

## **Abstract**

The aim of this study was to use the zebrafish as a model for studying inherited skeletal disease. The focus was on cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and matrilin-3 mutations since mutations in each of these proteins can cause human disease like pseudoachondroplasia (PSACH) and multiple epiphyseal dysplasia (MED). They share many binding partners and also interact with each other (Mann et al., 2004). We generated antibodies specific to zebrafish. Although *in situ* hybridization is useful for studying protein expression in fish, the generation of antibodies is important due to the lack of specific antibodies for fish proteins. CRISPR-Cas9 specific targets were also created to study the proteins (i.e. COMP and matrilin-3a), and a F0 chimera was bred with wild type fish to COMP and matrilin-3a heterozygous mutations, tyrosine controls and the second generation F1 was studied. HSP47a and HSP47b proteins were studied in a collaboration with the University of Pavia (Italy). We also acquired a COMP deficient fish line from the European Zebrafish Resource Center (EZRC) to compare the effects of the absence of the protein with those due to mutant protein. COMP deficient embryos showed several distinct phenotypes, while in COMP-knockout mice no obvious phenotype was evident; this indicates that disease arises not only from mutations in the protein but also from its absence. The fact that severe phenotypes could be observed only early in life indicates that absence or mutation in COMP is lethal in adulthood. We also observed that COMP tissue distribution in wild type zebrafish is different from that in mammals; COMP is present in tendons, interstitial connective tissue and fascia (myosepta), but not in cartilage.

## **Zusammenfassung**

Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Zebrafisch als Modell für das Studium erblicher Skeletterkrankungen zu verwenden. Der Fokus lag auf "cartilage oligomeric matrix protein" (COMP) und Matrilin-3a, da Mutationen in den für die Proteine kodierenden Genen beim Menschen z. B. zu Pseudoachondrodysplasie (PSACH) oder Multipler epiphysärer Dysplasie (MED) führen können. COMP und Matrilin-3 haben viele gemeinsame Bindungspartner und interagieren auch miteinander (Mann et al., 2004). Es wurden spezifische Antikörper gegen die Zebrafischproteine produziert. Obwohl auch *in situ* Hybridisierung für das Studium der Gewebeverteilung in Zebrafischen genutzt werden kann, ist die Erzeugung von Zebrafisch-spezifischen Antikörpern aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper gegen Zebrafischproteine nützlich. Zielsequenzen für eine Editierung der COMP, Matrilin-3a und Tyrosinase Gene (als Kontrolle) mittels der CRISPR-Cas9 Methode wurden bestimmt und die Gene editiert. F0 Chimäre wurden mit Wildtyp Zebrafischen gekreuzt und in der F1 Generation heterozygote Mutationen in den COMP und Matrilin-3a Genen nachgewiesen. HSP47a und HSP47b Proteine wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Pavia, Italien untersucht. Es wurde ebenfalls ein vom europäischen Zebrafish Resource Center (EZRC) erzeugter COMP Knockout untersucht, um die Auswirkungen eines fehlenden Proteins mit denen eines mutierten

Proteins zu vergleichen. COMP-defiziente Zebrafischembryos zeigten mehrere verschiedene Phänotypen, während bei COMP-Knockout-Mäusen kein offensichtlicher Phänotyp vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass Erkrankungen nicht nur durch Veränderungen der Proteinsequenz, sondern auch durch den Verlust des Proteins entstehen. Die Tatsache, dass schwere Phänotypen nur sehr früh in der Entwicklung beobachtet werden konnten, deutet darauf hin, dass die Abwesenheit von COMP oder Mutationen bis zum Erwachsenenalter zu Tode führen. Es wurde auch gezeigt, dass die Gewebeverteilung von COMP im Wildtyp-Zebrafisch sich von der in Säugetieren unterscheidet; COMP ist in Sehnen, interstitiellem Bindegewebe und Faszien (Myosepta), aber nicht im Knorpel vorhanden.