

Abstract

Abstract

The extracellular matrix protein netrin-4 belongs to the netrin family, which currently consists of five members (netrin-1, -3, -4, -G1, and -G2). Although the netrin family in general shows similarities to the N-terminal domains of the laminin γ chain, netrin-4 appears to be unique because it is more related to the β chain of laminin. Netrin-4 is localized within the basement membrane of specific tissues, such as the lung, kidney, spleen, mammary gland, and cerebellum. Netrin-1 and netrin-4 were originally discovered as an axonal guidance cue. Current research determined that netrin-4 also plays a role outside the nervous system; however, the mechanism underlying netrin-4 activity remains unknown.

This study elucidated a mechanism underlying the physiological role and the anti-angiogenic activity of netrin-4 using a *netrin-4*-knockout mouse model, biochemical experiments, structure guided mutants, and various angiogenesis assays. The current work demonstrates that netrin-4 is required for the formation of the lamina rara in the lung by connecting the extracellular matrix through laminin with the cell surface. In addition, *netrin-4*-deficiency impairs the barrier function of the pulmonary basement membrane resulting in increased lung metastases. Molecular and physiological data from this study clearly demonstrate that netrin-4 is necessary for proper laminin organization, positioning, and barrier function. Furthermore, netrin-4 possesses anti-angiogenic activity that is highlighted by reduced melanoma tumor growth, reduced lung metastases, and increased overall survival. Using different Net4 mutants that have impaired laminin γ 1 binding, the laminin γ 1 chain was determined to be responsible for netrin-4 activity on *in vitro* angiogenesis and *in vivo* tumor growth. The anti-angiogenic activity of netrin-4 is mediated via laminin γ 1 leading to the disintegration of the laminin complex inside the vascular basement membrane by replacing laminin β 1 chain and displacing laminin α of the laminin heterotrimer. Disintegration of the laminin network results in disruption of the vascular basement membrane, detachment of perivascular cells from the endothelium, and destabilization of the capillary network. These results provide new insights into the mechanism of netrin-4 anti-angiogenic activity mediated by its binding to the laminin γ 1 chain, which leads to decomposition of the vascular basement membrane. Moreover, this study explores the importance of the laminin network for perivascular stabilization of the capillary network.

Zusammenfassung

Zusammenfassung

Das extrazelluläre Matrix Protein Netrin-4 ist ein Mitglied der Netrin Familie zu der momentan 5 Mitglieder (Netrin-1, -3, -4, -G1 und -G2) gehören. Netrin-4 wird in der Basalmembran von speziellen Geweben wie der Lunge, Niere, Milz, Brustdrüse und dem Cerebellum gefunden. Die Netrine zeigen hohe Homologie zu den N-terminalen Domänen der Laminin Isoformen, wobei Netrin-4 als einziges Netrin homolog zur β Kurzarmkette anstatt γ ist. Netrin-1 und Netrin-4 wurden ursprünglich als axonale Wegfindungsproteine identifiziert. In der Literatur wurde gezeigt, dass Netrin-4 auch ausserhalb des Nervensystems eine Funktion aufweist. Doch der Mechanismus über den Netrin-4 diese Effekte vermittelt ist immer noch unbekannt.

Im Zuge dieser Arbeit konnte die physiologische Relevanz wie auch der Mechanismus der von Netrin-4 vermittelten anti-angiogenetischen Aktivität bestimmt werden. Hierfür wurde einerseits die *Netrin-4* defiziente Maus in Hinsicht auf Morphologie der Basalmembran untersucht, wie auch Netrin-4 Laminin Bindungsmutanten generiert mit denen biochemische Analysen und unterschiedliche Angiogenese Experimente durchgeführt wurden. Diese Studie belegt die essentielle Rolle von Netrin-4 für die Architektur der Basalmembran in Netrin-4 positiven Geweben wie der Lunge und der Niere, da in Netrin-4 defizienten Tieren diese Gewebe keine lamina rara mehr aufweisen. Zudem führt die Abwesenheit von Netrin-4 zu einer verminderten Barrierefunktion der Basalmembran, da in der Lunge mehr Metastasen und im Urin höhere Proteinmengen zu finden sind. Zusätzlich zur physiologischen Rolle, wirken hohe Konzentrationen von Netrin-4 über einen heterodimeren Komplex mit seinem bekannten Bindungspartner laminin $\gamma 1$ anti-angiogenetisch. Dieser Komplex verhindert und destabilisiert die Interaktion der drei Lamininketten $\alpha/\beta 1/\gamma 1$ verschiedener Laminin Heterotrimere und unterbindet so die Ausbildung des Laminin Netzwerkes, was in der Auflösung der vaskulären Basalmembran resultiert. Diese Auflösung führt zu der Loslösung perivaskulärer Zellen vom Endothelium und letztendlich zu einer Destabilisierung des kapillären Netzwerkes. Zudem konnte mit Hilfe eines Melanom Tumormodells die therapeutische Wirkung von Netrin-4 bestimmt werden mit dem Resultat, dass bei Gabe von Netrin-4 eine Reduktion von 50% des Tumorumens erzielt wurde. Desweiteren hat dieser Therapieansatz die Bildung von Metastasen verhindert und zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate in den Netrin-4 behandelten Gruppen geführt.