Chuzhanova, Jacqueline Feinberg, Claire Fieschi, Stéphanie Boisson-Dupuis, Alexandre Alcais, Orchidée Filipe-Santos, Jacinta Bustamante, Ludovic de Beaucoudrey, Ibrahim Al-Mohsen, Sami Al-Hajjar, Abdulaziz Al-Ghonaium, Parisa Adimi, Mehdi Mirsaeidi, Soheila Khalilzadeh, Sergio Rosenzweig, Oscar de la Calle Martin, Thomas R Bauer, Jennifer M Puck, Hans D Ochs, Dieter Furthner, Carolin Engelhorn, Bernd Belohradsky, Davood Mansouri, Steven M Holland, Robert D Schreiber, Laurent Abel, David N Cooper, Claire Soudais, and Jean-Laurent Casanova. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet*, 37(7):692–700, Jul 2005.

[81] Peter N Robinson, Patrick Booms, Stefanie Katzke, Markus Ladewig, Luitgard Neumann, Monika Palz, Reinhard Pregla, Frank Tiecke, and Thomas Rosenberg. Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Hum Mutat*, 20(3):153–161, Sep 2002.

[82] Meike Rybczynski, Alexander M J Bernhardt, Uwe Rehder, Bettina Fuisting, Ludwig Meiss, Ursula Voss, Christian Habermann, Christian Detter, Peter N Robinson, Mine Arslan-Kirchner, Jörg Schmidtke, Thomas S Mir, Jürgen Berger, Thomas Meinertz, and Yskert von Kodolitsch. The spectrum of syndromes and manifestations in individuals screened for suspected Marfan syndrome. *Am J Med Genet A*, 146A(24):3157–3166, Dec 2008.

[83] L. Faivre, G. Collod-Beroud, A. Child, B. Callewaert, B. L. Loeys, C. Binquet, E. Gautier, E. Arbustini, K. Mayer, M. Arslan-Kirchner, C. Stheneur, A. Kiotsekoglou, P. Comeglio, N. Marziliano, D. Halliday, C. Beroud, C. Bonithon-Kopp, M. Claustres, H. Plauchu, P. N. Robinson, L. Adès, J. De Backer, P. Coucke, U. Francke, A. De Paepe, C. Boileau, and G. Jondeau. Contribution of molecular analyses in diagnosing Marfan syndrome and type I fibrillinopathies: an international study of 1009 probands. *J Med Genet*, 45(6):384–390, Jun 2008.

[84] C. M. Kielty and C. A. Shuttleworth. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS Lett*, 336(2):323–326, Dec 1993.

[85] D. P. Reinhardt, D. E. Mechling, B. A. Boswell, D. R. Keene, L. Y. Sakai, and H. P. Bächinger. Calcium determines the shape of fibrillin. *J Biol Chem*, 272(11):7368–7373, Mar 1997.

[86] P. Booms, F. Tiecke, T. Rosenberg, C. Hagemeier, and P. N. Robinson. Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments. *Hum Genet*, 107(3):216–224, Sep 2000.

[87] Tillman Vollbrandt, Kerstin Tiedemann, Ehab El-Hallous, Guoqing Lin, Jürgen Brinckmann, Harald John, Boris Bätge, Holger Notbohm, and Dieter P Reinhardt. Consequences of cysteine mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules of fibrillin-1. *J Biol Chem*, 279(31):32924–32931, Jul 2004.

[88] P. Whiteman, R. S. Smallridge, V. Knott, J. J. Cordle, A. K. Downing, and P. A. Handford. A G1127S change in calcium-binding epidermal growth factor-like domain 13 of human fibrillin-1 causes short range conformational effects. *J Biol Chem*, 276(20):17156–17162, May 2001.

[89] Ji Young Suk, Sacha Jensen, Aileen McGettrick, Antony C Willis, Pat Whiteman, Christina Redfield, and Penny A Handford. Structural consequences of cysteine substitutions C1977Y and C1977R in calcium-binding epidermal growth factor-like domain 30 of human fibrillin-1. *J Biol Chem*, 279(49):51258–51265, Dec 2004.

[90] Rachel S Smallridge, Pat Whiteman, Jörn M Werner, Iain D Campbell, Penny A Handford, and A. Kristina Downing. Solution structure and dynamics of a calcium binding epidermal growth factor-like domain pair from the neonatal region of human fibrillin-1. *J Biol Chem*, 278(14):12199–12206, Apr 2003.

[91] Nitin H Sachdev, Nick Di Girolamo, Peter J McCluskey, Angela V Jennings, Roger McGuinness, Denis Wakefield, and Minas T Coroneo. Lens dislocation in Marfan syndrome: potential role of matrix metalloproteinases in fibrillin degradation. *Arch Ophthalmol*, 120(6):833–835, Jun 2002.

