

**Funktionale Charakterisierung von Nidogen
anhand gewebespezifischer Entwicklungsvorgänge**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Kerstin Böse

aus Bad Cannstatt

Köln, September 2005

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im Institut für Biochemie II (Direktor: Prof. Dr. Mats Paulsson) angefertigt.



Berichterstatter: Prof. Dr. Mats Paulsson
Prof. Dr. Siegfried Roth

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Helmut W. Klein

Tag der Disputation: 29. November 2005

Abstract

Basement membranes are highly specific sheets of the extracellular matrix that play essential roles during development and later tissue maintenance. Nidogens are ubiquitous basement membrane glycoproteins consisting of two isoforms. They have been suggested to play a crucial role in the assembly of basement membranes, in particular in building up ternary complexes between the main components, the network forming laminins and collagen type IV as well as perlecan. Since mice lacking both nidogen isoforms synthesize basement membranes and undergo complete embryonic development this model needs to be modified.

The aim of this study was to investigate the role of nidogens in diverse developmental mechanisms. Nidogen 1/2-deficient mice develop a fully penetrant soft tissue syndactyly in fore- as well as hindlimbs. The data presented here show that the basement membrane underneath the distal ectoderm gets disrupted during the establishment of the apical ectodermal ridge (AER), a specialised signalling centre. Although the basement membrane is restored as the limb buds grow out, mesenchymal cells protrude through the defect barrier and establish an ectopic cell layer on the distal surface of the autopod. This rupture of compartmentalisation is accompanied by a decrease in expression of the apoptotic signaling molecules *Bmp2* and *Bmp7* and subsequent syndactyly. Beside this structural defect a minority of nidogen 1/2-deficient mice show hypoplasia of anterior skeletal elements along the entire proximodistal axis, a phenocopy of AER-specific *Fgf8*-disruption. Deficiency of both nidogen isoforms results in anterior truncation, less compaction and splitting of the *Fgf8*-expression domain, the AER. Furthermore, the loss of basement membrane integrity leads to a diffusion of FGF8-protein into the underlying mesenchyme and likely alters its signalling capabilities.

In order to verify the via blocking experiments predicted role of nidogens during epithelial morphogenesis, development of the submandibular gland was investigated. While newborn nidogen 1/2-deficient mice show only a slight reduction in epithelial branches, the culture of embryonic explants revealed a strong defect in branching morphogenesis. Consistent with this defect Nidogen 1/2-deficient explants do not assemble any subepithelial basement membrane. Transgenic mice secreting the nidogen-binding-site in mammary gland epithelial cells have been generated to investigate the importance of the interaction between nidogen and laminin during epithelial morphogenesis. Low expression of the transgene hampered the attempts to answer this question.

The new findings presented in this thesis demonstrate the tissue-specific necessity of nidogens during organogenesis. This still leaves the possibility that nidogens do not exclusively act by maintaining structural stability but also by establishing an environment for proper signalling.

Zusammenfassung

Basalmembranen sind dünne Schichten der Extrazellulären Matrix und spielen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus eine zentrale Rolle. Das in Vertebraten durch zwei Isoformen repräsentierte Nidogen stellt eine ubiquitäre Komponente der Basalmembranen dar. Aufgrund der *in vitro* nachgewiesenen Interaktionen mit den beiden Netzwerke-ausbildenden Molekülen Laminin und Kollagen IV, sowie dem Heparansulfat-Proteoglycan Perlecan wurde Nidogen eine integrative Funktion bei der Assemblierung von Basalmembranen zugesprochen. Die Etablierung von Nidogen-defizienten Mauslinien demonstrierte jedoch, dass Nidogen *in vivo* nicht generell für die Assemblierung von Basalmembranen notwendig ist. Trotz dieser überraschenden Tatsache sind Nidogen 1/2-defiziente Mäuse nicht lebensfähig und bilden gewebespezifische Defekte aus, wie z.B. Syndaktylie der Vorder- als auch Hinterextremitäten.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Funktion von Nidogen in spezifischen Entwicklungsmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass in Nidogen 1/2-defizienten Gliedmaßen die Basalmembran mit Ausbildung der Apikalen Ektodermalen Randleiste (AER) im distalen Bereich der Extremitätenknospe ihre Integrität verliert. Trotz Aufbau einer morphologisch intakten Basalmembran in späteren Entwicklungsstadien führt die lokale Auflösung der epitheliomesenchymalen Kompartimentgrenze zur Ausbildung einer ektopischen mesenchymalen Zellschicht im distalen Bereich der Autopodien. Diese strukturellen Veränderungen gehen mit einer reduzierten Expression der Apoptose-vermittelnden Moleküle *Bmp2* und *Bmp7* einher, der vermuteten Ursache der Syndaktylie. Nidogen 1/2-defiziente Extremitäten zeigen außerdem mit geringer Penetranz einen Verlust anteriorer Skelettelemente entlang der gesamten proximodistalen Achse, eine Phänokopie der AER-spezifischen *Fgf8*-Defizienz. Tatsächlich konnten in den Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen sowohl morphologische als auch funktionelle Veränderungen in der AER, der Expressionsdomäne von *Fgf8*, nachgewiesen werden. Neben einer anterior verkürzten, weniger kompakt ausgebildeten und medial unterbrochenen AER, führt die defekte Barriere zu einer erleichterten Diffusion des FGF8-Proteins in das Mesenchym und mutmaßlich zu einer Veränderung der Signaltransduktion.

Anhand der Entwicklung der Unterkieferspeicheldrüse wurde die Auswirkung der Nidogen 1/2-Defizienz auf die epitheliale Verzweigungsmorphogenese untersucht. Während der Phänotyp *in vivo* begrenzt ist, konnte in einem *ex vivo*-System die anhand von

Blockierungsexperimenten vermutete Funktion von Nidogen bei der Speicheldrüsenmorphogenese bestätigt werden. Dabei korreliert die Reduktion epithelialer Verzweigung mit dem Verlust der Assemblierung von subepithelialen Basalmembranen in Nidogen 1/2-defizienten Explantaten. Inwiefern die hochaffine Interaktion von Nidogen und Laminin bei der epithelialen Morphogenese essentiell ist, sollte mit Hilfe eines Mausmodells untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten transgenen Linien, die ein mit der Bindung von Nidogen an Laminin konkurrierendes Peptid spezifisch in den sich ebenfalls über Verzweigungsmorphogenese entwickelnden Milchdrüsenepithelien sezernieren, konnten aufgrund von zu schwacher Expression nicht zur Klärung dieser Frage beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Basalmembranen in Nidogen 1/2-defizienten Mäusen nicht alle gewebespezifischen Ansprüche während der Organogenese erfüllen. Dabei vermittelt Nidogen nicht nur die mechanische Stabilität der Basalmembran sondern nimmt auch Einfluss auf die Signalwirkung im angrenzenden Gewebe.

| | |
|--|------------|
| Abstract | I |
| Zusammenfassung..... | III |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Basalmembran | 1 |
| 1.2 Die vier Hauptkomponenten der Basalmembran | 1 |
| 1.2.1 Kollagen IV | 1 |
| 1.2.2 Perlecan | 2 |
| 1.2.3 Laminin | 4 |
| 1.2.4 Nidogen | 5 |
| 1.3 Konservierung der Basalemembran-Genprodukte | 8 |
| 1.4 Bedeutung der Basalmembrankomponenten in der Embryonalentwicklung..... | 9 |
| 1.5 Verankerung in der Zellmembran | 10 |
| 1.6 <i>In vitro</i> Modell zur Basalmembran-Assemblierung..... | 11 |
| 1.7 Funktion von Basalmembranen während der Organogenese | 12 |
| 1.7.1 Extremitätenentwicklung | 15 |
| 1.7.2 Epitheliale Morphogenese..... | 17 |
| 1.8 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Modelle zur Analyse der Rolle von Nidogen | 19 |
| 1.9 Zielsetzung der Arbeit..... | 21 |
| 2 Ergebnisse | 23 |
| 2.1 Nidogen1/2-defiziente Mäuse leiden unter Syndaktylie | 23 |
| 2.1.1 Basalmembran-Defekte während der Extremitätenentwicklung..... | 26 |
| 2.1.2 Die Expression von Laminin-Rezeptoren ist reduziert | 30 |
| 2.1.3 Die endothelialen Zellen der frühen Blutgefäße sezernieren keine Basalmembran..... | 32 |
| 2.1.4 Der Verlust beider Nidogen-Isoformen führt zu verstärkter Apoptose in der Extremitätenknospe | 32 |
| 2.1.5 Die AER ist ungleichmäßig entlang der anterioposterior-Achse ausgebildet..... | 33 |
| 2.1.6 Signalleistung der AER..... | 34 |
| 2.1.7 Die Basalmembran wird verzögert gebildet und weist Lücken auf, durch die mesenchymale Zellen dringen..... | 36 |
| 2.1.8 Die interdigitale Apoptose am Tag 13,5pc kann nur durch externe apoptotische Signale ausgelöst werden | 39 |
| 2.1.9 Expressionsmuster von <i>Bmp2</i> , <i>4</i> und <i>7</i> | 41 |
| 2.1.10 Vergleich der Nidogen-Doppelmutanten mit der Laminin $\gamma 1\Delta III4$ -Maus | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.1.11 | In den rechten Vorderbeinen von Nidogen 1/2-defizienten Mäusen treten Skelettfehlbildungen mit geringer Penetranz auf | 45 |
| 2.1.12 | Das anteriore proximale Mesenchym weist am Tag 10,5pc eine starke apoptotische Aktivität auf | 46 |
| 2.1.13 | Die Lokalisation von FGF8 ist in den Extremitätenknospen verändert | 47 |
| 2.2 | Nidogen 1/2-defiziente Mäuse entwickeln leicht hypoplastische Speicheldrüsen.... | 50 |
| 2.2.1 | <i>In vitro</i> -Verzweigungsmorphogenese unter serumfreien Bedingungen..... | 53 |
| 2.2.2 | Einfluß von Serum auf die <i>ex vivo</i> -Kulturen..... | 55 |
| 2.2.3 | Deposition von Basalmembrankomponenten in kultivierten Speicheldrüsenprimordien..... | 57 |
| 2.3 | Modell zur <i>in vivo</i> -Analyse der Interaktion von Laminin und Nidogen | 59 |
| 2.3.1 | Generierung transgener Mauslinien | 60 |
| 2.3.2 | Nachweis der Expression des Transgens | 62 |
| 3 | Diskussion | 67 |
| 3.1 | Auswirkungen der Nidogen 1/2-Defizienz auf die Extremitätenentwicklung | 67 |
| 3.1.1 | Nidogen ist für die Integrität der die AER unterliegenden Basalmembran notwendig | 67 |
| 3.1.2 | Die Ausbildung der AER ist von einer intakten Basalmembran abhängig | 68 |
| 3.1.3 | Reduzierte interdigitale Apoptose als Ursache für Syndaktylie..... | 69 |
| 3.1.4 | Auswirkungen einer defekten AER..... | 70 |
| 3.1.5 | Der Verlust anteriorer Skelettelemente ähnelt Defekten in Wachstumsfaktoren | 71 |
| 3.1.6 | Über FGFs vermittelte Signale..... | 73 |
| 3.1.7 | Verstärkt anteriore Ausprägung der Fehlbildungen | 75 |
| 3.1.8 | Extremitätendefekte betreffen ausschließlich die rechte vordere Seite | 75 |
| 3.1.9 | Vergleich der Nidogen 1/2-Defizienz mit der Laminin γ 1III4-Defizienz..... | 76 |
| 3.1.10 | Weiterführende Experimente | 78 |
| 3.2 | Auswirkung der Nidogen 1/2-Defizienz auf die Entwicklung der Glandula submandibularis | 79 |
| 3.2.1 | Die <i>in vitro</i> Verzweigungsmorphogenese ist inhibiert..... | 79 |
| 3.2.2 | Auswirkungen der Blockierung unterschiedlicher Basalmembrankomponenten | 80 |
| 3.2.3 | Zusammenhang zwischen Nidogen und EGF | 81 |
| 3.3 | Etablierung einer transgenen Mauslinie | 82 |
| 4 | Material und Methoden | 85 |
| 4.1 | Material | 85 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.1.1 | Zellkulturmedien und Zubehör..... | 85 |
| 4.1.2 | Antikörper | 86 |
| 4.1.3 | Oligonukleotide..... | 87 |
| 4.1.4 | EST-Klone..... | 88 |
| 4.1.5 | Vektoren..... | 88 |
| 4.1.6 | Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierungen..... | 88 |
| 4.1.7 | Mauslinien..... | 88 |
| 4.2 | Methoden..... | 89 |
| 4.2.1 | Molekularbiologische Methoden..... | 89 |
| 4.2.1.1 | Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe oder Schwanzspitzen-Biopsien nach Laird <i>et al</i> (1991)..... | 89 |
| 4.2.1.2 | Southern Blot Analyse (Southern, 1975) | 89 |
| 4.2.1.3 | Radioaktive Markierung von DNA | 90 |
| 4.2.1.4 | Hybridisierung..... | 90 |
| 4.2.1.5 | Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe (Milchdrüsen) | 91 |
| 4.2.1.6 | Reverse Transkription (RT) | 91 |
| 4.2.1.7 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 91 |
| 4.2.1.8 | Digoxigenin (DIG)-Markierung einer RNA-Sonde | 92 |
| 4.2.2 | Histologische Methoden..... | 93 |
| 4.2.2.1 | Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten | 93 |
| 4.2.2.2 | Immunfluoreszenzfärbungen | 94 |
| 4.2.2.3 | TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) | 94 |
| 4.2.2.4 | <i>Whole mount in situ</i> Hybridisierung..... | 95 |
| 4.2.2.5 | <i>Whole mount</i> Färbung von Knochen und Knorpel..... | 96 |
| 4.2.2.6 | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 96 |
| 4.2.2.7 | Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 96 |
| 4.2.3 | Biochemische Methoden | 97 |
| 4.2.3.1 | Proteinextrakte aus murinen Gewebe..... | 97 |
| 4.2.3.2 | Immunpräzipitation | 97 |
| 4.2.3.3 | Immunoblot-Analyse..... | 97 |
| 4.2.4 | Organkulturmethoden..... | 98 |
| 4.2.4.1 | Kultur von Speicheldrüsen-Primordien..... | 98 |
| 4.2.4.2 | Implantation BMP4 abgebender Depots in embryonales Gewebe..... | 99 |
| 4.2.5 | Generierung transgener Mauslinien | 99 |

| | |
|-----------------------------|------------|
| 4.2.6 Tierzucht..... | 100 |
| 5 Literatur..... | 101 |
| Abkürzungsverzeichnis | 119 |
| Danksagung..... | 121 |
| Erklärung..... | 123 |
| Lebenslauf..... | 125 |

1 Einleitung

1.1 Die Basalmembran

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein Geflecht sekretierter Makromoleküle, dessen Zusammensetzung stark zwischen unterschiedlichen Geweben variiert. Basalmembranen stellen eine spezialisierte Form der Extrazellulären Matrix dar. Sie grenzen als dünne Schicht (20-300 nm) Epithel- und Endothelzellen vom benachbarten Bindegewebe ab, umgeben glatte und quergestreifte Muskelzellen, die Schwannzellen des peripheren Nervensystems sowie Fettzellen. Durch die konventionelle Fixierung für die Elektronenmikroskopie gliedern sich Basalmembranen in zwei strukturell unterscheidbare Schichten, die Lamina lucida, welche dem Parenchym anliegt, und benachbart zum Stroma die Lamina densa.

Ubiquitäre Bestandteile aller Basalmembranen sind die vier Hauptkomponenten Laminin, Kollagen IV, Nidogen und Perlecan. Diese vier Makromoleküle bilden das Grundgerüst, in das weitere spezifische ECM-Moleküle eingelagert werden. Sowohl durch unterschiedliche Anteile der Komponenten als auch durch die gewebespezifische Expression unterschiedlicher Isoformen wird eine erhebliche Variabilität erreicht.

1.2 Die vier Hauptkomponenten der Basalmembran

1.2.1 Kollagen IV

Kollagen IV ist ein nicht-fibrilläres Kollagen, das ausschließlich in Basalmembranen gefunden wird. Sechs unterschiedliche Polypeptide, $\alpha 1$ bis $\alpha 6$ bilden Heterotrimere. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten werden ubiquitär exprimiert, während die übrigen Untereinheiten in zeitlich und räumlich begrenzten Expressionsmustern auftreten (Miner and Sanes, 1994; Kuhn, 1995). Jede α -Kette ist aus drei Domänen aufgebaut; eine Cystein-reiche N-terminale 7S-Domäne, eine zentrale trihelikale Domäne und eine C-terminale nicht-kollagene NC1-Domäne.

Über die NC1-Domäne assemblieren die α -Ketten zunächst in Heterotrimere, welche sich anschließend paarweise aneinanderlagern, während die 7S-Domäne an der kovalenten Zusammenlagerung von jeweils vier Heterotrimern in eine spinnenartige Struktur beteiligt ist (Dolz *et al.*, 1988; Boutaud *et al.*, 2000). Zusätzlich zu diesen Verknüpfungen assoziieren Kollagen-Moleküle auch lateral und bilden so ein komplex verzweigtes Netzwerk (Yurchenco and Ruben, 1987).

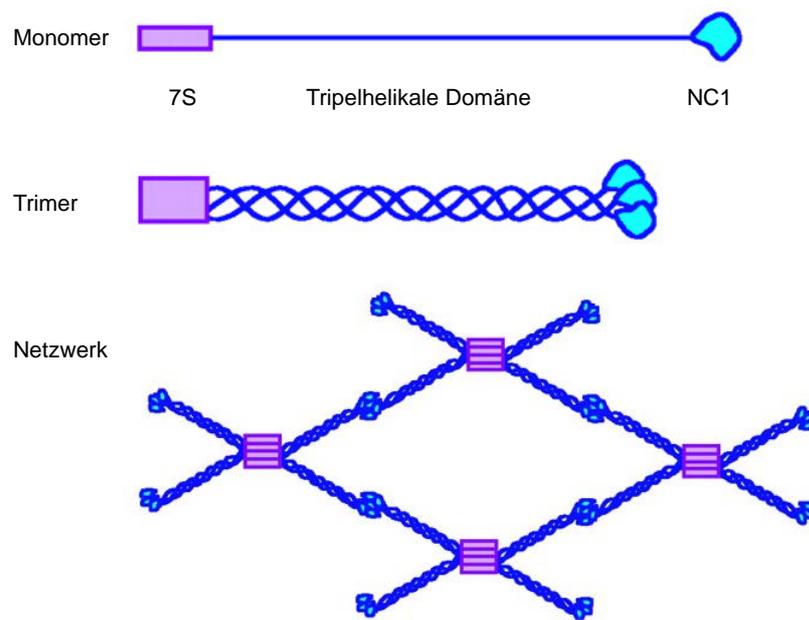


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Kollagen IV-Netzwerks. Drei α -Ketten bilden eine Tripelhelix mit aminoterminalen 7S- und carboxyterminalen NC1-Domänen. Je vier Moleküle bilden über ihre 7S-Domänen spinnenartige Strukturen aus, außerdem binden je zwei Trimere über die NC1-Domänen in Kopf-an-Kopf-Orientierung aneinander. Die lateralen Wechselwirkungen der Kollagen IV-Fibrillen ist hier nicht dargestellt (Ortega and Werb, 2002).

1.2.2 Perlecan

Perlecan ist ein Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG), das sowohl in allen Basalmembranen als auch in der ECM des Gelenkknorpels und in der Wachstumszone des Knochens gefunden wird. Das ~400 kDa große Kernprotein ist aus fünf Domänen aufgebaut, von denen vier Homologien zu weiteren sekretierten Proteinmodulen aufweisen. Die N-terminale Domäne ist einzigartig unter den Basalmembranmolekülen und besitzt drei Konsensussequenzen für die Anlagerung von Heparansulfat-Seitenketten (Paulsson *et al.*, 1987a). Eine weitere Glucosaminoglycan (GAG)-Kette kann an die Domäne V binden. Der Aufbau der GAG-

Ketten sowie deren Größe ist gewebespezifisch und bestimmt einen Großteil der Eigenschaften von Perlecan (Knox *et al.*, 2002). So bewirkt der große Anteil negativ geladener Gruppen im Heparansulfat Interaktionen mit Kationen und bedingt den hydrophilen Charakter des Proteoglycans.

In der Basalmembran geht Perlecan Interaktionen mit Laminin, Kollagen IV und Nidogen ein (Hopf *et al.*, 1999). Für die Domäne V sind Interaktionen mit Zelloberflächenrezeptoren wie β 1-Integrin und α -Dystroglycan beschrieben (Brown *et al.*, 1997; Talts *et al.*, 1999). Perlecan bindet und stabilisiert über seine HS-Ketten sowie den Proteinkern z.B. FGF2 (*fibroblast growth factor 2*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder PDGF (*platelet-derived growth factor*) und übernimmt so die Funktion eines Reservoirs für Wachstumsfaktoren (Iozzo, 1998; Mongiat *et al.*, 2000; Knox *et al.*, 2002). Im Extrazellularraum treten neben den sezernierten, Basalmembran-assoziierten HSPGs Perlecan, Agrin und Kollagen XVIII noch weitere, an die Zelloberfläche gebundene (Glypican) oder die Membran durchspannende (Syndecan) HSPGs auf. Mutationen in am Aufbau der HS-Ketten beteiligten Enzymen deckten die Funktion von HSPGs in der Signaltransduktion unterschiedlicher Wachstumsfaktoren auf (Esko and Selleck, 2002; Lin, 2004).

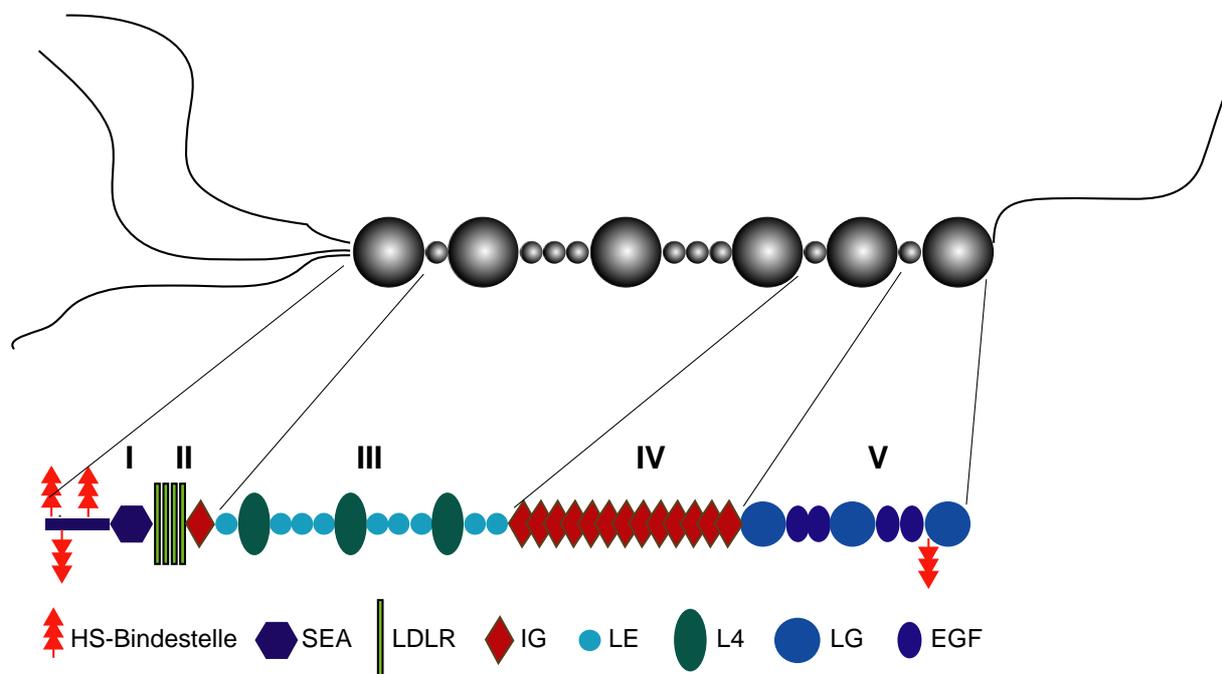


Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau des murinen Perlecan. Die fünf Domänen sind mit römischen Zahlen markiert. Der Proteinanteil besteht aus Modulen die auch in anderen ECM-Proteinen gefunden werden. Domäne I trägt drei Ser-Gly-Asp Triplets, die als Bindestellen für Heparansulfat dienen. Eine weitere konditionale Heparansulfat-Anlagerungsstelle befindet sich in Domäne V (modifiziert nach Iozzo, 2005).

1.2.3 Laminin

Die Laminine bilden die größte Familie unter den Basalmembranmolekülen. Jedes Laminin ist ein Heterotrimer aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die drei Ketten assemblieren über ihre lange *coiled-coil*-Domäne und bilden so ein Molekül bestehend aus einem langen sowie drei kurzen Armen. Die Untereinheiten sind in aufeinander folgende globuläre und stabförmige Domänen strukturiert, die α -Untereinheit erstreckt sich carboxyterminal über den *coiled-coil* Bereich hinaus und bildet die G-Domäne (Timpl *et al.*, 2000). In Säugern sind fünf α , drei β und drei γ -Ketten beschrieben. Von den 45 theoretisch möglichen Heterotrimeren wurden bis heute nur 15 identifiziert. Neben der gleichzeitigen Expression der Untereinheiten spielt möglicherweise auch die von ionischen Wechselwirkungen abhängige Stabilität der unterschiedlichen Trimere hierbei eine Rolle (Beck *et al.*, 1993). Eine zusätzliche Untereinheit entsteht durch differentielles RNA-Spleißen der $\alpha 3$ -Kette, außerdem werden einige der Ketten alternativ prozessiert, was zu einem weiteren Anstieg an Variabilität führt (Aumailley *et al.*, 2003). In Abbildung 1.3 sind die Laminin-Isoformen schematisch dargestellt. Entsprechend der Nomenklatur von Burgeson *et al.* (1994) wurden die Laminine in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung mit arabischen Zahlen nummeriert. Kürzlich wurde eine neue Nomenklatur für die Laminine vorgestellt, in der alle Heterotrimere entsprechend ihrer Untereinheiten bezeichnet werden und die in dieser Arbeit verwendet wird (Aumailley *et al.*, 2005).

Die Anzahl der Domänen in den kurzen Armen variiert zwischen den einzelnen Ketten, dadurch entstehen Heterotrimere mit einem oder mehreren trunkierten Armen. Die N-terminalen (LN) Domänen vermitteln über Ca^{2+} -abhängige Interaktionen die Polymerisation der Laminine in ein Netzwerk (Yurchenco and Cheng, 1993). In Polymerisationsassays konnte gezeigt werden, dass die trunkierten Laminine 332 und 311 nicht zu Netzwerken assoziieren und nicht mit Laminin 111 kopolymerisieren (Cheng *et al.*, 1997). Trotzdem werden diese Isoformen in Basalmembranen gefunden. Sie können über kovalente Interaktionen mit anderen Laminin-Isoformen, die Bindung an Nidogen oder an Laminin-Rezeptoren in der Basalmembran verankert werden. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass auch homologe LN-Domänen unterschiedlicher Trimere miteinander interagieren und somit auch die Ausbildung von Netzwerken mit trunkierten Laminin-Isoformen möglich ist (Odenthal *et al.*, 2004).

Die G-Domäne der unterschiedlichen Laminine, die unprozessiert aus fünf LG-Modulen besteht, vermittelt Interaktionen mit der Zelloberfläche (Yurchenco *et al.*, 2004). Viele G-Domänen interagieren mit Heparin und Sulfatiden, außerdem binden die meisten an $\alpha 6 \beta 1$ und $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin sowie einige an α -Dystroglycan.

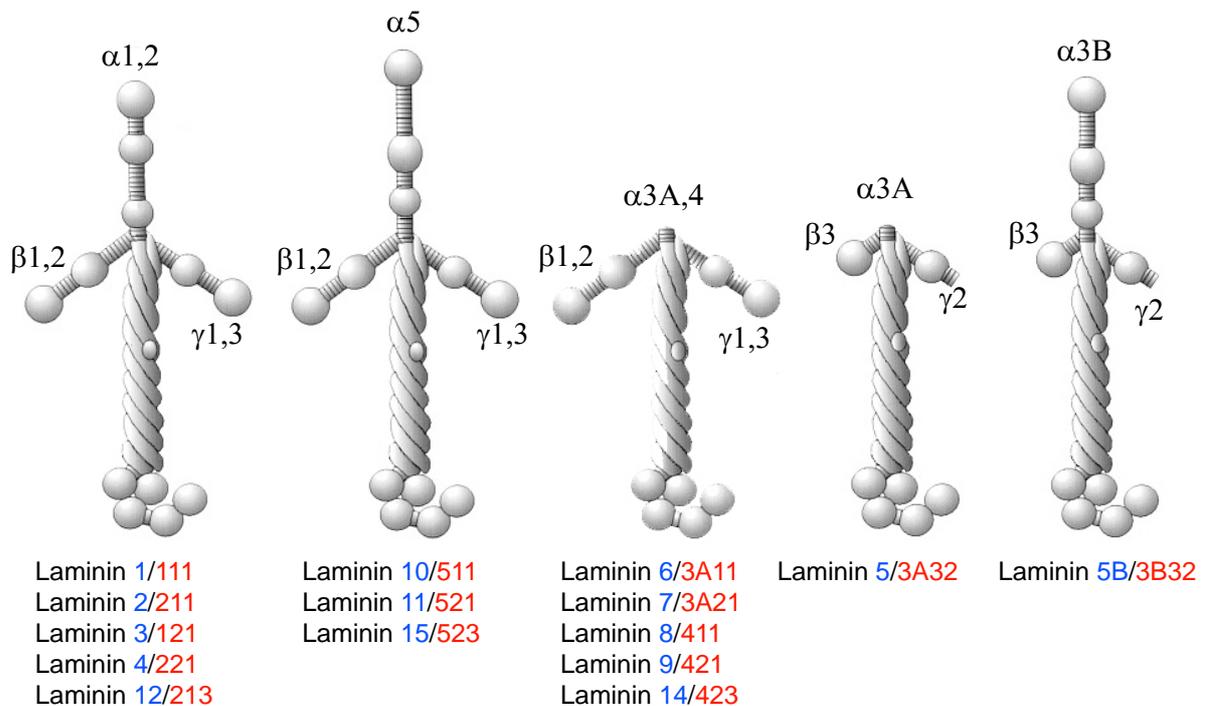


Abbildung 1.3: schematische Darstellung der Laminin-Isoformen. Die Nomenklatur nach Burgeson *et al.* (1994) ist in blau dargestellt, die neue Nomenklatur (Aumailley *et al.*, 2005) ist rot hervorgehoben. Durch Kombination unterschiedlicher α , β und γ -Ketten entstehen Laminine mit klassischem Aufbau, einer N-terminal verlängerten α -Untereinheit bzw. mit einem oder mehreren trunkierten kurzen Armen (modifiziert nach Cognato und Yurchenco, 2000).

1.2.4 Nidogen

Nidogen 1 wurde zuerst aufgrund seiner hohen Affinität zu Laminin aus Gewebekulturen koimmunopräzipitiert (Hogan *et al.*, 1980) und später aus Teratokarzinomazellen (Carlin *et al.*, 1981) und dem EHS-Tumor (Timpl *et al.*, 1983) isoliert. Das Protein ist aus drei globulären Domänen aufgebaut, die durch eine flexible Protease-sensitive Domäne sowie eine starre stabförmige Struktur miteinander verbunden sind (Fox *et al.*, 1991) (Abb. 1.4). Mit Hilfe von *rotary shadowing* Elektronenmikroskopie konnte die Komplexbildung zwischen Nidogen 1 und Laminin 111 bestätigt werden (Paulsson *et al.*, 1987b). Des Weiteren bindet

rekombinantes Nidogen 1 die anderen Hauptkomponenten der Basalmembran und kann ternäre Komplexe ausbilden (Fox *et al.*, 1991). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde postuliert, dass Nidogen als Schlüsselkomponente beim Aufbau von Basalmembranen fungiert, indem es die beiden unabhängig assemblierenden Laminin- und Kollagen IV-Netzwerke miteinander verbindet sowie andere Komponenten integriert (Timpl, 1996).

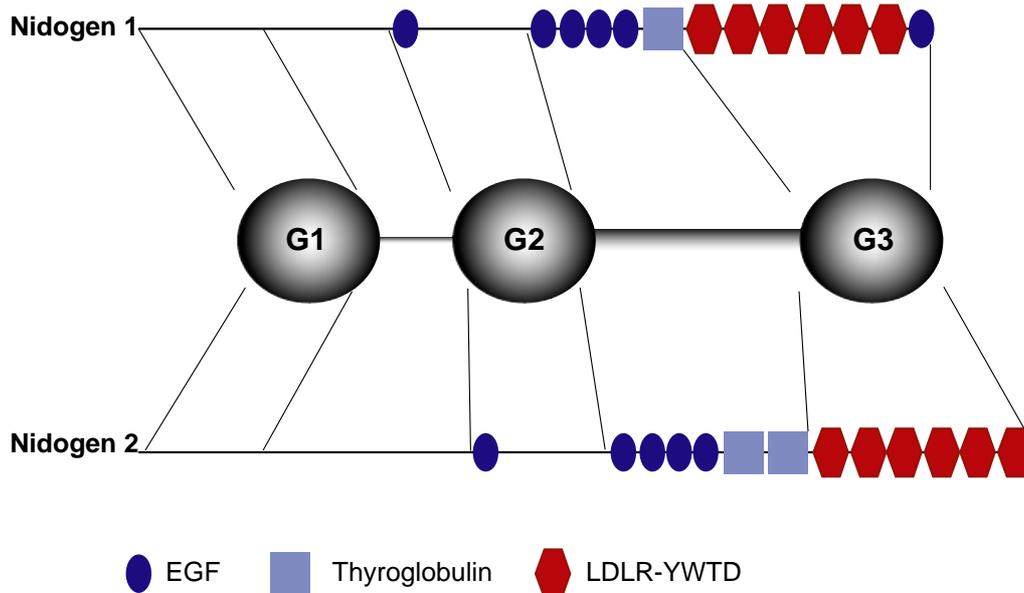


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau der beiden Nidogen-Isoformen. Obwohl murines Nidogen 1 und Nidogen 2 nur 27% Sequenzhomologie untereinander aufweisen, ist der strukturelle Aufbau in drei globuläre Domänen (G1-G3), die durch eine flexible und eine stabähnliche Struktur miteinander verbunden sind, konserviert (Kimura *et al.*, 1998). Die Domäne G2 vermittelt Interaktionen an Kollagen IV, Perlecan und Fibulin-1, während Laminin und Fibulin-2 an die Domäne G3 binden. Die beiden Isoformen unterscheiden sich geringfügig in der Anzahl ihrer Module. (Erickson and Couchman, 2000).

Die best charakterisierte Interaktion von Nidogen ist die zu Laminin. Die hochaffine Nidogen-Bindestelle wurde im LE-Modul 4 der Domäne III in der Laminin γ 1-Kette lokalisiert (γ 1III4) (Mayer *et al.*, 1993; Poschl *et al.*, 1994). Entsprechend der jüngst veröffentlichten Nomenklatur der Laminine wird diese Domäne als γ 1LEb3 bezeichnet (Aumailley *et al.*, 2005). Übereinstimmend mit den in dieser Arbeit zitierten Publikationen und verwendeten Konstrukten wird hier jedoch die Bezeichnung γ 1III4 beibehalten. Die dreidimensionale Struktur der entsprechenden 56 Aminosäuren großen Region wurde kristallographisch und mittels NMR analysiert (Baumgartner *et al.*, 1996; Stetefeld *et al.*, 1996). LE-Module bilden eine starre Struktur aus vier Schleifen, welche durch Disulfidbrückenbindungen zwischen acht Cysteinen und antiparallele β -Faltblätter stabilisiert

wird. Entscheidend für die Bindung an Nidogen sind drei Aminosäuren in Laminin γ 1III4 (Abb. 1.5), von denen zwei in der Laminin γ 2-Kette verändert vorliegen (V804S und N802S) (Mayer *et al.*, 1995). Die LDL-Rezeptor YWTD-Module in der Nidogen G3-Domäne bilden einen sechsblättrigen β -Propeller und damit die komplementäre Bindestelle aus (Mann *et al.*, 1988; Takagi *et al.*, 2003).

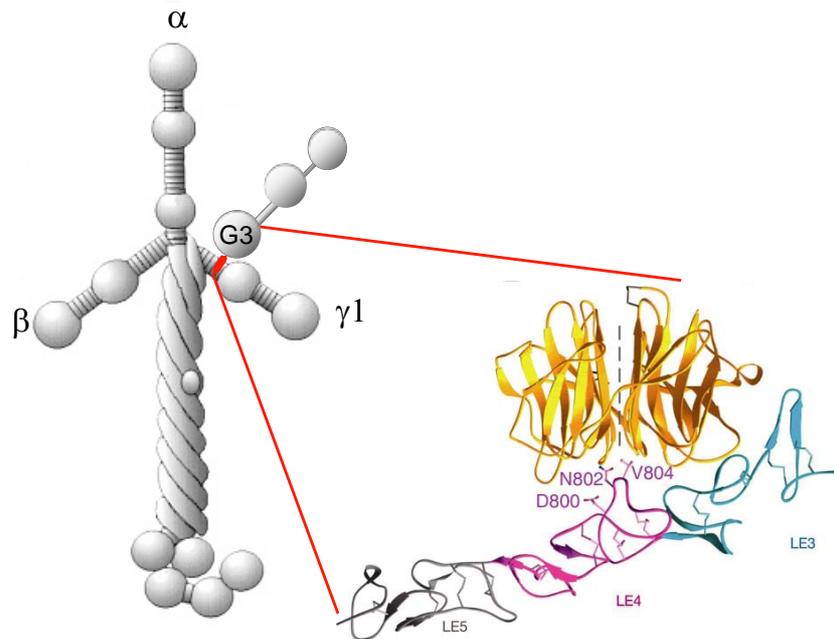


Abbildung 1.5: Bindung von Nidogen an Laminin. Die beiden Proteine sind schematisch dargestellt. Der Detailausschnitt zeigt die dreidimensionale Struktur der komplementären Bindungsstellen. Für die Interaktion essentielle Aminosäuren in Laminin γ 1III4 sind eingezeichnet (modifiziert nach Stetefeld *et al.*, 1996 und Takagi *et al.*, 2003).

In Säugern existiert eine zweite Isoform mit gleicher Domänenstruktur, Nidogen 2 (Kohfeldt *et al.*, 1998). Beide Nidogene weisen *in vitro* ein breites, überlappendes Spektrum an Bindungsaffinitäten zu anderen Komponenten der Basalmembran wie Fibulin, Perlecan und Kollagen IV auf (Hopf *et al.*, 2001; Salmivirta *et al.*, 2002; Schymeinsky *et al.*, 2002). Die Affinität von Nidogen 2 zu dem Lamy1III4-Modul variiert zwischen den humanen und murinen Homologen. Während humanes Nidogen 2 mit etwa 1000fach geringerer Affinität als Nidogen 1 bindet (Kohfeldt *et al.*, 1998), ist beim murinen Nidogen 2 die Bindung nur um das ~8fache reduziert (Miosge *et al.*, 2002; Salmivirta *et al.*, 2002). Nidogen 2 wird während der Embryonalentwicklung gemeinsam mit Nidogen 1 ubiquitär in allen Basalmembranen

exprimiert (Miosge *et al.*, 2002; Gersdorff *et al.*, 2005). Mit der Spezifizierung im adulten Organismus wird Nidogen 2 besonders in endothelialen Basalmembranen angereichert, während Nidogen 1 weiterhin in deutlich molarem Überschuss ubiquitärer Bestandteil aller Basalmembranen ist (Kohfeldt *et al.*, 1998; Murshed *et al.*, 2000).

1.3 Konservierung der Basalembran-Genprodukte

Die Proteine der extrazellulären Matrix sind Mosaik aus etwa 65 unterschiedlichen Domänen (Ponting *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass sie durch Gen-Duplikation und Exon-*shuffling* evolutionär entstanden (Pathy, 1996). Basalmembranen kommen in den Geweben fast aller multizellulärer Metazoen vor. Ihre Komponenten und Rezeptoren sind hochkonserviert und gehören zu den ältesten Genprodukten der ECM (Hynes and Zhao, 2000; Rubin *et al.*, 2000). Interstitielle ECM-Komponenten hingegen, wie Elastin, fibrilläre Kollagene und Fibronectin, scheinen sich nur in Säugern entwickelt zu haben. Sequenzvergleiche der Genome von *C. elegans*, *Drosophila* und Mensch zeigen starke Homologien von Laminin, Kollagen IV, Perlecan und Nidogen (Li *et al.*, 2003b), wobei die Anzahl der Isoformen in den Säugern zunimmt. Dies wird bei der Familie der Laminine besonders deutlich. *Drosophila* und *C. elegans* exprimieren je vier Laminin-Ketten, zwei α - sowie eine β - und eine γ -Kette, und damit zwei Heterotrimere. Eine der α -Untereinheiten hat starke Ähnlichkeit zu Laminin $\alpha 5$ der Säuger, während die andere die größte Homologie zu Laminin $\alpha 1$ aufweist. Während der Säuger-Embryogenese sind die Laminin $\alpha 1$ und $\alpha 5$ -Ketten die frühesten exprimierten α -Untereinheiten, die vermutlich evolutionär jüngeren Ketten werden erst in späteren Entwicklungsstadien in begrenzten Mustern exprimiert.

1.4 Bedeutung der Basalmembrankomponenten in der Embryonalentwicklung

In der Säugerentwicklung erscheint die erste Basalmembran kurz nach der Differenzierung der Morula in die Blastozyste. Die ersten Komponenten werden vom primitiven Endoderm synthetisiert und assemblieren an der Grenzschicht zur inneren Zellmasse. Nach der Implantation der Blastozyste in das Endometrium am Embryonaltag (E) 4,5 differenzieren sich die der Basalmembran anliegenden Zellen zum Epithel des Epiblasten und eine zentrale proamniotische Höhle bildet sich aus. Es entsteht die embryonale Basalmembran, die das viscerale Endoderm vom Epiblasten trennt, sowie Reicherts Membran, die zwischen parietalem Endoderm und dem Trophoblasten liegt.

Die Relevanz von Laminin wird durch die frühe embryonale Letalität am E 5.5 bei Verlust der Laminin $\gamma 1$ oder $\beta 1$ -Kette deutlich (Smyth *et al.*, 1999; Miner *et al.*, 2004). Beide von der Blastozyste sekretierten Basalmembranen bilden sich in Abwesenheit dieser Laminin-Ketten nicht aus und die Differenzierung der Blastozyste stoppt. In *Lama1*-defizienten Embryonen kann die $\alpha 5$ -Kette den Verlust partiell kompensieren und das parietale Endoderm sowie das embryonale Ektoderm differenzieren sich. Allerdings wird Reicherts Membran trotz Sekretion eines polymerisationsfähigen Laminin-Trimers auch in diesen Embryonen nicht gebildet und sie sterben am E 7 (Miner *et al.*, 2004).

