

## Abstract

Cutis laxa (CL) syndromes represent a wide spectrum of rare connective tissue disorders associated with reduced skin elasticity and fragmented elastic fiber network. Some forms can cause joint laxity, pulmonary emphysema, and aortic aneurysms. Currently, the molecular pathogenic mechanisms underlying most CL types are not fully understood and many causative genes are yet to be identified. In this thesis, the molecular mechanisms leading to aortic tortuosity, aortic aneurysm formation, and bone defects due to *EMILIN1* and *LTBP1* gene variants were investigated. Therefore, dermal fibroblast cultures derived from patient skin biopsies, as well as skin and aortic tissues from *Emilin1*<sup>-/-</sup> mice were studied. The biochemical findings gained in this thesis provide a better understanding on how EMILIN-1 affects collagen stability and network formation. EMILIN-1 was found to strongly impact fibulin-4 matrix deposition and lysyl oxidase (LOX) activity. However, in CL patient fibroblasts with known fibulin-4 deficiency neither EMILIN-1 assembly nor extracellular matrix (ECM) deposition was affected, suggesting that EMILIN-1 functions upstream of fibulin-4 in the process of elastic fiber formation. EMILIN-1 deficiency resulted in reduced collagen crosslinking indicated by the formation of thinner, disentwined fibers with reduced cross banding. EMILIN-1 deficiency led to increased transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) activity and collagen synthesis, however, collagen was found to be less anchored within the matrix assembled by fibroblasts. In *Emilin1*<sup>-/-</sup> mice, collagen was more extractable from the skin and showed an abnormal deposition in the aorta. Further,  $\mu$ CT analysis of *Emilin1*<sup>-/-</sup> femora showed a reduced presence of trabecular bone suggesting a requirement of EMILIN-1 for bone strength. Interestingly, in CL patients with LTBP-1 defects, distinct variants in the *LTBP1* gene impact fibulin-4 deposition and LOX activity differently, suggesting a different pathogenic mechanism in these patients. Moreover, the impact of these variants on TGF- $\beta$  signaling and collagen deposition was also different. A C-terminal variant strongly perturbs extracellular LTBP-1 and fibulin-4 deposition as well as active LOX levels, but led to increased extracellular presence of TGF- $\beta$  and collagen fibers. In contrast, an N-terminal truncation mutation led to loss of LTBP-1 within the ECM that did not affect fibulin-4 deposition, LOX and TGF- $\beta$  levels or collagen fiber assembly. Together, the findings of this thesis provide a new insight into the molecular mechanisms of CL and therefore a better understanding on how defects in elastic fiber associated proteins impact collagen fiber formation and homeostasis in the context of human disease.

## **Zusammenfassung**

Die Cutis-Laxa-Syndrome (CL) stellen ein breites Spektrum seltener Bindegewebserkrankungen dar, die mit einer verminderten Hautelastizität und einem fragmentierten elastischen Fasernetz einhergehen. Einige Formen können zu Gelenklaxität, Lungenemphysem und Aortenaneurysmen führen. Derzeit sind die molekularen Mechanismen, die den meisten CL-Typen zugrunde liegen, noch nicht vollständig geklärt, und viele ursächliche Gene sind noch unbekannt. In dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen untersucht, die zur Aortentortuosität, zur Bildung von Aortenaneurysmen und zu Knochendefekten aufgrund von *EMILIN1* und *LTBP1* Mutationen führen. Dazu wurden Hautfibroblastenkulturen von CL Patienten sowie Haut- und Aortengewebe von *Emilin1*<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Die in dieser Arbeit gewonnenen biochemischen Erkenntnisse ermöglichen ein besseres Verständnis darüber, wie EMILIN-1 die Kollagenstabilität und die Netzwerkbildung beeinflusst. Es wurde festgestellt, dass EMILIN-1 die Matrixablagerung von Fibulin-4 und die Aktivität von Lysyloxidase (LOX) stark beeinflusst. In Fibroblastenkulturen von CL Patienten mit bekanntem Fibulin-4 Defekt war jedoch die extrazelluläre Assemblierung von EMILIN-1 nicht beeinträchtigt. EMILIN-1 Defizienz führte zu einer verminderten Kollagenvernetzung, die sich in der Bildung dünnerer Fasern mit geringerer Quervernetzung zeigte. EMILIN-1 Defizienz führte zu einer erhöhten TGF- $\beta$ -Aktivität und Kollagensynthese, aber auch zu einer verminderten Verankerung von Kollagen in der Matrix. Bei *Emilin1*<sup>-/-</sup> Mäusen war das Kollagen stärker aus der Haut extrahierbar und zeigte eine abnorme Ablagerung in der Aorta. Die  $\mu$ CT-Analyse von *Emilin1*<sup>-/-</sup> Oberschenkelknochen zeigte ein geringeres Vorkommen von trabekulärem Knochen. Interessanterweise beeinflussen verschiedene Varianten von *LTBP1* Mutationen die Fibulin-4-Ablagerung und die LOX-Aktivität unterschiedlich, was auf einen anderen pathogenen Mechanismus bei diesen CL Patienten hindeutet. Eine C-terminale Trunktationsvariante führte zu einer stark beeinträchtigten LTBP-1 und Fibulin-4 Ablagerung sowie einer Reduktion von aktivem LOX, während die extrazelluläre Präsenz von TGF- $\beta$  und Kollagenfasern erhöht war. Im Gegensatz dazu führte eine N-terminale Trunkierungsmutation zu einem Verlust von LTBP-1 innerhalb der ECM, der die Fibulin-4 Ablagerung, extrazelluläre Mengen von TGF- $\beta$  und aktivem LOX oder den Kollagenfaseraufbau nicht beeinflusste. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen von CL und damit ein besseres Verständnis darüber, wie sich Defekte in elastischen Faser-assoziierten Proteinen auf die Kollagenfaserbildung und -homöostase im Kontext menschlicher Erkrankungen auswirken.