

**Contribution of extracellular matrix to embryonic fin development
and
Cutaneous wound closure in adult zebrafish**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Dipl. Biol. Reza Thomas Ramezani

aus Hürth

Köln, 2012

Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt

Prof. Dr. Wilhelm Bloch

Tag der mündlichen Prüfung:

21.05.12

Summary

I Contribution of extracellular matrix to embryonic fin development

The dermal-epidermal basement membrane (BM), a highly specialized, sheet-like extracellular matrix (ECM), provides a stabilizing interface by separating the epidermis from the dermis. The components ubiquitously found in BMs and needed for BM formation are Collagen IV, laminins, nidogens and Perlecan. Collagen IV and laminin form independent networks that are cross-linked by nidogens and Perlecan to provide strength and further connections. Two types of nidogens have been found so far in vertebrates, Nidogen 1 and 2. Recent studies have shown that Nidogen 2 also binds to Fibulin 6, another ECM component, and it has been suggested that Fibulin 6 competes with laminin for NID2 binding.

Here, the role of zebrafish nidogens during the embryonic development of the fin fold was examined. Four genes were identified to encode nidogens, namely *nid1a*, *nid1b*, *nid2a* and *nid2b*. The expression profile and the protein localisation in the fin fold epidermis, as well as morpholino oligonucleotide based knockdown experiments, assign a role for Nid2a in fin fold formation. The knockdown of *nid2a* results in fin dysmorphogenesis and mild fin blistering. Furthermore, the synergistic genetic interaction of *hemicentin 1* (*hmcn1*), the ortholog of *fibulin 6*, and *nid2a* in the formation of the fin fold suggests that the recent discovery of the direct biochemical interaction of the murine orthologs may also occur in zebrafish, and allows localisation and interaction studies of Nid2a and Hmcn1 within the BM zone *in vivo*.

Linkage analysis and positional cloning revealed that the fin blistering mutant *2A102* exhibits a new allele of *two of hearts* (*toh*). *toh* is a mutant in a multipass transmembrane transporter of spingolipids and resembles the phenotype of *miles apart* (*mil*), which is a mutant in the Sphingosine-1-phosphate receptor 2. Here, it was shown that the second *fibronectin* (*fn*) gene, *fn1b*, is a valid candidate to explain the fin phenotypes of *mil* and *toh*. *fn1b* was shown to be up-regulated in both mutants, although its protein level is strongly reduced, which might reflect the complex interplay and

crosstalk between the ECM and intracellular components. Additionally, two other ECM proteins, Hmcn2 and Collagen II, were identified to be lost in *toh* and *mil* mutants. Finally, a more detailed model for the maintenance of the early embryonic fin fold formation is proposed, in which the initial time point of fin fold outgrowth is pivotal for the further morphogenesis, and the maintenance of the fin fold structure already during lifting from the mesodem.

II Cutaneous wound closure in adult zebrafish

The adult zebrafish skin is composed of three compartments, the epidermis, dermis and hypodermis, and in contrast to adult mammalian skin, its pluristratified epidermis only consists of living cells. The skin exhibits a protective barrier against the environment and loss of its integrity, caused by wounding, therefore must be rapidly repaired. To date, reports of cutaneous wound healing in the adult zebrafish, *Danio rerio* are not available. The majority of reports concerning adult wound healing in fish used different fish species and were either performed in areas without scales, like the head, by complete removal of large areas of scales, the use of scale-less fish, or by the use of cell culture systems. In contrast to adult mammals, adult fish close their wounds rapidly by re-epithelialization and this process was suggested to depend on a leapfrog, or sliding mechanism.

Here, an adult wound closure assay was established, which preserves the scale-skin architecture, and was used in an adult ENU and insertional mutagenesis screen to identify mutants with impaired wound closure. By establishing and performing live imaging, the fast re-epithelialization of adult fish wounds could also be confirmed for the zebrafish. Moreover, the highly dynamic process of adult wound coverage in fish was observed for the first time *in vivo* by time lapse live imaging, which gave new insights into the highly dynamic and complex migration events of collective tissues. Based on the live imaging and scanning electron microscopy observation made here, and the current knowledge of collective cell migration, a hypothetical model of the wound closure process in adult zebrafish can be proposed. Due to the causative loss of polarization by wounding, the cells within the tissue pass the accompanied intracellular stress mechanically via the cytoskeleton and polarity components. The re-establishment of polarization, which happens through a change of shape, results in a linear stress submission in the tissue. Thereby, the cell shape changes of single cells are efficient enough to collectively drive the closure process.