Im Unterschied zur Laminin-Defizienz assembliert die Blastozyste andere Basalmembrankomponenten in Abwesenheit von Kollagen IV. Mutationen im bidirektionalen Promoter der *Col4 $\alpha 1$* und *$\alpha 2$* -Gene führt zum Verlust aller Kollagen IV-Isoformen während der periimplantären Entwicklung. Trotzdem bilden solche Embryonen Basalmembranen aus und entwickeln sich bis zu E10. Erst unter stärkeren mechanischen Belastungen führen Defekte in diesen rudimentären Basalmembranen zum Tod (Poschl *et al.*, 2004). Kollagen IV ist demnach für die Stabilität und Integrität der Basalmembranen notwendig. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen in Mäuseembryonen werden in Nematoden die beiden Laminin-Isoformen früher als Kollagen IV exprimiert und assemblieren auch in Kollagen IV-Mutanten (Gupta *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2003). Die frühen Basalmembranen enthalten demnach kein Kollagen. Ebenso ist die Funktion von Perlecan und Nidogen während der frühen Embryogenese nicht essentiell. Perlecan-defiziente Embryonen zeigen die ersten Defekte in mechanisch stark belasteten Basalmembranen am Tag 10,5 pc (Costell *et al.*,

1999), während der Verlust der Nidogen-Isoformen mit der vollständigen Embryonalentwicklung vereinbar ist (Bader *et al.*, 2005).

1.5 Verankerung in der Zellmembran

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Ausbildung von Basalmembranen ist die Adhäsion von strukturellen Komponenten an der Zelloberfläche. Die Aggregation von Netzwerken geschieht vorzugsweise wenn Laminin an Zelloberflächenrezeptoren gebunden vorliegt, wobei die Bindung seiner LG-Domänen an die Rezeptoren für die Differenzierung des Epiblasten notwendig sind (Colognato *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002). Bindungsstudien zeigten Interaktionen von Basalmembrankomponenten mit multiplen Zelloberflächenrezeptoren wie Integrinen, α -Dystroglycan, Syndecanen und Lipid-Sulfatiden (Talts *et al.*, 1999; Yurchenco *et al.*, 2004). Während einige dieser Interaktionen zur Zelladhäsion und damit zur Verankerung der Basalmembran beitragen, vermitteln die Bindungen an Integrine und α -Dystroglycan Signale in die Zelle und sind die einzigen bekannten Rezeptoren, die extrazelluläre Liganden mit Aktin bzw. Intermediärfilamenten des Zytoskeletts verbinden (Brakebusch and Fassler, 2003).

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine aus zwei nicht-kovalent assoziierten α - und β -Untereinheiten. Der Bindung an einen Liganden folgt die Rekrutierung von Signalmolekülen und die Initiierung einer Signalkaskade. Auf diese Weise übermitteln Integrine Signale zur Zellmotilität, Vitalität, Proliferation und Genexpression (Hynes, 2002). Die vermutlich biologisch relevanten Interaktionen werden zwischen den LG-Domänen der Laminine und unterschiedlichen β 1-Intgrinen sowie α 6 β 4-Integrin vermittelt (Colognato and Yurchenco, 2000; Salmivirta *et al.*, 2002). Auch für die anderen ubiquitären Basalmembrankomponenten wie Kollagen IV, Nidogen und Perlecan sind Interaktionen mit β 1-Integrinen beschrieben (Dedhar *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1997; Salmivirta *et al.*, 2002). Ein weiterer Hauptrezeptor von Basalmembrankomponenten ist α -Dystroglycan, das an die LG-Module von Perlecan, Agrin und mehreren Lamininen bindet (Hohenester *et al.*, 1999).

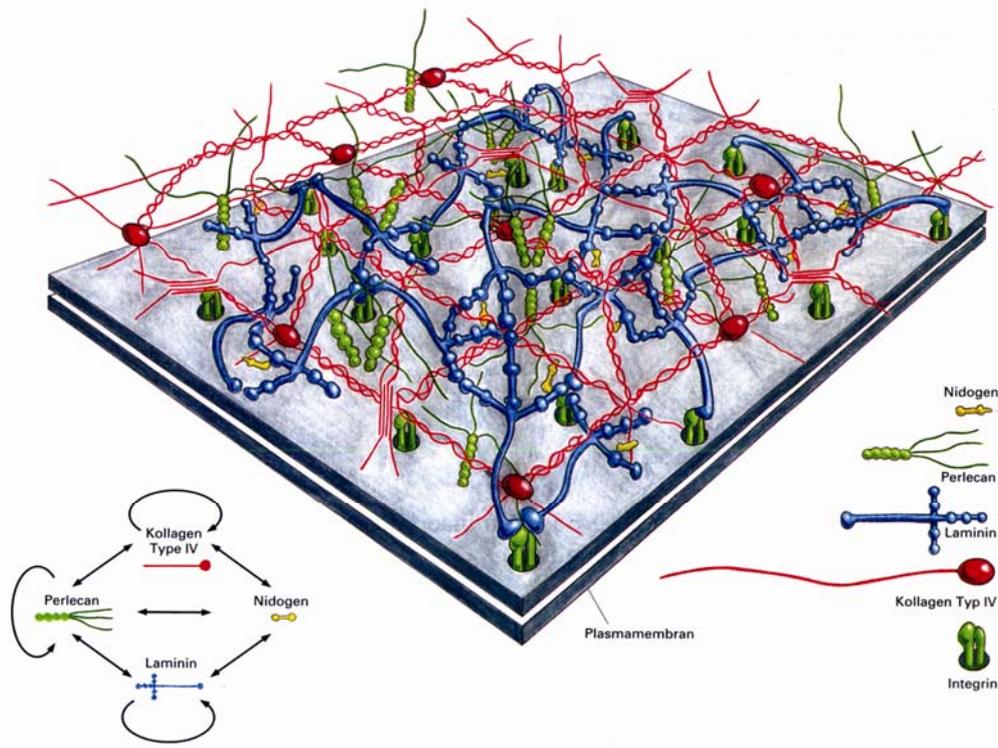


Abbildung 1.6: Modell der molekularen Zusammensetzung von Basalmembranen. Das Kollagen IV-Netzwerk und das Laminin-Netzwerk werden über Nidogen verknüpft. Perlecan bindet an Kollagen IV, Laminin, Nidogen und an sich selbst (Yurchenco and Schittny, 1990).

1.6 *In vitro* Modell zur Basalmembran-Assemblierung

Wenn pluripotente Embryonale Stammzellen unter definierten Bedingungen kultiviert werden, bilden sie embryoide Körperchen aus, die den frühen Stadien muriner Embryonalentwicklung ähneln. Embryoide Körperchen bilden eine äußere endodermale Zellschicht, eine subendodermale Basalmembran und differenzieren ein Epithelium mit einem zentralen, der proamniotischen Höhle ähnlichen Lumen. Die Differenzierung mutanter embryoider Körperchen in Gegenwart unterschiedlicher ECM-Komponenten und Fragmenten ermöglichte eine detaillierte Analyse der Basalmembran-Assemblierung und damit assoziierten Differenzierungsschritten (Li *et al.*, 2003b). Diese Untersuchungen zeigten, dass sowohl die Interaktionen zwischen den LN-Domänen als auch die Verankerung an der Zelloberfläche essentiell für die Laminin-Polymerisation, den Aufbau einer Basalmembran und die Differenzierung der Inneren Zellmasse sind. Die Assemblierung einer Basalmembran

ist für die Hohlraumbildung und die Polarisierung des Epiblasten notwendig (Murray and Edgar, 2000; Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).

Ähnlich der Laminin-Defizienz führen Verlust-Mutationen von β 1-Integrin oder α -Dystroglycan zu früher embryonaler Letalität am E 5.5 (Fassler and Meyer, 1995; Stephens *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1997). Die Analyse mutanter embryoider Körperchen konnte zeigen, dass β 1-Integrin für die Expression von Laminin essentiell ist und exogen zugegebenes Laminin assembliert wird. Weder β 1-Integrin, noch α -Dystroglycan oder Heparansulfate werden für die Assemblierung einer Basalmembran und der frühen Epiblasten-Differenzierung benötigt (Lin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002).

1.7 Funktion von Basalmembranen während der Organogenese

Zahlreiche heterotypische Zell-Zell-Interaktionen, die essentiell für die Organogenese sind, finden zwischen durch eine Basalmembran voneinander getrennten Zellen statt. Die Verlustphänotypen einzelner Basalmembrankomponenten spiegeln die Spezifität und Heterogenität der die unterschiedlichen Gewebe umgebenden Basalmembranen wieder. In der Haut werden die basalen Keratinozyten der Epidermis über eine spezielle adhäsive Struktur, die Hemidesmosomen, mit der unterliegenden Basalmembran verbunden. Mutationen in Genen, die am Aufbau der epidermalen-dermalen Basalmembran beteiligt sind, führen zu einer Trennung der beiden Hautschichten und Blasenbildung (Epidermolysis bullosa junctionalis) (Nakano *et al.*, 2002). Mutationen oder Verlust der Laminin α 2-Kette schwächt die Basalmembran der Skelettmuskulatur, was zu einer Zerstörung von Muskelfibrillen durch die mechanische Beanspruchung während der Kontraktion führt. Hingegen resultieren Defekte in der das Gehirn vom benachbarten Mesenchym abgrenzenden Basalmembran in einer Auflösung der Kompartimentgrenzen und Invasion von neuronalem Gewebe in das darüberliegende Ektoderm (Georges-Labouesse *et al.*, 1998; Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999; Costell *et al.*, 1999; Graus-Porta *et al.*, 2001; Poschl *et al.*, 2004). Am Beispiel der Schwanzzellen des peripheren Nervensystems kann der Einfluß von Basalmembranen auf das Differenzierungspotential der angrenzenden Zellen dargestellt werden. Der Verlust von Basalmembrankomponenten führt hier zu Myelinisierungsdefekten der Axone (Patton *et al.*, 1999; Chen and Strickland, 2003). Auch die Differenzierung von Zellen, die nicht direkt an

eine Basalmembran angrenzen, wird durch sie beeinflusst. In Laminin-defizienten embryoiden Körperchen konnte gezeigt werden, dass erst die Assemblierung einer subendodermalen Basalmembran Apoptose in den weiter innen liegenden Zellen und so die Ausbildung der proamniotischen Höhle induziert (Murray and Edgar, 2000).

In Tabelle 1.1 sind exemplarisch einige repräsentative Mutanten der Maus dargestellt. Mutationen in allen Laminin-Genen, außer *lam4* und *lamc3* sind publiziert. Die mutanten Phänotypen zeigen, dass die beiden ursprünglichen Laminin-Trimere, repräsentiert durch Laminin 111 und Laminin 511, essentiell für eine Vielzahl von Entwicklungsvorgängen wie Gastrulation, Schluß des Neuralrohres und Plazentabildung sind. Die anderen, später evolvierten Isoformen zeigen Gewebe- und Zelltyp-spezifische Funktionen. Im Folgenden wird die Funktion von Basalmembranen in einigen spezifischen Entwicklungsvorgängen detaillierter beschrieben.

Tabelle 1.1: Verlust-Phänotypen ausgewählter Basalmembran-Komponenten und ihrer Rezeptoren

| mutierter Lokus | Phänotyp | Referenz |
|-----------------------------------|--|---|
| Laminin $\alpha 1$ | Embryonal letal (E7), embryonale Basalmembran wird gebildet, Reicherts Membran fehlt | (Miner <i>et al.</i> , 2004) |
| Laminin $\alpha 2$ | Adult letal, Muskeldystrophie und periphere Neuropathie | (Miyagoe <i>et al.</i> , 1997; Patton <i>et al.</i> , 1999) |
| Laminin $\alpha 3$ | Neonatal letal, junktionale Epidermolysis bullosa | (Ryan <i>et al.</i> , 1999) |
| Laminin $\alpha 4$ | Vital, transiente Defekte in den kleinen Blutgefäßen | (Patton <i>et al.</i> , 1999; Thyboll <i>et al.</i> , 2002) |
| Laminin $\alpha 5$ | Embryonal letal (E14-17), Defekte in Plazenta, Neuralrohr, Extremitäten, Lunge und Niere | (Miner <i>et al.</i> , 1998; Miner and Li, 2000) |
| Laminin $\gamma 1$ oder $\beta 1$ | Embryonal letal (E5,5), keine Basalmembran wird gebildet | (Smyth <i>et al.</i> , 1998; Miner <i>et al.</i> , 2004) |
| Laminin $\beta 2$ | Postnatal letal, Defekte in der Neuromuskulären Verbindung und den Nierenglomeruli | (Noakes <i>et al.</i> , 1995) |
| Kollagen IV $\alpha 1 + \alpha 2$ | Embryonal letal (E10), Defekte in Reicherts Membran | (Poschl <i>et al.</i> , 2004) |
| Kollagen IV $\alpha 3$ | Adult letal, Nierendefekte | (Cosgrove <i>et al.</i> , 1996; Miner and Sanes, 1996) |
| Nidogen 1 | Lebensfähig und fertil, Epilepsie | (Murshed <i>et al.</i> , 2000) |
| Nidogen 2 | Lebensfähig und fertil | (Schymeinsky <i>et al.</i> , 2002) |
| Perlecan | Embryonal (E10,5) oder neonatal letal, Chondrodysplasie, Defekte im Gehirn und Herz | (Arikawa-Hirasawa <i>et al.</i> , 1999; Costell <i>et al.</i> , 1999) |
| $\beta 1$ -Integrin | Embryonal letal (E5,5) | (Fassler and Meyer, 1995; Stephens <i>et al.</i> , 1995) |
| $\beta 4$ -Integrin | Perinatal letal, Epidermolysis bullosa | (Dowling <i>et al.</i> , 1996) |
| $\alpha 2$ -Integrin | Reduzierte Verzweigungen in der Milchdrüse | (Chen <i>et al.</i> , 2002) |
| $\alpha 6$ -Integrin | Neonatal letal, Epidermolysis bullosa, neuronale Ektopia | (Georges-Labouesse <i>et al.</i> , 1996) |
| $\alpha 3$ -Integrin | Neonatal letal, reduzierte Verzweigungen in Niere und Lunge | (Kreidberg <i>et al.</i> , 1996; DiPersio <i>et al.</i> , 1997) |
| $\alpha 3 + \alpha 6$ -Integrin | Perinatal letal, Syndaktylie, hypoplastische Lunge, Defekte im Neuralrohr | (De Arcangelis <i>et al.</i> , 1999) |
| α -Dystroglycan | Embryonal letal (E6,5) | (Williamson <i>et al.</i> , 1997) |

1.7.1 Extremitätenentwicklung

Während der Entwicklung des Embryos entstehen eine Reihe von Organisationszentren, die positionelle Informationen an die umliegenden Zellen weiterleiten und so die Musterbildung steuern. Die Extremitätenentwicklung des Huhns und der Maus ist ein gut untersuchter Prozess der embryonalen Musterbildung. Sie beginnt mit der Bildung der Extremitätenknospe, einem Kern aus mesenchymalem Mesoderm, der von einem zunächst einschichtigen, epithelialen Ektoderm umgeben ist. Die Extremitäten weisen drei Entwicklungsachsen auf: die anterioposteriore, die proximodistale und die dorsoventrale Achse. Die Musterbildung entlang dieser Achsen wird von spezifischen transienten Signalzentren reguliert. Die beiden Haupt-Organisationzentren der Extremitätenknospe wurden 1948 von Saunders entdeckt, die Zone polarisierender Aktivität (ZPA) und die apikale Ektodermleiste (*apical ectodermal ridge*, AER) (Saunders, 1998). Zur Wirkungsweise der ZPA stellte Wolpert das klassische Morphogen-Gradienten-Modell vor, das die Existenz eines kleinen diffusiblen Moleküls impliziert, welches einen Diffusionsgradienten über der Extremitätenknospe bildet und so ein konzentrationsabhängiges Muster determiniert (Wolpert, 1969; Tickle, 1999). Dieses Modell lieferte eine Erklärung für die meisten experimentellen Manipulationen an den Extremitäten des Huhns und die theoretische Grundlage um nach diesem Morphogen zu suchen. Das erste gefundene Molekül, das die Funktion der ZPA nachahmen kann, war Retinsäure (Tickle *et al.*, 1982). Später konnte gezeigt werden, dass Retinsäure die Expression von Sonic hedgehog (*Shh*) induziert, welches die wichtigsten Attribute eines Morphogens, Dosis-abhängige Wirkung und Löslichkeit, besitzt (Riddle *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1994). Allerdings wird zumindest ein Teil der organisierenden Aktivität von SHH durch sekundäre Signale wie z.B. BMP2 übermittelt (Yang *et al.*, 1997; Drossopoulou *et al.*, 2000). Ein kompliziertes Netzwerk genetischer Interaktionen induziert und beschränkt die Expression von *Shh* auf den posterioren distalen Rand der Extremitätenknospe.

SHH interagiert mit den Signalmolekülen des zweiten Organisationszentrums, der AER, über eine positive Rückkopplung (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). Die AER erstreckt sich distal entlang der anterioposterioren Achse. Sie sekretiert Wachstumsfaktoren, die das darunter liegende Mesenchym, die Wachstumszone, in einem proliferierenden Zustand halten. Das 1974 aufgestellte Wachstumszonen-Modell beschreibt die proximodistale Musterbildung in der Extremitätenknospe (Summerbell, 1974). Dabei wird die Dauer, die eine Zelle unter dem Einfluß eines Morphogens steht, in einen Gradienten positioneller

Information umgewandelt. Sobald die Zellen die Wachstumszone verlassen, differenzieren sie entsprechend ihres zuvor determinierten Schicksals. Jüngere Beobachtungen stellen dieses Modell in Frage (Sun *et al.*, 2002; Barna *et al.*, 2005) und postulieren einen Mechanismus, in dem die Segmente schon vor dem Auswachsen der Extremitätenknospe determiniert sind (Dudley *et al.*, 2002).

Rekombinantes FGF-Protein ist in der Lage die Funktion der AER zu substituieren (Niswander *et al.*, 1993; Fallon *et al.*, 1994), allerdings ist die Rolle der spezifisch in der AER exprimierten FGFs aufgrund von partieller Redundanz schwer zu bestimmen. Der Verlust von FGF4, FGF9 oder FGF17 hat keine Auswirkungen auf die Extremitätenentwicklung (Moon *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Colvin *et al.*, 2001). Hingegen führt die extremitätenspezifische Inaktivierung von FGF8 zu hypoplastischen Elementen entlang der gesamten proximodistalen Achse wodurch die außerordentliche Funktion dieses Proteins deutlich wird (Lewandoski *et al.*, 2000; Moon and Capecchi, 2000). Die Basalmembran, die die AER von den mesenchymalen Zellen trennt, behindert die Passage von großen Molekülen wie FGFs. Diese regulieren über einen konzentrationsabhängigen Mechanismus die Proliferation und Differenzierung in den mesenchymalen Zellen (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003; Garcia-Maya *et al.*, 2005). Für die hochaffine Bindung und Aktivierung der Rezeptoren ist eine Assoziation mit HSPGs notwendig, die FGF-Aktivität kann demnach durch mehrere extrazelluläre Modulatoren beeinflusst werden (Ornitz, 2000; Pellegrini, 2001). Mutationen in Enzymen, die an der Modifikation der Glukosaminoglykanketten in HSPGs beteiligt sind, zeigten sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten die Interaktion von Wachstumsfaktoren mit HSPGs (Lin, 2004). So bilden z.B. Mäuse, denen die HS-2-O-Sulfotransferase oder Glucuronyl-C5-Epimerase fehlt, postaxiale Polydaktylie aus, ein Phänotyp, der auch nach Modifikation von Signalmolekülen auftritt (Bullock *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003a).

Die Aufrechterhaltung der AER hängt von anderen Faktoren als ihre Induktion und Differenzierung ab. BMPs wurden als Apoptose-induzierende Signale sowohl im Ektoderm der AER als auch im Mesoderm identifiziert (Ganan *et al.*, 1996; Zou and Niswander, 1996; Macias *et al.*, 1997). Sie sind außerdem an der Regulation chondrogener Differenzierung beteiligt, wobei die unterschiedlichen Funktionen der BMPs über differentiell exprimierte Rezeptoren vermittelt werden (Macias *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997). Auch BMPs wirken im Zusammenspiel mit HSPGs. So interagiert die Defizienz von Glypican 3 genetisch mit einem reduzierten BMP4-Level (Paine-Saunders *et al.*, 2000), möglicherweise indem Glypican 3 die Verteilung des BMP4-Antagonisten Noggin reguliert (Paine-Saunders *et al.*, 2002).

Für die normale Extremitätenentwicklung ist die Stabilität der Basalmembran notwendig. Laminin $\alpha 5$ -defiziente Mäuse weisen Unregelmäßigkeiten in der subektodermalen Basalmembran auf, die Integrität des Oberflächenektoderms ist gestört und schließlich bilden sich fusionierte Finger und Zehen aus (Miner *et al.*, 1998). Ähnliche Defekte zeigen Mäuse, denen die Integrin $\alpha 3$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten und somit ein Großteil der Laminin-Rezeptoren fehlt. Hier konnten morphologische Veränderungen der AER gezeigt werden (De Arcangelis *et al.*, 1999).

1.7.2 Epitheliale Morphogenese

Die epitheliale Verzweigung ist ein fundamentaler Prozess in vielen sich entwickelnden Organen wie den Speicheldrüsen, Milchdrüsen, der Lunge, Pankreas und Niere. Das Muster der Verzweigungsmorphogenese weist dabei sowohl gewebespezifische Charakteristika als auch einige grundlegende Gemeinsamkeiten auf. Es entstehen komplexe Wechselwirkungen zwischen dem sich verzweigenden Epithelium und dem benachbarten Mesenchym, was schließlich zu Wachstum und Verzweigung des Epithels sowie Differenzierung des Mesenchyms führt. Mutationen, die zu Defekten in einem dieser Organe führen, zeigen häufig auch Störungen in ähnlich entstehenden Geweben. So führt die Defizienz des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins sowohl zu reduzierten Verzweigungen in den Sammelgängen der Niere als auch in den Bronchien der Lunge (Kreidberg *et al.*, 1996).

Um den Mechanismus der Verzweigungsmorphogenese genauer zu untersuchen eignen sich *ex vivo* Experimente mit frühen Explantaten. Das Blockieren der Laminin-Polymerisation in Lungen-Explantaten führt zu Zerstörung der Basalmembran und einem Verlust der epithelialen Zellpolarität (Schuger *et al.*, 1998). Das am besten analysierte System zur epithelialen Verzweigungsmorphogenese sind die Primordien der Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis). Im Unterschied zu den Lungen sind hier die Epithelien zu Beginn der Verzweigungen noch nicht tubulär angelegt, sondern bilden erst später durch Apoptose Lumen aus. Während die Laminin-Isoformen in der frühen Organogenese einen dynamischen Umsatz zeigen, werden die meisten der bisher untersuchten Laminin-Rezeptoren stabil im gesamten Epithelium exprimiert. Um die Funktion unterschiedlicher Laminin-Domänen zu untersuchen wurden eine Vielzahl blockierender Antikörper und Peptide gegen Laminine und ihre Rezeptoren in Organkulturen eingesetzt. Die

Anzahl der Endknospen wird drastisch reduziert, wenn das Laminin $\alpha 1$ bzw. $\alpha 5$ LG4-Modul (Kadoya *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003), die Integrin $\alpha 6$ -Untereinheit oder α -Dystroglycan (Kadoya *et al.*, 1995; Durbeej *et al.*, 2001) blockiert wird. Die differentiellen Auswirkungen dieser Peptide auf die Assemblierung von Basalmembranen und die Morphologie der Endknospen deuten auf unterschiedliche Mechanismen mit denen die Verzweigungsmorphogenese inhibiert wird hin. Eine essentielle Funktion in der epithelialen Morphogenese scheint die Bindung von Laminin an Nidogen zu übernehmen. So konnte gezeigt werden, dass Antikörper, die die Interaktion von Laminin und Nidogen blockieren, mit der Basalmembranassemblierung interferieren und die Entwicklung von Lungen, Nieren und Speicheldrüsen *in vitro* inhibieren (Ekblom *et al.*, 1994; Kadoya *et al.*, 1997).

In der Maus beginnt die Entwicklung des Metanephros am Tag 11 *post conceptum* (*pc*) wenn das metanephrogene Blastem, welches später die Nephrone bildet, das Auswachsen der Ureterknospe vom Wolffschen Gang induziert. Die von einer Basalmembran umgebene Ureterknospe wächst in das Mesenchym und induziert dessen Kondensation zum Epithel. Dieses Epithel bildet das Nephron und seine distalen Enden fusionieren mit der Ureterknospe, welche sich verzweigt und so das Sammelsystem ausbildet. Insgesamt werden über repetitive reziproke Induktionen ~10.000 Nephrone gebildet. Die Transition von Mesenchym zum Epithel wird von der Assemblierung einer benachbarten Basalmembran begleitet. Blockierung der Laminin-Polymerisation in Organkulturen verhindert die Transition zum Epithel (Klein *et al.*, 1988; Sorokin *et al.*, 1990). Während der Entwicklung der Glomeruli wird Laminin 111 durch die Laminine 511 und 523 ersetzt. Wenn diese Umstellung der Laminin-Isoformen durch eine Mutation der *lama5*-Kette inhibiert wird, führt dies zu einer Desorganisation glomerulärer Zellen. 20% der *lama5*-defizienten Embryonen entwickeln nur eine oder gar keine Niere (Miner and Li, 2000). Inhibierung der Interaktion zwischen Laminin und Nidogen führt in 80 % der Fälle zu einer renalen Agenesie (Willem *et al.*, 2002). Auch Mäuse in denen die Sulfatierung von HS-Ketten gestört ist leiden unter renaler Agenesie (Bullock *et al.*, 1998). Das bekannteste HSPG der Basalmembran ist Perlecan. Es wurde vermutet, dass die HS-Ketten des Perlecan unerlässlich für die Filtrationsfunktion der glomerulären Basalmembran sind. Die Deletion der drei N-terminalen HS-Bindestellen im Perlecan führt allerdings zur kompensatorischen HS- sowie CS (Chondroitinsulfat)-Anlagerungen an anderen Domänen und interferiert nicht mit der Entwicklung und Funktion der Niere unter physiologischen Bedingungen (Rossi *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005).

Die Milchdrüsen unterlaufen während der Schwangerschaft eine intensive lobulo-alveoläre Entwicklung, so dass zum Zeitpunkt der Laktation die Drüse beinahe vollständig aus sekretorischem Epithelium besteht. Nach dem Abstillen entwickelt sich dieses Epithelium zurück, ein Vorgang der als Involution bezeichnet wird und durch apoptotischen Zellverlust charakterisiert ist. Während dieses Stadiums werden Moleküle der ECM proteolytisch gespalten. Die Überexpression der Matrixmetalloproteinase Stromelysin-1 löst in frühen Stadien der Milchdrüsenentwicklung verstärkte Verzweigungen und während der späten Schwangerschaft eine mit der Proteolyse von Nidogen korrelierende Apoptose in epithelialen Zellen aus (Simpson *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1996).

1.8 *In vitro* und *in vivo* Modelle zur Analyse der Rolle von Nidogen

Die hochaffine Bindung sowie die unterschiedlichen Expressionsorte deuten auf eine Schlüsselfunktion der Interaktion von Laminin und Nidogen beim Aufbau von Basalmembranen an der epitheliomesenchymalen Grenze hin (Ekblom *et al.*, 1994; Dziadek, 1995; Pujuguet *et al.*, 2000). Die exogene Zugabe eines die Nidogen-Bindestelle enthaltenden Peptides (Lamy1III3-5) führt zu Desorganisation von Basalmembranen sowohl in embryoiden Körperchen (Tunggal *et al.*, 2003) als auch in Haut-ähnlichen Kokulturen (Breitkreutz *et al.*, 2004). Um die biologische Signifikanz der Laminin-Nidogen-Interaktion zu untersuchen wurde das Nidogen-bindende Modul Lamy1III4 in einer transgenen Mauslinie deletiert. Überraschenderweise führt die Deletion der Nidogen-Bindestelle weder zur Zerstörung der Basalmembran in embryoiden Körperchen noch in transgenen Mäusen (Mayer *et al.*, 1998; Willem *et al.*, 2002). Die Grundzüge der Embryonalentwicklung sind nicht inhibiert, allerdings ist die frühe Morphogenese der Nieren gestört. Die *lamy1III4*-defizienten Mäuse sterben direkt nach der Geburt aufgrund von Defekten in der Lungenentwicklung (Willem *et al.*, 2002).

Die Etablierung von Nidogen-defizienten Mauslinien ermöglichte die Analyse aller Funktionen von Nidogen. Die Deletion des Exons 3 im *Nid1*-Lokus führte zu einem amorphen Nidogen 1-Allel (Murshed *et al.*, 2000). Die lebensfähigen und fertilen Mäuse bildeten in den meisten Organen ultrastrukturell unauffällige Basalmembranen aus und zeigten nur schwache neurologische Defekte (Dong *et al.*, 2002). In adulten Geweben wie der Herz- und Skelettmuskulatur ist Nidogen 2 im Wildtyp nur schwach exprimiert. In

Nidogen 1-defizienten Kardiomyozyten und Sarkomeren wird Nidogen 2 umverteilt und deutlich stärker exprimiert, was auf einen kompensatorischen Mechanismus deutet (Murshed *et al.*, 2000; Miosge *et al.*, 2002). Die Nidogen 2-defiziente Mauslinie wurde im Rahmen eines *screenings* nach früh exprimierten und sekretierten Genen (*secretory gene trap*) generiert (Skarnes *et al.*, 1995) und zeigt keinerlei phänotypischen Veränderungen (Schymeinsky *et al.*, 2002). Mit der Analyse des Nidogen 1/2-Doppelknockouts konnte die vermutete Kompensation der beiden Nidogen-Isoformen bestätigt werden (Bader *et al.*, 2005). Die in Nidogen 1-defizienten Mäusen beobachteten neurologischen Defekte verstärken sich im Nidogen 2-heterozygoten Hintergrund deutlich. Nidogen 1/2-defiziente Mäuse sind nicht überlebensfähig und sterben innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt mit Defekten im Herzen und nicht vollständig differenziertem Lungenepithel. Der Vergleich mit dem Laminin $\gamma 1$ III4-defizienten Mausmodell zeigte, neben einigen spezifischen Gewebedefekten, einen Großteil überlappender Phänotypen (Bader *et al.*, 2005). Die Grundzüge der Embryonalentwicklung sind ähnlich der Perlecan und Kollagen IV-Defizienzen nicht beeinträchtigt (Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999; Costell *et al.*, 1999; Poschl *et al.*, 2004). Eine einfache elementare Basalmembran ist demnach ausreichend für die Funktionen während der Embryogenese wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Zellviabilität.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Funktionen von Nidogen bei der Entwicklung spezifischer Organe. Nidogen galt lange Zeit als eine Schlüsselkomponente in der Assemblierung von Basalmembranen. *In vitro* Analysen deuteten darauf hin, dass Nidogen und speziell seine Interaktion mit Laminin eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Bildung von Basalmembranen und damit auch für die epitheliale Morphogenese darstellt (Ekblom *et al.*, 1994; Kadoya *et al.*, 1997). Die Generierung sowohl Nidogen 1- als auch Nidogen 2-defizienter Mäuse zeigt nun, dass dieses Modell überdacht werden muß. Von allen Defizienzen in ubiquitären Basalmembrankomponenten führt der Verlust von Nidogen zu den am wenigsten drastischen Phänotypen (Bader *et al.*, 2005). Die meisten Basalmembranen assemblieren und erfüllen ihre Funktion während der Embryogenese. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Rolle von Nidogen während später Entwicklungsvorgänge zu untersuchen. Die Nidogen 1/2-defizienten Mäuse weisen fusionierte Finger und Zehen (Syndaktylie) sowie mit geringere Penetranz Verluste anteriorer Skelettelemente auf. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die entwicklungsbiologischen Ursachen dieser Extremitätenmißbildungen untersucht werden.

Die Erkenntnisse zur Funktion spezifischer Basalmembrankomponenten während der epithelialen Verzweigungsmorphogenese wurden hauptsächlich durch den Einsatz blockierender Antikörpern in Organkulturmodellen gewonnen (Kadoya and Yamashina, 2005). In den Nidogen 1/2-defizienten Tieren sollte untersucht werden, ob hier tatsächlich die Verzweigungsmorphogenese in den Speicheldrüsen inhibiert ist und inwiefern eventuelle Defekte *in vivo* kompensiert werden können.

Besonders interessant ist der Vergleich der Defizienz beider Nidogen-Isoformen mit der Inhibition der Interaktion zwischen Nidogen und Laminin. Er kann Aufschluß darüber geben, ob Nidogen neben der Verknüpfung anderer Moleküle in das Laminin-Netzwerk noch weitere Funktionen ausübt. Vorhergehende Arbeiten von Judith Tunggal hatten gezeigt, dass das die Nidogen-Bindestelle der Laminin γ 1-Kette tragende Peptid die Interaktion von Laminin und Nidogen in embryoiden Körperchen inhibieren kann (Tunggal *et al.*, 2003). Dieses Modell sollte nun auf die Entwicklung und Differenzierung der Milchdrüse übertragen werden. Dazu sollten transgene Mauslinien etabliert werden, die während spezifischer Entwicklungsstadien einen Überschuß an Lamy1III4 exprimieren und dessen Einfluß auf die epitheliale Differenzierung untersucht werden.

2 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Nidogen während entwicklungsbiologischer Vorgänge analysiert werden. Die Ergebnisse gliedern sich in drei Teile. Für beide Nidogen-Isoformen lagen bereits charakterisierte amorphe Mauslinien vor (Murshed *et al.*, 2000; Schymeinsky *et al.*, 2002). Nidogen 1/2-doppelmutante Mäuse sind bei der Geburt bis zu 30% kleiner als ihre Geschwister und sterben innerhalb der ersten 24h aufgrund von Defekten in der Lunge und im Herzen (Bader *et al.*, 2005). Neben diesen bereits beschriebenen Phänotypen weisen Nidogen 1/2-defiziente Individuen fusionierte Finger und Zehen auf (Syndaktylie). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dieser Defekt in den Extremitäten analysiert. Im zweiten Teil wurde die Auswirkung der Nidogen-Defizienz auf die Verzweigungsmorphogenese in den Speicheldrüsen untersucht. Nidogen bindet mit hoher Affinität an Laminin und ist in der Lage *in vitro* ternäre Komplexe der Hauptkomponenten von Basalmembranen zu bilden (Fox *et al.*, 1991; Aumailley *et al.*, 1993). Die Generierung transgener Mauslinien, welche im differenzierenden Milchdrüsenepithel die Nidogen-Bindestelle der Laminin γ 1-Kette (Lamy1III3-5) sezernieren und so kompetitiv die Interaktion von Laminin und Nidogen inhibieren sollten, ist im dritten Teil beschrieben.

2.1 Nidogen1/2-defiziente Mäuse leiden unter Syndaktylie

Während Mäuse, die mindestens ein WT Nidogen 1 oder Nidogen 2-Allel besitzen, bei der Geburt normal ausgebildete Extremitäten zeigen, weisen Nidogen 1/2-defiziente Mäuse Syndaktylie der Vorder- als auch Hinterextremitäten mit vollständiger Penetranz auf. Die Anzahl der von den Fusionen betroffenen Glieder variiert zwischen den Individuen. In Abbildung 2.1.1, I sind die vorderen Autopodien einer Nidogen-doppelmutanten Maus am Tag P1 (postnatal) mit stark ausgeprägter sowie mit schwach ausgeprägter Syndaktylie dargestellt. Die Vorderextremitäten sind stärker fusioniert als die Hinterextremitäten, während die beiden Körperhälften gleich stark betroffen sind. Die Extremitäten Nidogen 1-heterozygoter, Nidogen 2-mutanter (*Nid1*^{+/+}; *Nid2*^{-/-}) Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten und wurden in der weiteren Analyse als Kontrollen verwendet.

Um die von der Fusion betroffenen Elemente genauer zu charakterisieren wurden die Knochen und Knorpelgewebe mit Alizarin-Rot und Alcian-Blau angefärbt (Abb. 2.1.1, II). Betroffen von den Verwachsungen ist die Haut entlang der Finger bzw. Zehen I bis IV, wobei entweder zwei, drei oder vier benachbarte Glieder von der Basis bis zur Spitze miteinander verbunden sind. Das Glied V verbleibt immer getrennt. Die Skelettelemente liegen weitgehend separiert und entsprechend ihrer Position differenziert vor. Missbildungen der Knochen sind nur an den distalen Phalangen ersichtlich. Bei Individuen mit stark ausgeprägtem Phänotyp sind diese miteinander assoziiert. In der Maus sollten zum Zeitpunkt der Geburt die Ossifikationszentren der Mittelhandknochen 2-5, der proximalen Phalangen 2-5, der mittleren Phalangen 2-4 sowie alle distalen Phalangen ausgebildet sein. Nidogen 1/2-defiziente Mäuse zeigen eine leicht verzögerte Ossifikation, die etwa einem Embryonaltag entspricht (Abb. 2.1.1, II B, E).

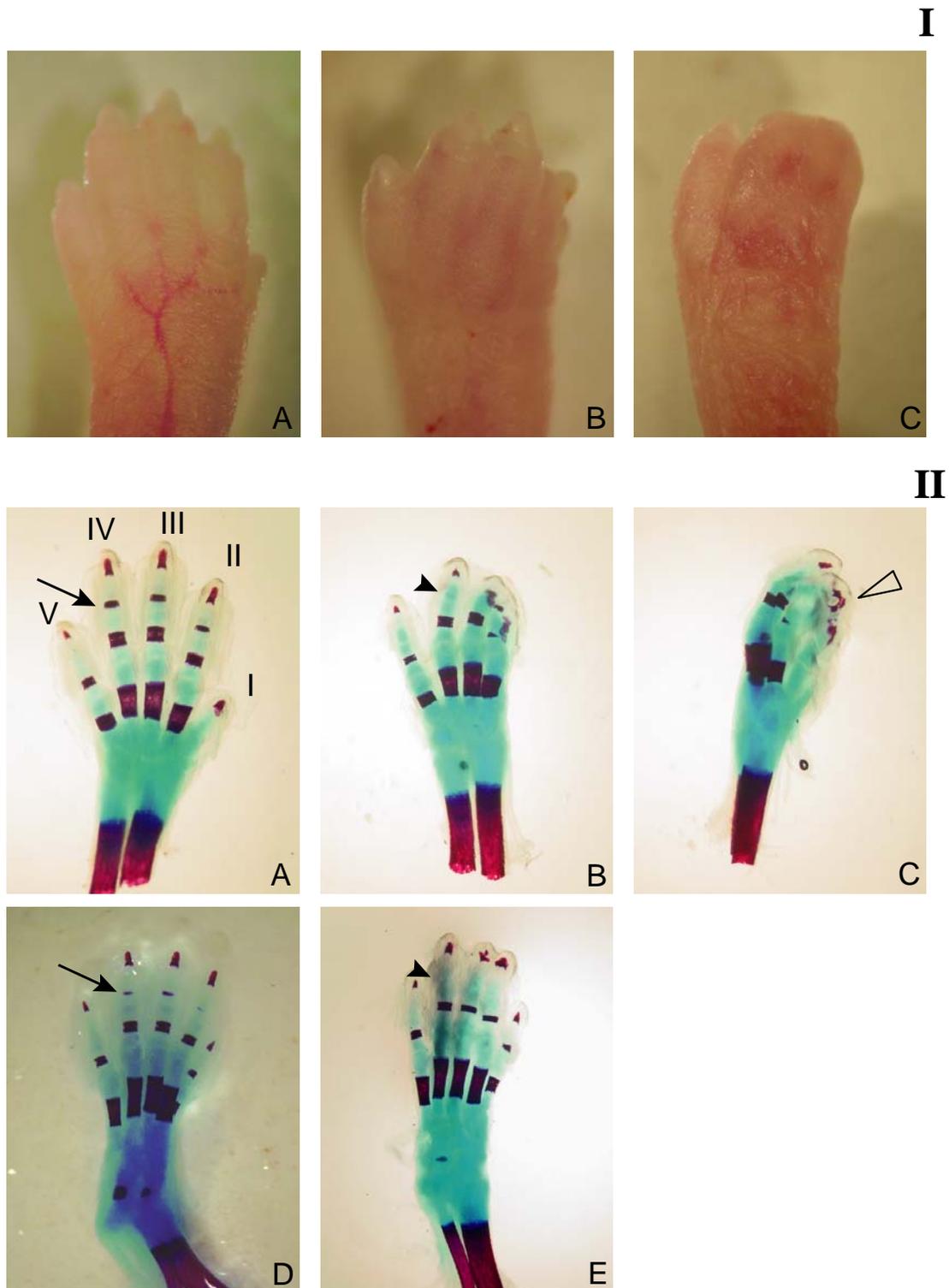


Abbildung 2.1.1: Syndaktylie mit vollständiger Penetranz. I: Photographien Nidogen 2- (A) bzw. Nidogen 1/2-defizienter vorderer linker Autopodien (B, C). Die Anzahl der fusionierten Finger variiert zwischen unterschiedlichen Individuen. **II:** Alizarin-Rot/Alcian-Blau Färbung am Tag P1. A: Nidogen 2-defiziente Hand, Aufsicht von dorsal. Die Finger sind von anterior nach posterior durchnummeriert. Der Pfeil deutet auf das Ossifikationszentrum im mittleren Phalanx IV. B, C: Nidogen 1/2-defiziente Hand von dorsal (B) bzw. lateral (C). Die offene Pfeilspitze in C deutet auf miteinander verbundene distale Phalangen der Finger I-III. Die Syndaktylie ist in den hinteren Extremitäten weniger stark ausgebildet. D: Nidogen 2-defizienter Fuß, E: Nidogen 1/2-defizienter Fuß. In Nidogen 1/2-defizienten Autopodien hat die Ossifikation der mittleren Phalangen noch nicht eingesetzt (Pfeilspitze in B und E).

2.1.1 Basalmembran-Defekte während der Extremitätenentwicklung

Die Entwicklung der Extremitäten beginnt in der Maus am 10. Tag nach der Befruchtung (10dpc, E10). Bis zum E14 sind alle Elemente angelegt und die Musterbildung ist abgeschlossen. Zur Analyse der embryonalen Grundlagen der Syndakylie in Nidogen 1/2-defizienten Extremitäten wurden Nidogen 1+/-; Nidogen 2-/- Mäuse untereinander verpaart und die Embryonen im entsprechenden Zeitraum analysiert. An den Stadien E9,5 bis E13,5 waren 22% (n=390) der Embryonen Nidogen 1/2-defizient. Dies entspricht nahezu dem erwarteten Mendelschen Verhältnis. Im Folgenden wird die Entwicklung am Beispiel der vorderen Extremitätenknospen dargestellt. Die hier beschriebenen Beobachtungen treffen mit etwas geringer ausgeprägten Defekten auch auf die hinteren Extremitäten zu.

