

Summary

The extracellular matrix (ECM), and particularly the basement membrane (BM), play pivotal roles during development and homeostasis of a variety of tissues. The BM is a complex structure composed of many tightly associated and regulated proteins, which contribute to its integrity, strength and flexibility. Human disorders, which involve impaired BM integrity or strength, lead to complex, debilitating symptoms, which can affect multiple tissues in the body. One example is Fraser syndrome; an autosomal recessive congenital disorder resulting from mutations in the Fraser genes encoding the BM-associated proteins, *Fras1* or *Frem2*. This disorder is characterized by multiple developmental defects including cryptophthalmos (fusion of the eyelids), syndactyly (fusion of the digits) and renal defects. Mouse models of Fraser syndrome demonstrated that cryptophthalmos and syndactyly are most likely caused by locally restricted transient embryonic blistering at the BM-dermal junction at corresponding positions of the skin above the eye and limb anlagen. More recently, zebrafish models of Fraser syndrome have been identified, which exhibit similar transient blistering in the embryonic and larval fins. At the same time, other zebrafish mutants with fin blistering were identified, one of which is caused by mutations in the proprotein convertase *FurinA*, while another is caused by mutations in *Hmcn1*, a thus far little investigated member of the fibulin family of ECM proteins. Immunohistochemistry of mutant and chimeric zebrafish embryos revealed that *FurinA* is required for ectodomain shedding and proper dermal localization of *Fras1* protein, and that *Frem2* is required for *Fras1* stabilisation, consistent with previous findings that mouse *Fras1* and *Frem2* proteins form a protein complex. In contrast, *Fras1* was found to be stable and properly localized in *hmcn1* zebrafish mutants, indicating that *Hmcn1* is not part of the *Fras1/Frem2* complex, but contributes to the BM-dermal junction by other means. To gain more insights into *Hemicentin* function during vertebrate development, the studies were extended to *Hmcn2*, a close relative of *Hmcn1*, and to the mouse. In both zebrafish and mouse, *hmcn2* shows an expression pattern partly complementary to that of *hmcn1* in mesenchymal versus epithelial compartments of various tissues. Gene-targeted mouse knockouts were generated for both *Hmcn1* and *Hmcn2*. Preliminary macroscopical analyses indicate that loss of either of them does not result in any defects characteristic for *Fras1* or *Frem2* mutants, but in defects shared by mutants in the ECM protein *Fibrillin2*, which is a major component of microfibers. Applying morpholino oligonucleotide (MO)-based antisense approaches, the role of *Hmcn2* was analysed during zebrafish

development. Unlike *hmcn1*, but like *fibulin1 (fbln1)*, another member of the fibulin family, *hmcn2* is predominantly expressed in fin mesenchymal, rather than epidermal cells. In addition, both *hmcn2* and *fbln1* are expressed in developing somites. While *hmcn2* MO-based knockdown did not yield any discernable defects, *hmcn2/fbln1* double knockdown fish displayed blistering in the trunk pointing to an essential contribution of these proteins from mesodermal sources for proper BM-dermal junction formation. This phenotype is similar to that previously described for *fibrillin2* mutants. Furthermore, *hmcn2/fbln1* double knockdown fish displayed impaired migration of fin mesenchymal cells into the fin folds, pointing to a crucial role of Hmcn2 and Fbln1 to remodel the fin fold dermal ECM, which is a prerequisite for fibroblast ingrowth. Results obtained via transmission electron microscopy suggest that this ECM remodeling might occur at the level of cross fibers, which resemble mammalian microfibers. Taken together, the results of this work reveal new and important insights into the previously uncharacterized role of the two hemicentin proteins during vertebrate development, identifying Fibulin1 and Fibrillin2 as potential interaction partners.

Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix und im besonderen die Basalmembran (BM) spielen während der Entwicklung und für die Homöostase verschiedener Gewebe eine entscheidende Rolle. Die BM ist eine komplexe Struktur, die aus vielen eng assoziierten Proteinen besteht, die zu ihrer Integrität, Festigkeit und Flexibilität beitragen. Menschliche Syndrome, die zu Störungen der Integrität oder der Festigkeit der BM führen, rufen komplexe Symptomen hervor, die viele verschiedene Gewebe betreffen. Ein Beispiel ist das Fraser-Syndrom, eine autosomale rezessive Erbkrankheit, hervorgerufen durch Mutationen in den Genen der Fraserfamilie *Fras1* oder *Frem2*, die für BM-assoziierte Proteine kodieren. Diese Krankheit prägt sich durch multiple Defekte in der Entwicklung aus, wie Cryptothalmos (eine Fusion des Augenlids), Syndactylie (eine Fusion der Finger) und Nierendefekte. Entsprechende Mausmodelle des Frasersyndroms haben gezeigt, dass Cryptothalmos und Syndactylie sehr wahrscheinlich durch Blasen zwischen der BM und der Dermis hervorgerufen werden. Diese bilden sich transient und lokal begrenzt an den jeweiligen Positionen der Haut über dem Auge und den Extremitätenanlagen. Vor kurzem wurden Zebrafishmodelle des Frasersyndroms identifiziert, die ähnliche transiente Blasen in embryonalen und larvalen Flossen bilden. Zur gleichen Zeit identifizierte Zebrafischmutanten, die ebenfalls Blasen in den Flossen zeigen, betreffen jedoch andere Gene. Diese Blasen werden durch Mutationen in der Proproteinconvertase *FurinA* verursacht, oder durch Mutationen in *Hemicentin1* (*Hmcn1*), einem bisher wenig untersuchten Mitglied der Fibulinfamilie der ECM-Proteine. Immunohistologische Färbungen an mutanten und chimären Zebrafishembryonen zeigten auf, dass *FurinA* notwendig ist, um die Ectodomäne des *Fras1*-Proteins zu spalten und das Protein korrekt dermal zu lokalisieren. Außerdem wurde durch diese Versuche verdeutlicht, dass *Frem2* benötigt wird, um *Fras1* zu stabilisieren. Das stimmt mit früheren Untersuchungen überein, die zeigten, dass murines *Fras1* und *Frem2* einen Komplex bilden. Im Gegensatz dazu habe ich herausgefunden, dass *Fras1* in *hmcn1* Zebrafischmutanten korrekt lokalisiert wird. Das deutet darauf hin, dass *Hmcn1* nicht Teil des *Fras1*/*Frem2*-Komplex ist, sondern durch andere Mechanismen zur Verbindung zwischen BM und Dermis beiträgt. In dieser Studie habe ich die Rolle von *Hmcn1* und dem nahverwandten *Hmcn2* während der Entwicklung sowohl von Zebrafish als auch von der Maus analysiert. Desweiteren habe ich Knockoutmäuse für *Hmcn1* und *Hmcn2* hergestellt. Vorläufige makroskopische Analysen zeigten, dass der Funktionsverlust von keinem der beiden Gene zu den für *Fras1* oder *Frem2*-typischen Charakteristika führt. Die

Mutanten entwickeln jedoch Defekte, die auch bei Fibrillin2-Mutanten auftreten. Fibrillin2, ein weiteres ECM-Protein, ist eine bedeutende Komponente der Mikrofasern. Um die Rolle von Hmcn2 während der Entwicklung von Zebrafischen zu untersuchen, habe ich einen auf Morpholino-oligonukleotiden basierenden Knockdown-Ansatz gewählt. *hmcn2* ist im Gegensatz zu *hmcn1*, jedoch ähnlich wie *fibulin1* (*fbln1*), ein anderes Mitglied der Fibulinfamilie, hauptsächlich in mesenchymalen Zellen der Flosse und nicht in epidermalen Zellen exprimiert. Zusätzlich sind sowohl *hmcn2* als auch *fbln1* in sich entwickelnden Somiten exprimiert. Während der Herunterregulierung von *hmcn2* durch Morpholinos keinen erkennbaren Phänotyp hervorruft, zeigten Embryos, bei denen *hmcn2* und *fbln1* gleichzeitig ausgeschaltet wurden, Blasen am Körper. Das deutet darauf hin, dass diese Proteine aus mesodermalen Ursprung essentiell zur Formierung der Verbindung zwischen BM und Dermis beitragen. Desweiteren war die Migration von mesenchymalen Zellen in der Flosse in den Flossensaum gestört. Daher könnten Hmcn2 und Fbln1 eine entscheidende Rolle spielen, die dermale ECM im Flossensaum zu modulieren, was die Voraussetzung für das Einwandern von Fibroblasten ist. Die Analyse mithilfe von Elektronentransmissionmikroskopie deutet darauf hin, dass das Modulieren der ECM auf der Ebene der cross fibers, stattfindet. Cross fibers sind Fasern, die den Mikrofasern von Säugetieren ähneln.

Zusammengefasst geben die Ergebnisse neue Einblicke in vorher noch nicht beschriebene Funktionen der Hemicentin-Proteine während der Entwicklung von Vertebraten. Außerdem wurden Fibulin1 und Fibrillin2 als mögliche interagierende Partner identifiziert.