[92] A. M. Segura, R. E. Luna, K. Horiba, W. G. Stetler-Stevenson, H. A. McAllister, J. T. Willerson, and V. J. Ferrans. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation*, 98(19 Suppl):II331–7; discussion II337–8, Nov 1998.

[93] Hidayatullah G Munshi, Yi I Wu, Subhendu Mukhopadhyay, Adam J Ottaviano, Antonella Sassano, Jennifer E Koblinski, Leonidas C Platanias, and M. Sharon Stack. Differential regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase activity by ERK 1/2- and p38 MAPK-modulated tissue inhibitor of metalloproteinases 2 expression controls transforming growth factor-beta1-induced pericellular collagenolysis. *J Biol Chem*, 279(37):39042–39050, Sep 2004.

[94] Kien T Tran, Philina Lamb, and Jau-Shyong Deng. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Sci*, 40(1):11–20, Oct 2005.

[95] G. A. Homandberg. Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments. *Front Biosci*, 4:D713–D730, Oct 1999.

[96] Atsushi Utani, Yutaka Momota, Hideharu Endo, Yoshitoshi Kasuya, Konrad Beck, Nobuharu Suzuki, Motoyoshi Nomizu, and Hiroshi Shinkai. Laminin alpha 3 lg4 module induces matrix metalloproteinase-1 through mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 278(36):34483–34490, Sep 2003.

[97] Arnaud Robinet, Abdel Fahem, Jean-Hubert Cauchard, Eric Huet, Loic Vincent, Sandrine Lorimier, Franck Antonicelli, Claudine Soria, Michel Crepin, William Hornebeck, and Georges Bellon. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci*, 118(Pt 2):343–356, Jan 2005.

[98] Patrick Booms, Andreas Ney, Frank Barthel, Gautier Moroy, Damian Counsell, Christoph Gille, Gao Guo, Reinhard Pregla, Stefan Mundlos, Alain J P Alix, and Peter N Robinson. A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis. *J Mol Cell Cardiol*, 40:234–246, Jan 2006.

[99] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, and G. Sherlock. Gene Ontology: tool for the unification of biology. the Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25(1):25–29, May 2000.

[100] Kalembeyi Ilunga, Rika Nishiura, Hiroyasu Inada, Amro El-Karef, Kyoko Imanaka-Yoshida, Teruyo Sakakura, and Toshimichi Yoshida. Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor-beta and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion. *Int J Exp Pathol*, 85(6):373–379, Dec 2004.

[101] Ilunga Kalembeyi, Hiroyasu Inada, Rika Nishiura, Kyoko Imanaka-Yoshida, Teruyo Sakakura, and Toshimichi Yoshida. Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta1. *Int J Cancer*, 105(1):53–60, May 2003.

[102] B. Jian, P. L. Jones, Q. Li, E. R. Mohler, F. J. Schoen, and R. J. Levy. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol*, 159(1):321–327, Jul 2001.

[103] A. Hinek. Nature and the multiple functions of the 67-kd elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes Commun*, 2(3):185–193, Jul 1994.

[104] Gao Guo, Patrick Booms, Marc Halushka, Harry C Dietz, Andreas Ney, Sigmar Stricker, Jochen Hecht, Stefan Mundlos, and Peter N Robinson. 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, Oct 2006.

[105] J. A. Curci, S. Liao, M. D. Huffman, S. D. Shapiro, and R. W. Thompson. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 102(11):1900–1910, Dec 1998.

[106] Kirk A Hance, Monika Tataria, Scott J Ziporin, Jason K Lee, and Robert W Thompson. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kd cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg*, 35(2):254–261, Feb 2002.

[107] W. C. Roberts and H. S. Honig. The spectrum of cardiovascular disease in the marfan syndrome: a clinico-morphologic study of 18 necropsy patients and comparison to 151 previously reported necropsy patients. *Am Heart J*, 104(1):115–135, Jul 1982.

[108] V. L. Gott, J. C. Laschinger, D. E. Cameron, H. C. Dietz, P. S. Greene, A. M. Gillinov, R. E. Pyeritz, D. E. Alejo, K. J. Fleischer, G. J. Anhalt, C. D. Stone, and V. A. McKusick. The Marfan syndrome and the cardiovascular surgeon. *Eur J Cardiothorac Surg*, 10(3):149–158, 1996.

[109] A. McGarry Houghton, Pablo A Quintero, David L Perkins, Dale K Kobayashi, Diane G Kelley, Luiz A Marconcini, Robert P Mecham, Robert M Senior, and Steven D Shapiro. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest*, 116:753–759, Feb 2006.

[110] T. Freestone, R. J. Turner, A. Coady, D. J. Higman, R. M. Greenhalgh, and J. T. Powell. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(8):1145–1151, Aug 1995.