Während der Entwicklung der Gliedmaßen bilden sich mehrere Signalzentren in der Extremitätenknospe aus. Distal erstreckt sich entlang der anterioposterioren Achse die apikale ektodermale Randleiste (AER), welche durch eine Basalmembran vom Mesoderm getrennt ist. Zur Analyse dieser Struktur wurden transversale Schnitte von in Paraffin eingebetteten, E10,5 datierten Extremitätenknospen angefertigt und mittels indirekter Immunfluoreszenz die Verteilung der ubiquitären Basalmembran-Komponenten Laminin, Kollagen IV und Perlecan untersucht (Abb. 2.1.2). Das hier verwendete polyklonale Antiserum ist gegen Laminin 111 gerichtet und erkennt die meisten Laminin-Isoformen. In Schnitten von Embryonen, welche mindestens ein Wildtyp (WT) Nidogen 1-Allel tragen, erstreckt sich unter dem gesamten, die Extremitätenknospe abdeckenden Ektoderm, eine kontinuierliche Deposition von Basalmembran-Markern. In Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen hingegen zeigen Laminin, Perlecan und Kollagen IV ein weniger klar definiertes Färbemuster. Während insbesondere für Laminin eine verstärkte Immunreaktivität in der AER festgestellt werden kann (Abb. 2.1.2, A, J), und Perlecan sowie Kollagen IV außerdem eine breite Verteilung im Mesenchym aufweisen, fehlt die typische lineare Lokalisation unterhalb des Ektoderms. Hiervon ist neben dem distalen (unterhalb der AER) auch der ventrale Bereich der Extremitätenknospe betroffen. In anderen Regionen des Embryos ist trotz einer etwas diffuseren Verteilung die Basalmembran-typische Lokalisation unterhalb von Epithelien jedoch nicht aufgehoben.

Die AER der Maus ist ein stratifiziertes Epithel, das sich vom übrigen einschichtigen, die Extremitätenknospe umschließenden Ektoderm abhebt. Diese epitheliale Struktur bildet sich erst nachdem die Extremitätenknospe als lateraler Auswuchs erscheint. In transversalen Schnitten Nidogen 1/2-defizienter Embryonen am Tag 9,5pc ist die Lokalisation von

Basalmembran-Markern unterhalb des gesamten Ektoderms noch intakt (Daten nicht gezeigt). Erst die stark proliferierende AER führt demnach zu einer Zerstörung der Laminin-Organisation. Die AER selbst erscheint in vielen Schnitten durch E10,5 Nidogen 1/2-defiziente Extremitätenanlagen hypertroph und entlang der dorsoventral-Achse verbreitert (Abb. 2.1.2, H, I.). Allerdings finden sich in denselben Extremitätenknospen lateral auch Bereiche, in denen die AER extrem abgeflacht ist (Abb. 2.1.2, J).

Diese Beobachtungen konnten anhand von ultrastrukturellen Daten des gleichen Entwicklungsstadiums bestätigt werden. Während in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von Kontrollschnitten die typische Gliederung der Basalmembran in Lamina lucida und Lamina densa dargestellt ist, können in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen diese Strukturen kaum ausgemacht werden (Abb. 2.1.3, D, E). Lichtmikroskopisch ist die Region der Basalmembran leicht zu erkennen, da sie eine Trennschicht zwischen Epithel und Mesenchym bildet. Die angrenzenden Epithelzellen haben alle basal Kontakt zur Basalmembran und sind somit polarisiert. In den doppelmutanten Extremitätenknospen hingegen verschwimmt diese optische Grenze (Abb. 2.1.3, A', B'). Die Zellen der AER zeigen morphologische Veränderungen wie Chromatinverdichtungen und Zellschrumpfung.

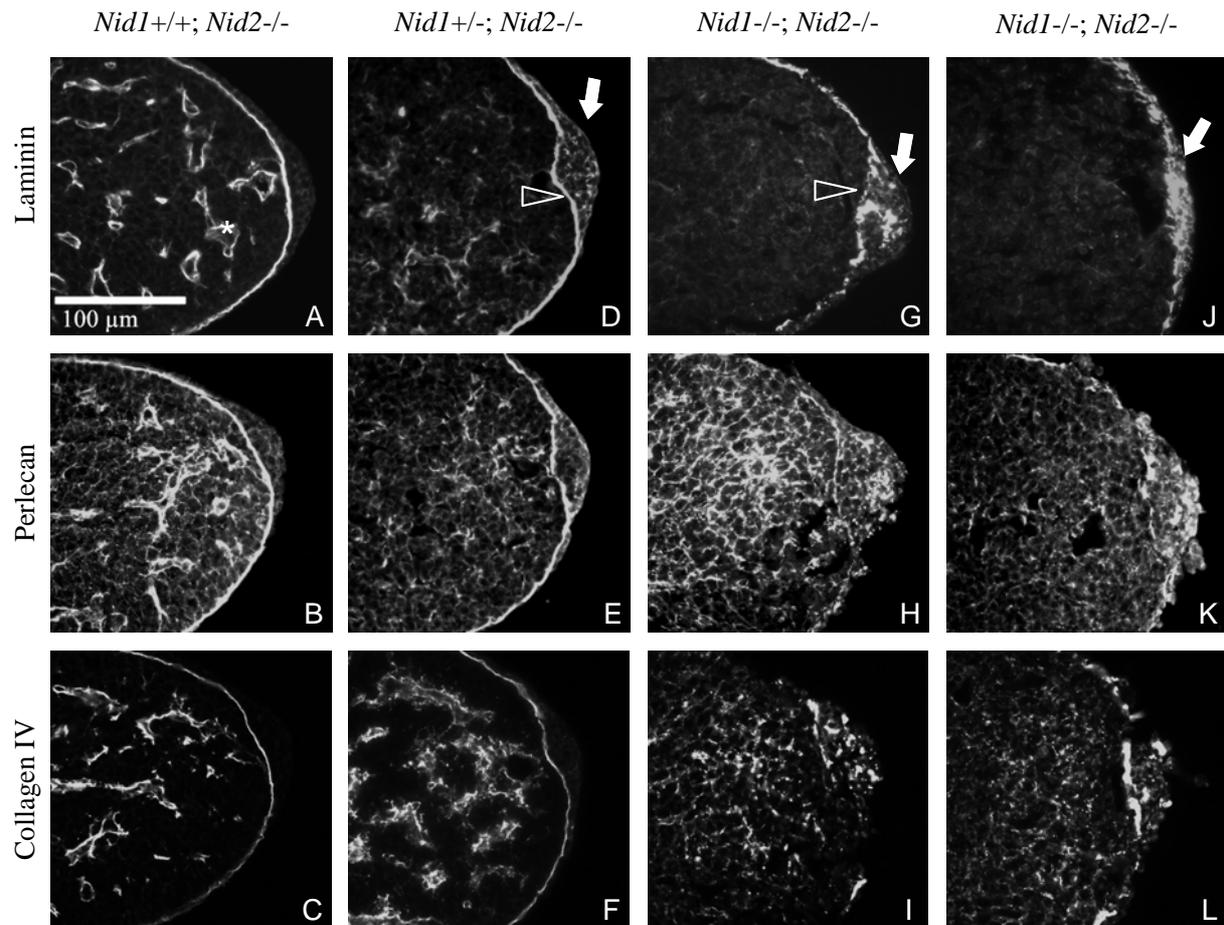


Abbildung 2.1.2: In Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen ist die Lokalisation von Basalmembran-Markern verändert. Immunfluoreszenzen auf transversalen Schnitten durch E10,5 Embryonen. In *Nid1*^{+/+}; *Nid2*^{-/-} sowie *Nid1*^{+/-}; *Nid2*^{-/-} Knospen (A-F) sind die Basalmembranmarkern Laminin, Perlecan und Kollagen IV unterhalb des Epithels (Pfeilspitze) und um die Endothelzellen junger Blutgefäße (Asterisk) lokalisiert. In Nidogen-doppelmutanten Extremitätenknospen (G-L) findet sich keine kontinuierliche Deposition unterhalb der AER (Pfeilspitze in G). Die AER ist in einigen Schnitten hypertroph (Pfeil in G), während sie sich in anderen Schnittebenen kaum vom übrigen Ektoderm abhebt (Pfeil in J). Die AER zeigt in Nidogen 1/2-defizienten Schnitten eine verstärkte Immunreaktivität der drei Marker. Im Mesenchym sind Perlecan und Kollagen IV diffus verteilt und nicht an den Endothelien konzentriert.

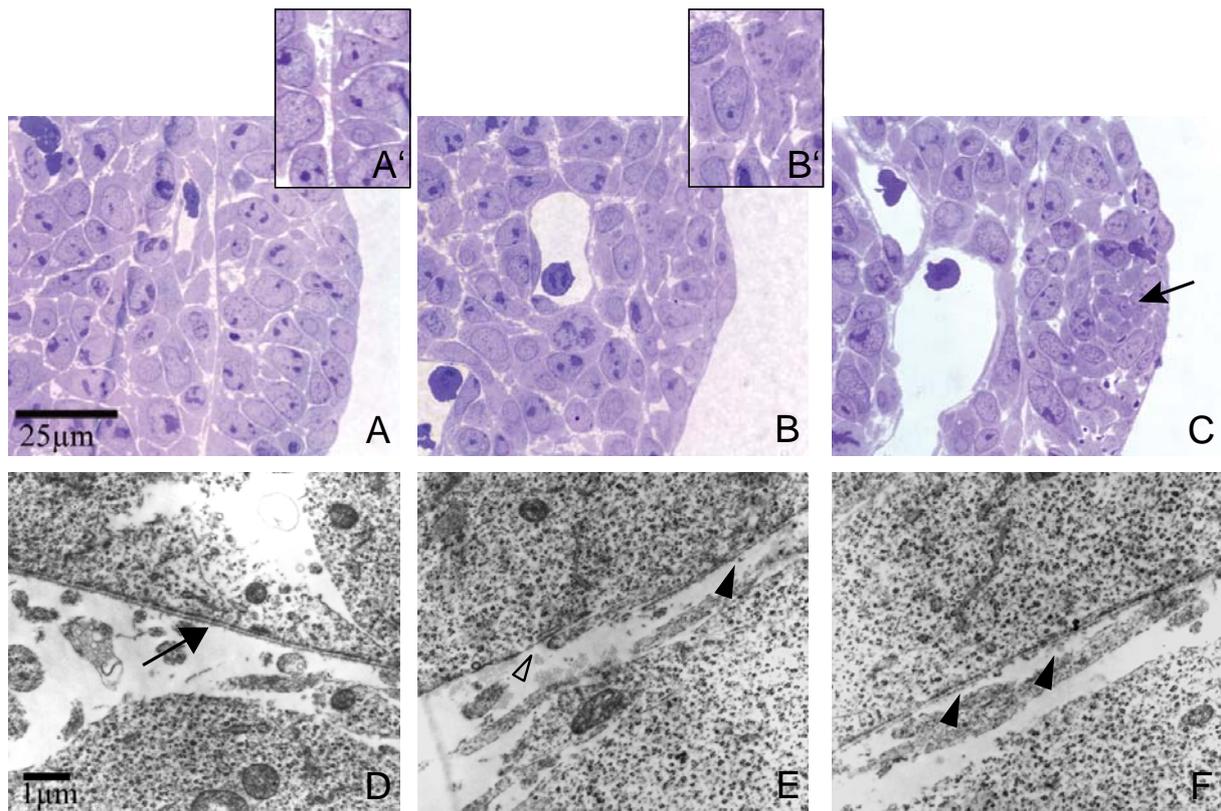


Abbildung 2.1.3: In Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen ist apikal keine Basalmembran ausgebildet. Mit Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitte Nidogen 2-defizienter Kontroll- (A) sowie Nidogen 1/2-defizienter (B,C) Extremitätenknospen. Die Detailansichten A' und B' zeigen den Grenzbereich zwischen Mesenchym und Epithel. Der Pfeil in C deutet auf morphologisch veränderte Zellen. In der unteren Reihe (D-F) sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der entsprechenden Bereiche gezeigt. D: Kontrolle; E,F: Nidogen 1/2-defizient. Der Pfeil in D deutet auf die elektronenmikroskopisch sichtbare Lamina lucida und Lamina densa. In den Doppelmutanten ist die Lamina densa porös (dunkle Pfeilspitze) bzw. es ist keine organisierte Extrazelluläre Matrix sichtbar (offene Pfeilspitze in E).

2.1.2 Die Expression von Laminin-Rezeptoren ist reduziert

Der Verlust einer intakten Basalmembran im apikalen Bereich Nidogen 1/2-defizienter Extremitätenknospen führte zu der Frage, ob die Expression und Lokalisation von Rezeptoren, welche das Laminin-Netzwerk mit den Zellen verbinden, auch verändert sind. Die Integrine stellen eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren, die u.a. an Komponenten der ECM binden. Zu den Laminin-Rezeptoren gehören Integrine der $\beta 1$ -Familie sowie das Integrin $\alpha 6\beta 4$. Um eine eventuell veränderte Integrin-Lokalisation zu überprüfen, wurden Doppelfärbungen von Laminin und $\beta 1$ -Integrin angefertigt (Abb. 2.1.4, I). Während in Kontrollschnitten $\beta 1$ -Integrin mit Laminin an der subektodermalen Basalmembran kolokalisiert, konnte in Nidogen 1/2-defizienten Tieren nur eine Kolokalisation in den epithelialen Zellen der AER detektiert werden (Abb. 2.1.4, I, C, F). Die Aufnahmen mit einem konfokalen Lasermikroskop ermöglichten die Analyse einzelner Ebenen des Präparates und zeigen deutlich, dass in der Nidogen 1/2-defizienten AER weniger $\beta 1$ -Integrin vorhanden ist (Abb. 2.1.4, I, G, H).

Ein weiterer prominenter Laminin-Rezeptor ist $\alpha 6\beta 4$ -Integrin. Immunfluoreszenzen mit einem Antikörper, der gegen die $\alpha 6$ -Untereinheit von Integrin-Heterodimeren gerichtet ist, ergeben ein ähnliches Färbemuster. Auch hier ist das Integrin nicht an der basalen Seite der ektodermalen Randleistenzellen in Nidogen 1/2-defizienten Embryonen lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Veränderungen im Expressionsprofil der Randleistenzellen und den beobachteten morphologischen Veränderungen (siehe Abb. 2.1.3) wurde überprüft, ob die ektodermalen Zellen auch ohne den Kontakt zur BM ihren epithelialen Charakter aufrecht erhalten. Das epitheliale Adhäsionsmolekül E-Cadherin ist in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen weiterhin im gesamten Ektoderm exprimiert (Abb. 2.1.4, II). Der Verlust einer intakten Basalmembran führt demnach nicht zu einer mesenchymalen Transition der angrenzenden epithelialen Gewebe.

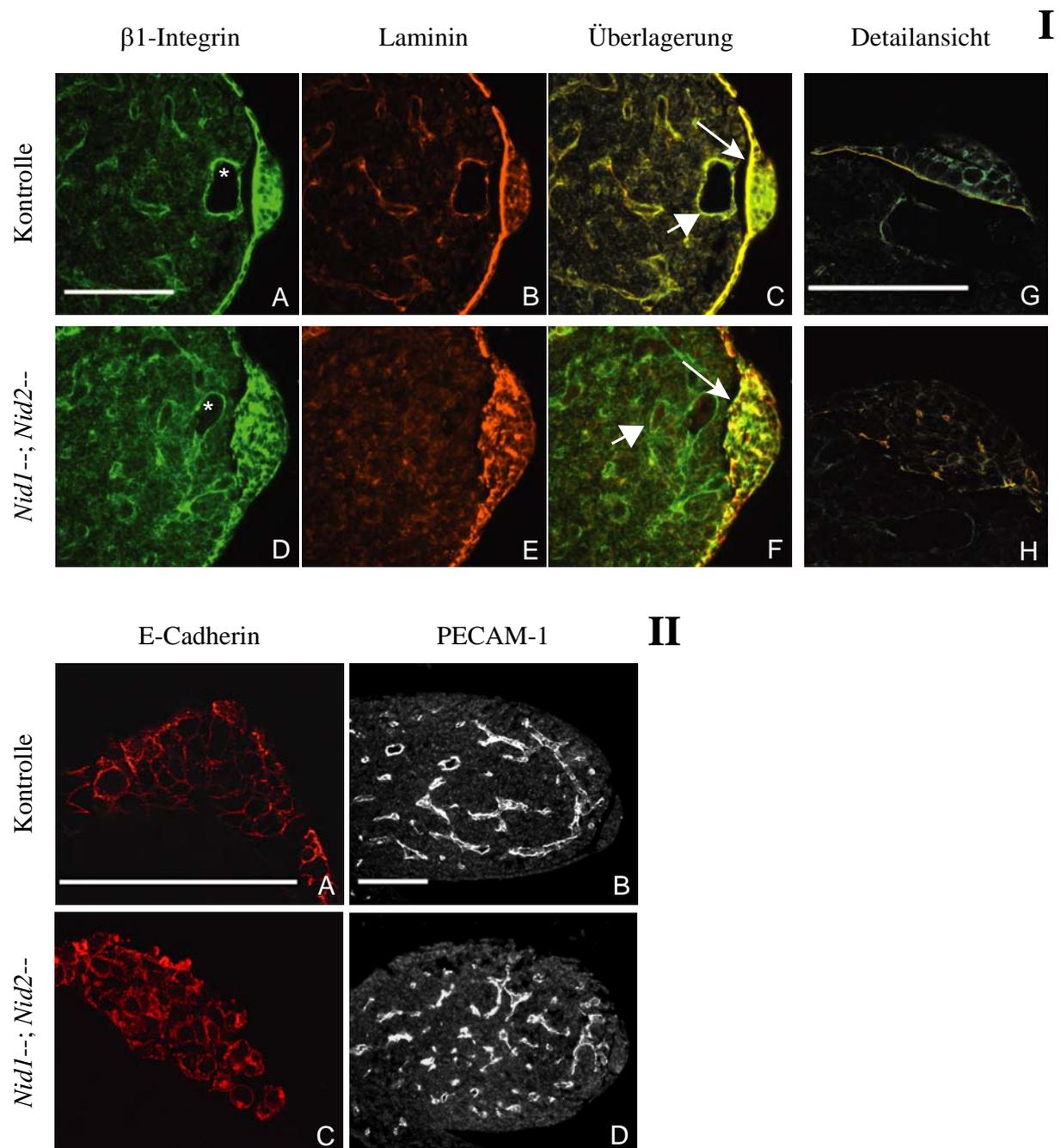


Abbildung 2.1.4: Immunlokalisation von epitheliale und endotheliale $\beta 1$ -Integrin in der Extremitätenknospe am E10.5. I: A-F: konventionelle Fluoreszenzmikroskopie. Anti- $\beta 1$ -Integrin färbt sowohl die epithelialen Zellen als auch Wände mesenchymaler Blutgefäße (Asterisk). Diese Verteilung wird auch in Nidogen 1/2-defizienten Knospen aufrechterhalten (D). Die in der Kontrolle beobachtete Kolokalisation von Laminin und $\beta 1$ -Integrin unterhalb des Epithels sowie des Endothels (Pfeile in C und G) ist im Nidogen 1/2-defizienten Gewebe zerstört. G,H: konfokale Aufnahmen derselben Präparate. **II:** A,C: konfokale Aufnahmen der Immunlokalisation von E-Cadherin in der AER. B, D: Markierung der Blutgefäße mit dem endothelialen Zellmarker PECAM-1. Die Skalierungsbalken repräsentieren jeweils 100 μ m.

2.1.3 Die endothelialen Zellen der frühen Blutgefäße sezernieren keine Basalmembran

Wie in Abbildung 2.1.2 dargestellt ist die Deposition der Basalmembran-Komponenten Laminin, Perlecan und Kollagen IV unter den Endothelien sich bildender Blutgefäßen am Tag 10,5 pc stark reduziert, was die Frage aufwirft, ob in Nidogen 1/2-defizienten Embryonen die Angiogenese beeinträchtigt ist. Eine Immunfärbung mit dem endothelialen Marker PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, CD31) zeigte keine auffälligen Unterschiede in der Dichte junger Kapillaren im Vergleich zu Kontrollembryonen. Wie aus Abbildung 2.1.4 hervorgeht, exprimieren in den Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen die jungen Blutgefäße β 1-Integrine ohne deren Liganden Laminin. Erst in späteren Entwicklungsstadien organisiert sich auch in Nidogen-doppelmutanten Embryonen eine endotheliale Basalmembran. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch das vaskuläre System nicht genauer untersucht.

2.1.4 Der Verlust beider Nidogen-Isoformen führt zu verstärkter Apoptose in der Extremitätenknospe

Wie bereits unter 2.1.1 beschrieben treten die Randleistenzellen in Nidogen 1/2-defizienten Embryonen nicht in Kontakt mit einer Basalmembran und weisen morphologische Veränderungen auf, die charakteristisch für sterbende Zellen sind (Abb. 2.1.3, C). Mittels *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Verlust einer Basalmembran zum Programmierten Zelltod (PCD) epithelialer Zellen führen kann (Pullan *et al.*, 1996). Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden apoptotische Zellen mit dem TUNEL-Assay detektiert.

In der AER unterlaufen regelmäßig Zellen den PCD. Abbildung 2.1.5 zeigt repräsentative Schnitte durch E10,5 Extremitätenknospen Nidogen 1/2-defizienter und Kontroll-Embryonen. Während im WT-Ektoderm nur vereinzelt apoptotische Zellen auftraten, bildeten sich in den Randleisten doppelmutanter Knospen Cluster von sterbenden Zellen aus. Eine im Vergleich zur AER weniger drastische, aber dennoch prominente Apoptose-positive Zellpopulation konnte im proximalen Mesenchym ausgemacht werden (Abb. 2.1.5, C).

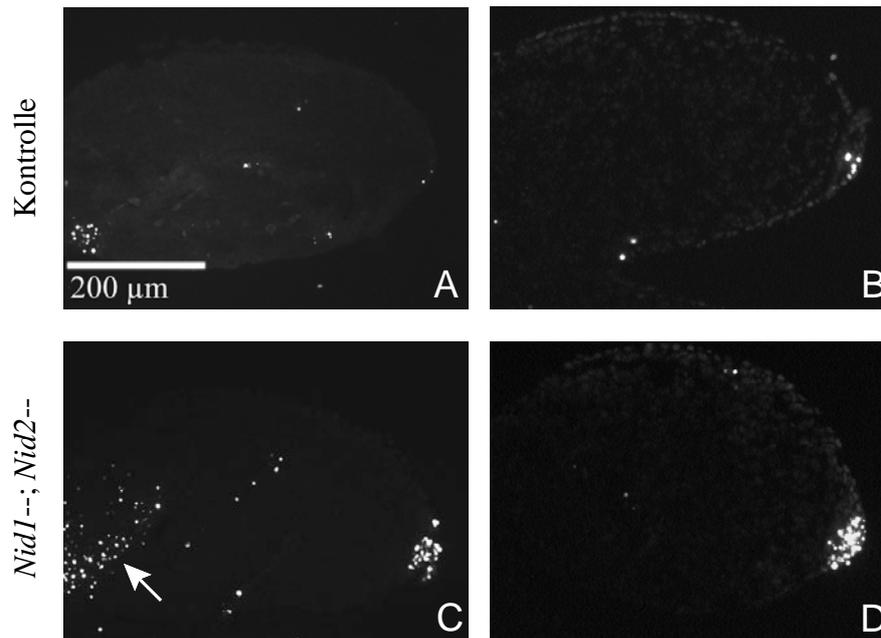


Abbildung 2.1.5: In Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen treten vermehrt apoptotische Zellen auf. Apoptotische Zellen wurden mit dem TUNEL-System detektiert. Im Kontrollgewebe (A, B) sind vereinzelt Apoptose-positive Zellen in der AER sowie einem begrenzten Bereich des proximalen Mesoderms zu finden. Bei Verlust von Nidogen 1 und 2 (C, D) unterlaufen deutlich mehr Zellen der AER den programmierten Zelltod. Zusätzlich konnte eine verstärkte apoptotische Aktivität im proximalen Mesoderm detektiert werden (Pfeil in C).

2.1.5 Die AER ist ungleichmäßig entlang der anterioposterior-Achse ausgebildet

Da die AER sich aufgrund ihres stratifizierten Aufbaus deutlich vom restlichen Ektoderm unterscheidet, kann sie auch rasterelektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Abb. 2.1.6). In Kontrollindividuen ist die AER zum Zeitpunkt E10,5 als gleichmäßige Erhebung entlang der anterioposterior-Achse in den vorderen Extremitätenknospen zu erkennen. In Nidogen 1/2-defizienten Embryonen hingegen erscheint die Oberfläche eben. Nur am distalsten Ende der Knospe ist die AER deutlich ausgebildet, wodurch der Eindruck eines Zellhaufens an der Spitze der Extremitätenknospe erzeugt wird. Die gesamte Extremitätenknospe ist kleiner und verschmälert sich entlang der anterioposterior-Achse nach distal hin. Dies ermöglicht die visuelle Genotypisierung schon in diesem frühen Embryonalstadium. Detailaufnahmen aus dem distalen Bereich zeigen, dass sich die abgeflachte, der AER entsprechende Region in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen breiter als im WT entlang der dorsoventral-Achse erstreckt (Abb. 2.1.6, C, F; siehe auch Abb. 2.1.2).

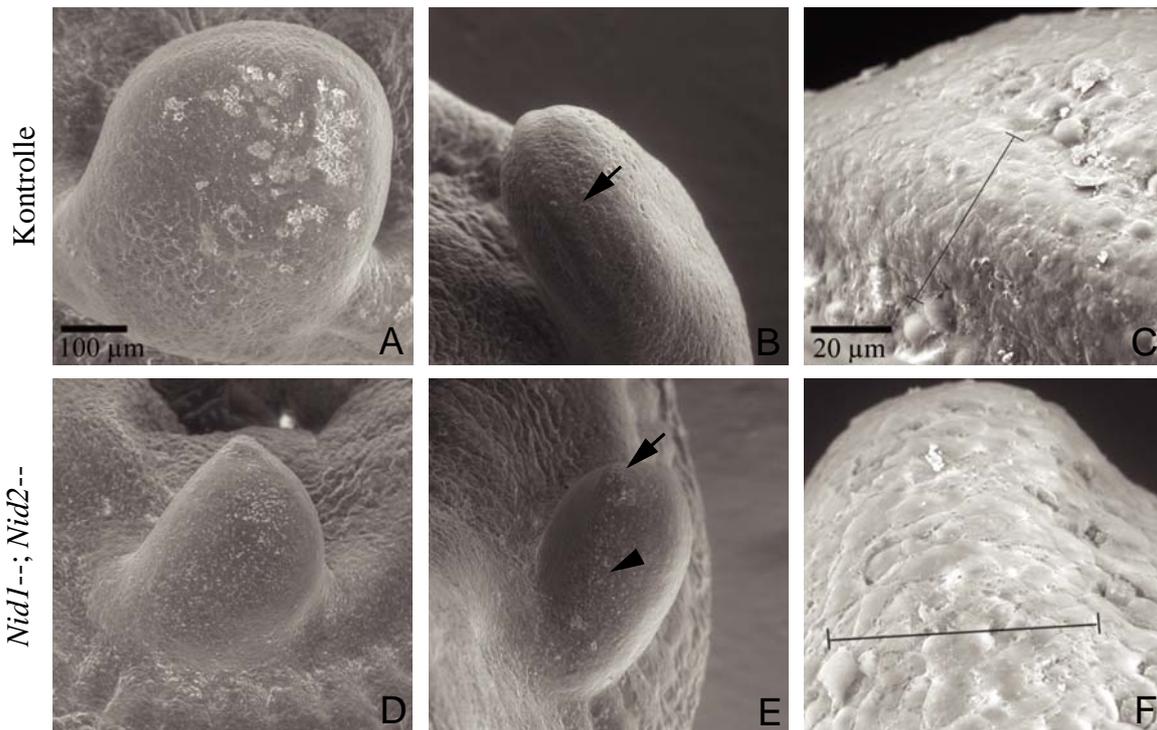


Abbildung 2.1.6: Die AER ist in weiten Bereichen der Nidogen 1/2-defizienten Knospen abgeflacht. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von vorderen E10,5 Extremitätenknospen.. A, D: Aufsicht von dorsal, anterior zeigt nach links. Die Extremitätenknospe des Nidogen-doppelmutanten Embryos ist deutlich kleiner und besonders im anterioren Bereich deformiert. B, E: Aufsicht von anterior, ventral zeigt nach links. Der Pfeil deutet auf die Randleiste. Im Nidogen 1/2-defizienten Embryo ist diese Erhebung nur distal ausgeprägt. Die Pfeilspitze markiert den dorsoventralen Grenzbereich, entlang dessen die AER verläuft. C, F: Die Detailaufnahmen zeigen den distalen Bereich der AER. Die Balken repräsentieren die Breite der AER, diese entspricht in der Kontrolle $\sim 50\mu\text{m}$ und in der Nidogen-doppelmutanten Knospe $\sim 70\mu\text{m}$.

2.1.6 Signalleistung der AER

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen in der AER und der Verlust einer unterliegenden BM führten zu der Frage, ob diese epithelialen Zellen ihre Signalwirkung aufrechterhalten können. Das vermutlich wichtigste sezernierte Molekül der AER ist FGF8. Es wird während des Auswachsens der Extremitätenknospe von allen epithelialen Zellen der AER exprimiert und unterstützt die Proliferation in dem darunter liegenden Mesenchym.

Mittels *in situ* Hybridisierungen wurde die Expression von *Fgf8* an dem zuvor beschriebenen Embryonalstadium 10,5 untersucht. Die Zellen der AER exprimieren sowohl in den Kontrollen als auch in Nidogen 1/2-defizienten Knospen vergleichbare Mengen an *Fgf8*-mRNA (Abb. 2.1.7, A-D). Allerdings verläuft die Schicht *Fgf8*-exprimierender Zellen in

den doppelmutanten Embryonen nicht gleichmäßig über die gesamte Extremitätenknospe. Distal verbreitert sich diese Domäne, während sie in den anterioren als auch posterioren Bereichen unregelmäßig wird und schließlich abbricht. Am Tag 11,5 pc können häufig Bereiche beobachtet werden, an denen die Expressionsdomäne von nicht exprimierenden Zellen durchbrochen wird (Abb. 2.1.7, E-J). Die AER erscheint dann medial unterbrochen und deutlich geweitet. Die hinteren Extremitätenknospen, die sich im Vergleich zu den vorderen Anlagen mit einer Verzögerung von $\sim 0,5$ Tagen entwickeln, zeigen zu diesem Zeitpunkt auch am Apex ein hypotroph ausgebildetes Ektoderm, welches keine *Fgf8*-mRNA exprimiert (Abb. 2.1.7, I, J).

In Abbildung 2.1.7, E und H wird deutlich, dass bereits am Tag 11,5 pc die Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen insbesondere entlang der anterioposterioren Achse verkürzt sind. Dieser Größenunterschied konnte häufig beobachtet werden, ohne dass die betreffenden Embryonen einen allgemeinen Entwicklungsrückstand aufwiesen (Anzahl der Somiten mit Kontrollen vergleichbar). Eine mögliche Ursache könnte die verstärkte apoptotische Region im proximalen Mesoderm sein, die am Tag 10,5 pc gefunden wurde (Abb. 2.1.5, C). Da FGF8 außerdem die mesodermalen Zellen der Extremitätenprimordien in einem undifferenzierten, proliferierenden Zustand hält, wäre auch eine verringerte Anzahl mitotisch aktiver Zellen im Mesoderm denkbar. Die Markierung proliferierender Zellen mit einem Antikörper gegen das in den aktiven Phasen des Zellzyklus gebildete Ki67-Antigen ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zum WT (Daten nicht gezeigt).

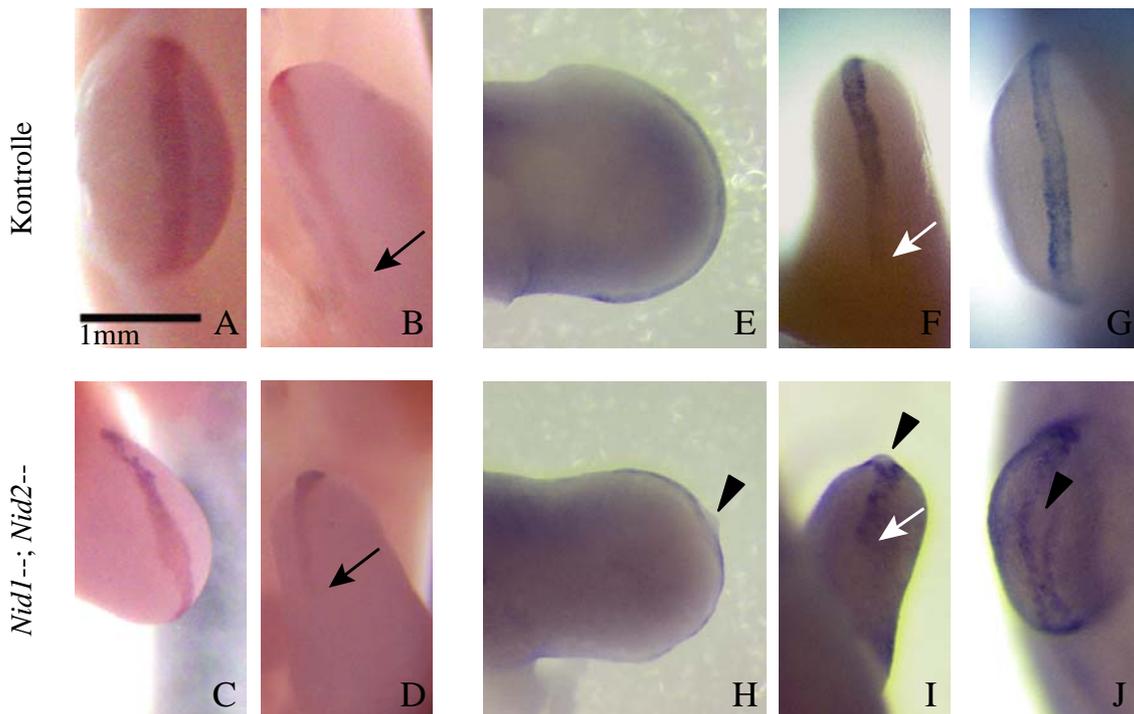


Abbildung 2.1.7: *In situ*-Hybridisierung mit einer *Fgf8*-spezifischen Sonde. A-D: Vorderextremitäten am Tag 10,5pc; E,H: Vorderextremitäten am Tag 11,5pc; F,G,I,J: Hinterextremitäten am Tag 11,5pc. Die Pfeile deuten auf den Beginn der Expressionsdomäne. Sie ist in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen proximal verkürzt. Die Pfeilspitzen markieren *Fgf8*-negative Zellen innerhalb der Randleiste (H-J).

2.1.7 Die Basalmembran wird verzögert gebildet und weist Lücken auf, durch die mesenchymale Zellen dringen

Nach der Spezifizierung der distalsten Skelettelemente wird die AER zurückgebildet und begrenzt damit vermutlich das Wachstum der Extremitäten (Rubin and Saunders, 1972; Rowe and Fallon, 1982; Saunders, 1998). Dies geschieht in der Maus zwischen dem E12 und 13. Zu diesem Zeitpunkt hat sich auch in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen eine kontinuierliche Deposition von Basalmembrankomponenten unterhalb des Epithels ausgebildet. Mit zunehmenden Entwicklungsstadien wird die Basalmembran stärker und am E13,5 ist eine vergleichbare Immunreaktivität in Nidogen-doppelmutanten und Kontroll-Embryonen zu beobachten (Abb. 2.1.8, A, D). Am apikalen Bereich, dem vormaligen Ort der AER, verbleiben jedoch große Lücken in der Basalmembran. Die Gegenfärbung mit dem epithelialen Zell-Marker E-Cadherin zeigt, dass mesenchymale Zellen durch diese Lücken dringen und dabei epitheliale Zellen verdrängen.

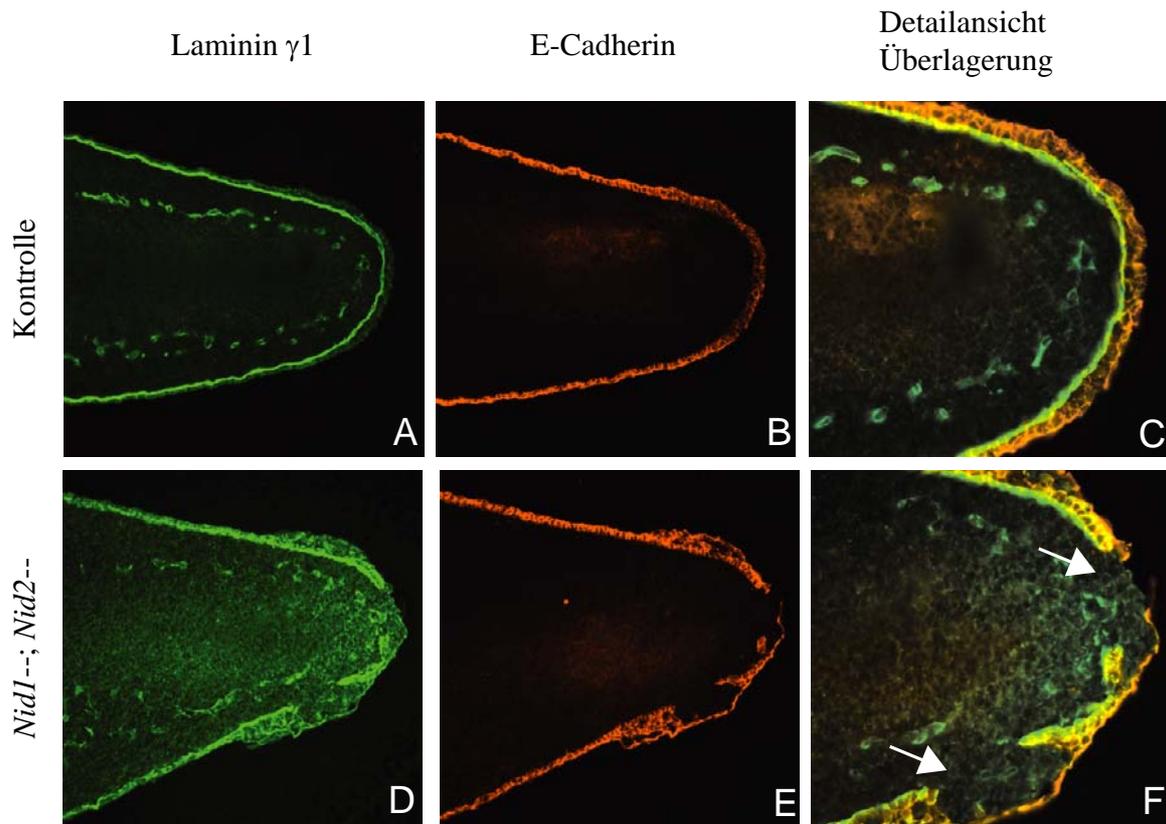


Abbildung 2.1.8: Die subektodermale BM regeneriert größtenteils bis zum Tag 13pc. Immunfluoreszenzen auf transversalen Schnitten durch E13,5 Handplatten. In den Nidogen 1/2-defizienten Anlagen hat sich Laminin linear unterhalb des Epithels angelagert. Distal bestehen Lücken in der Lamininlokalisierung. Die Gegenfärbung mit E-Cadherin zeigt, dass durch diese Lücken mesenchymale Zellen dringen (Pfeile in F).

Longitudinale Schnitte, die von dem gleichen Embryonalstadium anfertigt wurden, zeigen, dass in den Bereichen, in denen mesenchymales Material ausgetreten ist, das Epithel nun mehrschichtig vorliegt und sich vom exogenen Mesenchym durch eine weitere, zusätzliche Basalmembran abtrennt (Abb. 2.1.9, C, D). Nach außen hin bedeckt nur noch ein dünnes Epithel mit direktem Kontakt zu mesenchymalen Zellen die Handplatte.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in diesem Entwicklungsstadium machen die Veränderungen im apikalen Bereich der Handplatte deutlich. Das mesenchymale Gewebe verbindet benachbarte Glieder wie eine aufgesetzte Kappe. Das abschließende Gewebe in diesen Bereichen ist unregelmäßig (Abb. 2.1.9, A, B).

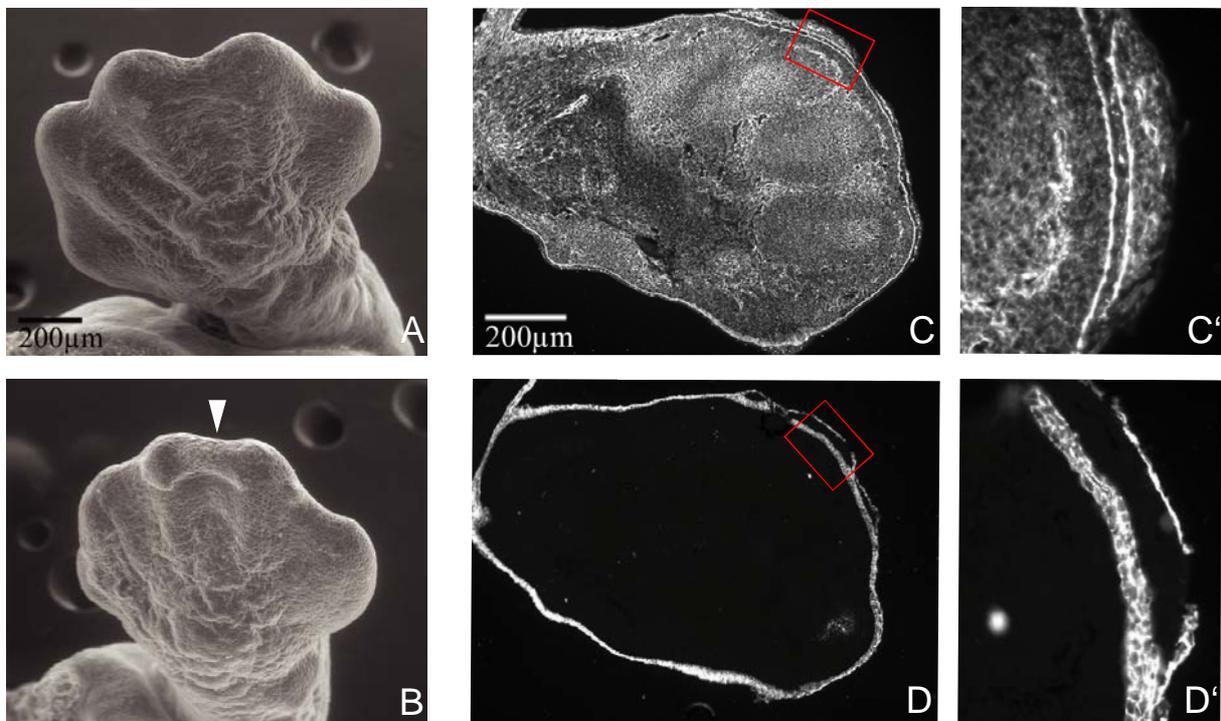


Abbildung 2.1.9: Nidogen 1/2-defiziente Handplatten werden distal von mesenchymalem Material bedeckt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Vorderextremitäten eines Kontroll- (A) bzw. Nidogen 1/2-defizienten (B) E13,5 Embryos. Aufsicht von ventral, anterior ist links. Die Pfeilspitze in B deutet auf zusätzliches Gewebe, welches benachbarte Fingerstrahlen miteinander verbindet. C, D: Immunfluoreszenzen auf Longitudinalschnitten durch Nidogen 1/2-defiziente Handplatten am Tag 13,5pc. Anterior ist oben. Die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen Perlecan (C) bzw. E-Cadherin (D). Die in C' und D' vergrößerten Ausschnitte sind als rote Boxen markiert. Distal der sich bildenden Finger liegt zusätzliches mesenchymales Gewebe dem Epithel auf. In diesen Bereichen liegt das Epithel mehrschichtig vor (D') und ist durch eine zweite BM vom ektopischen Mesenchym abgetrennt (C').

