

# 1 Zusammenfassung

Die zelluläre Mikroumgebung in Geweben, welche durch supramolekulare Netzwerke von extrazellulären Matrix Fasern definiert wird, ist essentiell für den Erhalt der Gewebestruktur und -funktion. Klinische und biochemische Daten implizieren, dass Kollagen VI und Fibrillin-2 gemeinsam an Prozessen beteiligt sind, die die Gewebeintegrität und das Zellschicksal kontrollieren. *FBN2* Mutationen sind ursächlich für kongenitale kontrakturale Arachnodaktylie, eine vererbte Erkrankung, welche durch Überwuchs der Langknochen, Muskelschwäche und Kontrakturen gekennzeichnet ist. Patienten mit Mutationen in den Kollagen VI Ketten zeigen ähnliche klinische Merkmale wie CCA Patienten, was auf ähnliche zugrunde liegende Pathomechanismen schließen lässt.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es herauszufinden, ob beide mikrofibrilläre Systeme physisch und funktionell miteinander interagieren, um die Gewebehomöostase zu gewährleisten. Mit Hilfe von Protein-Protein Interaktionsstudien und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte erstmals eine direkte Interaktion zwischen Kollagen VI und Fibrillin-2 nachgewiesen werden. Biochemische Extraktionsanalysen zeigten eine veränderte Löslichkeit der Kollagen VI Ketten in Fibrillin-2 defizientem Muskel. Zudem konnte in *Col6a1*<sup>-/-</sup> Muskelgewebe eine gestörte Assemblierung von Fibrillin-2 Mikrofibrillen in der muskulären EZM beobachtet werden.

Um eine von beiden Netzwerken gemeinsam ausgehende, regulative Funktion in der muskuloskelettalen Homöostase zu untersuchen, wurde eine *Col6a1*<sup>-/-</sup>;*Fbn2*<sup>-/-</sup> Mauslinie generiert. *Col6a1*<sup>-/-</sup>;*Fbn2*<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen bei Geburt eine dramatische Beeinträchtigung der Bewegungsfunktion der Hinterläufe auf, während *Fbn2*<sup>-/-</sup> Mäuse eine nur geringfügige veränderte Gangart („Watschelgang“) aufwiesen und *Col6a1*<sup>-/-</sup> Mäuse keine phänotypischen Anomalien zeigten. Histologische Analysen der Hinterlaufmuskulatur ergaben eine signifikant erhöhte Anzahl von Muskelzellen mit zentral lokalisierten Zellkernen und verringertem Durchmesser, sowie eine signifikant reduzierte Muskelmasse. Außerdem war die mRNA Expression myogener Regulationsfaktoren (*MyoD*, *Mrf4*) signifikant verändert. Diese Befunde lassen auf eine Verzögerung der Muskelreifung schließen. Durch eine massenspektrometrische Analyse von Muskelextraktionen neugeborener Mäuse wurde das Mikrofibrillen-assoziierte Protein 4 (MFAP4) als ein in seiner EZM Verankerung sowohl von Kollagen VI als auch Fibrillin-2 abhängiges Adaptormolekül im Skelettmuskel identifiziert. Elektronenmikroskopische Analysen von nativ isolierten Mikrofibrillen zeigten, dass MFAP4 innerhalb der Interaktionsstellen zwischen Fibrillin und Kollagen VI Mikrofibrillen lokalisiert. Mittels Bindungsstudien in Lösung konnte nachgewiesen werden, dass mehr rekombinantes Fibrillin-2 mit Kollagen VI Mikrofibrillen in Gegenwart von MFAP4 interagiert. Durch *in vitro* Studien konnte zudem ein positiver Einfluss von MFAP4 auf die BMP-Signaltransduktion identifiziert werden. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass Fibrillin-2 und Kollagen VI mikrofibrilläre Netzwerke gemeinsam eine wichtige balancierende Rolle in der skelettalen Muskelreifung und -homöostase einnehmen.

## 2 Abstract

Tissue microenvironments defined by extracellular matrix networks play an important role in regulating tissue structure and function. Evidence from human disease and biochemical data implicates that collagen VI and fibrillin-2 function in concert to actively regulate tissue integrity and cell fate. *FBN2* mutations in humans cause congenital contractural arachnodactyly a congenital disorder characterized by long bone overgrowth, muscle weakness, and contractures. Patients suffering from collagen VI mutations show similar clinical features to fibrillin-2 patients suggesting similar underlying pathomechanisms.

The aim of this thesis was to investigate whether both extracellular microfibrillar systems physically and functionally interact and to test whether deficiency in one microfibrillar system affects the functions of the other, therefore leading to the overlapping phenotypes in human disease.

Using protein-protein interaction studies in combination with electron microscopy a direct interaction between collagen VI and fibrillin-2 was detected for the first time. Biochemical extraction analysis revealed an altered anchorage of collagen VI chains in fibrillin-2 deficient muscle. In addition, impaired assembly of fibrillin-2 microfibrils could be observed in *Col6a1*<sup>-/-</sup> muscle tissue.

In order to investigate a regulatory function in musculoskeletal homeostasis depending on both networks, a *Col6a1*<sup>-/-</sup>;*Fbn2*<sup>-/-</sup> double knockout mouse line was generated.

*Col6a1*<sup>-/-</sup>;*Fbn2*<sup>-/-</sup> mice displayed a dramatic impairment of hindlimb locomotory function at birth, while *Fbn2*<sup>-/-</sup> mice had only a waddling gait and *Col6a1*<sup>-/-</sup> mice showed no phenotypic anomalies. Histological analysis of hindlimb muscles revealed a significantly higher number of myofibers with centrally placed nuclei and reduced diameter, as well as a significantly reduced muscle mass. In addition, the mRNA expression of myogenic regulatory factors (*MyoD*, *Mrf4*) was significantly altered. These findings suggest a delay in muscle maturation.

Mass-spectrometric analysis of muscle extracts from newborn mice identified microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) as a factor in muscle homeostasis depending on both collagen VI and fibrillin-2 microfibrils. Electron microscopy analysis of natively isolated microfibrils proved that MFAP4 localizes within the interaction interface between fibrillin and collagen VI microfibrils. Binding studies showed that more recombinant fibrillin-2 interacts with collagen VI microfibrils in the presence of MFAP4. In conclusion, the results suggest that the direct interaction of the fibrillin-2 and collagen VI microfibrillar networks is essential to balance skeletal muscle maturation and homeostasis.