

Abstract

AMACO (VWA2 protein) is a basement membrane associated protein that is secreted by epithelial cells in many organs. It is strongly expressed when invagination or budding occurs during development, was found as a molecular signature of hair placodes and is strikingly upregulated in the mid telogen phase of the hair cycle. AMACO is part of the Fraser complex, a group of proteins which when mutated cause the human Fraser syndrome with phenotypes such as cryptophthalmos, syndactyly and other developmental impairments. The core Fraser complex proteins Fras1, Frem1 and Frem2 all localize in a similar way beneath the lamina densa, where they mediate adhesion between the dermal-epidermal basement membrane and the underlying dermis during embryonic development.

Earlier studies using immunogold electron microscopy of adult mouse skin showed limited, clustered AMACO deposition below the lamina densa. Here, the presence of a novel cord-like suprastructure in the dermis of newborns is described to which AMACO, members of the Fraser complex and other associated proteins contribute. Differences in AMACO deposition between newborn and adult mice may be due to altered functions of AMACO at varying stages of development. To unequivocally designate the novel suprastructure, a new term, "anchoring cords", is proposed. The AMACO-containing anchoring cords have a diameter of 60nm, originate from the basement membrane and extend several microns into the dermis. In normal skin they become clearly evident only by the use of gold labelled antibodies in electron microscopy. Careful evaluation of tilt series collected from 300nm thick sections suggests an unlabeled, low density core to the cords. Surprisingly, the cords become visible without labelling when collagen VII is ablated. Direct interaction studies and co-immunoprecipitated skin extracts identified Frem2 as a strong interaction partner of AMACO.

AMACO deficient mice were generated to provide insight into its function. In contrast to Fraser complex deficient mice which display several developmental defects, AMACO deficient mice lack any obvious phenotype. Furthermore, the mutually dependent basement membrane deposition of the Fraser complex proteins was not perturbed in the absence of AMACO. Investigation of the hair follicle development in newborn AMACO deficient mice showed no gross aberration. However, the first anagen phase of the hair cycle showed longer hair follicles in AMACO knockout mice. Further, a possible delay in the transition from the second anagen to the telogen phase was detected. Strikingly, some AMACO deficient newborn mice displayed skin blister formation above the basal epithelial cells within the epidermis. This is in contrast to the subepidermal blisters that occur in Fraser complex deficient mice. The transient, pronounced deposition of AMACO and the Fraser complex proteins especially during development and their assembly into anchoring cords points to a transient function in connecting epidermis and dermis when the tissue is subject to remodelling.

Zusammenfassung

AMACO (VWA2-Protein) ist ein Basalmembran-assoziiertes Protein, das in vielen Organen von Epithelzellen sezerniert wird. Es wird stark exprimiert, wenn es zu Einstülpungen oder Ausknospungen während der Entwicklung kommt, wurde als molekularer Marker der Haarfollikelanlagen beschrieben und ist in der Mitte der Telogenphase des Haarzyklus auffallend hochreguliert. AMACO ist Teil des Fraser-Komplexes, einer Gruppe von Proteinen, die, wenn sie mutiert sind, das menschliche Fraser-Syndrom mit Phänotypen wie Kryptophthalmus, Syndaktylie und andere Entwicklungsstörungen verursachen. Die Hauptproteine des Fraser-Komplexes, Fras1, Frem1 und Frem2, sind alle in ähnlicher Weise unterhalb der Lamina densa lokalisiert, wo sie während der Embryonalentwicklung die Anhaftung der dermal-epidermalen Basalmembran an die darunter liegende Dermis vermitteln.

Frühere Studien zeigten mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie an Haut erwachsener Mäuse begrenzte Anhäufungen von AMACO unterhalb der Lamina densa. In dieser Arbeit wird das Vorhandensein einer neuartigen schnurartigen Suprastruktur in der Dermis von Neugeborenen beschrieben, zu der AMACO, Mitglieder des Fraser-Komplexes und andere assoziierte Proteine beitragen. Unterschiede in der Struktur der AMACO-Ablagerungen zwischen neugeborenen und erwachsenen Mäusen könnten auf eine veränderte Funktion von AMACO in verschiedenen Entwicklungsstadien zurückzuführen sein. Um die neuartige Suprastruktur eindeutig zu bezeichnen, wird der neue Begriff "anchoring cords" (Verankerungsschnüre) vorgeschlagen. Die AMACO-haltigen „anchoring cords“ haben einen Durchmesser von 60 nm, gehen von der Basalmembran aus und reichen mehrere Mikrometer in die Dermis hinein. In normaler Haut werden sie nur durch die Verwendung von goldmarkierten Antikörpern in der Elektronenmikroskopie deutlich sichtbar. Eine sorgfältige Auswertung von einer Serie von Aufnahmen aus verschiedenen Winkeln von 300 nm dicken Schnitten, deutet auf einen unmarkierten, wenig dichten Kern der Schnüre hin. Überraschenderweise werden die Schnüre auch ohne Markierung sichtbar, wenn Kollagen VII fehlt. Direkte Interaktionsstudien und Ko-Immunopräzipitation aus Hautextrakten ergaben, dass Frem2 ein starker Bindungspartner von AMACO ist.

Um einen Einblick in seine Funktion zu erhalten, wurden AMACO-defiziente Mäuse erzeugt. Im Gegensatz zu Mäusen, denen der Fraser-Komplex fehlt und die verschiedene Entwicklungsdefekte aufweisen, zeigen AMACO-defiziente Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp. Außerdem war die voneinander abhängige Ablagerung der Fraser-Komplex-Proteine an der Basalmembran in Abwesenheit von AMACO nicht gestört. Die Untersuchung der Haarfollikelentwicklung bei neugeborenen AMACO-defizienten Mäusen ergab nichts Auffälliges. In der ersten anagenen Phase des Haarzyklus waren die Haarfollikel in AMACO-Knockout-Mäusen jedoch länger. Außerdem wurde eine mögliche Verzögerung des zweiten

Übergangs von der Anagen- zur Telogenphase festgestellt. Auffallend ist, dass einige AMACO-defiziente neugeborene Mäuse Blasen oberhalb der basalen Epithelzellen in der Epidermis ausbildeten. Diese unterscheiden sich von den subepidermalen Blasen, die bei Fraser-Komplex-defizienten Mäusen auftreten. Die vorübergehende, starke Ablagerung von AMACO- und Fraser-Komplex-Proteinen insbesondere während der Entwicklung und ihr Zusammenbau zu „anchoring cords“ deutet auf eine vorübergehende Funktion bei der Verbindung von Epidermis und Dermis hin, wenn das Gewebe einen raschen Umbau durchläuft.