2.1.8 Die interdigitale Apoptose am Tag 13,5pc kann nur durch externe apoptotische Signale ausgelöst werden

Die Separation der Phalangen entsteht durch Degeneration des interdigitalen Gewebes sowie Wachstum der Fingerglieder (Salas-Vidal *et al.*, 2001). Eine mögliche Ursache für Syndaktylie ist eine Störung des Programmierten Zelltodes (PCD) im interdigitalen Mesenchym der betroffenen Glieder. Um dies zu untersuchen wurden apoptotische Zellen in longitudinalen Schnitten durch E13,5 Handplatten mit dem TUNEL-*assay* detektiert (Abb. 2.1.10, A, B). Zu diesem Zeitpunkt sind die späteren Phalangen schon als verdichtetes Mesenchym angelegt und breiten sich radial in der Handplatte aus. Die interdigitalen Bereiche sind im Wildtyp aufgrund des bereits eingesetzten PCD, welcher sich entlang eines distal-proximalen Gradienten ausbreitet, ausgedünnt. Im interdigitalen Mesenchym können entlang der gesamten Finger-Primordien Apoptose-positive Zellen detektiert werden. In Nidogen 1/2-defizienten Handplatten hingegen sind in diesem Entwicklungsstadium nahezu keine apoptotischen Zellen vorhanden.

Der Verlust apoptotischer Aktivität im interdigitalen Mesenchym der Nidogen 1/2-defizienten Embryonen kann auf ein fehlendes apoptotisches Signal oder auf die Inkompetenz der betroffenen Zellen auf ein solches Signal zu reagieren zurückzuführen sein. Mindestens drei BMPs (*bone morphogenetic proteins*) sind an der Spezifizierung des chondrogenen bzw. apoptotischen Schicksals beteiligt (Hogan, 1996; Dahn and Fallon, 2000) und in der Lage Zelltod in kompetenten Geweben auszulösen (Macias *et al.*, 1997).

Um die Reaktion Nidogen 1/2-defizienter Gewebe auf Apoptose-induzierende Signale zu untersuchen, wurden mit BMP4-getränkte Agarose-Kügelchen zwischen die Fingerstrahlen von E13,5 Handplatten inseriert und nach 20 h deren apoptotische Wirkung getestet (Abb. 2.1.10, C, D). Während die Implantation einer BSA-Quelle kaum Einfluss auf die Vitalität des umgebenden Gewebes hatte, unterlief das interdigitale Mesenchym nach Freisetzung von BMP4 den PCD. Dabei reagierte die Region proximal der Morphogen-Quelle deutlich stärker als der distale Bereich. Weitere Experimente konnten zeigen, dass in allen vier interdigitalen Strahlen der Nidogen 1/2-defizienten Handplatten Apoptose durch BMP4 induziert werden kann.

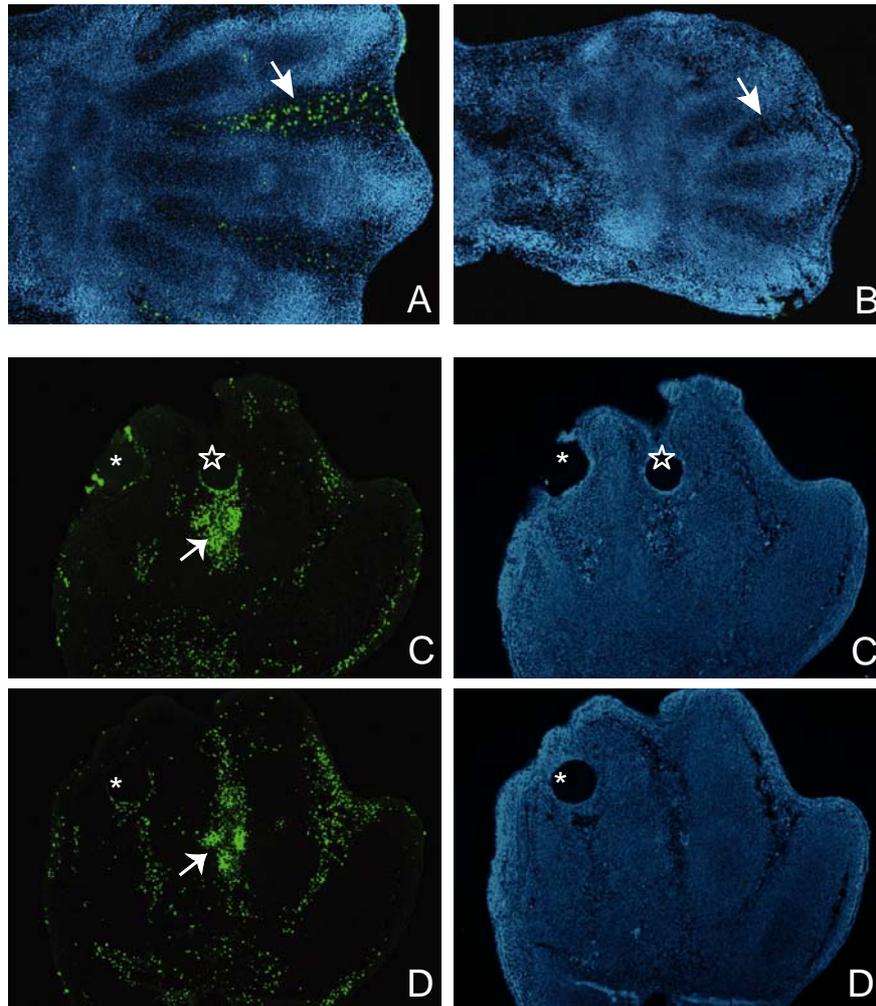


Abbildung 2.1.10: Die interdigitalen Apoptose ist in Nidogen 1/2 defizienten Handplatten stark reduziert, jedoch exogen induzierbar. Apoptotischer Zellen sind in grün dargestellt, Zellkerne sind mit Bisbenzimid H33258 (blau) gegengefärbt. E13,5 Handplatte einer Kontrolle (A) sowie einer Nidogen 1/2-defizienten Maus (B). Die beiden Fluoreszenzen sind überlagert dargestellt. Anterior ist oben, distal links. Während im interdigitalen Mesenchym (Pfeil) der Kontrolle viele apoptotische Zellen auftreten, kann in Nidogen 1/2-defizienten Handplatten nahezu kein apoptotisches Signal detektiert werden. C, D: In das interdigitale Mesenchym eines 13,5*dpc* Nidogen 1/2-defizienten Embryos wurden mit BSA (Asterisk) bzw. mit BMP4 (Stern) getränkte Agarose-Kügelchen implantiert und die Handplatten 20h kultiviert. Anterior ist links, distal oben. Dargestellt sind apoptotische Zellen in der Ebene der Cytokin-Quelle (C) sowie ventral davon (D). In C' und D' sind die Kernfärbungen derselben Schnitte gezeigt. Proximal (Pfeil in C) als auch ventral (Pfeil in D) der inserierten BMP4-Quelle treten stark apoptotische Regionen auf. Die Implantation der BSA-Quelle hingegen wirkt sich nicht auf die Vitalität des umgebenden Gewebes aus.

2.1.9 Expressionsmuster von *Bmp2*, *4* und *7*

Die Erkenntnis dass BMP4 den PCD in Nidogen-doppelmutanten Extremitäten induzieren kann, führt zu der Vermutung, dass bei Verlust der beiden Nidogen-Isoformen *Bmp4* nicht exprimiert oder das Protein nicht an den richtigen Stellen lokalisiert wird. *Bmp4* wird während der Extremitätenentwicklung in dem distalen Mesoderm unterhalb der AER und in der ektodermalen AER selbst exprimiert (Dunn *et al.*, 1997; Dupe *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004). Nach der Regression der AER beschränkt sich die Expression von *Bmp4* hauptsächlich auf die distalen Enden der entstehenden Phalangen.

In situ-Hybridisierungen mit einer *Bmp4*-spezifischen Sonde zeigten keinen Unterschied in der Signalintensität bzw. Lokalisation zwischen Kontrollen und Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen in den Stadien E10,5 bis E13,5 (E10,5 und E12,5 in Abb. 2.1.11, A-D dargestellt). Aufgrund mangelnder immunhistochemisch einsetzbarer Antikörper gegen BMP4 konnte das Protein nicht lokalisiert werden.

Zwei weitere Mitglieder der TGF β -Superfamilie, BMP2 und BMP7, können ebenso wie BMP4 Apoptose in kompetenten Geweben induzieren (Macias *et al.*, 1997). Beide zeigen dynamische Expressionsmuster während der Extremitätenentwicklung (Yang *et al.*, 1998; Dupe *et al.*, 1999). Während *Bmp4* am Tag 13,5pc hauptsächlich im distalsten Bereich der Handplatte nachgewiesen werden kann, werden *Bmp2* und *Bmp7* zu diesem Zeitpunkt in weiten Regionen des interdigitalen Mesenchyms exprimiert (Abb. 2.1.11, E, G). In Nidogen 1/2-defizienten E13,5 Autopodien ist die Expression von *Bmp2* und *Bmp7* im interdigitalen Mesenchym reduziert. Die Expressionsdomänen sind auf die proximalen Bereiche beschränkt (Abb. 2.1.11, F, H).

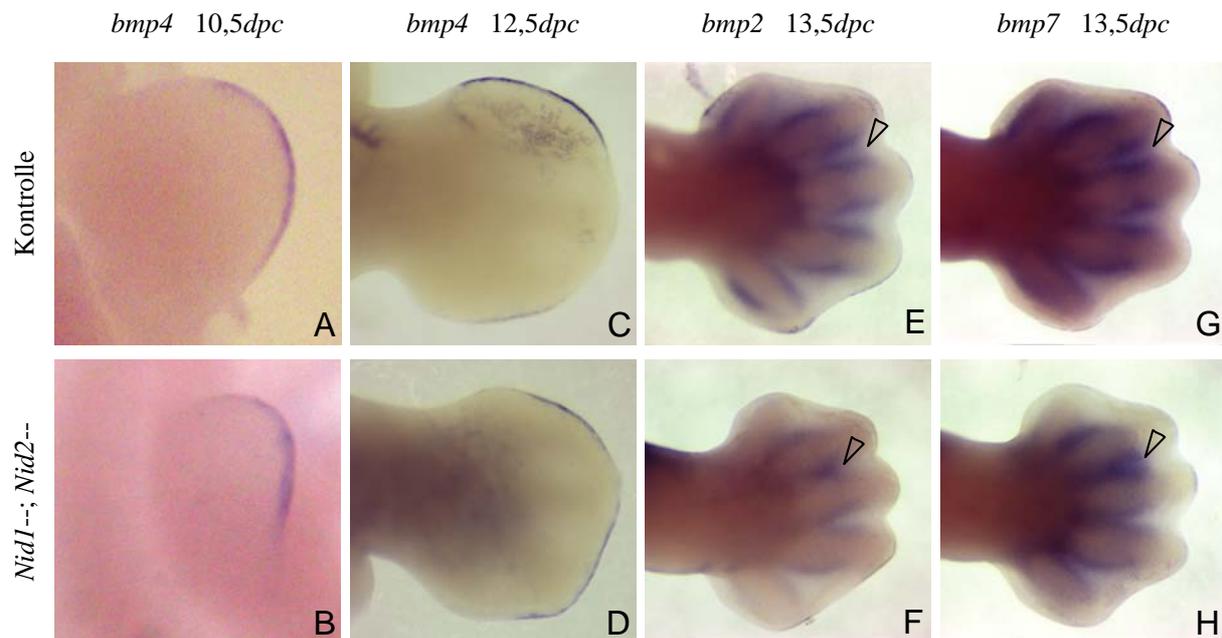


Abbildung 2.1.11: Im interdigitalen Mesoderm ist die Expression von *Bmp2* und *Bmp4* reduziert. *In situ* Hybridisierungen an Extremitätenprimordien unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Anterior ist oben, distal rechts. A-D: *Bmp4*-spezifische Sonde. Sowohl in Nidogen 1/2-defizienten als auch in Kontroll-Embryonen wird *Bmp4* in der AER und dem Mesoderm unterhalb der AER exprimiert. E-H: *In situ*-Hybridisierungen an E13,5 Fußplatten mit einer *Bmp2*- (E,F) bzw. *Bmp7*- (G,H) spezifischen Sonde. In Nidogen 1/2-defizienten Autopodien werden *Bmp2* und *Bmp7* weniger stark im distalen Mesenchym exprimiert. Pfeilspitzen kennzeichnen die distalen Grenzen der Expressionsdomänen.

2.1.10 Vergleich der Nidogen-Doppelmutanten mit der Laminin $\gamma 1\Delta III 4$ -Maus

Biochemische und strukturelle Untersuchungen an Nidogen 1 haben die Interaktion mit vielen anderen Basalmembran-assoziierten Proteinen nachgewiesen. Das aktuelle Modell zum Aufbau von Basalmembranen postuliert, dass Nidogen die beiden Laminin- und Kollagen IV-Netzwerke miteinander verbindet (Fox *et al.*, 1991; Aumailley *et al.*, 1993) sowie weitere Basalmembran-Komponenten integriert (Reinhardt *et al.*, 1993; Hopf *et al.*, 1999).

Laminine binden über eine LE (*laminin-type epidermal growth factor-like*)-Domäne in der $\gamma 1$ -Kette, $\gamma 1 III 4$, mit hoher Affinität an Nidogen 1 (Mayer *et al.*, 1993; Poschl *et al.*, 1994) und mit ~10fach geringerer Affinität an Nidogen 2 (Salmivirta *et al.*, 2002). Mäuse, denen das Laminin $\gamma 1 III 4$ -Modul fehlt, zeigen starke Störungen der frühen Nierenentwicklung und Veränderungen in der Morphogenese der Lunge (Willem *et al.*, 2002). Während der Lungenphänotyp dem in Nidogen 1/2-defizienten Mäusen beobachteten Defekt ähnelt, ist die

Nierenentwicklung nur in Laminin $\gamma 1\Delta III 4$ -Mäusen inhibiert. Die Unterschiede der beiden Linien werden auf freies Nidogen im Laminin $\gamma 1\Delta III 4$ -*knockout* oder eine weitere, bisher nicht identifizierte Funktion der $\gamma 1 III 4$ -Domäne zurückgeführt (Bader et al., 2005). Der Vergleich dieser beiden Mausmodelle ermöglicht demnach eine detaillierte Analyse der Rolle von Nidogen als Interaktionspartner von Basalmembran-Komponenten.

Bisher ist für die Laminin $\gamma 1 III 4$ -defizienten Mäuse kein Phänotyp in der Extremitätenentwicklung beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auch dieser Mausstamm auf Syndaktylie hin untersucht. Abbildung 2.1.12 zeigt Autopodien von Laminin $\gamma 1 III 4$ -defizienten *19dpc* Embryonen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen. Wie schon unter 2.1.1 für Nidogen-doppelmutante Mäuse beschrieben, variiert auch hier die Stärke des Phänotyps zwischen einzelnen Individuen, wobei die vorderen Extremitäten stärker betroffen sind als die hinteren. Die Alizarin-Rot/Alcian-Blau Färbung zeigt eine Verwachsung im proximalen Bereich von zwei oder mehreren Gliedern, wobei analog zur Nidogen *1/2*-Defizienz die Finger I-IV betroffen sind. Die Phalangen sind weder miteinander fusioniert noch unregelmäßig ausgebildet. Es handelt sich um eine im Vergleich zur Nidogen *1/2*-Defizienz deutlich schwächere, partielle Syndaktylie.

Die Analyse der ektodermalen Basalmembran am Tag *10,5pc* zeigt einen mit den Nidogen *1/2*-defizienten Tieren vergleichbaren Phänotyp (Abb. 2.1.13). Auch hier sind die Basalmembran-Marker Laminin und Kollagen IV nicht durchgängig unterhalb der AER organisiert. Die Immunreaktivität im Ektoderm ist erheblich stärker als in Extremitätenknospen des Wildtyps. Die neugebildeten Blutgefäße sind mit anti-Laminin 111 nicht nachzuweisen. Wie bereits an *18,5dpc* Nieren gezeigt (Willem et al., 2002) kann Nidogen 1 nicht immunhistologisch im Gewebe detektiert werden, während Nidogen 2 weiterhin in Assoziation mit Basalmembran-Komponenten wie Kollagen IV vorliegt.



Abbildung 2.1.12: Laminin γ 1III4-defiziente Mäuse weisen nur schwache Phänotypen in den Autopodien auf. Übersicht (A,B) und Alizarin-Alcian-Färbungen (C, D). Die *Lamc1 Δ III4* Pfoten sind gekrümmt (B). Die mittleren Finger sind fusioniert, verbleiben jedoch im distalen Bereich frei (D). Die Pfeile deuten auf die mittleren Phalangen IV. In den mutanten Autopodien hat sich dort noch kein Ossifikationszentrum ausgebildet.

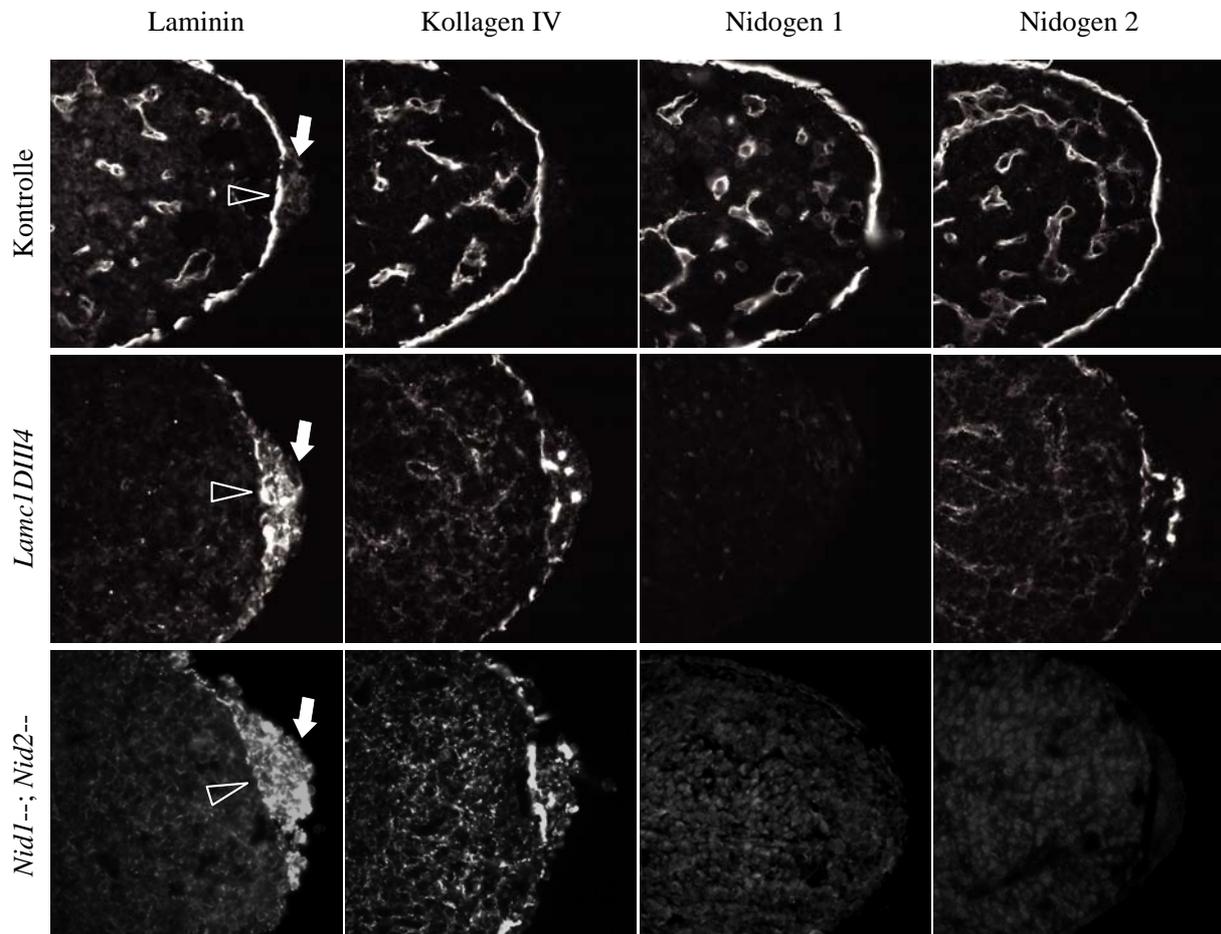


Abbildung 2.1.13: Der Verlust der Laminin γ 1III4-Domäne führt zu einem der Nidogen 1/2-Defizienz ähnlichen Phänotyp. Immunfluoreszenzen auf transversalen Schnitten durch E10,5 Extremitätenknospen. Die Pfeile zeigen auf die AER, die offenen Pfeilspitzen deuten auf den Bereich, an dem die subektodermale Basalmembran lokalisiert sein sollte. In Laminin γ 1III4-defizienten Embryonen sind, wie in den Nidogen-Doppelmutanten, Laminin und Kollagen IV nicht linear unterhalb des Ektoderms lokalisiert, sondern weisen verstärkte Immunreaktivität im Ektoderm auf. In Laminin γ 1III4-defizienten Schnitten kann kein Nidogen 1 nachgewiesen werden, während Nidogen 2 weiterhin mit Kollagen IV an den Blutgefäßen sowie im Bereich des Ektoderms lokalisiert ist.

2.1.11 In den rechten Vorderbeinen von Nidogen 1/2-defizienten Mäusen treten Skelettfehlbildungen mit geringer Penetranz auf

In einigen der neugeborenen Nidogen 1/2-defizienten Mäusen war eine Fehlstellung der rechten Vorderextremitäten auffällig. Die Anfärbung von Knorpel und Knochen in diesen Tieren zeigte fehlende oder hypoplastische Skelettelemente in allen drei Bereichen entlang der proximodistalen Achse, dem Stylopodium, Zeugopodium und Autopodium (Abb. 2.1.14). Betroffen sind jeweils die anterioren Elemente, der Tuberositas deltoidea, ein knöcherner Vorsprung des Humerus mit separatem Ossifikationszentrum, der Radius, der Karpus sowie einige Finger. Die Ausprägung dieser Defekte variiert von Extremitäten, in denen nur der Tuberositas deltoidea fehlt, bis hin zum vollständigen Verlust des Radius sowie mehrerer Handwurzelknochen und Finger. Eine anschließende statistische Auswertung ergab, dass diese Defekte in 18% (n=17) der doppelmutanten Mäuse auftreten. In keiner der untersuchten Individuen konnten vergleichbare Missbildungen im linken Vorderbein oder in den hinteren Extremitäten gefunden werden.

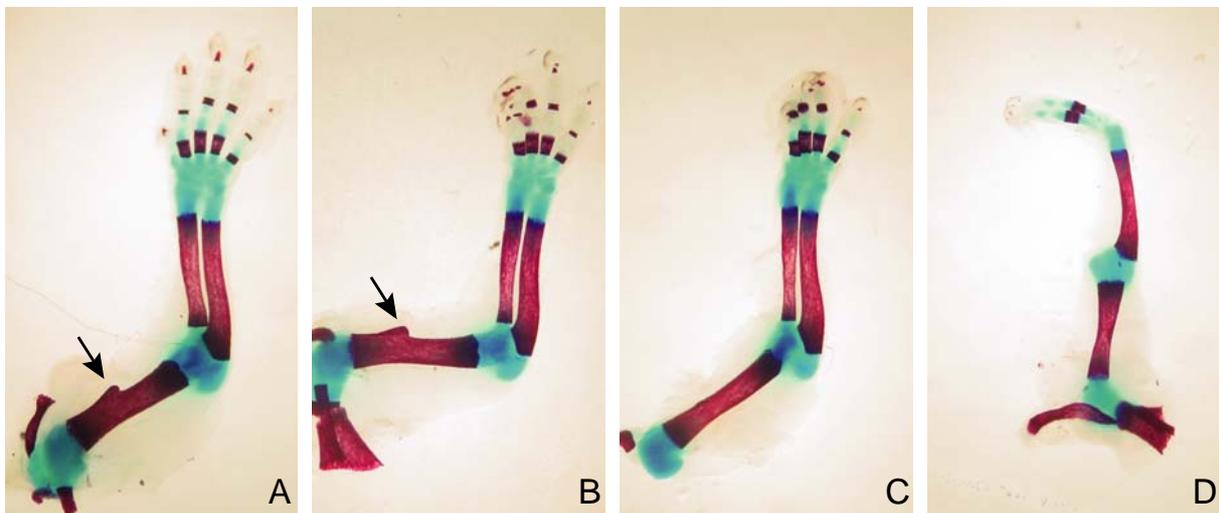


Abbildung 2.1.14: Variable Skelettfehlbildungen in den rechten Vorderextremitäten Nidogen 1/2-defizienter Mäuse. In A ist die rechte Vorderextremität einer Kontrolle dargestellt, B-C zeigt eine Reihe zunehmender Fehlbildungen in Nidogen-doppelmutanten Extremitäten. Der Tuberositas deltoidea ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. B zeigt einen leicht hypoplastischen Radius. In C fehlt zusätzlich der Tuberositas deltoidea sowie der Phalanx I. D zeigt den Verlust des Tuberositas deltoidea, des Radius, sowie mehrerer Karpalen, Metakarpalen und Phalangen.

2.1.12 Das anteriore proximale Mesenchym weist am Tag 10,5pc eine starke apoptotische Aktivität auf

Bereits am Tag 12pc können Embryonen mit anterioren Deformationen in den rechten Vorderextremitäten identifiziert werden. Die Verdichtung des Mesenchyms zum Knorpel beginnt am Tag E11,5 bis 12, wobei die posterioren Elemente zuerst angelegt werden (Wanek *et al.*, 1989). Der Verlust anteriorer Elemente ist demnach schon während der Determination chondrogener Bereiche angelegt und möglicherweise auf eine reduzierte Zellzahl zurückzuführen.

Da in den untersuchten Embryonalstadien keine Veränderung in der Anzahl proliferierender Zellen festgestellt werden konnte, wurden Extremitätenknospen Nidogen 1/2-defizienter Embryonen auf Apoptose hin untersucht. Während der Extremitätenentwicklung werden Zellen durch PCD eliminiert. Im Huhn treten zu unterschiedlichen Stadien mehrere Zonen mit verstärktem Zelltod auf, die ANZ (*anterior necrotic zone*), PNZ (*posterior necrotic zone*) sowie der *opaque patch*. In der Maus sind diese Regionen deutlich geringer ausgeprägt und entstehen am Tag 11,5 bis 12,5pc (Martin, 1990). Damit übereinstimmend konnten in unterschiedlichen Ebenen durch 10,5dpc Kontrollextremitäten keine stark apoptotischen Bereiche detektiert werden. Wie bereits in Abbildung 2.1.5 dargestellt, weisen einige Schnitte der doppelmutanten Extremitätenknospen vermehrt apoptotische Zellen im proximalen Mesoderm auf. Genauere Untersuchung entlang der anteroposterioren Achse zeigte einen stark apoptotischen Bereich im anterioren Mesoderm (Abb. 2.1.15). Ein leicht verstärkter PCD scheint in allen Nidogen 1/2-defizienten Embryonen zu entstehen, wobei der starke, anterior lokalisierte Bereich nur in zwei der analysierten Embryonen gefunden wurde.

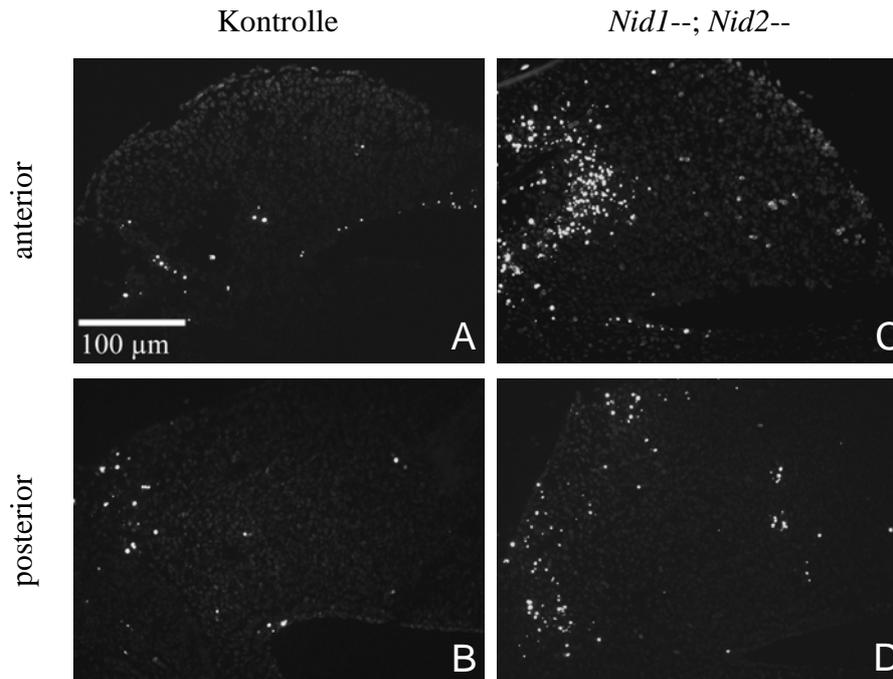


Abbildung 2.1.15: Vertärkter PCD im anterioren proximalen Mesoderm. Transversale Schnitte durch den anterioren (A,B) bzw. posterioren (C,D) Bereich rechter vorderer Extremitätenknospen am E10,5. Apoptotische Zellen wurden mit dem TUNEL-Assay detektiert. In Kontrollprimordien treten vereinzelt apoptotische Zellen gleichmäßig entlang der anteroposterior Achse auf. In der Nidogen 1/2-defizienten Knospe ist der PCD verstärkt mit einer auffälligen Häufung im anterioren Mesoderm.

2.1.13 Die Lokalisation von FGF8 ist in den Extremitätenknospen verändert

Die oben beschriebenen Skelettfehlbildungen weisen eine starke Ähnlichkeit zu den beobachteten Phänotypen nach konditionalem Verlust von FGF8 in den Extremitäten auf. Moon und Capecchi (2000) haben die Expression von *Fgf8* mit Beginn der Ausbildung der vorderen Extremitätenanlagen ausgeschaltet. Diese Mäuse entwickelten Vorderextremitäten mit fehlendem oder hypoplastischem Humerus, sowie Verlust des Radius und Finger I. Die transiente Expression von *Fgf8* bis zum E10 führt ebenfalls zu Hypoplasien in den anterioren Bereichen des Zeugopodiums, Stylopodiums und Autopodiums (Lewandoski *et al.*, 2000).

Wie bereits unter 2.1.6 dargestellt, hat der Verlust beider Nidogen-Isoformen keine drastischen Auswirkungen auf das Expressionslevel von *Fgf8*, die Expressionsdomäne hingegen weist Veränderungen auf und ist anterior verkürzt (Abb. 2.1.7). Im Folgenden wurde die Lokalisation des FGF8-Proteins genauer untersucht (Abb. 2.1.16). In WT-Extremitätenknospen ist FGF8 in der AER und an der gesamten ektodermalen Basalmembran der Extremitätenknospe verteilt, wo es mit deren Komponenten wie Laminin und Perlecan

kolokalisiert. Bei Verlust von Nidogen 1 und 2 und der damit assoziierten Zerstörung der Basalmembran lokalisieren FGF8 und Laminin hauptsächlich in der AER, andere Bereiche des Ektoderms zeigen keine Immunreaktivität (Abb. 2.1.16, A-C, G-I). Im Großteil der untersuchten Extremitätenknospen war die Lokalisation des FGF8-Proteins auf das Ektoderm begrenzt. Allerdings konnte in zwei der Nidogen-doppelmutanten Embryonen eine etwas tiefer ins Mesoderm eindringende Diffusion von FGF8 beobachtet werden.

HSPGs (Heparansulfat-Proteoglycane) modulieren die Aktivität von FGFs, indem sie die Bindung an ihre Rezeptoren, bzw. deren Aktivierung beeinflussen (Ornitz, 2000; Esko and Selleck, 2002). Mutationen im HSPG Perlecan führen zu Misregulationen von FGF-induzierten Signalwegen in *C. elegans* (Merz *et al.*, 2003) und *Drosophila* (Park *et al.*, 2003). Da Perlecan in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen nicht mit FGF8 an der subektodermalen Basalmembran kolokalisiert, sollte die Signaltransduktion von FGF8 analysiert werden. Die intrazelluläre Antwort auf FGF-Signale wird zelltypspezifisch über mehrere Signalkaskaden vermittelt, wobei universell der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Weg aktiviert wird. Als *read-out* für die Signalleistung von FGF8 in den Extremitätenknospen wurde die Verteilung der phosphorylierten p44/42 MAPK untersucht. Abbildung 2.1.16, G-L zeigt benachbarte Schnitte durch Extremitätenknospen von Kontroll- und Nidogen 1/2-defizienten Tieren. Die Signaltransduktion von FGF8 scheint in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenprimordien nicht erheblich beeinträchtigt zu sein, da in den meisten Schnitten p44/42 MAPK im gesamten Mesenchym vergleichbar zu den Kontrollen phosphoryliert vorlag (Abb. 2.1.16, J, K). Hingegen traten im demselben Individuum, in dem FGF8 tiefer in das Mesoderm diffundierte, Veränderungen im Phosphorylierungsmuster auf. Phosphorylierte p44/42 MAPK konnte hier nur im marginalen Bereich der Knospe detektiert werden, das zentrale Mesenchym zeigte kein Signal (Abb. 2.1.16, L).

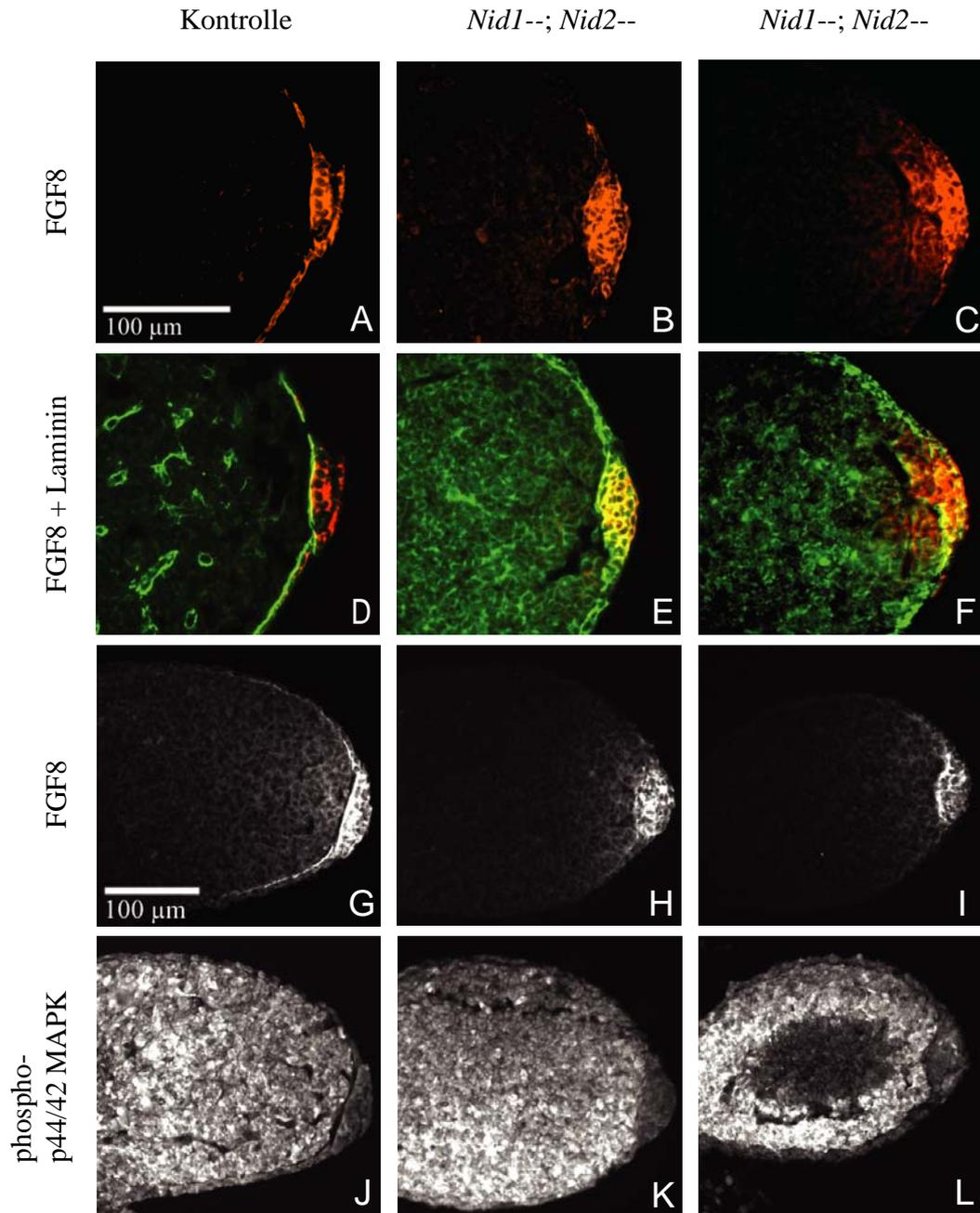


Abbildung 2.1.16: Immunlokalisation und Signalweiterleitung von FGF8 in der Extremitätenknospe.

Immunfluoreszenzen auf transversalen Schnitten durch E10,5 Extremitätenknospen. Dorsal ist oben, distal rechts. A-F und G-L sind jeweils mit dem gleichen Vergrößerungsfaktor dargestellt. In den Kontrollschnitten (A, G) ist FGF8 in der AER exprimiert. Es kolokalisiert mit Laminin an der subektodermalen Basalmembran. In dem darunterliegenden Mesenchym ist nahezu kein FGF8-Protein detektierbar. Durch die untypische Verteilung von Laminin in den epithelialen Zellen der Doppelmutante kommt es zu einer Kolokalisation mit FGF8 in der AER (E, F). In einigen Fällen kann FGF8 auch in einem nach proximal hin abfallenden Gradienten nachgewiesen werden (C, F). P44/42 MAPK liegt im FGF8-negativen Gewebe phosphoryliert vor (G-K). L zeigt die Extremitätenknospe eines doppelmutanten Embryos, in dem keine phosphorylierte p44/42 MAPK im zentralen Mesenchym detektiert wird.

2.2 Nidogen 1/2-defiziente Mäuse entwickeln leicht hypoplastische Speicheldrüsen

Ein häufig verwendeter Mechanismus in der Gestaltbildung ist die Verzweigungsmorphogenese. Hierbei entstehen komplexe Wechselwirkungen zwischen dem sich verzweigenden Epithel und dem benachbarten Mesenchym. Es ist bekannt, dass Basalmembran-Komponenten und insbesondere die Interaktion von Nidogen und Laminin essentiell für diese Morphogenese sind. Antikörper, die die Interaktion von Laminin und Nidogen blockieren, inhibieren die epitheliale Entwicklung von Niere, Lunge und Speicheldrüsen *in vitro* (Ekblom *et al.*, 1994; Kadoya *et al.*, 1997). Wie in vielen anderen embryonalen Geweben wird Nidogen vom Mesenchym und Endothelium exprimiert, während das Protein ausschließlich in den Basalmembranen des Epithels und Endothels gefunden wird (Kadoya *et al.*, 1997). Die epithelialen Verzweigungen der Unterkieferspeicheldrüse beginnen mit dem Embryonaltag 13 und sind am Tag E17 bereits abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt hat die Zytodifferenzierung eingesetzt und die epithelialen Gänge und Endknospen haben Lumen ausgebildet. Die funktionelle Differenzierung der Acini setzt jedoch erst kurz vor der Geburt ein und dauert bis zum Tag 5 an.

Während die Defizienz anderer ubiquitärer Basalmembrankomponenten wie Laminin, Perlecan und Kollagen IV zu embryonaler Lethalität führt, ermöglicht die vollständige Embryonalentwicklung in Nidogen-doppelmutanten Mäusen eine Analyse der Speicheldrüsenmorphogenese (Costell *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 1999; Miner *et al.*, 2004; Poschl *et al.*, 2004).

Die Speicheldrüsen wurden aus neugeborenen Mäusen präpariert, gewogen und auf Milimeterpapier fotografiert. Abbildung 2.2.1 zeigt die Morphologie der Speicheldrüsen einer Nidogen 1/2-defizienten Maus und ihres Nidogen 2-defizienten Geschwisters am Tag P1. Die Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis) und die Unterzungspeicheldrüse (Glandula sublingualis) sind von einer gemeinsamen Kapsel eingeschlossen. Die beiden Drüsen lassen sich in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung leicht unterscheiden, da die Glandula submandibularis größer und serös aufgebaut ist, während die Glandula sublingualis vorwiegend muköse Anteile besitzt. Das „späten Endknospen-Stadium“ ist durch ein polarisiertes Gangsystem, welches zahlreiche Endknospen miteinander verbindet, gekennzeichnet. Die Gänge und Endknospen weisen deutlich ausgeprägte Lumen auf. Die Speicheldrüsen Nidogen 1/2-defizienter Individuen sind bei der Geburt ~40% kleiner und

leichter. Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau und Entwicklungsgrad kaum von den Kontrolldrüsen. In der Glandula submandibularis ist jedoch der parenchymatische Anteil im Verhältnis zum Stroma geringer und die einzelnen Läppchen weisen eine reduzierte Zahl an Endknospen auf.