Wounding the fish at the trunk, by retaining their natural skin-scale architecture, gives new insights into the re-epithelialization potential of single cells in a collective tissue and further suggests and addresses a major role of single cells to the underlying driving forces of wound closure in adult zebrafish, and presumably also to embryonic and adult invertebrate wound closure. Therefore, the adult zebrafish wound closure appears to be

an attractive model for the study of collective cell migration *in vivo* and will allow further investigations to understand the mechanisms that underlie the rapid wound closure in adult fish and invertebrates, as well as in embryos.

Zusammenfassung

I Beteiligung der extrazellulären Matrix an embryonaler Flossenentwicklung

Die dermal-epidermale Basalmembran (BM), eine hochspezialisierte extrazelluläre Matrix (EZM), stellt eine stabilisierende Verbindung zwischen der Epidermis und der Dermis dar. Collagen IV, Laminine, Nidogene und Perlecan sind die ubiquitären Komponenten, die in BM zu finden sind. Collagen IV und Laminin formen unabhängig voneinander Netzwerke, die miteinander durch Perlecan und Nidogene verbunden sind und zu weiteren Komponenten verknüpft werden. Bis jetzt wurden zwei Nidogene in Vertebraten identifiziert, Nidogen 1 und 2. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Nidogen 2 mittels seiner G3 Domäne Fibulin 6 bindet, wobei spekuliert wird, dass die Bindung von Fibulin 6 zu Nidogen 2 mit der Bindung zu Laminin konkurriert.

In dieser Studie wurde die Rolle der Nidogene während der embryonalen Flossenentwicklung untersucht. Es konnten vier Gene im Zebrafisch-Genom identifiziert werden, die Nidogene kodieren, *nid1a*, *nid1b*, *nid2a* und *nid2b*. Die Expression und Proteinlokalisierung, sowie der Morpholino knockdown, verdeutlichten die Beteiligung von Nid2a an der Flossenentwicklung. Der knockdown von *nid2a* resultiert in Mismorphogenese der Flossen und Blasenbildung. Die synergistische genetische Interaktion von *hemicentin 1* (*hmcn1*), dem *fibulin 6* Ortholog, und *nid2a* bei der Entwicklung der Flosse, führt zu der Annahme, dass die direkte biochemische Interaktion der Mausorthoge auch *in vivo* für den Zebrafisch zutrifft und verdeutlicht die mögliche Lokalisation von Nid2a und Hmcn1 im Bereich der BM.

Kopplungsanalyse und positionelles Klonieren enthüllte, dass die Flossenmutante *2A102* ein neues Allel von *two of hearts* (*toh*) darstellt. *toh* ist eine Mutante für einen multipass Transmembrantransporter für Sphingolipide und spiegelt den Phänotyp einer Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2 Mutante namens *miles-apart* (*mil*) wieder. Hier konnte gezeigt werden, dass das zweite *fibronectin* (*fn*) Gen, *fn1b*, ein guter Kandidat ist, um die Flossenphänotypen der beiden Mutanten *toh* und *mil* zu erklären. Es konnte

gezeigt werden, dass die Genaktivität von *fn1b* in beiden Mutanten überreguliert ist, obwohl das Proteinlevel stark reduziert ist, was wahrscheinlich einem komplexen Zusammenspiel und Kommunikation von EZM und intrazellulären Komponenten zugrunde liegt. Darüber hinaus konnte der Verlust von Hmcn2 und Collagen II in *toh* und *mil* Mutanten nachgewiesen werden. Basierend auf dem aktuellen Wissen und den hier gemachten Beobachtungen, kann ein detaillierteres Modell der frühen embryonalen Flossenentwicklung vorgeschlagen werden, in dem der initiale Zeitpunkt der Flossenentwicklung essentiell für die spätere Morphogenese ist, und mehr noch, bereits für die Erhaltung der Flossenstruktur während des Abhebens vom Mesoderm entscheidend ist.