[111] Celine Buckley, Charles W Wyble, Martin Borhani, Terri L Ennis, Dale K Kobayashi, John A Curci, Steven D Shapiro, and Robert W Thompson. Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *J Am Coll Surg*, 199(6):896–903, Dec 2004.

[112] Ada W Y Chung, H. H Clarice Yang, Marek W Radomski, and Cornelis van Breemen. 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. *Circ Res*, 102(8):e73–e85, Apr 2008.

[113] Wanfen Xiong, Rebecca A Knispel, Harry C Dietz, Francesco Ramirez, and B. Timothy Baxter. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg*, 47(1):166–72; discussion 172, Jan 2008.

[114] Maurice A M van Steensel, Michel van Geel, Lizelotte J M T Parren, Constance T R M Schrander-Stumpel, and Dominique Marcus-Soekarman. Shprintzen-Goldberg syndrome associated with a novel missense mutation in TGFBR2. *Exp Dermatol*, 17(4):362–365, Apr 2008.

[115] A. De Paepe, R. B. Devereux, H. C. Dietz, R. C. Hennekam, and R. E. Pyeritz. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet*, 62(4):417–426, Apr 1996.

[116] Peter N Robinson, Luitgard M Neumann, Stephanie Demuth, Herbert Enders, Ursula Jung, Rainer König, Beate Mitulla, Dietmar Müller, Petra Muschke, Lutz Pfeiffer, Bettina Prager, Mirja Somer, and Sigrid Tinschert. Shprintzen-Goldberg syndrome: fourteen new patients and a clinical analysis. *Am J Med Genet A*, 135(3):251–262, Jun 2005.

[117] Gill Bejerano, Michael Pheasant, Igor Makunin, Stuart Stephen, W. James Kent, John S Mattick, and David Haussler. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, 304(5675):1321–1325, May 2004.

Danksagung

Meinem Vater möchte ich für seine Unterstützung und Hilfe während meines Medizinstudiums und danach danken. Björn Heidrich danke ich für die erste Einführung in die Laborarbeit. Herrn Prof. Peter Nürnberg danke ich für die Einführung in die molekulare Humangenetik und für die schöne Zeit im Labor, wo ich die Faszination der Forschung kennenlernte. Hartmut Peters danke ich für die Unterstützung mit dem Aufbau der Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese. Frau Prof. Sigrid Tinschert danke ich für für die Einführung in die klinische Genetik. Herrn Prof. Gaedicke und allen Kollegen in der Kinderklinik der Charité danke ich für die Unterstützung im Labor und bei der Facharztweiterbildung. Christian Hagemeier danke ich für die Unterstützung im Labor der Kinderklinik in der Ziegelstraße. Luitgard Neumann-Graul und Denise Horn danke ich für die Unterstützung bei der Weiterbildung in der Humangenetik. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Stefan Mundlos, der mich nicht nur bei meinen Forschungsarbeiten zum Marfan-Syndrom sondern auch bei meinen zunächst etwas quixotischen Plänen in der Bioinformatik tatkräftig unterstützt hat.

Im Laufe der nun über ein Jahrzehnt anhaltende Beschäftigung mit MFS hatte ich das Privilegium und das Vergnügen, Kollegen aus vielen Teilen Deutschlands und der Welt kennenzulernen, die mir bei unzähligen Anlässen geholfen haben. Hierzu zählen Yskert von Kodolitsch, Michael Raghunath, Marina Vogler und viele andere von der MarfanHilfe (Deutschland) e.V., Maureen Boxer, Maurice Godfrey, Thomas Rosenberg, Dieter Reinhardt, Harry C. Dietz und die National Marfan Organization der USA.

Ich bin zu besonderem Dank meinen Studenten gegenüber verpflichtet, ohne die diese Arbeiten unmöglich gewesen wäre: Patrick Booms, durch dessen Arbeit das Marfan-Projekt in Gang gekommen ist, Frank Tiecke, Monika Palz, Stefanie Katzke, Gao Guo sowie den Bioinformatikern Sebastian Bauer, Sebastian Köhler, Christian Rödelsperger und Marten Jäger. Ein weiterer Dank geht an Frau Angelika Pletschacher, durch deren Engagement vieles möglich

wurde. Den Mitgliedern der Forschergruppe Mundlos danke ich für die Unterstützung und Mitarbeit, insbesondere aber nicht nur Jochen Hecht, Claus-Eric Ott und Petra Seemann. Allen weiteren Kooperationspartnern spreche ich hier meinen Dank aus (Ihr wisst, wer Ihr seid!).

Meiner Frau Elisabeth und meinen Kindern Sophie und Anna gilt mein besonderer Dank für die unendliche Freude, die sie mir geben.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 3. Januar 2009 (Dr. P.N. Robinson)