Immunfluoreszenzen mit Antikörpern, die gegen Komponenten der Basalmembranen gerichtet sind, zeigen, dass die epithelialen Endknospen sowie Gangsysteme durchgängig von einer Basalmembran umgeben sind. Auch in Nidogen 1/2-doppelmutanten Drüsen sind ubiquitäre Basalmembrankomponenten an der basalen Oberfläche der Epithelien organisiert. Allerdings ist die Verteilung in den doppelmutanten Unterkieferspeicheldrüsen weniger distinkt als in den Kontrollen. Während die Gänge starke Immunfluoreszenz aufweisen, ist Laminin an den Endstücken eher schwach lokalisiert. Auch die interstitiellen mesenchymalen Anteile zeigen Immunreaktivität (Abb. 2.2.1,III).

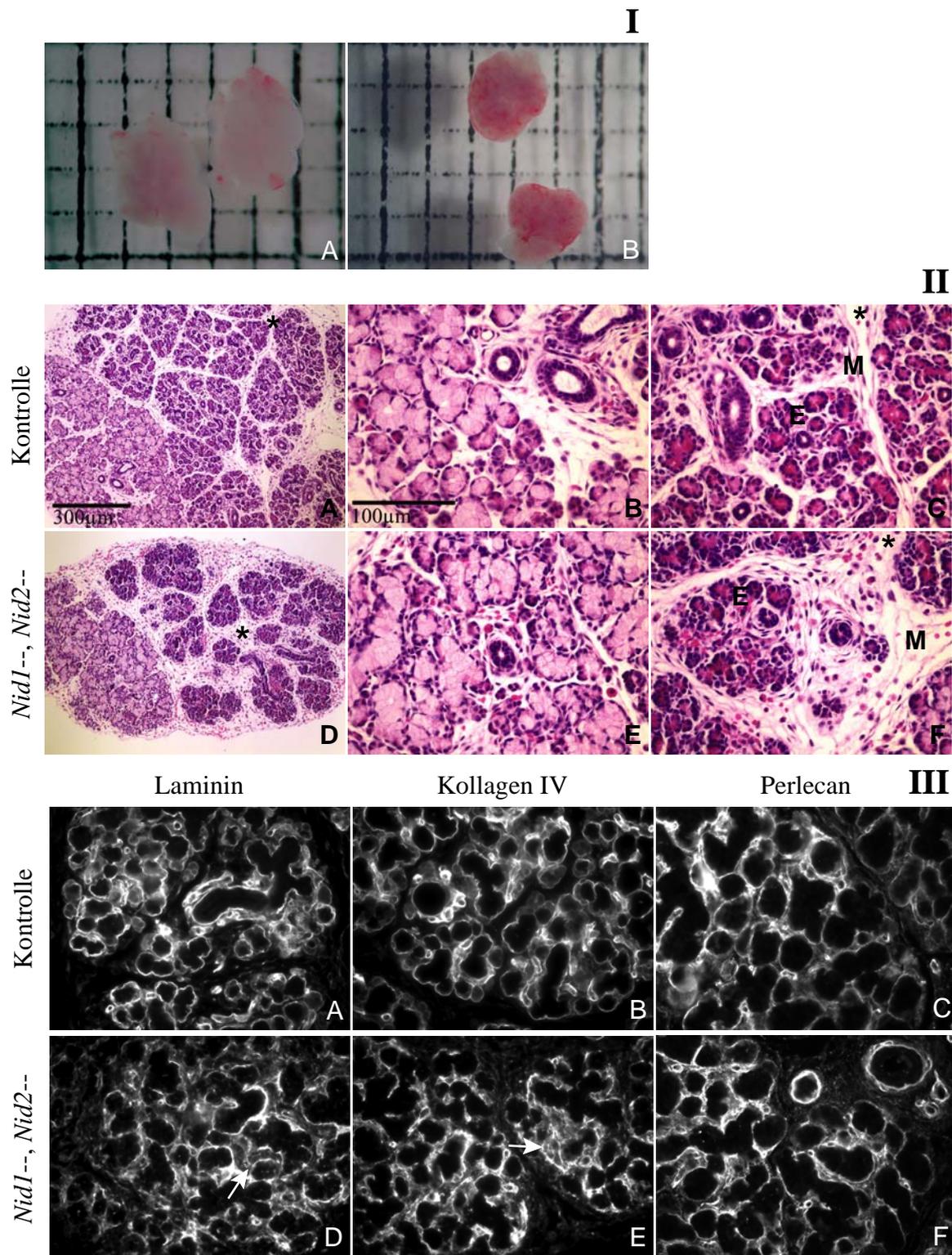


Abbildung 2.2.1: Das epitheliale Gewebe Nidogen 1/2-defizienter Glandulae submandibularis ist hypoplastisch. I: Übersicht der Speicheldrüsen aus einer Nidogen 2 (A) bzw. Nidogen 1/2-defizienten Maus am Tag P1. **II:** HE-Färbung auf Paraffinschnitten. Die Glandula submandibularis ist mit einem Asterisk gekennzeichnet und in C bzw. F vergrößert dargestellt. B und E zeigen Detailaufnahmen der Glandula sublingualis. E: Epithel; M: Mesenchym. **III:** Immunfluoreszenzen auf Paraffinschnitten durch die Glandula submandibularis. Die Basalmembrankomponenten Laminin, Kollagen IV und Perlecan umgeben alle epithelialen Strukturen. Im Nidogen 1/2-doppelmutanten Gewebe zeigt außerdem das Mesenchym eine verstärkte Immunreaktivität von Laminin und Kollagen IV (Pfeile in D und E).

2.2.1 *In vitro*-Verzweigungsmorphogenese unter serumfreien Bedingungen

Um den Mechanismus der Verzweigungsmorphogenese genauer zu untersuchen wurden die Speicheldrüsenprimordien aus 13,5dpc Embryonen präpariert und in Kultur gebracht. Zu diesem Zeitpunkt besteht das Epithelium aus einigen undifferenzierten terminalen Clustern, welche mit dem distalen Ende des epithelialen Stammes verbunden sind. Diese Primordien sind in der Lage sich *ex vivo* begrenzt weiterzuentwickeln. Als Ergebnis repetitiver Verzweigung bildet sich nach drei Tagen unter serumfreien Kulturbedingungen ein Gangsystem mit ca. 100 Endknospen, die jeweils kleiner als 100 μm im Durchmesser sind. Die Anzahl der Endknospen wurde bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Entwicklungsstadien der Embryonen zwischen unterschiedlichen Würfen als auch innerhalb eines Wurfes unterscheiden sich leicht, weshalb die Speicheldrüsenprimordien zu Beginn der Organkultur eine unterschiedliche Anzahl von terminalen Clustern aufweisen. Diese Zahl variiert von einer bis vier Knospen und ist schwer zu bestimmen da sich die Explantate noch nicht auf dem Filter ausgebreitet haben. Um solche fehlerhaften Einflüsse auf die Auswertung der Verzweigungsmorphogenese auszuschließen, wurde außerdem der Quotient aus der Anzahl der Endknospen nach 72 h und 24 h in Kultur gebildet.

In Abbildung 2.2.2, I ist die Morphologie der explantierten Speicheldrüsenanlagen nach dreitägiger Kultur dargestellt. Die Organe wurden gemäß ihres Genotyps in drei Gruppen eingeteilt. Den stärksten Verzweigungsgrad weisen die Nidogen 1+/+; Nidogen 2-/- Explantate auf. Die durchschnittliche Endknospenszahl in Nidogen 1+/-; Nidogen 2-/- Primordien ist jedoch nicht signifikant reduziert, weshalb diese beiden Genotypen in den weiteren Analysen als eine Kontrollgruppe zusammengefasst wurden. Nidogen 1/2-defiziente Primordien bilden *in vitro* im Durchschnitt nur etwa halb so viele Endknospen aus wie Kontrollexplantate. Innerhalb von 48 h in Kultur vermehrt sich die Anzahl der Endknospen in den Kontrollen um das 6fache, während in den Nidogen-Doppelmutanten nur eine 3-4fache Zunahme zu beobachten ist (Abb. 2.2.2; II, III). Die reduzierte Anzahl an epithelialen Endknospen in Nidogen 1/2-defizienten Speicheldrüsenexplantaten ist demnach nicht allein auf eine leicht verzögerte Embryonalentwicklung zurückzuführen.

Während die Varianz in der gemessenen Verzweigungsgeschwindigkeit relativ hoch ist, zeigen alle Nidogen-doppelmutanten Primordien in den Randbereichen deutlich vergrößerte, fusionierte Endknospen, die in ihrer Form an die terminalen Cluster am E13 erinnern. Die zentralen Endknospen hingegen erscheinen klein und rund.

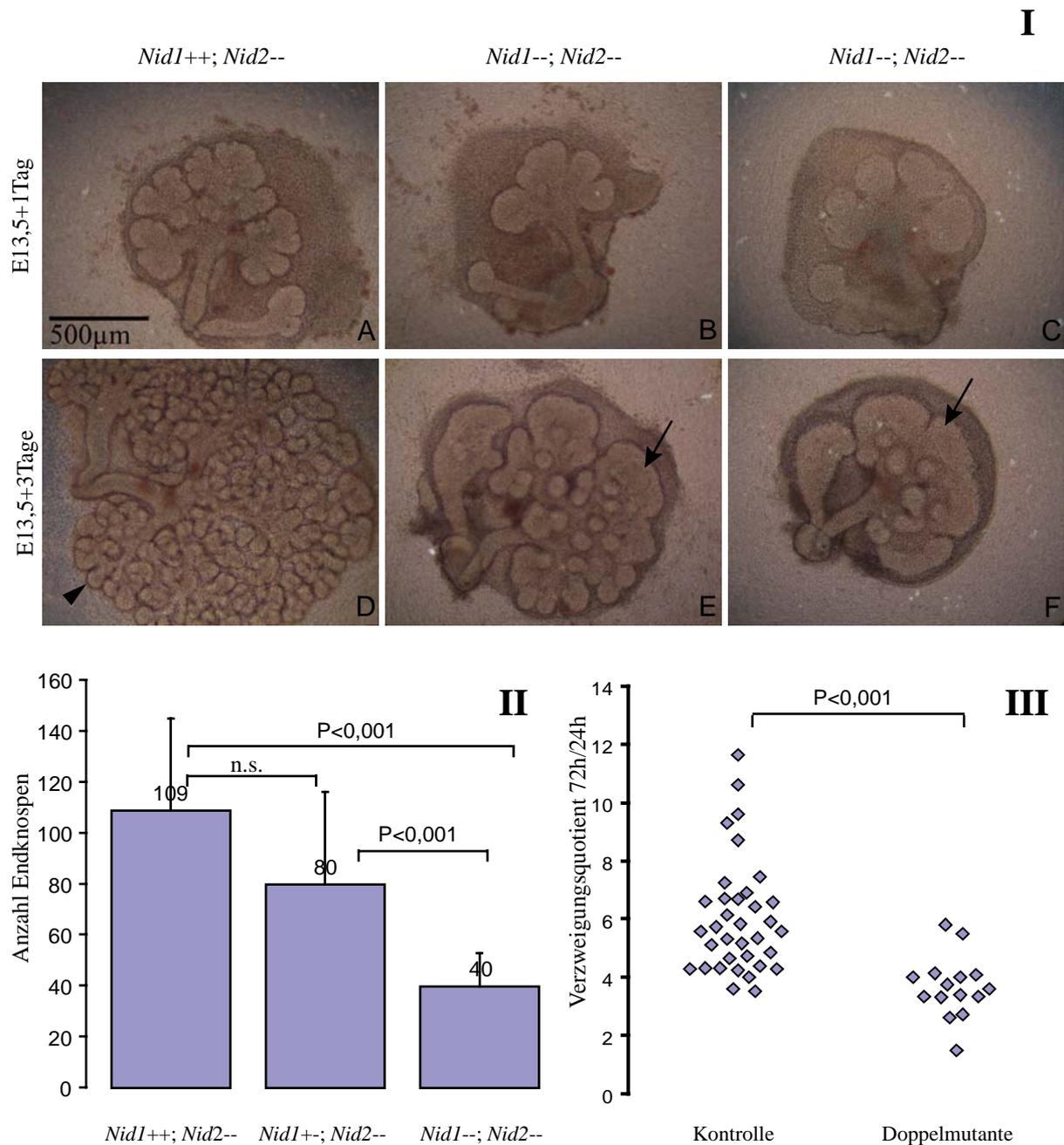


Abbildung 2.2.2: Verzweigungsmorphogenese von Speicheldrüsenprimordien *in vitro*. **I:** Fotografien von Speicheldrüsenprimordien nach 24 h (A-C) bzw. 72 h (D-F) in Kultur unter serumfreien Bedingungen. In den Nidogen 2-defizienten Anlagen ist das Epithel nach drei Tagen reich verzweigt und alle Endknospen sind gleichmäßig geformt (Pfeilspitze in D). In Nidogen 1/2-doppelmutanten Primordien haben sich deutlich weniger Endknospen ausgebildet. Diese sind vergrößert und im Randbereich fusioniert (Pfeil in E und F). **II:** Balkendiagramm: Dargestellt sind die Durchschnittswerte der Endknospennzahlen am Tag 3. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Die Signifikanzniveaus, mit denen sich die Gruppen unterscheiden, sind eingezeichnet (U-Test nach Mann und Whitney); n.s.: nicht signifikant. **III:** Streudiagramm. Dargestellt ist der Quotient aus der Anzahl der Endknospen nach 72 h und 24 h in Kultur. Explantate der Genotypen *Nid1*^{+/+}; *Nid2*^{-/-} und *Nid1*^{+/-}; *Nid2*^{-/-} wurden als Kontrollgruppe zusammengefasst. Die Messwerte weichen nur geringfügig von normalverteilten Daten ab.

2.2.2 Einfluß von Serum auf die *ex vivo*-Kulturen

Die verringerte bzw. verlangsamte Verzweigungsmorphogenese der Speicheldrüsen-Explantate in Kultur bestätigt die Beobachtung einer hypoplastischen Glandula submandibularis bei Entwicklung *in vivo*. Dieser Phänotyp scheint *in vitro* deutlicher ausgeprägt zu sein. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass die hier als Kontrollgruppe verwendeten Nidogen 2-defizienten Speicheldrüsenprimordien *in vitro* weniger Endknospen ausbilden als WT-Primordien, während in histologischen Präparaten am Tag P1 kein offensichtlicher Unterschied auftritt (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren erscheinen die Morphologie und die Größe der Endstücke in den Nidogen 1/2-defizienten neugeborenen Mäusen normal ausgebildet, während unter Kulturbedingungen recht drastische Veränderungen in Form und Größe auftreten. Diese Beobachtungen lassen auf einen Mechanismus schließen, der *in vivo* einen solchen Defekt kompensiert.

Um dies zu untersuchen wurde das Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) ergänzt. Unter diesen Bedingungen kultivierte Speicheldrüsen bildeten eine um 30-40% vermehrte Anzahl an Endknospen aus. Die Varianz innerhalb der Nidogendoppelmutanten Gruppe war bei diesem Versuchsansatz besonders groß. Während in einigen Nidogen 1/2-defizienten Drüsenprimordien kaum Anzeichen für eine verbesserte Morphogenese gefunden werden konnte, zeigten andere Explantate eine mit den Kontrollen vergleichbare Morphologie. Alle Endknospen dieser Anlagen waren gleichmäßig und rund ausgebildet (siehe Abb. 2.2.3, B, C). Die Anzahl der Endknospen in den Nidogen 1/2-defizienten Primordien ist weiterhin signifikant reduziert.

Als mögliche Inhaltsstoffe des FCS, die diesen Effekt auf die Speicheldrüsenkultur ausüben, kommen Wachstumsfaktoren in Frage. Die Zugabe von EGF (*epidermal growth factor*) führt zu einer Verstärkung der Verzweigungsmorphogenese (Nogawa and Takahashi, 1991), vermutlich indem es die Expression der Integrin $\alpha 6$ -Untereinheit (Kashimata and Gresik, 1997) sowie Nidogen (Kadoya *et al.*, 1997) induziert. Um den Effekt von EGF auf das Verzweigungsverhalten zu testen, wurde jeweils eine Drüse in mit 20 ng/ml EGF supplementiertem Medium inkubiert, während die zweite Drüse aus demselben Embryo ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurde. Der in der Literatur beschriebene Effekt auf die Verzweigungsmorphogenese konnte nicht in allen Experimentansätzen gemessen werden. Für die Auswertung wurden nur die Experimente, in denen die Kontroll-Explantate eine deutliche Zunahme an Endknospen zeigten, berücksichtigt. Die in Gegenwart von EGF wachsenden

Primordien zeigten eine um 35% (n=6) vermehrte Anzahl an Endknospen. Nidogen 1/2-defiziente Explantate verhielten sich ähnlich, auch hier konnte ein Anstieg in der Anzahl der Verzweigungen festgestellt werden (46%, n=3). Eine Auswirkung auf die Morphologie der epithelialen Endknospen wurde allerdings nicht beobachtet.

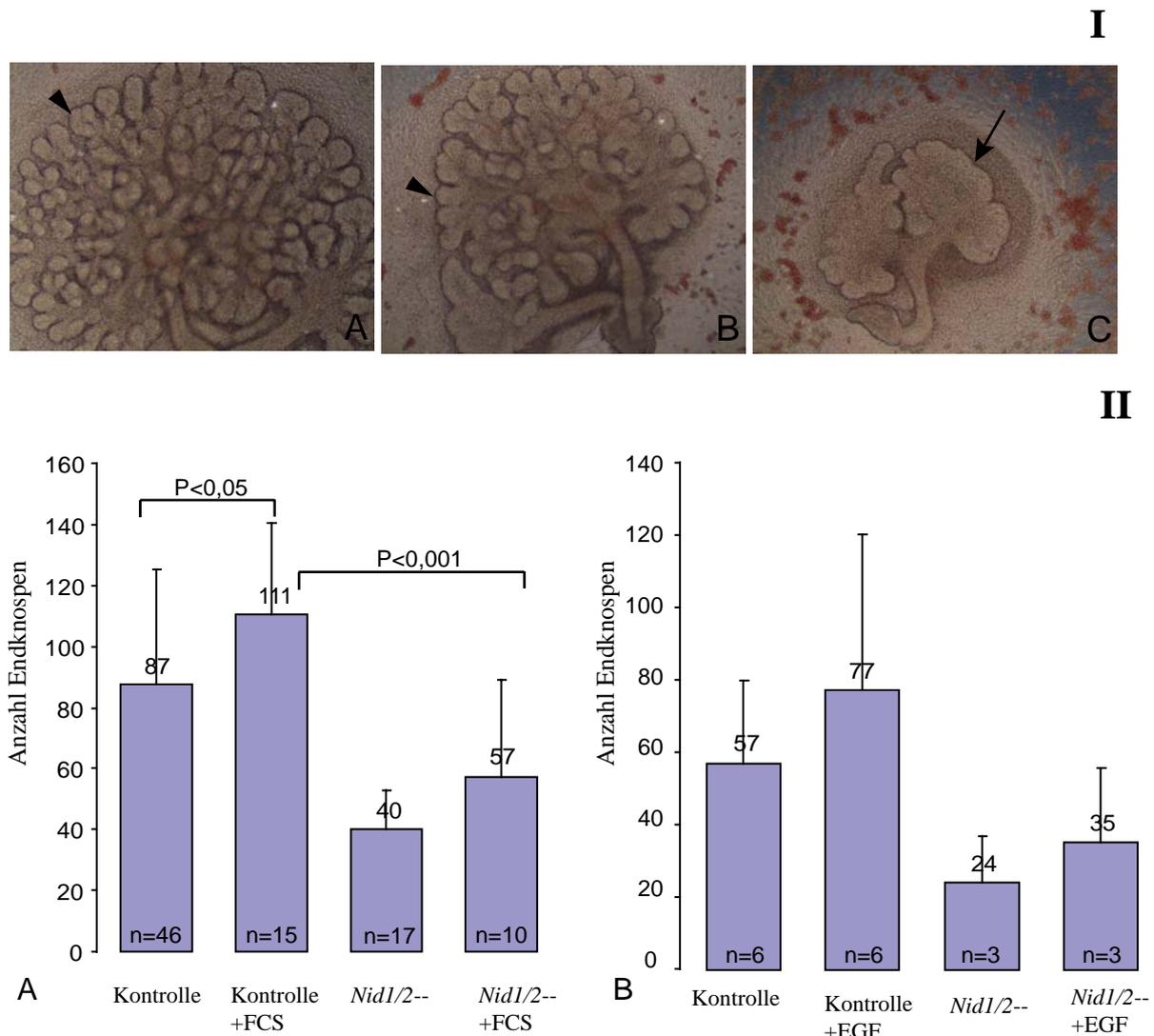


Abbildung 2.2.3: Verzweigungsmorphogenese in ergänztem Medium. I: Fotografien einer Kontrolle (A) sowie Nidogen 1/2-defizienten Speicheldrüsen (B, C) nach dreitägiger Kultur in mit 10% FCS supplementiertem Medium. In einigen Nidogen 1/2-defizienten Explantaten sind die Endknospen klein und rund (Pfeilspitze in A und B), während in anderen Primordien die Knospen fusionieren (Pfeil in C). II: Darstellung der Auswirkung von 10% FCS (A) bzw. 20 ng/ml EGF (B) im Balkendiagramm. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte der Endknospenanzahl nach drei Tagen in Kultur. A: Die Zugabe von FCS erhöht die Anzahl der Endknospen. Signifikant unterschiedliche Gruppen sind gekennzeichnet. B: EGF verstärkt die Anzahl der Endknospen sowohl in Kontroll- als auch in Nidogen 1/2-defizienten Explantaten. Der Stichprobenumfang ist hier zu gering für eine aussagekräftige statistische Auswertung.

2.2.3 Deposition von Basalmembrankomponenten in kultivierten Speicheldrüsenprimordien

Für die Verzweigungsmorphogenese von Speicheldrüsen sind Reorganisationen der Basalmembran von entscheidender Bedeutung. Mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz mit gegen Laminin gerichteten Antikörpern wurde die Basalmembran in den kultivierten Speicheldrüsenanlagen untersucht (Abb. 2.2.4). Dazu wurden sowohl Primordien, die drei Tage in serumfreiem Medium kultiviert wurden, als auch Primordien, die in Gegenwart von 10% FCS inkubiert wurden, ausgewertet. Übereinstimmend mit publizierten Daten zur Laminin-Lokalisation detektiert das polyklonale Serum Laminin an der epithelio-mesenchymalen Grenze aller gebildeten Gänge und Endstücke in den Kontrollen. Sowohl in dem Nidogen 1/2-defizienten Drüsengewebe, welches sich im definierten Medium kaum verzweigt hatte, als auch in Nidogen-doppelmutanten Primordien, die sich in Gegenwart von FCS ähnlich den Kontrollen entwickelten, ist Laminin ausschließlich an der basalen Seite der epithelialen Gangsysteme angereichert. Die distalen Endstücke hingegen sind nicht von einer Basalmembran umgeben. In den schlecht ausgebildeten und stark vergrößerten Endknospen der Nidogen 1/2-defizienten Organen ist Laminin gleichmäßig in allen epithelialen Zellen verteilt, während es sich in gut entwickelten Knospen auf die basale Zellschicht beschränkt. Die ultrastrukturelle Analyse zeigt im Kontrollgewebe eine durchgängige, das gesamte Epithel unterliegende Basalmembran, wobei das Gangsystem von einer dichter organisierten ECM als das Endknospenepithel umgeben ist. In den Nidogen 1/2-defizienten Explantaten findet sich trotz der immunhistologisch gezeigten Lokalisation von Laminin an den epithelialen Verbindungsstücken ultrastrukturell keine Basalmembran. Lediglich vereinzelt sind Ablagerungen von extrazellulärem Material auszumachen.

Die Blockierung der Interaktion von Laminin und Nidogen mittels spezifischer Antikörper führt zu Nekrose in den behandelten Organen (Ekblom *et al.*, 1994). In den hier untersuchten Nidogen 1/2-defizienten Explantaten wurden zwar im Vergleich zu den Kontrollen weniger mitotisch aktive Zellen in den Endknospen gefunden, die deutliche Größenzunahme der Endknospen deutet jedoch darauf hin, dass nicht eine reduzierte Zellzahl die Ursache für die morphogenetische Störung darstellt. Hiermit übereinstimmend wurde keine Zunahme apoptotischer Zellen detektiert (Daten nicht gezeigt).

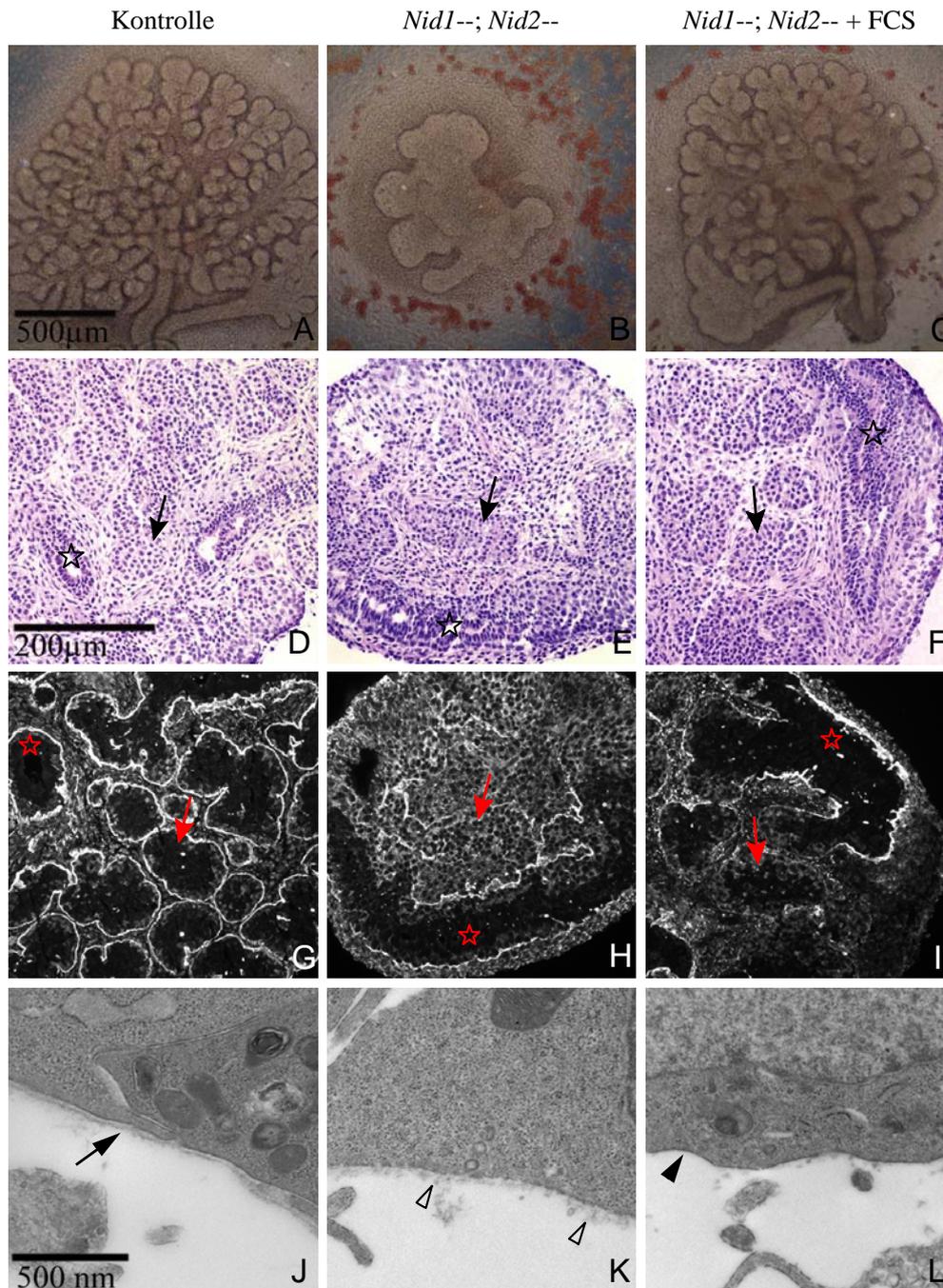


Abbildung 2.2.4: Organisation von Laminin in Drüsenepithelien nach dreitägiger Entwicklung *in vitro*.

A-C: Morphologische Übersicht der Speicheldrüsenprimordien vor der Einbettung. D-F: HE-Färbung auf Gefrierschnitten. Die Pfeile deuten auf epitheliale Endknospen. Die Sterne kennzeichnen epitheliale Gänge. G-I: Immunfluoreszenzen mit einem gegen Laminin 111 gerichteten polyklonalen Antiserum auf zu D-E benachbarten Schnitten. Im Kontrollgewebe (G) sind sowohl das Gangsystem als auch die Endknospen von einer kontinuierlichen Laminin-Deposition umgeben. In dem schwach verzweigten Nidogen 1/2-defizienten Primordium hat sich ein Gangsystem mit zentralem Lumen gebildet, dessen Zellen sich durch Laminin vom Mesenchym abgrenzen (H). Die wenigen in der HE-Färbung identifizierbaren Endknospen weisen keine basale Immunreaktivität auf. Stattdessen zeigt sich eine gleichmäßig starke Laminin-Verteilung im Endknospenepithel und Mesenchym. Die nach Inkubation in Gegenwart von FCS stärker verzweigten Nidogen 1/2-defizienten Anlagen weisen regelmäßig angeordnete, runde Endknospen auf (C). Die Laminin-Deposition unterhalb des Gangsystems endet auch hier im Übergangsbereich zu den Endstücken. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen in der Kontrolle eine durchgängige Basalmembran an den epithelialen Zellen des Gangsystems (Pfeil in J). In Nidogen-doppelmutanten Explantaten findet sich nicht organisiertes (offene Pfeilspitze in K) oder gar kein extrazelluläres Material (Pfeilspitze in L).

2.3 Modell zur *in vivo*-Analyse der Interaktion von Laminin und Nidogen

Mehrere *in vitro* Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass die Interaktion von Nidogen und Laminin essentiell für die epitheliale Differenzierung ist (Ekblom *et al.*, 1994; Kadoya *et al.*, 1997). Die hochaffine Bindung von Nidogen an Laminin wird über ein einzelnes LE-Modul in der Laminin $\gamma 1$ -Kette, Lam γ 1III4, vermittelt. Der singuläre Aminosäureaustausch N802S reduziert die Bindungsaffinität zu Nidogen 1 um das 46.000fache (Poschl *et al.*, 1996). In vorhergehenden Arbeiten in diesem Labor wurde das die Nidogen-Bindungsstelle tragende Fragment Lam γ 1III3-5 rekombinant in Säugerzellen exprimiert. In einem Modellsystem zur Nachahmung früher embryonaler Entwicklung konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid den Aufbau einer Basalmembran inhibiert (Tunggal *et al.*, 2003). Um die Relevanz dieser Ergebnisse *in vivo* nachzuweisen sollten im Rahmen dieser Arbeit transgene Mauslinien etabliert werden, in welchen Lam γ 1III3-5 in den epithelialen Zellen der Milchdrüsen exprimiert wird. Das transgene Peptid, welches aufgrund fehlender LN-Module nicht in das Laminin-Netzwerk integriert werden kann, sollte an Nidogen binden und dieses so aus dem Basalmembran-aufbauenden System entfernen. Die Möglichkeit durch unterschiedliche Kopienzahl des Transgens unterschiedliche Mengen an Nidogen zu binden, ermöglicht eine Analyse hypomorpher Funktionsverluste. Als interne Kontrolle der Spezifität der beobachteten Phänotypen sollte das transgen exprimierte Konstrukt Lam γ 1III3-5 N802S dienen.

Im Unterschied zu den meisten Organen durchläuft die Milchdrüse einen Großteil ihrer Entwicklung im erwachsenen Organismus. Während die Sammelgänge schon in der Pubertät gebildet werden, entstehen die Milch-sekretierenden Alveoli erst während der Schwangerschaft und werden während der Involution wieder abgebaut. Dies hat den Vorteil, dass selbst starke Entwicklungsdefekte nicht zur Letalität führen und die Männchen das Transgen an die nächste Generation übertragen können, falls die Weibchen ihre Jungen nicht säugen können. Das *whey acidic protein (Wap)* Gen wird nahezu ausschließlich in Milchdrüsengewebe exprimiert. Die regulatorischen Elemente des *Wap* sind bereits gut untersucht und auf ihnen basierende Expressionsvektoren sind eine beliebte Methode um transgene Elemente in den epithelialen Zellen der Milchdrüse während der späten Schwangerschaft und Laktogenese zu exprimieren (Rosen *et al.*, 1996; Hutchinson and Muller, 2000). Dieses Entwicklungsstadium ist durch starke Proliferation gekennzeichnet, die terminalen Endknospen differenzieren sich zu den Milch-sekretierenden Alveoli. Der hier

verwendete WAP-Expressionsvektor #1 enthält 2,4 kb der 5'-UTR (*untranslated region*) sowie 1,8 kb der 3'UTR des endogenen *Wap*-Gens, der Bereich zwischen diesen regulatorischen Regionen wurde durch multiple Restriktionsschnittstellen ersetzt (Burdon *et al.*, 1991). Der Vektor enthält außerdem eine *loxP*-Insertionsstelle in der 3'-UTR mit deren Hilfe mehrfach in Kopf-an-Schwanz-Orientierung integrierte Transgene ausgeschnitten werden können.

2.3.1 Generierung transgener Mauslinien

Die Konstrukte γ 1III3-5 und γ 1III3-5 N802S lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits mit einem N-terminalen BM40-Signalpeptid und FLAG-Epitop fusioniert im Vektor pCEP-Pu vor (Tunggal *et al.*, 2003). Die Inserts wurden über *HindIII* und *NotI* Verdau aus dem Vektor geschnitten und die überhängenden Enden aufgefüllt. Die Ligation der Fragmente erfolgte in den direkt *downstream* der 5'-UTR linearisierten WAP-Expressionsvektor. Die DNA-Sequenz wurde überprüft und ein 6 kb großes lineares Fragment, welches die regulatorischen Elemente des *Wap*-Gens sowie das zu exprimierende Peptid trägt, durch Mikroinjektion in den Pronukleus von befruchteten Eizellen injiziert. DNA-Fragmente inserieren zufällig im Genom, wobei häufig mehrere aneinander gereihte Konstrukte an derselben Stelle integrieren (Tandemintegration). Die aus den injizierten Zygoten hervorgehende Generation wurde mittels PCR auf die Insertion des Transgens hin überprüft. Die Primer für die PCR wurden so gewählt, dass sie die Schnittstelle zwischen den regulatorischen Elementen des *Wap*-Gens und der *Lamc1*-Sequenz überspannen (Abb. 2.3.1, I). Die endogenen Sequenzen liegen auf unterschiedlichen Chromosomen und können nicht amplifiziert werden. Unter diesen Bedingungen wird nur in genomischer DNA transgener Mäuse ein Fragment von 630 bp amplifiziert. Zur Überprüfung der Qualität der isolierten DNA wurde eine Test-PCR mit für das *Lamc1*-Gen spezifischen Primern durchgeführt. Für beide Konstrukte wurden jeweils zwei *founder*-Mäuse erhalten, aus denen insgesamt vier unabhängige Linien etabliert werden konnten (Tabelle 2.1).

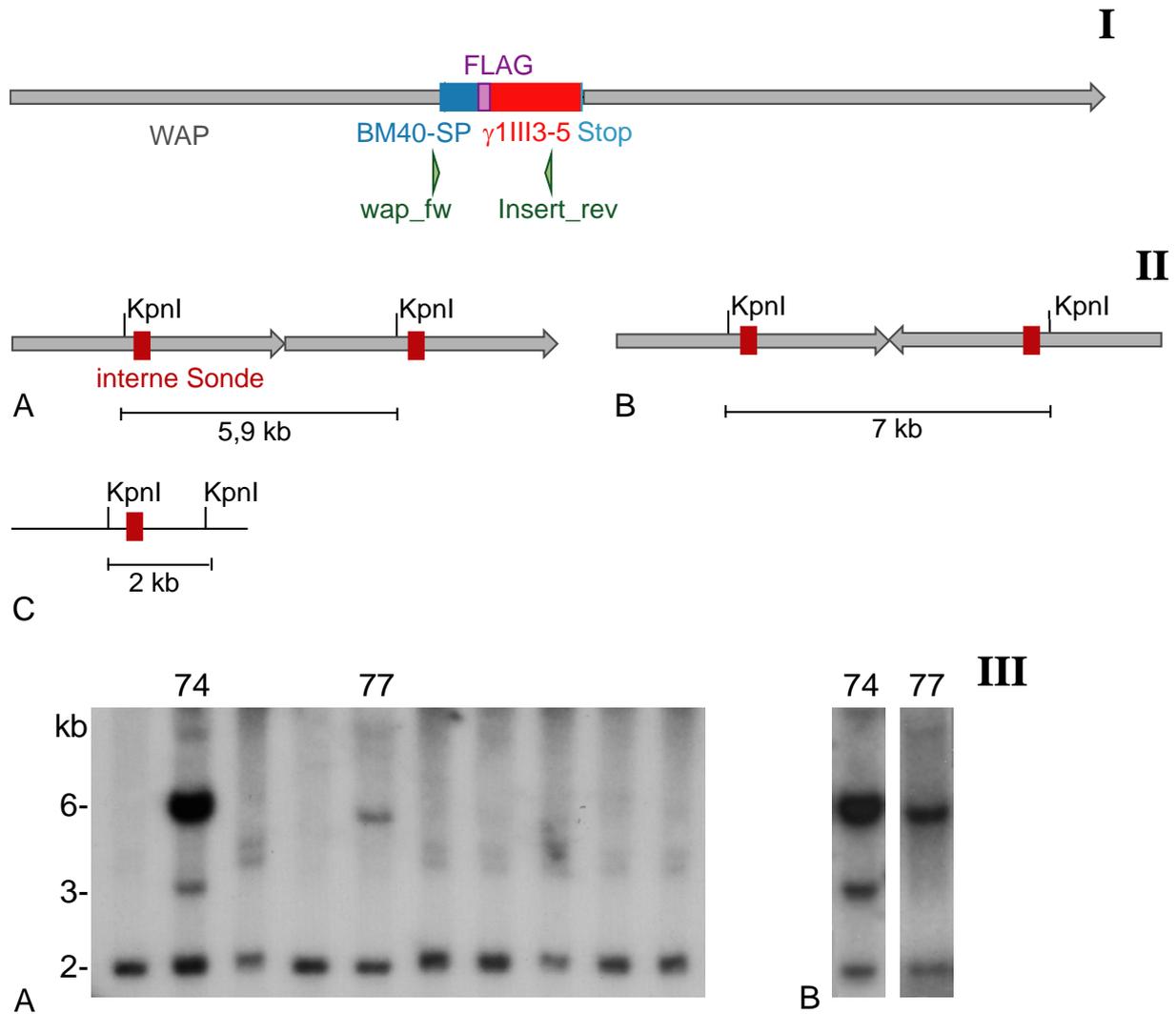


Abbildung 2.3.1: Generierung transgener Mäuse. **I:** Schematische Darstellung des Expressionsvektors. Die für die Nidogen-Bindestelle des *Lamcl*-Gens kodierende Sequenz (γ 1III3-5) wurde zwischen die regulatorischen, nicht translatierten Regionen des *Wap*-Gens (Burdon *et al.*, 1991) inseriert. Die Konstrukte tragen N-terminal ein BM40-Signalpeptid, um die Sekretion in der extrazellulären Raum zu gewährleisten, sowie ein FLAG-Epitop zur späteren Identifizierung des transgenen Peptids. **II:** schematische Darstellung der mittels Southernblot-Analyse detektierbaren Integrationsformen. Die Tandemintegration mehrerer Konstrukte in „Kopf-an-Schwanz“-Orientierung führt nach Restriktion mit *KpnI* und Detektion mit einer γ 1III3-5 spezifischen Sonde zu einer Bande auf Höhe von 5,9 kb (A). „Kopf-an-Kopf“-Orientierung liefert ein 7 kb großes Fragment (B). Das endogene *Lamcl*-Gen wird durch eine Bande bei 2 kb repräsentiert und kann als Ladekontrolle sowie zur Abschätzung der Integrationshäufigkeit dienen (C). **III:** Southernblot-Analyse zur Genotypisierung der F0-Generation (A) sowie der etablierten Linien (B). Die beiden Transgen-positiven Linien (74 und 77) zeigen unterschiedlich intensive Banden bei ~6 kb. Die schwache Bande oberhalb von 3 kb in Linie 74 repräsentiert eine singuläre Integration oder das terminale Fragment einer Tandemintegration, über deren Größen keine Vorhersage getroffen werden kann. Beide Linien weisen multiple Integrationen auf.

Tabelle 2.1: Generierung transgener Mauslinien. Für beide Konstrukte konnten je zwei unabhängige Mauslinien etabliert werden.

| Konstrukt | Anteil transgen-positiver an Gesamtzahl der geborenen Mäuse | etablierte Mauslinien |
|-----------------------|---|-----------------------------|
| γ 1III3-5 | 2/40 (5%) | 74 WAP- γ 1III3-5 |
| | | 77 WAP- γ 1III3-5 |
| γ 1III3-5N802S | 2/55 (3,6%) | 25 WAP- γ 1III3-5mut |
| | | 40 WAP- γ 1III3-5mut |

Zur genaueren Analyse der Insertionen wurde das Southern Blot-Verfahren verwendet. Durch Wahl einer geeigneten Sonde und Restriktionsverdau können Aussagen über die Art und Häufigkeit der Integration gemacht werden (für lam γ 1III3-5 in Abb. 2.3.1 dargestellt). Als Sonde wurde ein Bereich aus den Laminin γ 1III3-5-Modulen verwendet. Alle DNA-Proben zeigen ein Fragment auf Höhe von 2 kb, welches das endogene *Lamc1* darstellt. Beide Linien, 74 WAP- γ 1III3-5 und 77 WAP- γ 1III3-5 weisen zusätzlich ein Fragment von ~6 kb auf, hier sind mehrere Konstrukte in Kopf-an-Schwanz-Orientierung integriert. Die Bandenintensitäten wurden mit ImageQuantTM 5.2 (Molecular Dynamics) ausgewertet und so die Integrationshäufigkeit des Transgens bestimmt. In Linie 74 WAP- γ 1III3-5 liegt das Transgen in 16facher Kopienzahl vor, in Linie 77 WAP- γ 1III3-5 in 4facher. Das schwach hybridisierende Fragment bei ~3 kb repräsentiert entweder ein flankierendes Element oder eine singuläre Integration.

