

1. Zusammenfassung

Nidogen-1 und -2 sind ubiquitäre Basalmembran-Komponenten, denen eine Schlüsselrolle in der Basalmembranbildung zugeordnet wurde. Dennoch zeigten Mäuse, die für beide Nidogene defizient sind, oder denen das hoch affine Nidogen-Bindungsmodul (III4) auf der Laminin γ 1 Kette fehlt, Basalmembran-Defekte und Gewebeabnormalitäten nur in einigen, wenn gleich nicht identischen Organen. Alle diese Tiere sterben kurz nach der Geburt. Eine neue, hier verwendete Mauslinie, der die Nidogen-Bindungsaktivität fehlt (γ 1N802S $^{-/-}$), ist im Gegensatz zu den γ 1III4 $^{-/-}$ Mäusen fertil und zeigt keine offensichtlichen Basalmembran-Defekte. Diese Mäuse zeigen, wie auch die γ 1III4 $^{-/-}$ Mäuse, eine reduzierte Nidogen-1 Proteinmenge, während die Nidogen-2 Menge unverändert ist. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass Nidogen-1 und -2 verschiedene Laminin-Bindungsstellen oder unterschiedliche Bindungspartner besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Möglichkeit einer weiteren Laminin-Bindungsstelle und zum anderen die Möglichkeit neuer Bindungspartner für Nidogen-2 untersucht. Immunpräzipitationen mit Nidogen-2 und Laminin γ 1-Antikörpern zeigten, dass es für Nidogen-2 eine alternative Laminin-Bindungsstelle geben könnte. Mit Massenspektrometrie-Analysen (LC-MS/MS) der präzipitierten Proteine konnte gleichzeitig Perlecan als wahrscheinlich alternativer Bindungspartner für Nidogen-2 identifiziert werden. Um die Rolle der verschiedenen Nidogen-Bindungsdomänen bei der Basalmembranbildung zu untersuchen, wurden Hautorganotypische Kulturen mit Nidogen defizienten Fibroblasten verwendet und diesen die verschiedenen rekombinant hergestellten Nidogendomänen zugesetzt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Nidogen-1 die G2 und G3 Domäne zur Basalmembranbildung benötigt, während Nidogen-2 dies nur über die rod-G3 Domäne ermöglicht. Um Einblick in den Einfluss beider Nidogene auf die Hautreifung zu erhalten, wurde ein Mausstamm mit Hautspezifischer Deletion von Nidogen-1 in einem Nidogen-2 defizienten Hintergrund ($NID1fj^{-/-} // NID2^{-/-} // COL1A2-Cre^{ERT}$) generiert. Trotz effizienter Deletion des Nidogen-1 in Fibroblasten kam es nach zusätzlicher Deletion von Nidogen-2 zu einer Zunahme der Nidogen-1 Proteinmenge und einer vermehrten Ablagerung in der dermo-epidermalen Basalmembran im Vergleich zu $NID1fj^{-/-} // COL1A2-Cre^{ERT}$ positiven Tieren. Dies deutet auf eine Stabilisierung von Nidogen-1 durch den Verlust von Nidogen-2 hin. Zusammenfassend haben diese Untersuchungen ein unterschiedliches Bindungsverhalten beider Nidogenisoformen gezeigt.

Ob dies der Grund für die isoformspezifischen Funktionen beider Nidogene ist, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Abstract

Nidogen-1 and -2 are ubiquitous basement membrane components which are considered to play a key role in basement membrane assembly. However, mice lacking both nidogens, or the high affinity nidogen binding module (III4) on the laminin γ 1 chain, showed basement membrane defects and tissue abnormalities only in certain, albeit not identical, organs. All of these animals die shortly after birth. A new mouse line used here which lacks nidogen binding activity (γ 1N802S^{-/-}) in contrast to the γ 1III4^{-/-} mice, is fertile and shows no obvious basement membrane defects. These mice show, as well as γ 1III4^{-/-} mice, reduced nidogen-1 protein levels while the amount of nidogen-2 is unaltered. That data suggests different laminin binding sites or different binding partners for nidogen-1 and -2. During this study we analyzed, on the one hand the possibility of another laminin binding site and, on the other hand, the possibility of new binding partners for nidogen-2. Immunoprecipitation with nidogen-2 and laminin γ 1 antibody showed that an alternative laminin binding site for nidogen-2 could exist. With mass spectrometry analysis (LC-MS/MS) of the precipitated proteins we also identified perlecan as a probable alternative binding partner for nidogen-2. To investigate the role of different nidogen binding domains in basement membrane assembly, skin-organotypic cultures with nidogen deficient fibroblasts supplemented with the different recombinant nidogen domains were used. This showed that for nidogen-1, G2 and G3 domains are needed for basement membrane formation, while nidogen-2 only needs the rod-G3 domain. To get more insight into the influence of both nidogens on skin maturation a mouse strain with a skin specific deletion of nidogen-1 in a nidogen-2 deficient background ($NID1f|/-//NID2-/-//COL1A2-Cre^{ERT}$) was generated. Despite the efficient deletion of nidogen-1 in fibroblasts, the additional deletion of nidogen-2 results in an increase in nidogen-1 protein levels and an increased deposition in the dermo-epidermal basement membrane compared to $NID1f|/-//COL1A2-Cre^{ERT}$ positive animals. This indicates a stabilization of the nidogen-1 protein by the loss of nidogen-2. In summary, these studies have shown a different binding behavior of both nidogen isoforms. If this is the reason for the isoform specific functions of both nidogens must be clarified in further studies.