

ZUSAMMENFASSUNG

AMACO und Kollagen XXVIII sind zwei erst kürzlich entdeckte extrazelluläre Matrixproteine, die beide zur von Willebrand Faktor A (VWA)-ähnliche Domänen enthaltenden Proteinsuperfamilie gehören. Während für Kollagen XXVIII die Lokalisation in der Basalmembran spezieller Nervenfasern bekannt war, war für AMACO nur die grobe Gewebeverteilung bestimmt worden. Die Funktion der Proteine war unbekannt.

In dieser Arbeit konnte AMACO spezifisch in der Haut und der Niere detektiert werden. Die Lokalisation in der Haut zeigte eine regelmäßige Ablegung von AMACO in der *Sublamina densa*, die gut mit den Eintrittspunkten der Kollagen VII-haltigen Verankerungsfibrillen in die Basalmembran korrelierte, AMACO könnte daher eine Funktion in der dermal-epidermalen Verknüpfung haben. In der Niere neugeborener Mäuse assoziiert AMACO mit den Basalmembranen der *Macula densa*, des Sammelrohrs und Abschnitten des distalen Tubulus. Interessanterweise konnte AMACO auch an spezifischen Basalmembranen des Pronephros (der embryonalen Niere) des Zebrafischs detektiert werden. Obwohl der AMACO-*Knockdown* im Zebrafisch keine typischen Nierenphänotypen zeigte, ist die konservierte Expression in den verschiedenen Nierentypen ein starkes Indiz für eine funktionelle Rolle von AMACO in der Niere.

Murines AMACO vermittelt Zelladhäsion über β 1-Integrine mittels eines C-terminalen RGD-Motivs. Dieses Sequenzmotiv ist in allen untersuchten Spezies (u. a. auch dem Schimpansen), mit Ausnahme des Menschen, gut konserviert. AMACO gehört zu den wenigen Proteinen im menschlichen Genom, die die spezifischen Konsensussequenzen für die seltene, funktionell bedeutsame O-Fucosylierung und O-Glucosylierung auf derselben EGF-ähnlichen Domäne tragen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Glykane auf AMACO in ihrer vollen Länge vorkommen. Hiermit gelang erstmalig der Nachweis, dass beide Glykane auf derselben EGF-ähnlichen Domäne unabhängig voneinander um weitere Zuckerreste verlängert werden können. Weiterhin ist AMACO das erste extrazelluläre Matrixprotein, für das diese Art der Glykosylierung experimentell nachgewiesen werden konnte.

Die Funktion von Kollagen XXVIII wurde im Zebrafisch untersucht. Die Expression von Kollagen XXVIII ist am stärksten in der Embryonalentwicklung zwischen 20 und 48 Stunden

und fehlt im adulten Zebrafisch. Mittels eines spezifischen Antikörpers konnte das Protein unter der Haut und um das Neuralrohr detektiert werden.

Die Analyse der Kollagen XXVIII-*Knockdown* Zebrafische zeigte eine abgerundete Somitenform sowie einen starken Defekt in der Entwicklung des Kopfskeletts. Obwohl abgerundete Somiten im Allgemeinen auf einen Defekt der langsamen Muskulatur hinweisen, war die Migration der langsamen Muskelfasern nicht gestört. Die Struktur der langsamen Muskulatur wirkte allerdings leicht verändert. Obwohl die Kollagen XXVIII-*Knockdown* Zebrafische Defekte in der Knorpelentwicklung aufwiesen, konnte Kollagen XXVIII nicht im Knorpel von Wildtypfischen nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Rolle von Kollagen XXVIII in Entwicklungsprozessen hin, die zur Knorpelentwicklung führen. Im Kopfskelett waren vor allem die Kiemenbögen, welche ausschließlich von Neuralleistenzellen gebildet werden, weniger jedoch das Neurokranium durch die Defekte betroffen.

Die beobachteten Defekte der Morphants sowie die Lokalisation von Kollagen XXVIII an den Migrationswegen der Neuralleistenzellen weisen daher auf eine mögliche Rolle von Kollagen XXVIII im Zebrafisch bei der Migration der Neuralleistenzellen hin.

ABSTRACT

AMACO and collagen XXVIII are two recently discovered extracellular matrix proteins, belonging to the superfamily of von Willebrand Factor A (VWA) domain containing proteins. While earlier studies localised collagen XXVIII to specific basement membranes of the sciatic nerve in mice, the tissue distribution of AMACO was only superficially characterised.

In this study the expression of AMACO was studied in the murine kidney and skin. In skin AMACO showed a regular deposition below the basement membrane (*sublamina densa*), which correlates nicely with the entry points of the collagen VII-containing anchoring fibrils in the *lamina densa*. This indicates that AMACO might play a role at the dermal-epidermal junction. In kidneys of newborn mice, AMACO was associated with certain basement membranes of the distal tubule, the *macula densa* and the collecting duct. Interestingly, in zebrafish AMACO is also deposited in the basement membrane of the pronephros (the embryonic kidney). Although AMACO morphants do not exhibit typical kidney phenotypes, the conserved deposition in different kidney types indicates a role of AMACO in the kidney.

Murine AMACO mediates cell attachment via an RGD-motif at its C-terminus. This motif is well conserved in all investigated species (even in the chimpanzee) but not in human. AMACO is one of the few proteins in the human genome, which contains specific consensus sequences for the rare and functionally important O-fucosylation and O-glucosylation on a single EGF-like domain. It was shown for the first time that both glycosylations can be elongated independently on the same EGF-like domain. Furthermore, AMACO is the first extracellular protein, which is experimentally shown to be modified with these kinds of glycans.

The function of collagen XXVIII was analysed in the zebrafish. Collagen XXVIII is highest expressed between 20-48 hours of development but is absent in adult zebrafish. The protein is localised below the dermis and adjacent to the neural tube by a specific antibody.

Collagen XXVIII knockdowns are characterised by severe morphological changes like rounded somites and a strong defect in head cartilage development. Normally, rounded somites are indicative for defects in slow muscle fiber formation. The developmentally important migration of slow muscle fibers was not affected; however, the structure appeared slightly altered. Although cartilage formation was strongly affected in morphants, collagen XXVIII was not detected in developing cartilage of wildtype zebrafish, indicating a role of

collagen XXVIII in earlier processes leading to cartilage formation. The cartilage defects were more pronounced in the exclusively neural crest derived arches than in the neurocranium.

The defects in the collagen XXVIII morphants and the localisation of the protein at the migration pathways of neural crest cells both suggest a function of collagen XXVIII in neural crest cell migration.