2.3.2 Nachweis der Expression des Transgens

Die Expression eines Transgens wird von den regulatorischen Sequenzen in seiner Umgebung kontrolliert. Neben den im Konstrukt enthaltenen Elementen nehmen häufig regulatorische Regionen des Integrationsortes Einfluß auf die Expressionsstärke. Die 2,4 kb der *Wap*-5'-UTR sollten zu einer starken Induktion im Milchdrüsenepithel während der späten Schwangerschaft führen. Um das Transkript in diesem Stadium nachzuweisen wurden die Milchdrüsen aus Mäusen am Tag 18 der Schwangerschaft sowie am Tag 5 der Laktation präpariert und ihre RNA isoliert. In beiden untersuchten Linien, 74 WAP- γ 1III3-5 und

77 WAP- γ 1III3-5, konnte zu diesen Zeitpunkten das Transgen auf RNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 2.3.2). Da die RT-PCR keine quantitative Nachweismethode ist, kann aufgrund der Bandenintensität keine Aussage über das Expressionslevel getroffen werden.

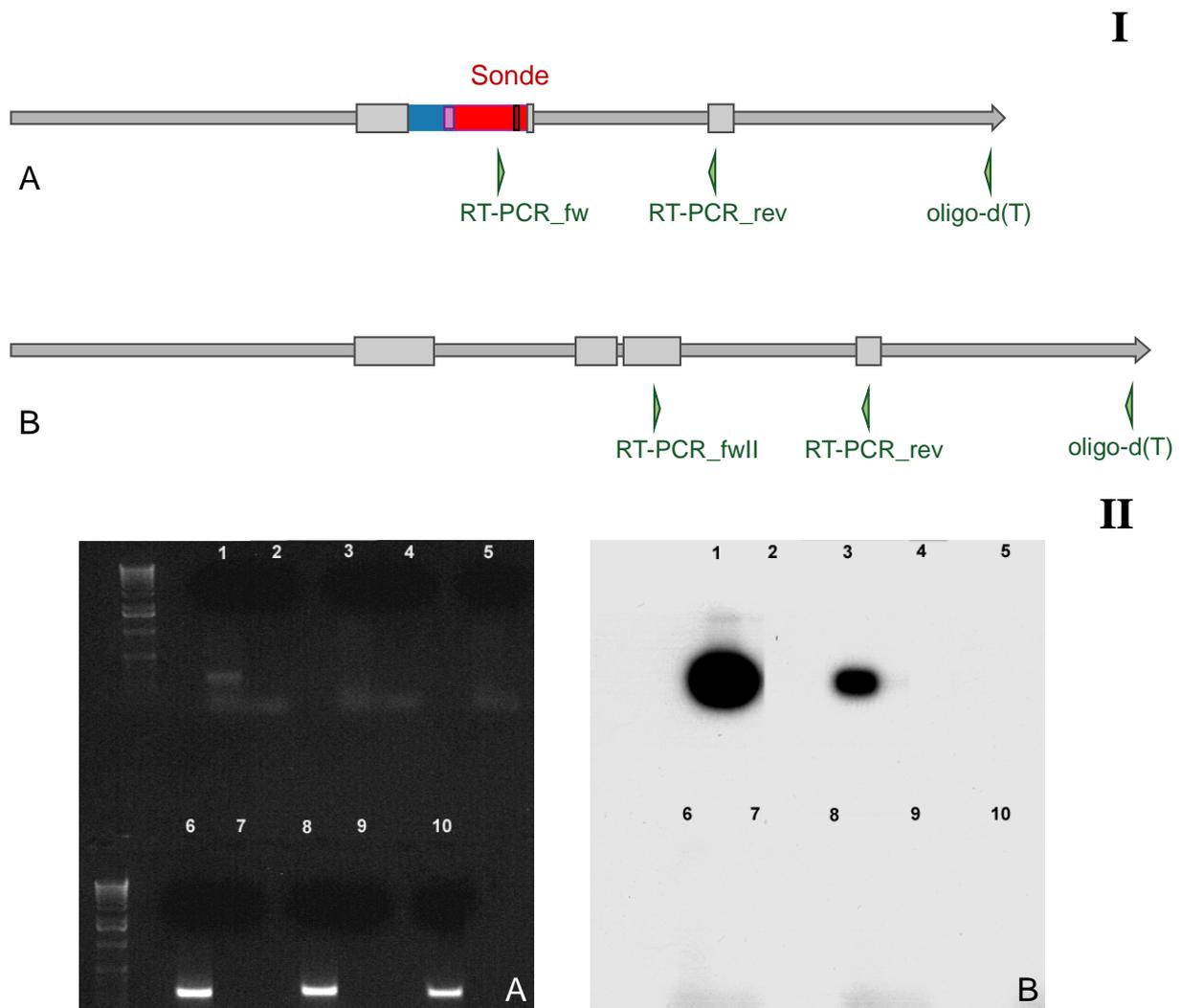


Abbildung 2.3.2: Nachweis des exprimierten Transgens mittels RT-PCR. I: Organisation der Primer für die RT-PCR. Die reverse Transkription erfolgte mit einem oligo-d(T)Primer. Die Primer für die anschließende PCR (grüne Pfeilspitzen) überspannen jeweils ein Intron (Exons sind in blau hervorgehoben) um eine Differenzierung von DNA und RNA-*template* zu ermöglichen. Im transgenen Konstrukt (A) amplifizieren die verwendeten Primer 240 bp gespleißte RNA. Der Primer RT-PCRII_fw bindet nur im endogenen *Wap*-Gen in Exon 3 (B) und dient zur Kontrolle der RNA-Qualität. RT-PCR mit diesem Primer-Paar sollte in einem 230 bp großem Fragment resultieren. **II:** Als *template* für die RT-PCR diente aus laktierenden Milchdrüsen der Linie 77 WAP- γ 1III3-5 (Spur 1,6), Linie 74 WAP- γ 1III3-5 (Spur 3,8) bzw. eines WT Tieres (Spur 5,10) isolierte RNA. Als Kontaminationskontrollen wurden in Spur 2,4,7 und 9 kein *template* eingesetzt. Spur 1-5 weisen transgene RNA nach (RT-PCR_fw; RT-PCR_rev). Spur 6-10 weisen das endogene *Wap* nach (RT-PCR_fwII; RT-PCR_rev). Sowohl in der Linie 77 WAP-LE3-5 (Spur 1) als auch in der Linie 74 WAP-LE3-5 (Spur 3) konnten Fragmente in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Die Spezifität der Banden wurde mittels Southernblot-Analyse gezeigt (B).

Die Weibchen beider WAP γ 1III3-5 transgenen Linien waren alle in der Lage Würfe von durchschnittlicher Größe (8-10 Junge) zu säugen. Die Milchdrüsen dieser Tiere zeigten auch nach mehreren Schwangerschaften keine Auffälligkeiten gegenüber ihren transgen-negativen Geschwistern.

Zum Nachweis des transgenen Peptids wurden Proteinextrakte von Milchdrüsenengewebe hergestellt und im Westernblot analysiert. Die Umsetzung mit einem polyklonalen Antiserum gegen Laminin 111 bzw. Nidogen 1 zeigt, dass mit dem verwendeten Protokoll die Basalmembrankomponenten extrahiert wurden (Abb. 2.3.3, I A). Die Detektion des Transgens erfolgte über sein FLAG-Epitop. Weder am Tag 16 der Schwangerschaft noch am Tag 5 der Laktation konnte das transgene Peptid nachgewiesen werden. Um die Sensitivität des Proteinnachweises zu erhöhen sollte das Transgen mit einem gegen die Nidogen-Bindestelle generierten Antikörper (anti-Lamy1III3-5) immunpräzipitiert werden. Als Kontrolle wurde das rekombinante in 293 EBNA-Zellen exprimierte und aufgereinigte Peptid FLAG-Laminin γ 1III3-5 präzipitiert. Der Antikörper ist in der Lage das zugesetzte Peptid bis zu einer Konzentration von 5 ng/ μ l zu präzipitieren (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 2.3.3, I, B sind die Proteinextrakte der beiden transgenen Linien und einer Kontrolle sowie die entsprechenden Immunpräzipitationen dargestellt. Die schwache Bande oberhalb der erwarteten Höhe repräsentiert die kleine Untereinheit der Maus-IgGs (Immunglobulin G) und kann durch ein intensives *preclearing* der Proteinextrakte entfernt werden. In beiden transgenen Linien war das Transgen nicht nachweisbar.

Als weitere Möglichkeit zum Nachweis des Peptids wurden indirekte Immunfluoreszenzen auf Gefrier- als auch Paraffinschnitten der Milchdrüsenengewebe angefertigt. Ein gegen das FLAG-Epitop gerichteter monoklonaler Antikörper (M2, Sigma) konnte das Transgen nicht detektieren. Experimente von Judith Tunggal hatten gezeigt, dass das rekombinante Protein die Interaktion von Nidogen und Laminin inhibiert (Tunggal *et al.*, 2003). In den beiden WAP- γ 1III3-5 Linien lokalisieren jedoch Nidogen und Laminin weiterhin gemeinsam an der alveolären Basalmembran (Abb. 2.3.3, II).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beide Linien das transgene Peptid nicht in mit den hier durchgeführten Methoden detektierbaren Mengen exprimieren. Aufgrund der großen Mengen von endogenem Nidogen kann nur ein stark exprimiertes Transgen eine wirkungsvolle kompetitive Hemmung der Laminin-Nidogen-Interaktion erzielen. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Linien sind für die weitere Analyse nicht geeignet.

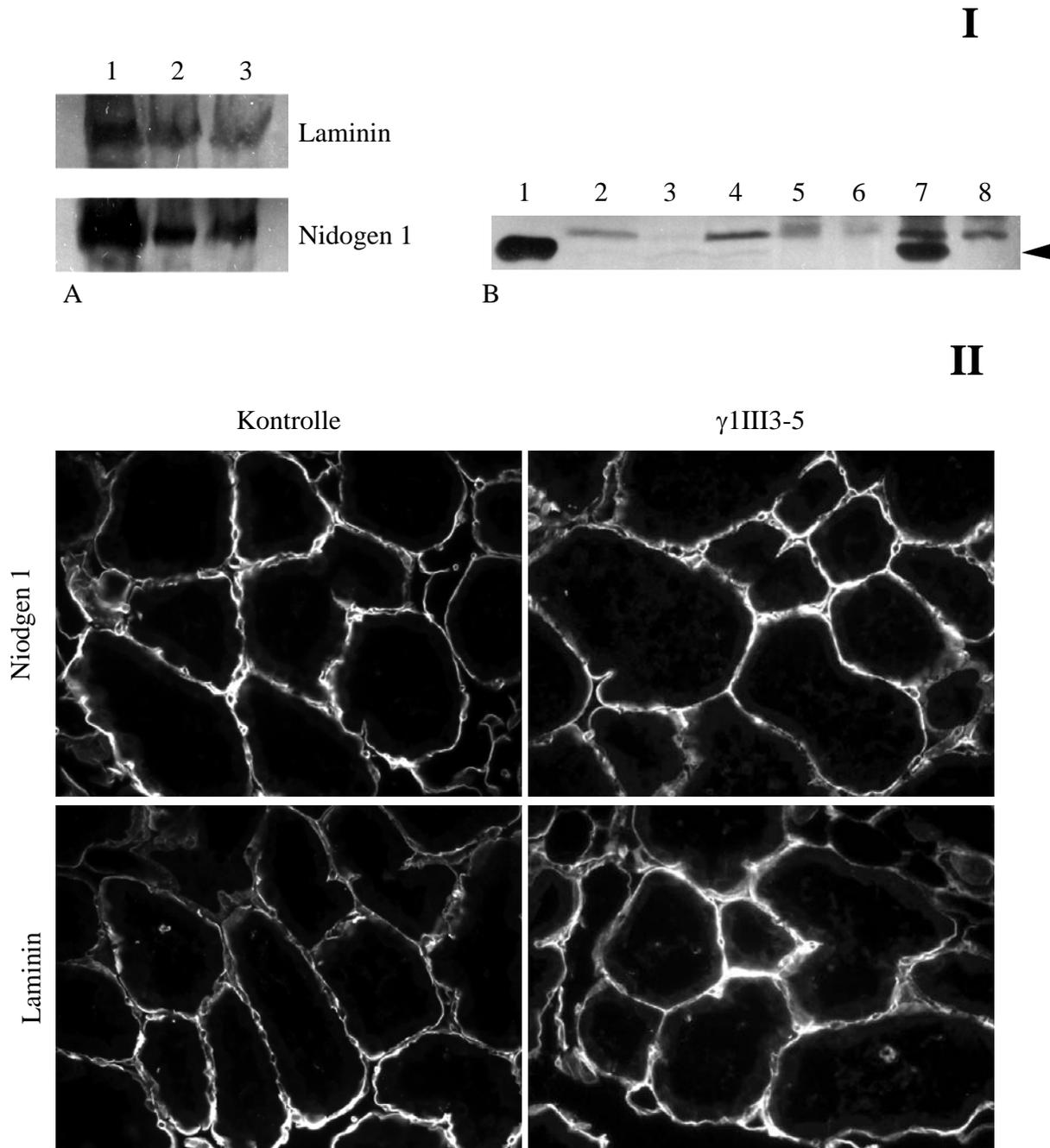


Abbildung 2.3.3: Das Transgen wird auf Proteinebene nicht in nachweisbaren Mengen exprimiert. **I:** Westernblot-Analysen zum Nachweis von Basalmembrankomponenten bzw. des transgenen Peptids in Proteinextrakten aus laktierenden Milchdrüsen. **A:** Detektion von Laminin und Nidogen 1 in Extrakten der Linie 74 WAP- γ 1III3-5 (Spur 1), Linie 77 WAP- γ 1III3-5 (Spur 2) bzw. einer nicht-transgenen Maus (Spur 3). **B:** Immunpräzipitation mit anti-Lamy1III3-5. Die Umsetzung des Blots erfolgte mit einem monoklonalen gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper (M2, Sigma). In Spur 1 ist 0,4 μ g rekombinates FLAG-Lamy1III3-5 aufgetragen. Die Spuren 2-4 zeigen die Proteinextrakte der Linie 77-WAP- γ 1III3-5, der Linie 74-WAP- γ 1III3-5 sowie einer nicht transgenen Maus. Daneben folgen die Immunpräzipitationen der entsprechenden beiden transgenen Linien 74 und 77. In Spur 7 ist als Positivkontrolle für die Präzipitation dem nicht transgenen Extrakt 0,6 μ g rekombinates FLAG-Lamy1III3-5 zusetzt worden. Spur 8 zeigt das Präzipitat des nicht-transgenen Extrakts. **II:** Immunfluoreszenzen auf Schnitten laktierender Milchdrüsen. Sowohl im Kontrollgewebe, als auch in der Linie 74-WAP- γ 1III3-5 sind Laminin und Nidogen 1 an der die Alveolen umgebenden Basalmembran lokalisiert.

3 Diskussion

3.1 Auswirkungen der Nidogen 1/2-Defizienz auf die Extremitätenentwicklung

3.1.1 Nidogen ist für die Integrität der die AER unterliegenden Basalmembran notwendig

Laminin, Kollagen IV, Perlecan und Nidogen stellen ubiquitäre Komponenten der Basalmembranen dar. Die unterschiedlichen Anforderungen an diese Moleküle werden durch die Betrachtung der betreffenden Defizienz-Phänotypen deutlich. Während Laminin essentiell für die Assemblierung jeder Basalmembran ist, werden bei Verlust von Kollagen IV oder Perlecan Basalmembranen noch so weit ausgebildet, dass sie zumindest den frühen Anforderungen während der Embryonalentwicklung gerecht werden (Smyth *et al.*, 1998; Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999; Costell *et al.*, 1999; Poschl *et al.*, 2004). Erst bei einer stärkeren mechanischen Belastung, wie der Kontraktion von Kardiomyozyten oder der Expansion der Hirnventrikel, verlieren diese Basalmembranen ihre Integrität, was schließlich zum Tod führt (Costell *et al.*, 1999; Poschl *et al.*, 2004). Die jeweils singuläre Defizienz einer der beiden Nidogen-Isoformen hingegen hat keinerlei Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit und Fertilität, was auf eine gegenseitige Kompensation der beiden Nidogene deutet (Murshed *et al.*, 2000; Schymeinsky *et al.*, 2002). Tatsächlich zeigen die Nidogen 1/2-defizienten Tiere Defekte in den Basalmembranen, diese sind jedoch begrenzt und beeinträchtigen die Funktion der betreffenden Gewebe, wie z.B. das Herz, in geringerem Ausmaß als der Verlust von Kollagen IV oder Perlecan (Bader *et al.*, 2005). Die unter 2.1.1 beschriebenen Defekte in der die AER (apikale ektodermale Randleiste) unterliegenden Basalmembran sind die einzigen zu diesem Entwicklungszeitpunkt beobachteten Basalmembranstörungen. Neben den in dieser Arbeit analysierten Nidogen 1/2-defizienten Mäusen sind zwei weitere Defizienzen von Basalmembrankomponenten bzw. –Rezeptoren beschrieben, die zu Syndaktylie führen (Miner *et al.*, 1998; De Arcangelis *et al.*, 1999). Sowohl der Verlust der Laminin $\alpha 5$ -Untereinheit als auch der $\alpha 3/\alpha 6$ -Integrine resultiert außerdem in Exencephalie, ein Defekt, der auf den

unvollständigen Schluß des Neuralrohrs zurückzuführen ist. In den Nidogen 1/2-defizienten Embryonen treten diese Störungen nicht auf, die Basalmembran des Neuralrohres erscheint am E10,5 intakt, obgleich es sich hier auch um ein stark proliferierendes Gewebe handelt. Die Integrität der Basalmembran in den Extremitätenknospen zwischen E9,5 und E13,5 stellt demnach eine gewebespezifische Anforderung an Nidogen dar.

3.1.2 Die Ausbildung der AER ist von einer intakten Basalmembran abhängig

Die murine AER wird kurz nach dem Auswachsen der Extremitätenknospe ausgebildet, indem ihre ektodermalen Vorläuferzellen morphogenetische Bewegungen und Komprimierung unterlaufen (Loomis *et al.*, 1998). Zu Beginn der Extremitätenentwicklung (9,5dpc) ist die subektodermale Basalmembran immunhistologisch noch intakt. Erst am Tag 10,5dpc, wenn die AER als distale ektodermale Erhebung deutlich wird, treten Störungen in der Lokalisation von Basalmembran-Komponenten auf. Diese Defekte sind auf den distalen und ventralen Bereich der Extremitätenknospe begrenzt. Gleichzeitig ist in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen eine abgeflachte und hypermorphe AER zu beobachten. Da die Vorläuferzellen der AER aus der ventralen Ektodermpopulation rekrutiert werden und von dort nach distal wandern, ist dieser Bereich der Basalmembran stärkerer Belastung ausgesetzt. Analysen, wie z.B. die Kondensation des ventralen Nervenstrangs im *Drosophila*-Embryo deuten darauf hin, dass die Ausbildung einer intakten Basalmembran für solche morphogenetischen Bewegungen notwendig ist (Olofsson and Page, 2005).

β 1-Integrine stellen die Hauptrezeptoren der Basalmembranen dar. In der Extremitätenknospe wird β 1-Integrin im gesamten Oberflächen-Ektoderm an der basalen Zellseite exprimiert, während es in der AER zusätzlich um die gesamten Zellen herum verteilt vorliegt. Die Defizienz beider Nidogen-Isoformen führt neben der Disruption der Basalmembran zu einer deutlichen Reduktion von Integrinen sowohl unterhalb der AER, wo es normalerweise mit Laminin kolokalisiert, als auch innerhalb der apikalen Randleiste (Abb. 2.1.4). Experimente mit embryoiden Körperchen haben gezeigt, dass die Defizienz von β 1-Integrin zu einer reduzierten Expression der Laminin α 1-Kette führt (Aumailley *et al.*, 2000). Ebenso resultiert der Verlust der α 3 und α 6-Integrine in einer reduzierten Immunreaktivität von Laminin α 1 unterhalb der AER sowie einer weniger kompakt organisierten Randleiste (De Arcangelis *et al.*, 1999). Hier konnte nun gezeigt werden, dass auch umgekehrt

Komponenten der Basalmembran Einfluß auf die Lokalisation und Expression von Integrinen ausüben. Neben der Verknüpfung von Zellen und extrazellulärer Matrix vermitteln Integrine auch Zell-Zell-Adhäsion. Die dichte Zellanordnung in der AER verleiht mechanische Festigkeit und trägt dazu bei, dass sie in dorsoventral-Richtung flach bleibt (Critchlow and Hinchliffe, 1994). Die schwächere Immunreaktion von Integrinen in der AER könnte demnach auch eine Ursache für die weniger dicht organisierten epithelialen Zellen darstellen.

3.1.3 Reduzierte interdigitale Apoptose als Ursache für Syndaktylie

Die voll penetrante Syndaktylie in Nidogen 1/2-defizienten Extremitäten wird durch eine drastisch reduzierte interdigitale Apoptose hervorgerufen. Die exogene Applikation des Apoptose-induzierenden Zytokins BMP4 löst allerdings den programmierten Zelltod in dem mutanten Gewebe aus (siehe 2.1.8). Das interdigitale Mesenchym hat demnach nicht die Kompetenz verloren auf apoptotische Signale zu reagieren. Ähnliche Untersuchungen an Fibrillin 2-defizienten Autopodien, deren interstitielle Matrix strukturell verändert ist, haben gezeigt, dass hier die betreffenden Bereiche bereits auf das chondrogene Schicksal determiniert sind bevor der interdigitale Zelltod induziert wird (Arteaga-Solis *et al.*, 2001; Chaudhry *et al.*, 2001). Im Unterschied zu den Fibrillin 2-mutanten Autopodien, in denen einige Phalangen fusioniert sind, liegt in Nidogen 1/2-defizienten Extremitäten das Stützgewebe weitestgehend separiert vor. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass bei Verlust von Nidogen eine reduzierte Menge an apoptotischen Induktoren zu der Syndaktylie führt. Tatsächlich konnte hier gezeigt werden, dass sowohl die Expressionsstärke als auch die Expressionsdomänen der beiden Apoptose-induzierenden Faktoren *Bmp2* und *Bmp7* in den interdigitalen Bereichen reduziert bzw. distal verkürzt sind. Diese Beobachtung stellt eine hinreichende Ursache für die fehlende Separation der Finger und Zehen dar. Bereits in anderen Syndaktylie-Mausmodellen wurden reduzierte *Bmp2*- und *Bmp7*-Level in den von der Fusion betroffenen Bereichen beobachtet (Jiang *et al.*, 1998; Heymer and Ruther, 1999). Die molekulare Ursache für die Veränderungen im Expressionslevel dieser BMPs konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings gibt es Hinweise auf eine reziproke Abhängigkeit der Expressionen von BMPs und FGFs (Francis *et al.*, 1994; Laufer *et al.*, 1994; Heymer and Ruther, 1999).

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass das Mesenchym proximal der Zytokin-Quelle stärker apoptotisch reagiert als distal davon. Tatsächlich liegen bei stark ausgeprägter Syndaktylie in den Nidogen 1/2-defizienten Tieren die distalen Phalangen fusioniert vor. Der distale Bereich der Handplatten wird in Nidogen 1/2-defizienten Embryonen von einer ektopischen Mesodermis überlagert (Abb. 2.1.9). Das Ektoderm ist in diesen Regionen ebenfalls verändert, es wurde vermutlich durch das ausdringende Mesenchym verdrängt und zurückgefaltet. Die Auflösungen von Kompartimentgrenzen und das Eindringen von Zellen in benachbartes Gewebe ist ein typisches Resultat defekter Basalmembranen (Huang *et al.*, 2003). Entsprechende Beobachtungen sind auch in der Laminin $\alpha 5$ und $\alpha 3/\alpha 6$ -Integrin-Defizienz beschrieben und wurden als physische Behinderung der interdigitalen Apoptose diskutiert, ohne dass eine Veränderung in der Lokalisation oder Expression von Signalmolekülen gezeigt wurde (Miner *et al.*, 1998).

3.1.4 Auswirkungen einer defekten AER

Die AER ist für das kontrollierte Auswachsen der Extremitätenknospen verantwortlich, eine chirurgische Entfernung während der Entwicklung führt zu distal trunkierten Extremitäten. Die Anzahl der Zellen in der AER sowie ihre Ausmaße werden strikt reguliert. Entscheidend sind hierbei negative Regulatoren wie BMPs und sogenannte AERMFs (*AER maintenance factor*). *Bmp7*-defiziente Mäuse bilden eine verlängerte AER und postaxiale Polydaktylie aus (Luo *et al.*, 1995; Hofmann *et al.*, 1996). Ein ähnlicher Phänotyp wird in *Bmp4*-haploinsuffizienten Tiere beobachtet (Dunn *et al.*, 1997). Die Inhibierung mehrerer BMPs durch die ektopische Expression des BMP-Antagonisten Noggin führt zu einer sowohl räumlichen als auch zeitlichen Expansion der AER und resultiert in Poly- als auch Syndaktylie (Guha *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Für die Etablierung und Aufrechterhaltung der AER ist Wnt3/ β -Catenin essentiell (Barrow *et al.*, 2003). Mutationen von dickkopf, einem Wnt-Antagonisten, führen ähnlich der Inhibierung von BMPs zu einer verbreiterten AER und Polysyndaktylie (Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Adamska *et al.*, 2003; MacDonald *et al.*, 2004). Die in dem hypomorphen dickkopf-Allel *doubleridge* beschriebene Morphologie der AER ähnelt den in Nidogen 1/2-defizienten Embryonen beobachteten Veränderungen, allerdings führt der Verlust von

Nidogen zu einer anterioren Verkürzung der AER und ist nicht von einer Polydaktylie begleitet.

Die Beteiligung eines weiteren Signaltransduktionswegs an der Aufrechterhaltung der AER wurde durch Mutationen im Notch-Liganden *Serrate 2/Jagged 2* aufgedeckt. Das hypo- und amorphe Allel zeigen eine unterschiedlich starke Beteiligung der Knochen an der Syndaktylie (Sidow *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1998). Dies spricht dafür, dass der gleiche Mechanismus beide Ausprägungen hervorruft und unterstützt die Annahme, dass die Extremitätendefekte in den *Lama5*-Mutanten, in denen auch das Stützgewebe fusioniert ist, ebenso wie in *Nid1/2*-mutanten Mäusen auf einer instabilen Basalmembran beruhen. Hinweise für eine funktionelle Beziehung zwischen der Integrität der Basalmembran und dem ECM-Rezeptor Notch kommen von einer humanen Krankheit. In der durch Mutationen in Notch 3 hervorgerufenen CADASIL (*cerebral autosomla dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*) bilden sich ektopische Aggregate von Basalmembran-Komponenten in den Blutgefäßen (Rafalowska *et al.*, 2004).

3.1.5 Der Verlust anteriorer Skelettelemente ähnelt Defekten in Wachstumsfaktoren

Wie bereits oben diskutiert, führen die Defizienzen weiterer Basalmembran-assoziiierter Moleküle ebenfalls zu Syndaktylie. Sowohl in Laminin $\alpha 5$ als auch Integrin $\alpha 3/\alpha 6$ -Mutanten sind von der Fusion sowohl alle Glieder als auch teilweise das Stützgewebe betroffen und somit stärker ausgeprägt als in den hier analysierten Nidogen-Doppelmutanten. Trotz dieser starken Defekte sind keine Verluste von mehreren Skelettelementen entlang der proximodistalen Achse beschrieben. Ebenso weisen die unter 3.1.4 beschriebenen Mutanten mit einer weniger kompakten und verbreiterten AER zwar Syndaktylie, jedoch keine der für die Nidogen 1/2-Defizienz gezeigten Aplasien ähnlichen Phänotypen auf. Dies deutet auf zwei voneinander getrennte Funktionen von Nidogen, wobei der Verlust anteriorer Skelettelemente nicht allein auf eine reduzierte mechanische Stabilität der Basalmembran oder Expansion der AER zurückzuführen ist.

Ähnliche Hypo- und Aplasien von anterioren Extremitätenelementen treten nach der Eliminierung von *Fgf8* auf. So führt die Defizienz des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Sp8* zu einer nicht ausgebildeten AER und nur kurzzeitiger *Fgf8*-Expression. Die resultierenden Extremitäten dieser Tiere weisen fehlende Elemente besonders in distal-anterioren Strukturen

auf (Bell *et al.*, 2003). Ebenso zeigt der gewebespezifische Verlust von *Fgf8* in der AER auffallende Homologien zu den Nidogen 1/2-defizienten Extremitäten. Embryonen, die *Fgf8* in den Extremitätenknospen nur transient exprimieren (~E9 bis E10,25) bilden hypo- oder aplastische anteriore Elemente entlang der gesamten proximodistalen Achse aus (Lewandoski *et al.*, 2000). Die vollständige Eliminierung von *Fgf8* in den vorderen Extremitätenknospen führt zur Aplasie des Radius und Finger I mit 100%iger Penetranz (Moon and Capecchi, 2000).

In den Extremitätenknospen am Tag 10,5pc konnte gezeigt werden, dass FGF8 in der AER und an der subektodermalen Basalmembran lokalisiert, wo es vermutlich auf das die Basalmembran kontaktierende, marginale Mesenchym wirkt. In den Nidogen 1/2-defizienten Knospen ist diese Verteilung aufgehoben, FGF8 wird nicht an der Basalmembran konzentriert. Stattdessen kolokalisiert es mit der ektopisch deponierten ECM in der AER. In einigen Individuen führte die Zerstörung der Basalmembran zu einer tieferen Diffusion von FGF8 ins Mesenchym (Abb. 2.1.16). Dadurch reduziert sich die Konzentration von FGF8 im distalen Mesenchym, dem Bereich der stärksten Proliferation, und gleichzeitig gelangt FGF8 in zentrale Bereiche des Mesoderms, wo es im WT nicht auftritt. Aufgrund der durch den Verlust der beiden Nidogen-Isoformen verursachten Defekte in der Basalmembran ist auch die Lokalisation von Heparansulfat-Proteoglycanen (HSPGs) betroffen. HSPGs bilden zusammen mit FGFs und FGFRs Komplexe, die die Signaltransduktion erleichtern (Ornitz, 2000). Durch die diffuse Verteilung von Basalmembran-assoziierten HSPGs könnten in Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen Kofaktoren für die Aktivierung der FGFRs fehlen und so einen Verlustphänotyp auslösen. Von Perlecan ist bekannt, dass es über seine HS-Ketten sowie den Proteinanteil mit FGF2 (Knox *et al.*, 2002), FGF7 (Mongiat *et al.*, 2000) und FGF-BP (Mongiat *et al.*, 2001) *in vitro* interagiert. Perlecan-defiziente Embryonen, die die frühe letale Phase überstehen, bilden starke Chondrodysplasien aus, die möglicherweise eine Syndaktylie überdecken (Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999; Costell *et al.*, 1999). Neben Perlecan könnten jedoch auch weitere in der Basalmembran lokalisierte HSPGs, wie z.B. Agrin oder Kollagen XVIII, diese Funktion ausüben.

Ebenso denkbar ist, dass die verbreiterte *Fgf8*-Expressionsdomäne oder die zerstörte Diffusionsbarriere des Proteins zu einem ektopischen anti-apoptotischen Signal führt. FGFs und ihre Rezeptoren sind häufig reziprok in mesenchymalem bzw. epithelialem Gewebe lokalisiert. FGFR-Spleißvarianten vom b-Typ werden in Epithelien exprimiert und binden FGFs mesenchymaler Herkunft, während die vom c-Typ im Mesenchym lokalisiert sind und analog FGFs aus dem Epithel binden (Ornitz *et al.*, 1996). Verschiedene FGFs können den

gleichen Rezeptor aktivieren, wobei ein Teil der Spezifität des FGF-Signals vermutlich durch die räumlich getrennte Verteilung sichergestellt wird. Tiefer in das Mesenchym diffundierende FGF8-Moleküle könnten demzufolge ektopische Signale auslösen. Tatsächlich inhibiert die lokale Applikation von FGF2 den durch BMPs induzierten interdigitalen Zelltod (Macias *et al.*, 1996; Buckland *et al.*, 1998).

Unterstützt wird die Theorie, dass in Nidogen 1/2-defizienten Mäusen die Syndaktylie durch ein ektopisches FGF-Signal verursacht wird, durch humane kongenitale Krankheiten. Beim Apert-Syndrom tritt neben Missbildungen im Schädel- und Gesichtsbereich eine ausgeprägte Syndaktylie an Händen und Füßen auf, die durch Mutationen im *Fgfr2*-Gen verursacht wird. Einige der krankheitsauslösenden Mutationen führen zur ektopischen Expression der Spleißvarianten FGFR2IIIb in Fibroblasten, andere Mutationen bewirken eine unspezifische Bindung von FGF10 an FGFR2IIIc. In beiden Fällen wird eine autokrine Wirkung von FGF10 ermöglicht (Wilkie *et al.*, 2002; Ibrahimi *et al.*, 2004).

3.1.6 Über FGFs vermittelte Signale

Rekombinantes FGF kann die wesentlichen Funktionen der AER übernehmen und das Auswachsen der Extremitätenknospe regulieren. Nach der chirurgischen Entfernung der AER unterlaufen die ~200 µm unterhalb der AER lokalisierten mesenchymalen Zellen den programmierten Zelltod (Rowe *et al.*, 1982; Dudley *et al.*, 2002). Eine inhibierte FGF-Signaltransduktion sollte demnach erwartungsgemäß in einer Veränderung der Zellvitalität im distalen Mesenchym unterhalb der AER resultieren. Ein solcher Effekt konnte in den Nidogen 1/2-defizienten Extremitätenknospen nicht beobachtet werden. Stattdessen wurde am E10,5 eine Region mit verstärkter apoptotischer Aktivität im anterioren proximalen Mesenchym detektiert (Abb. 2.1.15). Zu diesem Zeitpunkt ist keine verstärkte apoptotische Region in der Extremitätenknospe bekannt, die anteriore und posteriore nekrotische Zone sowie der *opaque patch* werden erst später in der Extremitätenentwicklung ausgebildet. Ähnliche Auswirkungen sind in Mutanten, die zu einer Eliminierung der *Fgf*-Expression in der AER führen, beschrieben. Bei Defizienz von *Fgf8* und *Fgf4* in den Extremitätenknospen tritt im proximalen Mesenchym eine deutlich apoptotische Region auf (Sun *et al.*, 2002). Ebenso resultiert die Defizienz von *Fgf8*, *Fgfr2IIIb* oder *Sp8* in einer proximal lokalisierten verstärkten Apoptose (Moon and Capecchi, 2000; Revest *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2003). Alle

hier beschriebenen Mutationen führen zu Hypo- und Aplasien entlang der proximodistalen Achse. Es erscheint demnach wahrscheinlich, dass am E10,5 die Vorläuferzellen der später fehlenden Elemente sterben.

FGFs lösen abhängig vom jeweiligen Zelltyp so unterschiedliche Reaktionen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose aus. Die Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 und p38 wird in allen Zelltypen beobachtet, während die Aktivierung der anderen Signalkaskaden (PI(3)K/Akt-Weg, PLC γ -Weg) zelltypspezifisch auftritt. Determinanten für die differentielle FGF-Reaktionen sind die unterschiedlichen Rezeptoren, das Vorhandensein von Effektoren, sowie Zelltyp-abhängige Regulation der Gen-Transkription. Durch den gegenseitigen Einfluss unterschiedlicher Signalwege wird die Reaktion der Zelle auf den gleichen Liganden zusätzlich beeinflusst (Dailey *et al.*, 2005).

Übereinstimmend mit einem über die epithelio-mesenchymalen Grenze hinweg erfolgenden FGF-Signal wurde nicht im Ektoderm, sondern im Mesenchym der Extremitätenknospen phosphorylierte p44/42 MAPK detektiert. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Nidogen 1/2-defizienten Embryonen, unterstützt durch die Beobachtung, dass im Allgemeinen das Auswachsen der Extremitätenknospe entlang der proximodistalen Achse nicht gestört ist. Nur in einem der analysierten Nidogen 1/2-defizienten Embryonen wurde ein verändertes Phosphorylierungsmuster beobachtet. In den dem Ektoderm benachbarten Zellen liegt p44/42 MAPK weiterhin phosphoryliert vor. Lediglich der zentrale Bereich der Extremitätenknospe zeigt hier kein Signal (Abb. 2.1.16). Da in dem betreffenden Embryo auch eine starke apoptotische Reaktion im proximalen Mesenchym sowie eine Diffusion von FGF8 in das Mesenchym beobachtet wurden, ist ein funktionaler Zusammenhang zwischen der FGF-Signaltransduktion und dem programmierten Zelltod wahrscheinlich.

Widersprüchliche Ergebnisse zu den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen lieferte die Analyse der FGF8-Signaltransduktion im Huhn. Zu einem dem Entwicklungsstadium E11 der Maus entsprechenden Zeitpunkt wurde die durch den PI(3)K/Akt-Weg induzierte Mkp3 (MAPK Phosphatase 3) im Mesenchym lokalisiert. Mkp3 dephosphoryliert p44/42 MAPK und dementsprechend wurde die phosphorylierte Form der p44/42 MAPK hauptsächlich in der AER detektiert (Kawakami *et al.*, 2003). Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, dass Aktivierung des MAPK-Wegs zum Zelltod führen kann, während die Aktivierung des PI(3)K/Akt-Weges dies verhindert. Die Analyse der Phosphorylierung von p44/42 MAPK in der Maus hingegen unterstützt die in der

vorliegenden Arbeit dargestellte exklusive Lokalisation im Mesenchym. Am Expressionsort von FGF8, der AER, liegt p44/42 MAPK nicht phosphoryliert vor (Corson *et al.*, 2003). Diese unabhängigen Untersuchungen deuten auf Unterschiede in der FGF-Signaltransduktion zwischen Huhn und Maus, bzw. zeigen eine strikte zeitliche Regulation während der Extremitätenentwicklung.

3.1.7 Verstärkt anteriore Ausprägung der Fehlbildungen

Der Verlust von Knochen in Nidogen 1/2-defizienten Extremitäten betrifft alle Bereiche entlang der proximodistalen Achse, zeigt jedoch eine Präferenz für anteriore Elemente. Ebenso ist der einzige nie von der Fusion betroffene Finger der posterior gelegene Nummer V. Die Hypoplasien gehen, wie oben diskutiert, vermutlich auf die verstärkte Apoptose am E10,5 zurück. Diese apoptotisch aktive Region wurde im anterioren Bereich lokalisiert und könnte so spezifisch anteriore Vorläufer dezimieren. Da die posterioren Strukturen sowohl im Zeugopodium als auch Stylopodium zeitlich vor den anterioren Strukturen angelegt werden (Wanek *et al.*, 1989) führt eine Dezimierung der Zellpopulation möglicherweise immer zum Verlust anteriorer Elemente.

In den Autopodien hingegen werden zunächst die medialen und anschließend die lateralen Elemente angelegt. Von den Extremitätenknospen des Huhns ist bekannt, dass die posteriore AER deutlicher ausgeprägt ist als die anteriore (Todt and Fallon, 1984). Hier werden neben *Fgf8* und *Fgf9* auch *Fgf4* exprimiert. Möglicherweise ist also die posteriore AER weniger anfällig gegenüber partiellen Funktionsverlusten, da sie diese durch redundante Genfunktionen ausgleichen kann.

3.1.8 Extremitätendefekte betreffen ausschließlich die rechte vordere Seite

Differenzen in der Ausprägung von Defekten zwischen Vorder- und Hinterextremitäten sind in der Literatur häufig beschrieben und reflektieren z.T. die differentiell exprimierten Hox-Gene entlang der cephal-caudalen Achse (Yamaguchi *et al.*, 2004). In den Nidogen 1/2-defizienten Mäusen ist, ebenso wie in den Laminin $\alpha 5$ -defizienten Tieren, die Syndaktylie

stärker in den vorderen als in den hinteren Extremitäten ausgebildet (Miner *et al.*, 1998). Obwohl Nidogen nicht, wie ursprünglich angenommen, allgemein eine notwendige Voraussetzung für die Assemblierung von Basalmembranen darstellt, ist die Lokalisation von Basalmembrankomponenten in den frühen embryonalen Entwicklungsphasen diffuser als in Kontrollembryonen (siehe 2.1.1). Dies spricht dafür, dass die einzelnen Komponenten in Abwesenheit von Nidogen nicht so fest oder schnell in das Netzwerk integriert werden können und Nidogen 1/2-defiziente Basalmembranen etwas mehr Zeit zum Reifen benötigen. Da die hinteren Extremitätenknospen etwa 0,5 Tage später als die vorderen auswachsen, ist hier die Basalmembran möglicherweise bereits widerstandsfähiger.

Alle in Nidogen 1/2-defizienten Mäusen beobachteten skeletalen Hypo- oder Aplasien betrafen ausschließlich die vordere rechte Extremität. Tatsächlich treten in mutanten Mäusen mit nicht vollständig penetranten Extremitätendefekten diese häufiger in der rechten Körperhälfte als in der linken auf, so ist z.B. die Syn- und Polydaktylie in den *doubleridge* Mäusen häufiger rechts ausgeprägt. Ebenso führt die Haploinsuffizienz von *Bmp4* ausschließlich in der rechten Körperhälfte zu Polydaktylie (Dunn *et al.*, 1997; Paine-Saunders *et al.*, 2000). Die molekularen Ursachen für diese Präferenz sind nicht bekannt. Einen interessanten Aspekt liefert eine genauere Betrachtung der Embryonalentwicklung. Bei der murinen Entwicklung findet typischerweise am E 8,5-9 eine Drehung des Embryos statt, bei der das Ektoderm nach Außen und das Endoderm nach Innen gestülpt wird. Der Embryo dreht sich bei Betrachtung von caudal entgegen dem Uhrzeigersinn und damit über seine rechte Körperhälfte. Dementsprechend ist die rechte Körperhälfte zu Beginn des Auswachsens der vorderen Extremitätenknospen einer stärkeren Belastung ausgesetzt und dadurch möglicherweise anfälliger für mechanischen Stress.