II Kutaner Wundverschluss im adulten Zebrafisch

Die adulte Zebrafisch Haut besteht aus drei Bereichen, der Epidermis, der Dermis und der Hypodermis, und im Vergleich zu adulter Säugetierhaut, besteht die mehrschichtige Epidermis von Zebrafischen nur aus lebenden Zellen. Die Haut stellt eine schützende Barriere gegenüber der Umwelt dar, die bei einem Integritätsverlust schnellstmöglich wiederhergestellt werden muss. Bis zum heutigen Tag sind keine Studien betreffend kutaner Wundheilung im adulten Zebrafisch, *Danio rerio*, zu finden. Der Hauptteil der Arbeiten, die adulte Wundheilung im Fisch betreffen, wurden mit anderen Fischarten in Regionen ohne Schuppen, wie dem Kopf, durch die Entfernung großer Schuppenregionen, mit schuppenlosen Fischen, oder durch die Verwendung von Zellkulturen durchgeführt. Anders als in adulten Säugern, erfolgt der Prozess des Wundverschlusses in adulten Fischen durch eine sehr schnelle Re-Epithelialisierung und es wird angenommen, dass dies auf einem Bocksprung Mechanismus oder Gleitmodell beruht.

In dieser Studie wurde eine adulte Wundverschluss-Untersuchung etabliert, die die normale Schuppenstruktur der Haut unverändert lässt und auf einen adulten ENU und insertional basierte Mutagenese-Durchmusterung angewendet, um Mutanten mit beeinträchtigtem Wundverschluss zu identifizieren. Die Etablierung und Durchführung einer Methode zur Dokumentation von Live-Beobachtungen am adulten Zebrafischen konnte zeigen, dass die schnelle Re-Epithelialisierung auch im Zebrafisch geschieht. Mehr noch, es konnten zum ersten Mal die hoch dynamischen Prozesse des Wundverschlusses *in vivo*, im adulten Fisch, beobachtet werden, dies ermöglichte neue Einblicke in die hoch dynamischen und komplexen Vorgänge während der kollektiven Migration von Geweben. Basierend auf den hier gemachten Live- und Rasterelektronenmikroskopie-Beobachtungen und dem gegenwärtigen Wissen über kollektive Zellmigration, kann ein hypothetisches Modell für den Prozess des adulten Wundverschlusses im Zebrafisch postuliert werden. Dabei ist der Verlust von Polarisation, der aus der Verwundung resultiert, der Auslöser für intrazellulären Stress der, von einer Zelle zur Anderen über das Cytoskelett und Komponenten des Polaritäts-Stoffwechselwegs, mechanisch weitergegeben wird. Die Wiedererlangung von Polarität wird von den Zellen durch Veränderungen ihrer Form herbeigeführt, was zu einer

linearen Stress-Übermittlung im Gewebe führt. Hierbei sind die Zellformveränderungen einer einzelnen Zelle effizient genug um kollektiv den Wundverschluss anzutreiben.

Das Verwunden der Fische am Rumpf, bei Erhaltung der Schuppenstruktur, gibt neue Einblicke in das Re-Epithelialisierungspotential einzelner Zellen in einem Kollektiven Gewebe, und führt darüber hinaus zu der Annahme, dass die Hauptrolle der zugrunde liegenden Kräfte von einzelnen Zellen bereit gestellt werden, und dass dies vermutlich auch auf adulte Invertebraten und embryonale Wundheilung bezogen werden kann. Der adulte Zebrafisch-Wundverschluss stellt somit ein attraktives Modell für kollektive Zellmigrationsstudien *in vivo* dar, und wird zukünftigen Nachforschungen erlauben die Mechanismen zu verstehen, die dem schnellen Wundverschluss in adulten Fischen und Invertebraten, sowie Embryonen zu Grunde liegen.