3.1.9 Vergleich der Nidogen 1/2-Defizienz mit der Laminin γ 1III4-Defizienz

Nidogen weist seine höchste Bindungsaffinität zu Laminin auf. Die Defizienz des LE-Moduls in Domäne III der Laminin γ 1-Kette hebt die Interaktion zwischen diesen beiden Basalmembran-Proteinen vollständig auf. Transgene Mäuse, denen diese Bindestelle fehlt, zeigen ebenso wie Nidogen 1/2-defiziente Mäuse nicht vollständig ausgebildete Lungen. In anderen Organen, treten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Mausmodellen auf, eine Agenesie der Nieren wird z.B. nur in *Lamc1 Δ III4*-Embryonen gefunden. Als Ursache für

diese Effekte werden das freie Nidogen oder bislang unbekannte zusätzliche Funktionen des Lam γ 1III4-Moduls diskutiert. (Willem *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide transgenen Linien hinsichtlich ihrer Ausprägung der Syndaktylie untersucht. Zum Zeitpunkt der ersten sichtbaren Defekte in der distalen subektodermalen Basalmembran in *Nid1/2*-defizienten Embryonen weisen auch *Lamc1 Δ III4* Extremitätenknospen untypische Verteilungen von Basalmembrankomponenten auf (Abb.2.1.13). Sofern eine Zerstörung der Basalmembran immunhistologisch beurteilt werden kann, ist dieser Defekt in den beiden Linien ähnlich stark ausgeprägt. Wie bereits für andere Gewebe beschrieben, zeigen die Extremitätenknospen keinerlei Immunreaktivität gegen Nidogen 1 (Willem *et al.*, 2002). Während Nidogen 1 nicht in der Basalmembran gehalten wird, kolokalisiert Nidogen 2 weiterhin mit anderen Basalmembrankomponenten. Die Affinität von Nidogen 2 zu Lam γ 1III4 ist im Vergleich zu Nidogen 1 um etwa den Faktor 8 reduziert. Interaktionsstudien mit vollständigem Laminin gaben Hinweise auf eine mögliche zusätzliche Bindestelle für humanes Nidogen 2 in Laminin (Kohfeldt *et al.*, 1998). In anderen Bindungsstudien wurden etwas stärkere Interaktionen von Nidogen 2 mit Kollagen IV oder Perlecan gemessen (Miosge *et al.*, 2002; Salmivirta *et al.*, 2002). Dies könnte die stärkere Integration von Nidogen 2 erklären. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Lamc1 Δ III4*-Mauslinie nicht einer weiteren detaillierten Analyse unterzogen, aber es erscheint wahrscheinlich, dass durch eine Restfunktion von Nidogen 2 die Struktur der Basalmembran schneller wiederhergestellt werden kann und so die Auswirkungen begrenzt werden. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass in den *Lamc1III4*-defizienten Extremitätenknospen bereits am E10,5 Kollagen IV und Nidogen 2 an den Endothelien detektiert werden können, während bei Verlust beider Nidogen-Isoformen erst in späteren Entwicklungsstadien Basalmembranmoleküle an den kleinen Blutgefäßen lokalisieren (2.1.3, 2.1.10, Abb. 2.1.13). Mit dieser Annahme übereinstimmend zeigen *Lamc1 Δ III4* Mäuse eine nicht vollständig penetrante, partielle Syndaktylie ohne Beteiligung skelettaler Elemente, einen im Vergleich zur Nidogen 1/2-Defizienz abgeschwächten Phänotyp.

3.1.10 Weiterführende Experimente

Die Analyse der Ursachen für die Syndaktylie in Nidogen 1/2-defizienten Extremitäten hat gezeigt, dass die Expression von *Bmp2* und *Bmp7* in den interdigitalen Bereichen reduziert ist. Um eine genetische Interaktion zwischen Nidogen und BMPs zu testen, könnten z.B. *Bmp7*-defizienten Mäuse in die hier analysierte *Nid1/2*-defiziente Linie eingekreuzt werden. Der Verlust von *Bmp7* führt zu Polydaktylie in den Hinterextremitäten (Luo *et al.*, 1995; Hofmann *et al.*, 1996). Bei einer unabhängigen Funktion der beiden Komponenten, Nidogen und BMP7, würde man einen rein additiven Effekt der beiden Phänotypen in den Tripel-*knockouts* erwarten. Bei Interaktion der beiden Mechanismen hingegen würde das sensitivierte System eine Verstärkung einer der beiden Phänotypen, Syndaktylie oder Polydaktylie, auslösen. Auf diese Art wurde bereits die funktionelle Interaktion von BMP7 und Fibrillin 2, einer Hauptkomponente extrazellulärer Fibrillen, nachgewiesen (Arteaga-Solis *et al.*, 2001).

Bei der Frage, ob durch eine Mutation bestimmte Signaltransduktionswege gestört sind, wie in diesem Fall FGF8, eignet sich ebenfalls die Analyse der kombinierten Mutanten. Bei einer Interaktion würde der Phänotyp der *downstream* agierenden Komponente auftreten. Kreuzungsschematisch ist dieser Ansatz jedoch nicht durchführbar, da es sich hier um vier Allele handelt und beide verwendeten Cre-Linien, *Msx2*-Cre bzw. *Rarb*-Cre, mit jeweils einem der beiden *Nid*-Gene auf demselben Chromosom liegen. Trotzdem wäre eine Analyse der Basalmembranassemblierung in den AER-spezifischen *Fgf8*-defizienten Extremitätenknospen interessant, da in embryoiden Körperchen gezeigt wurde, dass die FGF-Signaltransduktion für die Expression von Basalmembranmolekülen, wie Laminin und Kollagen IV, unerlässlich ist und die Etablierung einer Basalmembran Defekte in der FGF-Signaltransduktion partiell retten kann (Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004).

FGFs aktivieren ihre Rezeptoren über Interaktion mit HSPGs. Um zu überprüfen ob die veränderte Lokalisation von Basalmembran-assoziierten HSPGs Auswirkungen auf die Bindungen von FGFs an ihre Rezeptoren hat, könnten LACE (*ligand and carbohydrate engagement*)-Experimente durchgeführt werden. Dabei werden bestimmte Ligand und Rezeptor-Paare auf Bindung an Heparansulfat *in situ* untersucht (Allen and Rapraeger, 2003). Der Vergleich von Nidogen 1/2-defizienten mit Kontroll-Embryonen sollte dann eine Aussage zur Rezeptorspezifität von FGF8 in Nidogen-doppelmutantem Gewebe erlauben.

3.2 Auswirkung der Nidogen 1/2-Defizienz auf die Entwicklung der Glandula submandibularis

3.2.1 Die *in vitro* Verzweigungsmorphogenese ist inhibiert

Während der Entwicklung der Unterkieferspeicheldrüse gehen Epithelium und Mesenchym komplexe Wechselwirkungen ein, über die schließlich ein reich verzweigtes Parenchym sowie ein differenziertes Stroma entstehen. In Nidogen 1/2-defizienten Mäusen ist am Tag P1 die Glandula submandibularis dem Wildtyp entsprechend ausgebildet, zeigt jedoch eine leicht reduzierte Anzahl an epithelialen Endknospen. Der Ablauf der Entwicklung unter definierten Bedingungen in Kultur deckte Defekte in der epithelialen Verzweigungsmorphogenese auf (siehe 2.2.1). Allgemein stellt die Organkultur ein sensitiviertes System dar, in dem sich schwache Defekte leichter als *in vivo* phänotypisch manifestieren. Die Nidogen-doppelmutanten Explantate bildeten weniger und häufig vergrößerte Endknospen aus. Bei Betrachtung eines Explantats zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultur wird deutlich, dass die frühen Endknospen sich nicht weiter verzweigen, sondern nur an Größe zunehmen und manchmal miteinander verschmelzen, während in der Nähe des epithelialen Stammes in reduzierter Anzahl neue Sprossungen stattfinden. Laminin lokalisiert an der basalen Oberfläche der epithelialen Gänge, nicht aber an den epithelialen Endstücken in Nidogen 1/2-defizienten Speicheldrüsenexplantaten (Abb 2.2.4). Im Wildtyp wurde übereinstimmend mit publizierten Daten während der Ausbildung und dem Auswachsen neuer Verzweigungen Laminin permanent an der basalen Oberfläche der Epithelien detektiert (Hardman and Spooner, 1992). Die Akkumulation von Basalmembrankomponenten korreliert demnach mit der Ausbildung von neuen Verzweigungen.

Die stark proliferierenden und Spalten ausbildenden Endknospen stellen ein System mit einer hohen Umsatzrate an Basalmembrankomponenten dar (Kadoya and Yamashina, 2005). Dies spiegelt sich in dem elektronenmikroskopisch beobachteten Unterschied zwischen den lockeren Basalmembranpositionen an den Endknospen und den deutlicher ausgebildeten Basalmembranen an den Verbindungsstücken wider (siehe 2.2.3). In den Nidogen 1/2-defizienten Explantaten hingegen wird trotz der Konzentration von Laminin an dem sich entwickelnden Gangsystem auch hier keine ultrastrukturell definierte Basalmembran ausgebildet.

Die epitheliale Morphogenese der Glandula submandibularis *in vitro* stellt folglich ein System dar, in dem Nidogen tatsächlich für die Assemblierung von Basalmembranen notwendig ist.

3.2.2 Auswirkungen der Blockierung unterschiedlicher Basalmembrankomponenten

Organkulturen werden häufig verwendet um die Auswirkungen bestimmter blockierender Antikörper sowie Peptide auf die Verzweigungsmorphogenese von Speicheldrüsen zu untersuchen. Die Blockierung diverser Basalmembrankomponenten oder Rezeptoren inhibiert dabei über unterschiedliche Mechanismen die Verzweigungsmorphogenese, nicht immer liegen der Inhibierung Defekte in der Basalmembran zugrunde. So führt z.B. die Blockierung der Intergin $\alpha 6$ -Untereinheit oder Laminin $\alpha 1$ G4-Domäne zu reduzierten Verzweigungen mit gleichmäßig ausgebildeten Endknospen, wobei nur bei Inhibierung der Laminin $\alpha 1$ G4-Domäne die Integrität der Basalmembran beeinflusst wird (Kadoya *et al.*, 1995; Kadoya *et al.*, 1998). Auch die spezifische Inhibierung der Interaktion von Nidogen und Laminin durch einen Antikörper reduziert die Anzahl der Verzweigungen in Speicheldrüsenexplantaten (Kadoya *et al.*, 1997). Die gebildeten Endknospen zeigen allerdings im Unterschied zu den Nidogen 1/2-defizienten Explantaten eine stark elongierte Morphologie mit unregelmäßiger Oberfläche. Dies deutet auf einen Mechanismus, bei dem Nidogen für die Ausbildung von Spalten an den Endknospen essentiell ist, während die Interaktion von Laminin und Nidogen nicht für die Initiierung von Verzweigungen, sondern deren Auswachsen verantwortlich ist. Ein solches, durch die exogene Zugabe von Inhibitoren beeinflusstes System ist allerdings anfällig für unspezifische Effekte. Die Zugabe von Antikörpern kann z.B. neben der erwünschten Blockierung noch weitere Interaktionen inhibieren. Das die Nidogen-Bindestelle tragende Peptid Lamy1III3-5 interferiert überraschenderweise nicht mit der Verzweigungsmorphogenese in Speicheldrüsen (Kadoya *et al.*, 1997), obwohl sein Einfluß auf die Laminin-Nidogen-Interaktion und die Basalmembranassemblierung in anderen Systemen gezeigt wurde (Tunggal *et al.*, 2003; Breikreutz *et al.*, 2004).

Bei den hier verwendeten Speicheldrüsen-Primordien von mutanten Mäusen können solche sekundären, unspezifischen Effekte ausgeschlossen werden. Um eine Aussage über die funktionelle Beteiligung der Interaktion zwischen Laminin und Nidogen treffen zu können, sollten die Speicheldrüsenprimordien Laminin γ III4-defizienter Embryonen unter denselben

Bedingungen wie die Nidogen-doppelmutanten Primordien kultiviert und vergleichend analysiert werden.

3.2.3 Zusammenhang zwischen Nidogen und EGF

Die Ähnlichkeit zwischen den phänotypischen Ausprägungen von defekten ECM-Komponenten und Wachstumsfaktoren hat zu Spekulationen über eine Verknüpfung dieser beiden Systeme bei der Speicheldrüsenmorphogenese geführt (Kadoya and Yamashina, 2005). EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-defiziente Glandulae submandibularis zeigen *in vivo* eine leicht reduzierte Anzahl von Verzweigungen (Jaskoll and Melnick, 1999) während chemische Inhibitoren der von EGFR aktivierten Signaltransduktionskaskade *in vitro* die epitheliale Morphogenese inhibieren (Kashimata *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2003). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zum Einfluss von EGF auf die Verzweigungsmorphogenese konnte eine tendenzielle Zunahme an Endknospen sowohl in Kontroll- als auch in den Nidogen-doppelmutanten Drüsen beobachtet werden, eine spezifische Rettung des Nidogen 1/2-defizienten Phänotyps wurde jedoch nicht gezeigt. Für eine detaillierte Untersuchung der Wirkung von EGF auf Nidogen-defiziente Basalmembranen muss eine umfangreichere Analyse durchgeführt werden.

Interessant wäre die Untersuchung der Auswirkung ectopischer Basalmembrankomponenten auf die Assemblierung und Integrität der Nidogen 1/2-defizienten Basalmembranen. Möglicherweise agiert Nidogen, indem es die Moleküle der Basalmembran in räumliche Nähe bringt. Eine Erhöhung der Konzentration von z.B. Laminin könnte den gleichen Effekt haben und so die Verzweigungsmorphogenese unterstützen.

3.3 Etablierung einer transgenen Mauslinie

Sowohl Nidogen 1/2-defiziente als auch Laminin γ 1III4-defiziente Mäuse sterben während oder kurz nach der Geburt mit nicht vollständig ausgereiften Lungenepithelien (Willem *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2005). Um die Funktion der Interaktion von Laminin und Nidogen während späterer Differenzierungsschritte in der epithelialen Morphogenese zu untersuchen, eignet sich die Milchdrüse, ein Organ das auch bei starken Entwicklungsdefiziten nicht zur Letalität führt und aufgrund seiner Größe und zyklischen Entwicklung leicht zugänglich ist. Für das die Nidogen-Bindestelle tragende Peptid Lam γ 1III3-5 wurde bereits gezeigt, dass es die Interaktion von Laminin und Nidogen kompetitiv hemmt und so die Integrität von Basalmembranen beeinflussen kann (Tunggal *et al.*, 2003; Bader *et al.*, 2005).

Für die Etablierung transgener Mäuse ist die Wahl des richtigen Promoters von entscheidender Bedeutung. Der *Wap* (*whey acidic protein*)-Promotor ist gut charakterisiert und wurde in der Vergangenheit häufig verwendet um die Expression in den epithelialen Zellen der Milchdrüse während der späten Phase der Schwangerschaft und Laktation zu dirigieren (McKnight *et al.*, 1995). So konnte u. a. die Metalloproteinase Stromelysin mit dem *Wap*-Promotor gezielt im Milchdrüsenepithel exprimiert und gezeigt werden, dass der Abbau der Basalmembran in virginellen Weibchen zu einem Anstieg an epithelialen Verzweigungen und zu einer verfrühten Differenzierung führt (Sympson *et al.*, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei transgene Linien generiert, die in unterschiedlicher Kopienzahl die mit dem FLAG-Epitop markierte *Lamc1III3-5* Sequenz unter der Kontrolle des *Wap*-Promoters tragen (WAP- γ 1III3-5). Das Transgen konnte jedoch auf Proteinebene nicht detektiert werden (siehe 2.2.2). Da in beiden Linien RNA des Transgens nach Reverser Transkription mit einem oligo-dT-Primer nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die 3'UTR der Konstrukte intakt ist. Das Peptid wurde bereits aus dem Überstand von stabil transgenen 293-EBNA Zellen isoliert und seine biologische Aktivität nachgewiesen, weshalb eine fehlerhafte Faltung oder Sekretion ausgeschlossen werden kann. Modifizierte Proteine oder Proteinfragmente degradieren in einigen Fällen deutlich schneller als ihre endogenen Pendanten (Ramalho *et al.*, 2002).

Anhand der RT-PCR kann keine quantitative Aussage über die Transkript-Menge gemacht werden. Neben der Promotorsequenz beeinflussen auch cis-agierende, positionsabhängige Faktoren die Expression eines Transgens. Da der Großteil des Säuger-genoms als Heterochromatin vorliegt, integrieren transgene Sequenzen häufig in

transkriptionell inaktive Bereiche und werden reprimiert. Für den hier verwendeten WAP-Expressionsvektor wurde gezeigt, dass 50% der transgenen Linien das Transgen abhängig von der Kopienzahl exprimieren (Burdon *et al.*, 1991). Die starken Positionseffekte können umgangen werden, indem MARs (*matrix attachment regions*), strukturgebende Domänengrenzen, *in vitro* an den Promotor ligiert werden (McKnight *et al.*, 1996). Der Mechanismus mit dem MARs auf die Transkription der flankierten Sequenzen wirken ist nicht vollständig verstanden, die durch sie vermittelte, vom Integrationsort unabhängige Expression wurde jedoch für mehrere Transgene beschrieben. Gleichzeitig wird jedoch auch der positive Einfluß von *Enhancer*-Regionen unterbunden und in einigen Fällen wurde ein Verlust der von der Kopienanzahl abhängigen Expressionsstärke beschrieben (McKnight *et al.*, 1992).

Um diese Probleme zu umgehen, könnten konditionale *knockout*-Linien verwendet werden. In einer kooperierenden Arbeitsgruppe wurde kürzlich eine Mauslinie mit einem von *loxP*-Sequenzen flankierten Nidogen 1-Allel hergestellt (R. Nischt, unveröffentlichte Daten). Es existieren mehrere Mauslinien, in denen die Cre-Rekombinase gezielt in den Milchdrüsen exprimiert wird (Wagner *et al.*, 1997; Selbert *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 2001; Wintermantel *et al.*, 2002). Da Nidogen 2-defiziente Mäuse vital und fertil sind, kann ein Stamm generiert werden, in dem Nidogen 2 ubiquitär und Nidogen 1 gewebespezifisch im Milchdrüsengewebe deletiert ist. Bei diesem experimentellen Ansatz muss bedacht werden, dass das diffusible Nidogen in den meisten Geweben mesenchymal exprimiert wird und somit eine Deletion im Epithel nicht ausreichend ist.

Laminin wird im Unterschied zu Nidogen epithelial exprimiert und ist weniger diffusibel. Für die Analyse der Auswirkung einer inhibierten Bindung von Laminin und Nidogen im Milchdrüsenepithel eignen sich somit Transplantationsexperimente. Dabei wird die mutante Milchdrüsenanlage von *Lamc111A4*-Embryonen in das freigelegte Fettpolster von WT-Mäusen transplantiert. Die mutante Drüse entwickelt sich in dem Stroma des Wirts und kann während aller Entwicklungsstadien analysiert werden.

4 Material und Methoden

Alle nicht aufgeführten Standardmethoden, Lösungen und Puffer sind aus Sambrook *et al.* (1989) entnommen.

4.1 Material

4.1.1 Zellkulturmedien und Zubehör

| Reagenz | Hersteller |
|---|-------------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F-12) 1:1 | Gibco |
| L-Glutamin | Gibco |
| Penicillin-Streptomycin | Gibco |
| Fetal Calf Serum (FCS) | Biochrom KG |
| Transferrin | Gibco |
| Epidermal Growth Factor (EGF) | Sigma |
| Rekombinantes humanes BMP-4 | R&D Systems |
| Nuclepore Polycarbonate Membran (0,1 µm Porengröße) | Whatman |
| Affi-Gel Blue Gel | BioRad |

4.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

| Antikörper | Quelle | Verdünnung ^{IF} | Referenz/Hersteller |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| α -Nidogen 1 | Kaninchen, polyklonal | 1:5000 | Anju Vasudevan |
| α -Nidogen 2 | Kaninchen, polyklonal | 1:5000 | Anju Vasudevan |
| α -Perlecan | Kaninchen, polyklonal | 1:1000 | (Schulze <i>et al.</i> , 1995) |
| α -EHS Laminin | Kaninchen, polyklonal | 1:2000 | (Kucherer-Ehret <i>et al.</i> , 1990) |
| α -Typ IV Kollagen | Ziege, polyklonal | 1: 100 | Southern Biotech |
| α -E-Cadherin | Kaninchen, polyklonal | 1:1000 | (Boussadia <i>et al.</i> , 2002) |
| α -Laminin γ 1 | Ratte, monoklonal | 1:2000 | Chemicon |
| α -Laminin γ 1III3-5 | Kaninchen, polyklonal | 1:50 ^{IP} | (Mayer <i>et al.</i> , 1998) |
| α -phospho-p44/42 MAPK | Kaninchen, monoklonal | 1:60 | Cell Signaling Technology |
| α -FGF8 | Maus, monoklonal | 1:1000 | R&D Systems |
| α -mouse Ki-67 | Ratte, monoklonal | 1:50 | DakoCytomation |
| α -CD29 (β 1-Integrin) | Ratte, monoklonal | 1:100 | BD Biosciences |
| α -CD31 (PECAM-1) | Ratte, monoklonal | 1:500 | BD Biosciences |
| α -FLAG M2 | Maus, monoklonal | 1:2000 ^{WB} | Sigma-Aldrich |
| α -Digoxigenin-AP | Schaf, Fab-Fragmente | 1:2000 | Roche |

^{IF}: Immunfluoreszenz ^{IP}: Immunpräzipitation, ^{WB}: Western Blot

Sekundäre Antikörper

| Antikörper, Typ | Quelle | Verdünnung | Hersteller |
|--|---------------|-------------------|--|
| Anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt | Ziege | 1:800 | Jackson ImmunoResearch Laboratories |
| Anti-Ziege IgG, Alexa Fluor 488-gekoppelt | Esel | 1:1000 | Molecular Probes |
| Anti-Maus IgG, Cy3-gekoppelt | Ziege | 1:800 | Jackson ImmunoResearch Laboratories |
| Anti-Ratte IgG, Alexa Fluor 488-gekoppelt | Ziege | 1:1000 | Molecular Probes |

4.1.3 Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Verwendung |
|--------------------|---------------------------------|--|
| MM21 | CTTCAAACCTCAGAGGACACAG | Genotypisierung des Nidogen 1-Allels |
| MM27 | CCTCATTGACCTACATGTAGC | |
| MM29 | GAGAAAGAGTGGGACGATAG | |
| Lamy1_fw | AGATGTGAACTCTGTGATGAC | Genotypisierung des Laminin γ 1 Δ III4-Allels |
| Lamy1_rev | TGCAAGAAGTGGTTCACACCGCATTCT | |
| BMP4_KpnII | ATCGGTACCTGGGTGATGCTTGGGACTA | Bmp4-Sonde |
| BMP4_EcoRI | ATGGAATTCCTCTTCAACCTCAGCAGCATC | |
| oligo d(T) | (T) ₃₆ | RT-PCR zum Nachweis des Transgens |
| Insert_for | AGCAACAGAGCAGCTGTAACCC | |
| Ex3_for | TTGGTGTTCGAAAGCTGGC | |
| Ex4_rev | ATAGACTTGGGTGGTCACTCCC | |
| Ex16_fw | GTCCCAAAGACAAAGGAAGTGGTG | Genotypisierung der transgenen Mäuse |
| Ex17_rev | TTTGCAATTTGTCGGCTGGATTGGG | |
| Wap_fw | CCAAGAAGGAAGTGTGTAGCCC | |
| Probe_fw | ATACTCGAGATGTGAACTCTGTGATGACGGC | interne Sonde |
| Probe_rev | ATACTCGAGGCAGACACTGGCATTGTCCG | Laminin γ 1III3-5 |
| WapSeq_for | GACAGCCATCAGTCACTTGC | Sequenzierung des Transgens |
| WapSeq_rev | GACTGCATACCTGGCACTGG | |

4.1.4 EST-Klone

| Bezeichnung/ID | Vektor | Gen |
|----------------|-------------|-------------|
| IRAKp961E2125Q | pCMV-SPORT6 | <i>Bmp4</i> |

4.1.5 Vektoren

| Bezeichnung | Typ | Referenz |
|-----------------------|---|---|
| CMV- γ 1III3-5 | Expressionsvektor mit N-terminalem FLAG | (Tunggal <i>et al.</i> , 2003) |
| # 1 | WAP-Expressionsvektor | Wagner, Hennighausen (Burdon <i>et al.</i> , 1991) |

4.1.6 Sonden für *in situ*-Hybridisierungen

| Gen | GenBank Sequenz | Referenz |
|-------------|------------------------|-------------------------------|
| <i>Fgf8</i> | NM 010205: nt 184-1124 | (Crossley and Martin, 1995) |
| <i>Bmp2</i> | NM 007553 nt 53-1215 | (Lyons <i>et al.</i> , 1989) |
| <i>Bmp7</i> | BC 010771 nt 170-1033 | (Furuta <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>Bmp4</i> | X 56848 nt: 776-1284 | (Semba <i>et al.</i> , 2000) |

4.1.7 Mauslinien

| Name | Symbol | Beschreibung | Referenz |
|------------------------|-------------------------------------|--|------------------------------------|
| Nidogen 1 | <i>Nid1</i> | Deletion von Exon 3, amorph | (Murshed <i>et al.</i> , 2000) |
| Nidogen 2 | <i>Nid2</i> | Insertion eines <i>gene-trap</i> Vektors in Intron 4, amorph | (Schymeinsky <i>et al.</i> , 2002) |
| Laminin γ 1III4 | <i>Lamc1ΔIII4</i> | Deletion der Nidogen-Bindestelle | (Willem <i>et al.</i> , 2002) |

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe oder Schwanzspitzen-Biopsien nach Laird *et al.* (1991)

Zur Genotypisierung adulter Mäuse wurden ca. 0,5 cm lange Schwanzspitzen, zur Isolierung von embryonaler DNA ca. 1 mm³ große Gewebestücke bzw die extra-embryonale Membran (Dottersack, Amnion) mit 600 µl Lysis-Puffer (100 mM Tris pH 8,0, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% SDS, 0,4 mg/ml Proteinase K) ü.N. bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform Extraktion der DNA. Die gefällte DNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und zur anschließenden Genotypisierung mittels PCR oder Southern Blot Analyse eingesetzt.

4.2.1.2 Southern Blot Analyse (Southern, 1975)

Die als Southern Blot bezeichnete Methode beschreibt den Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde können spezifische Fragmente identifiziert werden.

Die zuvor restringierte DNA wurde in einem 0,8%igen Agaraosegel aufgetrennt. Um die Übertragung großer Fragmente zu erleichtern wurden diese vor der Denaturierung zunächst ~20 min in 0,25 M HCl depuriniert. Der Transfer auf die Nylonmembran (Roti-Nylon Plus, Roth) erfolgte in der Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,25 M NaOH) über einen Zeitraum von ~16 h aufgrund von Kapillarkräften. Die Membran wurde anschließend kurz in 2 x SSC-Lösung gewaschen und getrocknet.

4.2.1.3 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden erfolgte mit dem „Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)“ Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Hierbei werden mittels „random priming“ Fragmente von ~100–1000 bp Länge markiert. Für die Reaktion wurden ca. 50 ng der zu markierenden DNA eingesetzt, welche zuvor mittels Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten wurden.

Einzelsträngige Oligonukleotide wurden radioaktiv endmarkiert. Hierbei überträgt die T4-Polynukleotidkinase (PNK) die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe der DNA.

Reaktionsansatz:

| Komponente | Volumen |
|--|--------------|
| ddH ₂ O | 15,5 μ l |
| DNA | 10,0 pg |
| 10 x PNK Reaktionspuffer | 2,5 μ l |
| T4-PNK (10 U/ μ l) | 1,0 μ l |
| γ - ³² P(ATP) (2MBq) | 5,0 μ l |

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C.

4.2.1.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der auf die Nylonmembran transferierten DNA erfolgte in Anlehnung an die von (Church and Gilbert, 1984) beschriebene Standardmethode. Danach wurde die Membran mit Hybridisierungslösung (500 mM NaPO₄, pH 7,15, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 500 μ g/ml denaturiertes Heringssperma) ca. 4 h bei 65 °C rollend vorinkubiert. Anschließend wurde die hitzedenaturierte Sonde zugegeben und ü.N. bei 65 °C hybridisiert. Die Membran wurde mehrfach bei 42 – 55°C in Waschlösung (40 mM NaPO₄, pH 7,15, 1% SDS, 1 mM EDTA) gespült. Bei Erreichen einer ausreichend geringen Hintergrundaktivität der Membran wurde diese in eine Autoradiographiekassette mit Röntgenfilm eingelegt und bei –80°C entsprechend ihrer Restaktivität exponiert.

4.2.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe (Milchdrüsen)

Milchdrüsen weiblicher Mäuse unterschiedlicher Stadien der Mammogenese bzw. Laktogenese wurden kurz in DEPC-PBS gewaschen und bei -80 °C gelagert. Etwa 100 mg Gewebe wurde in 1 ml TRIZOL (Invitrogen) homogenisiert und die RNA nach Angaben des Herstellers extrahiert. Zur Qualitätsprüfung wurden ~2 µg der in DEPC- H₂O resuspendierten RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.1.6 Reverse Transkription (RT)

Für die Synthese der cDNA wurde 1-1,5 µg isolierte Gesamt-RNA zusammen mit 25 µM oligo-dT-Primer in 13,5 µl Gesamtvolumen zur Beseitigung von Sekundärstrukturen für 2 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C gekühlt. Dem Reaktionsansatz wurden 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (je 25 mM), 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl,) sowie 1 µl AMV-Reverse Transcriptase (20 U/µl, QBiogene) zugefügt und 1h bei 42 °C inkubiert. Durch 10minütiges Erhitzen auf 70 °C wurde die Reaktion gestoppt. Für die anschließende PCR wurde 1 µl des RT-Ansatzes eingesetzt.

4.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Reaktionen zur Genotypisierung wurden mit *Taq*-DNA-Polymerase (Roche) durchgeführt, während bei anschließender Klonierung von PCR-Fragmenten *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem *Tpersonal*-Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Beispielhaft ist der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil zur Amplifizierung der Nidogen 1 Allele angegeben.

Reaktionsansatz (25 μ l):

| Komponente | Volumen |
|--|---------------|
| genomische DNA | 1,0 μ l |
| 10 x PCR Reaktionspuffer | 2,5 μ l |
| MgCl ₂ (25 μ M) | 2,0 μ l |
| dNTPs (jeweils 25 mM) | 0,5 μ l |
| Forward primer (10 μ M) (MM21 bzw. MM29) | 0,5 μ l |
| Reverse primer (10 μ M) (MM27) | 0,5 μ l |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l) | 0,25 μ l |
| ddH ₂ O | 17,75 μ l |

Temperaturprofil

| Schritt | Temperatur ($^{\circ}$ C) | Dauer | Anzahl der Zyklen |
|---------------------------------|----------------------------|--------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 94 | 3 min | 1 x |
| Denaturierung | 94 | 40 sec | |
| Primer-Annealing | 50 - 60 | 40 sec | 35 x |
| PrimerExtension/ DNA-Elongation | 72 | 1 min | |
| Finale Elongation | 72 | 7 min | 1 x |

4.2.1.8 Digoxigenin (DIG)-Markierung einer RNA-Sonde

Die Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung erfolgte mittels *in vitro* Transkription. Dazu wurde zunächst das Plasmid mit Restriktionsendonukleasen linearisiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Synthese des *antisense*-Transkripts erfolgte je nach Orientierung des Inserts mit T7-oder T3-RNA-Polymerase in folgendem Ansatz für 2 h bei 37 $^{\circ}$ C.

| Komponente | Volumen |
|---|----------------|
| linearisierte DNA | 1 µg |
| DIG RNA Labeling Mix (Roche) | 2 µl |
| 10 x Transkriptionspuffer | 2 µl |
| RNase Inhibitor (40 U/µl) | 0,5 µl |
| T7- oder T3-RNA-Polymerase (20 U/µl, Roche) | 2 µl |
| DEPC-H ₂ O | ad 20µl |

Die DNA-Matrize wurde durch Behandlung mit 2 µl DNase I, (RNase frei, Roche) für 10 min bei 37 °C entfernt, die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH8,0) gestoppt und das Transkript durch Zugabe von 2,5 µl 4M LiCl sowie 75 µl bei -20 °C vorgekühltem EtOH gefällt. Das Präzipitat wurde in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert und die Qualität mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Ausbeute an DIG-markierter RNA wurde über einen *spot test* gegen einen DIG-markierten Standard bestimmt.

4.2.2 Histologische Methoden

4.2.2.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die entnommenen Gewebe kurz in PBS gewaschen, in Tissue-Tek-Einbettlösung (Sakura) in Flüssig-Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Blöcke wurden bei -20 °C in einem Kryostat (Leika, CM3050) mit einer Schnittdicke von 7 µm geschnitten. Bis zur immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.

Gewebe für die Paraffineinbettung wurden je nach Gewebestärke 30 min bis 1 h in 4% PFA fixiert und 2 h bis ü.N. in 70% EtOH überführt. Die folgenden Schritte wurden in einem Einbettautomaten (Citadell 1000, Shandon) durchgeführt, wobei die Länge der Inkubationszeiten mit den Gewebetypen und deren Durchmesser variierte. Dehydrierung in aufsteigender EtOH-Reihe: 70%, 80%, 90%, 96%, 3 x 100% EtOH, 3 x Xylol, Infiltration mit Paraffin Nr. 3, Paraffin Nr. 6. Die engültige orientierte Einbettung erfolgte in Paraffin Nr.6 und anschließender Lagerung bei 4°C. Die 6 µm dicken Schnitte wurden mit einem Mikrotom

(Microtom GmbH) angefertigt, in einem Wasserbad gestreckt, bei 37°C getrocknet und schließlich bei RT gelagert.

4.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Paraffinschnitte wurden zunächst wie folgt entparaffiniert: 2 x 5 min Xylol, 2 x 5 min Isopropanol, je 3 min 96% EtOH, 70% EtOH, H₂O und in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) überführt. Je nach Spezifität des gewählten Antikörpers wurden die Epitope entweder mittels HIER (*heat induced epitope retrieval*: 10 min bei 95 °C in 10 mM Citratpuffer, pH 6,0) oder Trypsin-Behandlung (10 min bei 37 °C in 0,1% Trypsin/0,1% CaCl₂-Lösung, Stoppen der Reaktion mit Leitungswasser) zugänglich gemacht. Anschließend wurden die Schnitte in TBS überführt, 10 min mit 0,25% Triton X-100 (in TBS) permeabilisiert und 2 x 10 min mit TBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte 1 h in 5% BSA (in TBS) inkubiert. Der Primärantikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Nach dem Entfernen von überschüssigem Antikörper durch 4maliges Waschen für 10 min in TBS erfolgte der zweite Blockierungsschritt für 15 min in 0,8% BSA und (je nach Herkunft des Sekundärantikörpers) 3% NGS (*normal goat serum*) oder NRS (*normal rabbit serum*). Der in dieser Blockierungslösung verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde 45 min bei RT inkubiert und anschließend die Schnitte 4 x 5 min in TBS gewaschen. Die Eindeckelung erfolgte mit DAKO Non fade Mountant (Dako Cytomation). Die Färbungen wurden an einem Zeiss Axiophot 165 Mikroskop oder konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (DM IRE2, Leica) dokumentiert.

4.2.2.3 TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)

Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte mit dem DeadEndTM Fluorometric TUNEL System (Promega) nach Angaben des Herstellers. Diese Methode beruht auf der enzymatisch katalysierten Inkorporation von fluorescein-12-dUTP an die 3' OH-Enden der fragmentierten DNA mittels der terminalen Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) (Gavrieli *et al.*, 1992).

4.2.2.4 Whole mount *in situ* Hybridisierung

Die Detektion der Expression bestimmter, für die Entwicklung der Extremitätenknospen essentieller Gene im intakten Maus-Embryo wurde leicht modifiziert nach Jowett (1997) durchgeführt. Alle bis zur Hybridisierung verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt und RNase-freie Arbeitsbedingungen geschaffen. 10,5 – 13,5dpc (*days post conception*) Embryonen wurden in kaltem DEPC-PBS aus dem Uterus präpariert. Die den Embryo umgebenden extraembryonalen Hüllen, der Dottersack und das Amnion, wurden für die Genotypisierung benutzt (siehe 4.2.1.1). Um einen besseren Zugang der Lösungen in alle Gewebe zu erreichen wurde der Kopf abgetrennt. Die Fixierung erfolgte ü.N. bei 4 °C in 4% PFA. Es folgte die Dehydrierung über eine aufsteigenden MetOH-Reihe (25%, 50%, 75%, 2x 100%, je 10 min). Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde 2 h bei RT in 6% H₂O₂ (in MetOH) reduziert. Nach schrittweiser Überführung in PBT (PBS, 0,1% Tween-20) wurden die Gewebe für 8 min mit Proteinase K (10 µg/ml PBT) permeabilisiert. Die Postfixierung erfolgte nach zweimaligem Waschen in PBT mit 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd für 20 min. Die anschließend 2x in PBT gewaschenen Embryonen wurden für mindestens 16 h in 200 µl Hybridisierungsmix (50% Formamid, 5 mM EDTA, 1,3 x SSC, 125 µg/ml Yeast RNA, 0,2% Tween-20, 0,5% CHAPS, 100 µg/ml Heparin, mit 1 M Citronensäure auf pH 5,0 einstellen) bei 68 °C im Wasserbad prähybridisiert. Ca. 200 ng der DIG-markierte RNA-Sonde (siehe 4.2.2.7) wurde in 200 µl Hybridisierungsmix vorgewärmt und die Embryonen mindestens 24 h bei 68°C im Schüttelwasserbad hybridisiert. Die Embryonen wurden 2x 30 min in der Prähybridisierungslösung und 1x in Hybridisierungsmix/MABT (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5) (1:1) bei 68 °C gewaschen. Die folgenden 3 Waschschritte erfolgten je 1h bei RT in 10 ml Volumen MABT. Anschließend wurde 1 h in MABTB (MABT + 2% Blockierungsreagenz (Roche, 1096176) und 2 h in MABT/20% NSS (*normal sheep serum*) blockiert. Die Inkubation mit anti-DIG-AP (1:2000 in MABTB/20% NSS) erfolgte ü.N. bei 4 °C. Die Embryonen wurden 3x kurz sowie 3 x 1 h in je 15 ml MABT gewaschen und schließlich 2 x 10 min in NTMT (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9,5, 0,1% Tween-20, 5 mM Levamisol) äquilibriert. Die Färbung erfolgte in 4,5 µl NBT (75 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 3,5 µl BCIP (50 mg/ml in DMF)/ml NTMT im Dunkeln bei RT. Die Nachweisreaktion wurde nach 30 min – 5 h mit PBT abgestoppt. Durch Dehydrierung mit MetOH intensiviert sich die Färbung (dunkelblau). Die nochmals ü.N. in 4% PFA fixierten Gewebe wurden an einem Stereomikroskop (Leica MZ FLIII) fotografiert.

4.2.2.5 Whole mount Färbung von Knochen und Knorpel

Zur Färbung der Knochen und Knorpelgewebe wurden die Extremitäten neugeborener Mäuse mindestens 3 Tage in 95% EtOH eingelegt um anschließend die Haut leicht entfernen zu können. Die Färbung mit Alcian Blue 8GX (Sigma A3157) und Alizarin Red (Sigma A5533) sowie die anschließende Klärung des Gewebes erfolgte nach einem Protokoll von Jegalian und De Robertis (1992).

4.2.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Embryonales Gewebe wurde ü.N. in 2,5% Glutaraldehyd fixiert und in Cacodylatpuffer (100 mM, pH 7,2) gewaschen. Die anschließende Prozessierung wurde im Institut für Pathologie, Universitätsklinik Köln durchgeführt. Die Postfixierung erfolgte mit 2% OsO₄ für 2 h bei RT. Anschließend wurde mehrfach mit A. bidest gespült und die Gewebe über eine aufsteigenden EtOH-Reihe (50%, 70%, 90%, 2x 100%) in Propylenoxid überführt. Die Proben wurden zunächst 1 h in einem Propylenoxid/Araldit (2:1)-Gemisch inkubiert und anschließend in Araldit eingebettet. Semidünnschnitte (1-2 µm) wurden mit Toluidin-Blau gefärbt. Die Dünnschnitte (50 nm) wurden mit einem Diamantmesser angefertigt und zur Kontrastierung mit Bleicitrat und Uranylcitrat behandelt. Die gewaschenen und getrockneten Schnitte wurden anschließend in einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 902A, Zeiss) analysiert.

4.2.2.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Analyse von Oberflächenstrukturen wurden Embryonen im Stadium 10,5dpc und 13,5dpc ü.N. bei 4 °C in 1% Glutaraldehyd/4% PFA fixiert und in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 gewaschen. Die weitere Prozessierung der Proben wurde von A. Page, Biomedical Imaging Unit, Southampton General Hospital, UK durchgeführt. Das Gewebe wurde über einen EtOH-Gradienten dehydriert und am Kritischen Punkt getrocknet. Die Proben wurden auf einem Aluminiumhalter befestigt und unbeschichtet in einem FEI Quanta 200 Rasterelektronenmikroskop (Oregon, USA) unter variablem Druck (VP-Modus) analysiert.

4.2.3 Biochemische Methoden

4.2.3.1 Proteinextrakte aus murinen Gewebe

Um Proteine der extrazellulären Matrix aus murinem Milchdrüsengewebe zu extrahieren wurde ein Protokoll von Paulsson *et al.* (1987b) abgewandelt. Das Gewebe wurde in 0,05 M Tris/HCl, pH 7,4, 0,1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1x Complete-Protease-Inhibitor (Roche) homogenisiert, 2 h bei 4°C rotierend extrahiert und der ÜS mittels Zentrifugation (30 min, 10.000 rpm) geklärt.

4.2.3.2 Immunpräzipitation

Zur Detektion des Lam γ 1III3-5-Peptids wurden 100 μ l Proteinextrakt zunächst für 2 h bei 4 °C mit 20 μ l Protein A-Agarose (Roche) vorinkubiert um Immunglobuline (IgGs) zu entfernen (*preclearing*). Nach Zentrifugation (5min, 3000rpm) wurde der ÜS mit 1,5 μ l anti-Laminin γ 1III3-5 und 30 μ l frischer Protein A-Agarose ü.N. bei 4 °C immunpräzipitiert. Die Agarose wurde 2x mit TBS gewaschen, in Probenpuffer (reduzierend) aufgenommen und im Immunoblot analysiert.

4.2.3.3 Immunoblot-Analyse

Die zu untersuchenden Proben wurden nach Standard-Protokollen mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran NC, Schleicher & Schüll) transferiert, mit 3%igem Milchpulver in TBS blockiert und dem entsprechenden Antikörper umgesetzt. Immunoreaktive Proteine wurden mit dem ECL (*enhanced chemiluminescence*)-System detektiert.

4.2.4 Organkulturmethoden

Alle Kulturen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre durchgeführt. Das Nährmedium (DMEM: F12) wurde standardmäßig mit 2 mM L-Glutamin und 200 µg/ml Penicillin/Streptomycin ergänzt.

4.2.4.1 Kultur von Speicheldrüsen-Primordien

Um den Prozess der epithelialen Verzweigung in der Speicheldrüse zu untersuchen wurden 13,5dpc Embryonen in kaltem PBS aus dem Uterus präpariert, ein ca. 1mm breites Stück um die Mandibel und Zunge herausgeschnitten und in Nährmedium überführt. Die Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis) besteht zu diesem Zeitpunkt aus einem wenig verzweigten Epithel mit kondensiertem Mesenchym. Je nach Entwicklungsstadium hat sich schon die Glandula sublingualis gebildet. Die freigelegten Drüsen-Primordien wurden in einem möglichst geringen Volumen Medium auf eine Polycarbonatmembran überführt (Nuclepore, 0,1 µm Porengröße) und 3 Tage schwimmend kultiviert. Das mit 50 µg/ml Transferrin und je nach Experiment zusätzlich mit 10% FCS oder 10-20ng/ml EGF supplementierte Kulturmedium wurde täglich gewechselt.

Die Organkulturen wurden nach 24 h und 72 h fotografiert und die Endknospen gezählt. Sowohl die Anzahl der Endknospen nach 72 h als auch der Quotient aus den Werten nach 72 h und 24 h wurden mit der Software SigmaStatTM, Version 3.1, Sytsat Software Inc. ausgewertet. Die Werte wurden auf ihre Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Varianzhomogenität (F-Test) hin überprüft. Die anschließenden Stichprobenvergleiche wurden nach Mann und Whitney (U-Test) und bei mehr als 3 unabhängigen Gruppen nach Kruskall und Wallis (H-Test) mit anschließendem Post hoc-Test durchgeführt.

4.2.4.2 Implantation BMP4 abgebender Depots in embryonales Gewebe

Die Handplatten von 13.5dpc Nidogen 1/2-defizienten Embryonen wurden in kaltem PBS präpariert, auf eine Polycarbonatmembran überführt und schwimmend auf DMEM:F12 inkubiert. Agarose-Kügelchen (Affi-Gel Blue Gel, BioRad) wurden in PBS gewaschen, getrocknet und 1 h bei 37°C mit 100 ng/µl rekombinantem BMP4 (R&D Systems) oder 100 ng/µl BSA inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen kurz in PBS überführt und nach Größe sortiert. Je ein Kügelchen wurde in das interdigitale Mesenchym der Handplatten implantiert und die Organe für 20 h kultiviert. Anschließend wurden die Handplatten in PBS gewaschen und für die Detektion apoptotischer Zellen prozessiert (siehe 4.2.2.1 und 4.2.2.3).

4.2.5 Generierung transgener Mauslinien

Die folgenden Arbeiten wurden von Wieslaw Krzyzak im ZMMK Zentrallabor der Universität Köln durchgeführt. Als Oocytenspender dienten superovulierte Weibchen (C57Bl/6 x DBA/2, F2-Hybrid) die 2 Tage vor der Verpaarung mit 10 U Gonadotropin (Sigma) und unmittelbar davor mit 10 U Choriongonadotropin (Sigma) stimuliert wurden. Die befruchteten Eizellen wurden nach 24 h entnommen, anhaftende Cumulus-Zellen mit Hyaluronidase (300 mg/ml) entfernt und die isolierte Transgen-Kassette (2 ng/µl) in den Pronukleus der Zygote injiziert. Die manipulierten Zygoten wurden in scheinchwangere Ammen-Mütter transferiert.

Die Nachkommen (F0-Generation) wurden über PCR und Southern Blot-Analyse genotypisiert und zur Etablierung transgener Maus-Linien mit C57Bl/6 verpaart. Zur Bestimmung der Kopienzahl wurden die Intensitäten der Banden im Southern Blot mittels ImageQuant™ 5.2 (Molecular Dynamics) quantifiziert.

4.2.6 Tierzucht

Nidogen 1 heterozygote, Nidogen 2 homozygote Tiere (*Nid1*^{+/-}; *Nid2*^{-/-}) wurden untereinander verpaart um Nidogen 1/2-homozygot mutante Embryonen (*Nid1*^{-/-}; *Nid2*^{-/-}) zu erhalten. Diese Tiere werden im Folgenden als Nidogen 1/2-defizient oder Nidogen-Doppelnulld bezeichnet. Die in dieser Arbeit als Kontrollen klassifizierten Embryonen entstammten demselben Wurf und waren WT oder heterozygot für den Nidogen 1-Lokus und homozygot mutant für Nidogen 2 (*Nid1*^{+/+}; *Nid2*^{-/-} oder *Nid1*^{+/-}; *Nid2*^{-/-}).

Der Tag an dem der Vaginalpfropf gefunden wurde, wurde als 0,5dpc gewertet. Für eine genauere Altersbestimmung wurden die Somiten posterior der hinteren Extremitätenknospe gezählt. Nach dieser Methode entspricht 10,5dpc etwa 8, 11,5dpc etwa 18 und 12,5dpc etwa 30 Schwanzsomiten.

5 Literatur

- Adamska, M., MacDonald, B.T., and Meisler, M.H.** (2003). Doubleridge, a mouse mutant with defective compaction of the apical ectodermal ridge and normal dorsal-ventral patterning of the limb. *Dev Biol* **255**, 350-362.
- Alexander, C.M., Howard, E.W., Bissell, M.J., and Werb, Z.** (1996). Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol* **135**, 1669-1677.
- Allen, B.L., and Rapraeger, A.C.** (2003). Spatial and temporal expression of heparan sulfate in mouse development regulates FGF and FGF receptor assembly. *J Cell Biol* **163**, 637-648.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y.** (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* **23**, 354-358.
- Arteaga-Solis, E., Gayraud, B., Lee, S.Y., Shum, L., Sakai, L., and Ramirez, F.** (2001). Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils. *J Cell Biol* **154**, 275-281.
- Aumailley, M., El Khal, A., Knoss, N., and Tunggal, L.** (2003). Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol* **22**, 49-54.
- Aumailley, M., Pesch, M., Tunggal, L., Gaill, F., and Fassler, R.** (2000). Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in $\beta 1$ integrin-deficient embryoid bodies. *J Cell Sci* **113 Pt 2**, 259-268.
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R., and Fox, J.W.** (1993). Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int* **43**, 7-12.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J.C., Kleinman, H.K., Marinkovich, M.P., Martin, G.R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J.H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J.R., Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L.M., Talts, J.F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der Mark, K., Wewer, U.M., Yamada, Y., and Yurchenco, P.D.** (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* **24**, 326-332.
- Bader, B.L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkalapati, S., Murshed, M., and Nischt, R.** (2005). Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* **25**, 6846-6856.
- Barna, M., Pandolfi, P.P., and Niswander, L.** (2005). Gli3 and Plzf cooperate in proximal limb patterning at early stages of limb development. *Nature* **436**, 277-281.
- Barrow, J.R., Thomas, K.R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M.R., and McMahon, A.P.** (2003). Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev* **17**, 394-409.

- Baumgartner, R., Czisch, M., Mayer, U., Poschl, E., Huber, R., Timpl, R., and Holak, T.A.** (1996). Structure of the nidogen binding LE module of the laminin γ 1 chain in solution. *J Mol Biol* **257**, 658-668.
- Beck, K., Dixon, T.W., Engel, J., and Parry, D.A.** (1993). Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J Mol Biol* **231**, 311-323.
- Bell, S.M., Schreiner, C.M., Waclaw, R.R., Campbell, K., Potter, S.S., and Scott, W.J.** (2003). Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12195-12200.
- Boussadia, O., Kutsch, S., Hierholzer, A., Delmas, V., and Kemler, R.** (2002). E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mech Dev* **115**, 53-62.
- Boutaud, A., Borza, D.B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K.O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M.E., and Hudson, B.G.** (2000). Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J Biol Chem* **275**, 30716-30724.
- Brakebusch, C., and Fassler, R.** (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* **22**, 2324-2333.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N., Schmidt, C., Beck, R., Werner, U., Stark, H.J., Gerl, M., and Fusenig, N.E.** (2004). Inhibition of basement membrane formation by a nidogen-binding laminin γ 1-chain fragment in human skin-organotypic cocultures. *J Cell Sci* **117**, 2611-2622.
- Brown, J.C., Sasaki, T., Gohring, W., Yamada, Y., and Timpl, R.** (1997). The C-terminal domain V of perlecan promotes β 1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem* **250**, 39-46.
- Buckland, R.A., Collinson, J.M., Graham, E., Davidson, D.R., and Hill, R.E.** (1998). Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud. *Mech Dev* **71**, 143-150.
- Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S., and Wilson, V.A.** (1998). Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* **12**, 1894-1906.
- Burdon, T., Sankaran, L., Wall, R.J., Spencer, M., and Hennighausen, L.** (1991). Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation. *J Biol Chem* **266**, 6909-6914.
- Burgeson, R.E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G.R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J., Timpl, R., Tryggvason, K., Yamada, Y., and Yurchenco, P.** (1994). A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* **14**, 209-211.

- Capdevila, J., and Izpisua Belmonte, J.C.** (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 87-132.
- Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B., and Chung, A.E.** (1981). Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* **256**, 5209-5214.
- Chang, D.T., Lopez, A., von Kessler, D.P., Chiang, C., Simandl, B.K., Zhao, R., Seldin, M.F., Fallon, J.F., and Beachy, P.A.** (1994). Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* **120**, 3339-3353.
- Chaudhry, S.S., Gazzard, J., Baldock, C., Dixon, J., Rock, M.J., Skinner, G.C., Steel, K.P., Kielty, C.M., and Dixon, M.J.** (2001). Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. *Hum Mol Genet* **10**, 835-843.
- Chen, J., Diacovo, T.G., Grenache, D.G., Santoro, S.A., and Zutter, M.M.** (2002). The $\alpha 2$ integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* **161**, 337-344.
- Chen, Z.L., and Strickland, S.** (2003). Laminin $\gamma 1$ is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol* **163**, 889-899.
- Cheng, Y.S., Champlaud, M.F., Burgeson, R.E., Marinkovich, M.P., and Yurchenco, P.D.** (1997). Self-assembly of laminin isoforms. *J Biol Chem* **272**, 31525-31532.
- Church, G.M., and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-1995.
- Colognato, H., and Yurchenco, P.D.** (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* **218**, 213-234.
- Colognato, H., Winkelmann, D.A., and Yurchenco, P.D.** (1999). Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* **145**, 619-631.
- Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B., and Ornitz, D.M.** (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* **104**, 875-889.
- Corson, L.B., Yamanaka, Y., Lai, K.M., and Rossant, J.** (2003). Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* **130**, 4527-4537.
- Cosgrove, D., Meehan, D.T., Grunkemeyer, J.A., Kornak, J.M., Sayers, R., Hunter, W.J., and Samuelson, G.C.** (1996). Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* **10**, 2981-2992.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., and Fassler, R.** (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* **147**, 1109-1122.
- Critchlow, M.A., and Hinchliffe, J.R.** (1994). Immunolocalization of basement membrane components and $\beta 1$ integrin in the chick wing bud identifies specialized properties of the apical ectodermal ridge. *Dev Biol* **163**, 253-269.

- Crossley, P.H., and Martin, G.R.** (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, 439-451.
- Dahn, R.D., and Fallon, J.F.** (2000). Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* **289**, 438-441.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., and Basilico, C.** (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 233-247.
- De Arcangelis, A., Mark, M., Kreidberg, J., Sorokin, L., and Georges-Labouesse, E.** (1999). Synergistic activities of $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development* **126**, 3957-3968.
- Dedhar, S., Jewell, K., Rojiani, M., and Gray, V.** (1992). The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin $\alpha 3/\beta 1$. *J Biol Chem* **267**, 18908-18914.
- DiPersio, C.M., Hodivala-Dilke, K.M., Jaenisch, R., Kreidberg, J.A., and Hynes, R.O.** (1997). $\alpha 3\beta 1$ Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol* **137**, 729-742.
- Dolz, R., Engel, J., and Kuhn, K.** (1988). Folding of collagen IV. *Eur J Biochem* **178**, 357-366.
- Dong, L., Chen, Y., Lewis, M., Hsieh, J.C., Reing, J., Chaillet, J.R., Howell, C.Y., Melhem, M., Inoue, S., Kuszak, J.R., DeGeest, K., and Chung, A.E.** (2002). Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking entactin-1/nidogen-1. *Lab Invest* **82**, 1617-1630.
- Dowling, J., Yu, Q.C., and Fuchs, E.** (1996). $\beta 4$ integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol* **134**, 559-572.
- Drossopoulou, G., Lewis, K.E., Sanz-Ezquerro, J.J., Nikbakht, N., McMahon, A.P., Hofmann, C., and Tickle, C.** (2000). A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range *Shh* signalling and *Bmp* signalling. *Development* **127**, 1337-1348.
- Dudley, A.T., Ros, M.A., and Tabin, C.J.** (2002). A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* **418**, 539-544.
- Dunn, N.R., Winnier, G.E., Hargett, L.K., Schrick, J.J., Fogo, A.B., and Hogan, B.L.** (1997). Haploinsufficient phenotypes in *Bmp4* heterozygous null mice and modification by mutations in *Gli3* and *Alx4*. *Dev Biol* **188**, 235-247.
- Dupe, V., Ghyselinck, N.B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P.J., Chambon, P., and Mark, M.** (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* **208**, 30-43.

- Durbeej, M., Talts, J.F., Henry, M.D., Yurchenco, P.D., Campbell, K.P., and Ekblom, P.** (2001). Dystroglycan binding to laminin α 1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differentiation* **69**, 121-134.
- Dziadek, M.** (1995). Role of laminin-nidogen complexes in basement membrane formation during embryonic development. *Experientia* **51**, 901-913.
- Ekblom, P., Ekblom, M., Fecker, L., Klein, G., Zhang, H.Y., Kadoya, Y., Chu, M.L., Mayer, U., and Timpl, R.** (1994). Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development* **120**, 2003-2014.
- Erickson, A.C., and Couchman, J.R.** (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* **48**, 1291-1306.
- Esko, J.D., and Selleck, S.B.** (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* **71**, 435-471.
- Fallon, J.F., Lopez, A., Ros, M.A., Savage, M.P., Olwin, B.B., and Simandl, B.K.** (1994). FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, 104-107.
- Fassler, R., and Meyer, M.** (1995). Consequences of lack of β 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**, 1896-1908.
- Fox, J.W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., Engel, J., and Chu, M.L.** (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J* **10**, 3137-3146.
- Francis, P.H., Richardson, M.K., Brickell, P.M., and Tickle, C.** (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**, 209-218.
- Furuta, Y., Piston, D.W., and Hogan, B.L.** (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* **124**, 2203-2212.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M.A., and Hurle, J.M.** (1996). Role of TGF β s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**, 2349-2357.
- Garcia-Maya, M., Anderson, A.A., Kendal, C.E., Kenny, A.V., Edwards-Ingram, L.C., Holladay, A., and Saffell, J.L.** (2005). Ligand concentration is a driver of divergent signaling and pleiotropic cellular responses to FGF. *J Cell Physiol*.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A.** (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**, 493-501.
- Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N., and Gansmuller, A.** (1998). Essential role of α 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* **8**, 983-986.

- Georges-Labouesse, E., Messaddeq, N., Yehia, G., Cadalbert, L., Dierich, A., and Le Meur, M.** (1996). Absence of integrin $\alpha 6$ leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet* **13**, 370-373.
- Gersdorff, N., Muller, M., Otto, S., Poschadel, R., Hubner, S., and Miosge, N.** (2005). Basement membrane composition in the early mouse embryo day 7. *Dev Dyn* **233**, 1140-1148.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C., and Muller, U.** (2001). $\beta 1$ -class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* **31**, 367-379.
- Guha, U., Gomes, W.A., Kobayashi, T., Pestell, R.G., and Kessler, J.A.** (2002). In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb. *Dev Biol* **249**, 108-120.
- Gupta, M.C., Graham, P.L., and Kramer, J.M.** (1997). Characterization of alpha1(IV) collagen mutations in *Caenorhabditis elegans* and the effects of alpha1 and alpha2(IV) mutations on type IV collagen distribution. *J Cell Biol* **137**, 1185-1196.
- Hardman, P., and Spooner, B.S.** (1992). Localization of extracellular matrix components in developing mouse salivary glands by confocal microscopy. *Anat Rec* **234**, 452-459.
- Heymer, J., and Ruther, U.** (1999). Syndactyly of *Ft/+* mice correlates with an imbalance in *bmp4* and *fgf8* expression. *Mech Dev* **88**, 173-181.
- Hofmann, C., Luo, G., Balling, R., and Karsenty, G.** (1996). Analysis of limb patterning in BMP-7-deficient mice. *Dev Genet* **19**, 43-50.
- Hogan, B.L.** (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* **10**, 1580-1594.
- Hogan, B.L., Cooper, A.R., and Kurkinen, M.** (1980). Incorporation into Reichert's membrane of laminin-like extracellular proteins synthesized by parietal endoderm cells of the mouse embryo. *Dev Biol* **80**, 289-300.
- Hohenester, E., Tisi, D., Talts, J.F., and Timpl, R.** (1999). The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol Cell* **4**, 783-792.
- Hopf, M., Gohring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., and Timpl, R.** (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem* **259**, 917-925.
- Hopf, M., Gohring, W., Ries, A., Timpl, R., and Hohenester, E.** (2001). Crystal structure and mutational analysis of a perlecan-binding fragment of nidogen-1. *Nat Struct Biol* **8**, 634-640.
- Huang, C.C., Hall, D.H., Hedgecock, E.M., Kao, G., Karantza, V., Vogel, B.E., Hutter, H., Chisholm, A.D., Yurchenco, P.D., and Wadsworth, W.G.** (2003). Laminin α subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* **130**, 3343-3358.

- Hutchinson, J.N., and Muller, W.J.** (2000). Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* **19**, 6130-6137.
- Hynes, R.O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Hynes, R.O., and Zhao, Q.** (2000). The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* **150**, F89-96.
- Ibrahimi, O.A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Itoh, N., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M.** (2004). Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Hum Mol Genet* **13**, 2313-2324.
- Iozzo, R.V.** (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* **67**, 609-652.
- Iozzo, R.V.** (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 646-656.
- Jaskoll, T., and Melnick, M.** (1999). Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF- α /EGF, IGF, TGF- β , TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF- β 2, TGF- β 3, and EGF-r null mutations. *Anat Rec* **256**, 252-268.
- Jegalian, B.G., and De Robertis, E.M.** (1992). Homeotic transformations in the mouse induced by overexpression of a human Hox3.3 transgene. *Cell* **71**, 901-910.
- Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H.D., Shawber, C., Norton, C.R., Serreze, D.V., Weinmaster, G., and Gridley, T.** (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* **12**, 1046-1057.
- Jowett, T.** (1997). *Tissue in situ hybridization: methods in animal development.* (New York: John Wiley & Sons).
- Kadoya, Y., and Yamashina, S.** (2005). Salivary gland morphogenesis and basement membranes. *Anat Sci Int* **80**, 71-79.
- Kadoya, Y., Nomizu, M., Sorokin, L.M., Yamashina, S., and Yamada, Y.** (1998). Laminin α 1 chain G domain peptide, RKRLQVQLSIRT, inhibits epithelial branching morphogenesis of cultured embryonic mouse submandibular gland. *Dev Dyn* **212**, 394-402.
- Kadoya, Y., Mochizuki, M., Nomizu, M., Sorokin, L., and Yamashina, S.** (2003). Role for laminin- α 5 chain LG4 module in epithelial branching morphogenesis. *Dev Biol* **263**, 153-164.
- Kadoya, Y., Kadoya, K., Durbeej, M., Holmval, K., Sorokin, L., and Ekblom, P.** (1995). Antibodies against domain E3 of laminin-1 and integrin α 6 subunit perturb branching epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes. *J Cell Biol* **129**, 521-534.

- Kadoya, Y., Salmivirta, K., Talts, J.F., Kadoya, K., Mayer, U., Timpl, R., and Ekblom, P.** (1997). Importance of nidogen binding to laminin γ 1 for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland. *Development* **124**, 683-691.
- Kashimata, M., and Gresik, E.W.** (1997). Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular gland and regulates expression of the α 6-integrin subunit. *Dev Dyn* **208**, 149-161.
- Kashimata, M., Sayeed, S., Ka, A., Onetti-Muda, A., Sakagami, H., Faraggiana, T., and Gresik, E.W.** (2000). The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol* **220**, 183-196.
- Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., Koth, C.M., Buscher, D., Itoh, T., Raya, A., Ng, J.K., Esteban, C.R., Takahashi, S., Henrique, D., Schwarz, M.F., Asahara, H., and Izpisua Belmonte, J.C.** (2003). MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol* **5**, 513-519.
- Kimura, N., Toyoshima, T., Kojima, T., and Shimane, M.** (1998). Entactin-2: a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen. *Exp Cell Res* **241**, 36-45.
- Klein, G., Langegger, M., Timpl, R., and Ekblom, P.** (1988). Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. *Cell* **55**, 331-341.
- Knox, S., Merry, C., Stringer, S., Melrose, J., and Whitelock, J.** (2002). Not all perlecan are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors. *J Biol Chem* **277**, 14657-14665.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Gohring, W., and Timpl, R.** (1998). Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol* **282**, 99-109.
- Kreidberg, J.A., Donovan, M.J., Goldstein, S.L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R.C., and Jaenisch, R.** (1996). α 3 β 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* **122**, 3537-3547.
- Kucherer-Ehret, A., Pottgiesser, J., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H., and Edgar, D.** (1990). Developmental loss of laminin from the interstitial extracellular matrix correlates with decreased laminin gene expression. *Development* **110**, 1285-1293.
- Kuhn, K.** (1995). Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol* **14**, 439-445.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., and Berns, A.** (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19**, 4293.
- Larsen, M., Hoffman, M.P., Sakai, T., Neibaur, J.C., Mitchell, J.M., and Yamada, K.M.** (2003). Role of PI 3-kinase and PIP3 in submandibular gland branching morphogenesis. *Dev Biol* **255**, 178-191.

- Laufer, E., Nelson, C.E., Johnson, R.L., Morgan, B.A., and Tabin, C.** (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* **79**, 993-1003.
- Lewandoski, M., Sun, X., and Martin, G.R.** (2000). Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* **26**, 460-463.
- Li, J.P., Gong, F., Hagner-McWhirter, A., Forsberg, E., Abrink, M., Kisilevsky, R., Zhang, X., and Lindahl, U.** (2003a). Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J Biol Chem* **278**, 28363-28366.
- Li, L., Arman, E., Ekblom, P., Edgar, D., Murray, P., and Lonai, P.** (2004). Distinct GATA6- and laminin-dependent mechanisms regulate endodermal and ectodermal embryonic stem cell fates. *Development* **131**, 5277-5286.
- Li, S., Edgar, D., Fassler, R., Wadsworth, W., and Yurchenco, P.D.** (2003b). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell* **4**, 613-624.
- Li, S., Harrison, D., Carbonetto, S., Fassler, R., Smyth, N., Edgar, D., and Yurchenco, P.D.** (2002). Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol* **157**, 1279-1290.
- Li, X., Chen, Y., Scheele, S., Arman, E., Haffner-Krausz, R., Ekblom, P., and Lonai, P.** (2001). Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body. *J Cell Biol* **153**, 811-822.
- Lin, X.** (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* **131**, 6009-6021.
- Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J.D., Wells, D.E., and Matzuk, M.M.** (2000). Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* **224**, 299-311.
- Loomis, C.A., Kimmel, R.A., Tong, C.X., Michaud, J., and Joyner, A.L.** (1998). Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development* **125**, 1137-1148.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A., and Karsenty, G.** (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* **9**, 2808-2820.
- Lyons, K.M., Pelton, R.W., and Hogan, B.L.** (1989). Patterns of expression of murine *Vgr-1* and *BMP-2a* RNA suggest that transforming growth factor- β -like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev* **3**, 1657-1668.
- MacDonald, B.T., Adamska, M., and Meisler, M.H.** (2004). Hypomorphic expression of *Dkk1* in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with *Lrp6*. *Development* **131**, 2543-2552.

- Macias, D., Ganan, Y., Ros, M.A., and Hurle, J.M.** (1996). In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 and FGF-4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anat Embryol (Berl)* **193**, 533-541.
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T.K., Piedra, M.E., Ros, M.A., and Hurle, J.M.** (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109-1117.
- Mann, K., Deutzmann, R., and Timpl, R.** (1988). Characterization of proteolytic fragments of the laminin-nidogen complex and their activity in ligand-binding assays. *Eur J Biochem* **178**, 71-80.
- Martin, P.** (1990). Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int J Dev Biol* **34**, 323-336.
- Mayer, U., Kohfeldt, E., and Timpl, R.** (1998). Structural and genetic analysis of laminin-nidogen interaction. *Ann N Y Acad Sci* **857**, 130-142.
- Mayer, U., Poschl, E., Gerecke, D.R., Wagman, D.W., Burgeson, R.E., and Timpl, R.** (1995). Low nidogen affinity of laminin-5 can be attributed to two serine residues in EGF-like motif γ 2III4. *FEBS Lett* **365**, 129-132.
- Mayer, U., Nischt, R., Poschl, E., Mann, K., Fukuda, K., Gerl, M., Yamada, Y., and Timpl, R.** (1993). A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J* **12**, 1879-1885.
- McKnight, R.A., Spencer, M., Wall, R.J., and Hennighausen, L.** (1996). Severe position effects imposed on a 1 kb mouse whey acidic protein gene promoter are overcome by heterologous matrix attachment regions. *Mol Reprod Dev* **44**, 179-184.
- McKnight, R.A., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R.J., and Hennighausen, L.** (1992). Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6943-6947.
- McKnight, R.A., Spencer, M., Dittmer, J., Brady, J.N., Wall, R.J., and Hennighausen, L.** (1995). An Ets site in the whey acidic protein gene promoter mediates transcriptional activation in the mammary gland of pregnant mice but is dispensable during lactation. *Mol Endocrinol* **9**, 717-724.
- Merz, D.C., Alves, G., Kawano, T., Zheng, H., and Culotti, J.G.** (2003). UNC-52/perlecan affects gonadal leader cell migrations in *C. elegans* hermaphrodites through alterations in growth factor signaling. *Dev Biol* **256**, 173-186.
- Miner, J.H., and Sanes, J.R.** (1994). Collagen IV α 3, α 4, and α 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol* **127**, 879-891.
- Miner, J.H., and Sanes, J.R.** (1996). Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen α 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol* **135**, 1403-1413.

- Miner, J.H., and Li, C.** (2000). Defective glomerulogenesis in the absence of laminin $\alpha 5$ demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol* **217**, 278-289.
- Miner, J.H., Cunningham, J., and Sanes, J.R.** (1998). Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin $\alpha 5$ chain. *J Cell Biol* **143**, 1713-1723.
- Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G., and Sutherland, A.E.** (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* **131**, 2247-2256.
- Miosge, N., Sasaki, T., and Timpl, R.** (2002). Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol* **21**, 611-621.
- Miyagoe, Y., Hanaoka, K., Nonaka, I., Hayasaka, M., Nabeshima, Y., Arahata, K., and Takeda, S.** (1997). Laminin $\alpha 2$ chain-null mutant mice by targeted disruption of the Lama2 gene: a new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett* **415**, 33-39.
- Mongiat, M., Otto, J., Oldershaw, R., Ferrer, F., Sato, J.D., and Iozzo, R.V.** (2001). Fibroblast growth factor-binding protein is a novel partner for perlecan protein core. *J Biol Chem* **276**, 10263-10271.
- Mongiat, M., Taylor, K., Otto, J., Aho, S., Uitto, J., Whitelock, J.M., and Iozzo, R.V.** (2000). The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7. *J Biol Chem* **275**, 7095-7100.
- Moon, A.M., and Capecchi, M.R.** (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* **26**, 455-459.
- Moon, A.M., Boulet, A.M., and Capecchi, M.R.** (2000). Normal limb development in conditional mutants of Fgf4. *Development* **127**, 989-996.
- Morita, H., Yoshimura, A., Inui, K., Ideura, T., Watanabe, H., Wang, L., Soininen, R., and Tryggvason, K.** (2005). Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1703-1710.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., Niehrs, C., Belmonte, J.C., and Westphal, H.** (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* **1**, 423-434.
- Murray, P., and Edgar, D.** (2000). Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development. *J Cell Biol* **150**, 1215-1221.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M., and Nischt, R.** (2000). The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol* **20**, 7007-7012.
- Nakano, A., Chao, S.C., Pulkkinen, L., Murrell, D., Bruckner-Tuderman, L., Pfendner, E., and Uitto, J.** (2002). Laminin 5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: molecular basis of Herlitz vs. non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet* **110**, 41-51.

- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., and Martin, G.R.** (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**, 579-587.
- Noakes, P.G., Miner, J.H., Gautam, M., Cunningham, J.M., Sanes, J.R., and Merlie, J.P.** (1995). The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin β 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin β 1. *Nat Genet* **10**, 400-406.
- Nogawa, H., and Takahashi, Y.** (1991). Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development* **112**, 855-861.
- Odenthal, U., Haehn, S., Tunggal, P., Merkl, B., Schomburg, D., Frie, C., Paulsson, M., and Smyth, N.** (2004). Molecular analysis of laminin N-terminal domains mediating self-interactions. *J Biol Chem* **279**, 44504-44512.
- Olofsson, B., and Page, D.T.** (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* **279**, 233-243.
- Ornitz, D.M.** (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* **22**, 108-112.
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M.** (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271**, 15292-15297.
- Ortega, N., and Werb, Z.** (2002). New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci* **115**, 4201-4214.
- Paine-Saunders, S., Viviano, B.L., Economides, A.N., and Saunders, S.** (2002). Heparan sulfate proteoglycans retain Noggin at the cell surface: a potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients. *J Biol Chem* **277**, 2089-2096.
- Paine-Saunders, S., Viviano, B.L., Zupicich, J., Skarnes, W.C., and Saunders, S.** (2000). glypican-3 controls cellular responses to Bmp4 in limb patterning and skeletal development. *Dev Biol* **225**, 179-187.
- Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M.M., Caldwell, M.C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C.J., McDermott, S., and Datta, S.** (2003). *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Dev Biol* **253**, 247-257.
- Pathy, L.** (1996). Exon shuffling and other ways of module exchange. *Matrix Biol* **15**, 301-310; discussion 311-302.
- Patton, B.L., Connoll, A.M., Martin, P.T., Cunningham, J.M., Mehta, S., Pestronk, A., Miner, J.H., and Sanes, J.R.** (1999). Distribution of ten laminin chains in dystrophic and regenerating muscles. *Neuromuscul Disord* **9**, 423-433.
- Paulsson, M., Yurchenco, P.D., Ruben, G.C., Engel, J., and Timpl, R.** (1987a). Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane. *J Mol Biol* **197**, 297-313.

- Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K., and Engel, J.** (1987b). Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur J Biochem* **166**, 11-19.
- Pellegrini, L.** (2001). Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 629-634.
- Ponting, C.P., Schultz, J., Milpetz, F., and Bork, P.** (1999). SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res* **27**, 229-232.
- Poschl, E., Fox, J.W., Block, D., Mayer, U., and Timpl, R.** (1994). Two non-contiguous regions contribute to nidogen binding to a single EGF-like motif of the laminin $\gamma 1$ chain. *EMBO J* **13**, 3741-3747.
- Poschl, E., Schlotzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U.** (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* **131**, 1619-1628.
- Poschl, E., Mayer, U., Stetefeld, J., Baumgartner, R., Holak, T.A., Huber, R., and Timpl, R.** (1996). Site-directed mutagenesis and structural interpretation of the nidogen binding site of the laminin $\gamma 1$ chain. *EMBO J* **15**, 5154-5159.
- Pujuguet, P., Simian, M., Liaw, J., Timpl, R., Werb, Z., and Bissell, M.J.** (2000). Nidogen-1 regulates laminin-1-dependent mammary-specific gene expression. *J Cell Sci* **113** (Pt 5), 849-858.
- Pullan, S., Wilson, J., Metcalfe, A., Edwards, G.M., Goberdhan, N., Tilly, J., Hickman, J.A., Dive, C., and Streuli, C.H.** (1996). Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci* **109** (Pt 3), 631-642.
- Rafalowska, J., Dziewulska, D., and Fidzianska, A.** (2004). CADASIL: what component of the vessel wall is really a target for Notch 3 gene mutations? *Neurol Res* **26**, 558-562.
- Ramalho, J.S., Anders, R., Jaissle, G.B., Seeliger, M.W., Huxley, C., and Seabra, M.C.** (2002). Rapid degradation of dominant-negative Rab27 proteins in vivo precludes their use in transgenic mouse models. *BMC Cell Biol* **3**, 26.
- Reinhardt, D., Mann, K., Nischt, R., Fox, J.W., Chu, M.L., Krieg, T., and Timpl, R.** (1993). Mapping of nidogen binding sites for collagen type IV, heparan sulfate proteoglycan, and zinc. *J Biol Chem* **268**, 10881-10887.
- Revest, J.M., Spencer-Dene, B., Kerr, K., De Moerlooze, L., Rosewell, I., and Dickson, C.** (2001). Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev Biol* **231**, 47-62.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-1416.

- Rosen, J.M., Li, S., Raught, B., and Hadsell, D.** (1996). The mammary gland as a bioreactor: factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes. *Am J Clin Nutr* **63**, 627S-632S.
- Rossi, M., Morita, H., Sormunen, R., Airene, S., Kreivi, M., Wang, L., Fukai, N., Olsen, B.R., Tryggvason, K., and Soininen, R.** (2003). Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney. *EMBO J* **22**, 236-245.
- Rowe, D.A., and Fallon, J.F.** (1982). The proximodistal determination of skeletal parts in the developing chick leg. *J Embryol Exp Morphol* **68**, 1-7.
- Rowe, D.A., Cairns, J.M., and Fallon, J.F.** (1982). Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Dev Biol* **93**, 83-91.
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R.A., Goldstein, L.S., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J., Kuehl, P.M., Lemaitre, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.H., Pickeral, O.K., Shue, C., Vossall, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., and Lewis, S.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-2215.
- Rubin, L., and Saunders, J.W., Jr.** (1972). Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev Biol* **28**, 94-112.
- Ryan, M.C., Lee, K., Miyashita, Y., and Carter, W.G.** (1999). Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *J Cell Biol* **145**, 1309-1323.
- Salas-Vidal, E., Valencia, C., and Covarrubias, L.** (2001). Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev Dyn* **220**, 295-306.
- Salmivirta, K., Talts, J.F., Olsson, M., Sasaki, T., Timpl, R., and Ekblom, P.** (2002). Binding of mouse nidogen-2 to basement membrane components and cells and its expression in embryonic and adult tissues suggest complementary functions of the two nidogens. *Exp Cell Res* **279**, 188-201.
- Sambrook, F., Maniatis.** (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanz-Ezquerro, J.J., and Tickle, C.** (2003). Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* **13**, 1830-1836.
- Saunders, J.W., Jr.** (1998). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. 1948. *J Exp Zool* **282**, 628-668.

- Schuger, L., Yurchenco, P., Relan, N.K., and Yang, Y.** (1998). Laminin fragment E4 inhibition studies: basement membrane assembly and embryonic lung epithelial cell polarization requires laminin polymerization. *Int J Dev Biol* **42**, 217-220.
- Schulze, B., Mann, K., Battistutta, R., Wiedemann, H., and Timpl, R.** (1995). Structural properties of recombinant domain III-3 of perlecan containing a globular domain inserted into an epidermal-growth-factor-like motif. *Eur J Biochem* **231**, 551-556.
- Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Poschl, E., Rao, C., Beier, D.R., Skarnes, W.C., Timpl, R., and Bader, B.L.** (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol Cell Biol* **22**, 6820-6830.
- Selbert, S., Bentley, D.J., Melton, D.W., Rannie, D., Lourenco, P., Watson, C.J., and Clarke, A.R.** (1998). Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. *Transgenic Res* **7**, 387-396.
- Semba, I., Nonaka, K., Takahashi, I., Takahashi, K., Dashner, R., Shum, L., Nuckolls, G.H., and Slavkin, H.C.** (2000). Positionally-dependent chondrogenesis induced by BMP4 is co-regulated by Sox9 and Msx2. *Dev Dyn* **217**, 401-414.
- Sidow, A., Bulotsky, M.S., Kerrebrock, A.W., Bronson, R.T., Daly, M.J., Reeve, M.P., Hawkins, T.L., Birren, B.W., Jaenisch, R., and Lander, E.S.** (1997). *Serrate2* is disrupted in the mouse limb-development mutant syndactylism. *Nature* **389**, 722-725.
- Skarnes, W.C., Moss, J.E., Hurlley, S.M., and Beddington, R.S.** (1995). Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6592-6596.
- Smyth, N., Vatansever, H.S., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M., and Edgar, D.** (1998). The targeted deletion of the *LAMC1* gene. *Ann N Y Acad Sci* **857**, 283-286.
- Smyth, N., Vatansever, H.S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M., and Edgar, D.** (1999). Absence of basement membranes after targeting the *LAMC1* gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* **144**, 151-160.
- Sorokin, L., Sonnenberg, A., Aumailley, M., Timpl, R., and Ekblom, P.** (1990). Recognition of the laminin E8 cell-binding site by an integrin possessing the $\alpha 6$ subunit is essential for epithelial polarization in developing kidney tubules. *J Cell Biol* **111**, 1265-1273.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Stephens, L.E., Sutherland, A.E., Klimanskaya, I.V., Andrieux, A., Meneses, J., Pedersen, R.A., and Damsky, C.H.** (1995). Deletion of $\beta 1$ integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* **9**, 1883-1895.
- Stetefeld, J., Mayer, U., Timpl, R., and Huber, R.** (1996). Crystal structure of three consecutive laminin-type epidermal growth factor-like (LE) modules of laminin $\gamma 1$ chain harboring the nidogen binding site. *J Mol Biol* **257**, 644-657.

- Summerbell, D.** (1974). A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol* **32**, 651-660.
- Sun, X., Mariani, F.V., and Martin, G.R.** (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* **418**, 501-508.
- Sun, X., Lewandoski, M., Meyers, E.N., Liu, Y.H., Maxson, R.E., Jr., and Martin, G.R.** (2000). Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* **25**, 83-86.
- Suzuki, N., Nakatsuka, H., Mochizuki, M., Nishi, N., Kadoya, Y., Utani, A., Oishi, S., Fujii, N., Kleinman, H.K., and Nomizu, M.** (2003). Biological activities of homologous loop regions in the laminin α chain G domains. *J Biol Chem* **278**, 45697-45705.
- Sympson, C.J., Talhouk, R.S., Alexander, C.M., Chin, J.R., Clift, S.M., Bissell, M.J., and Werb, Z.** (1994). Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J Cell Biol* **125**, 681-693.
- Takagi, J., Yang, Y., Liu, J.H., Wang, J.H., and Springer, T.A.** (2003). Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic β -propeller interface. *Nature* **424**, 969-974.
- Talts, J.F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A., and Timpl, R.** (1999). Binding of the G domains of laminin α 1 and α 2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, α -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J* **18**, 863-870.
- Thyboll, J., Kortesmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., Sorokin, L., Risling, M., Cao, Y., and Tryggvason, K.** (2002). Deletion of the laminin α 4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol* **22**, 1194-1202.
- Tickle, C.** (1999). Morphogen gradients in vertebrate limb development. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 345-351.
- Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L., and Lee, J.** (1982). Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* **296**, 564-566.
- Timpl, R.** (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 618-624.
- Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, H., and Wick, G.** (1983). Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem* **137**, 455-465.
- Timpl, R., Tisi, D., Talts, J.F., Andac, Z., Sasaki, T., and Hohenester, E.** (2000). Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* **19**, 309-317.
- Todt, W.L., and Fallon, J.F.** (1984). Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol* **80**, 21-41.

- Tunggal, J., Wartenberg, M., Paulsson, M., and Smyth, N.** (2003). Expression of the nidogen-binding site of the laminin γ 1 chain disturbs basement membrane formation and maintenance in F9 embryoid bodies. *J Cell Sci* **116**, 803-812.
- Wagner, K.U., McAllister, K., Ward, T., Davis, B., Wiseman, R., and Hennighausen, L.** (2001). Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res* **10**, 545-553.
- Wagner, K.U., Wall, R.J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P.A., and Hennighausen, L.** (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res* **25**, 4323-4330.
- Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R., and Bryant, S.V.** (1989). A staging system for mouse limb development. *J Exp Zool* **249**, 41-49.
- Wang, C.K., Omi, M., Ferrari, D., Cheng, H.C., Lizarraga, G., Chin, H.J., Upholt, W.B., Dealy, C.N., and Kosher, R.A.** (2004). Function of BMPs in the apical ectoderm of the developing mouse limb. *Dev Biol* **269**, 109-122.
- Wilkie, A.O., Patey, S.J., Kan, S.H., van den Ouweland, A.M., and Hamel, B.C.** (2002). FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. *Am J Med Genet* **112**, 266-278.
- Willem, M., Miosge, N., Halfter, W., Smyth, N., Jannetti, I., Burghart, E., Timpl, R., and Mayer, U.** (2002). Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin γ 1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* **129**, 2711-2722.
- Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., and Campbell, K.P.** (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet* **6**, 831-841.
- Wintermantel, T.M., Mayer, A.K., Schutz, G., and Greiner, E.F.** (2002). Targeting mammary epithelial cells using a bacterial artificial chromosome. *Genesis* **33**, 125-130.
- Wolpert, L.** (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* **25**, 1-47.
- Xu, J., Liu, Z., and Ornitz, D.M.** (2000). Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* **127**, 1833-1843.
- Yamaguchi, K., Francis-West, P.H., Shiraishi, K., and Akita, K.** (2004). Premature regression of the leg apical ectodermal ridge in the Japanese chick wingless mutant. *Anat Embryol (Berl)* **208**, 487-497.
- Yang, Y., Guillot, P., Boyd, Y., Lyon, M.F., and McMahon, A.P.** (1998). Evidence that preaxial polydactyly in the Doublefoot mutant is due to ectopic Indian Hedgehog signaling. *Development* **125**, 3123-3132.

- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P.T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., and Tickle, C.** (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* **124**, 4393-4404.
- Yurchenco, P.D., and Ruben, G.C.** (1987). Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol* **105**, 2559-2568.
- Yurchenco, P.D., and Schittny, J.C.** (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* **4**, 1577-1590.
- Yurchenco, P.D., and Cheng, Y.S.** (1993). Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J Biol Chem* **268**, 17286-17299.
- Yurchenco, P.D., Amenta, P.S., and Patton, B.L.** (2004). Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* **22**, 521-538.
- Zou, H., and Niswander, L.** (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-741.
- Zou, H., Wieser, R., Massague, J., and Niswander, L.** (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* **11**, 2191-2203.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| α - | anti- |
| Abb. | Abbildung |
| AER | Apikale Ektodermale Randleiste |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| bp | Basenpaare |
| BM | Basalmembran |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| <i>dpc</i> | <i>days post conceptum</i> , Tage nach der Befruchtung |
| E | Embryonalstadium (entspricht <i>dpc</i>) |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> , fötales Kälberserum |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| GAG | Glucosaminoglycan |
| h | Stunden |
| HSPG | Heparansulfat-Proteoglycan |
| kb | Kilobasen |
| kDa | KiloDalton |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| M | Molar |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MBq | Megabequerel |
| mRNA | messenger RNA |
| μ l | Mikroliter |
| n | Stichprobenumfang |
| N | Asn, Asparagin |
| nm | Nanometer |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernresonanzspektroskopie |
| P | Postnataltag |
| PCD | <i>Programmed Cell Death</i> , Programmierter Zelltod |

| | |
|-------|---|
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PECAM | Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule |
| pg | Pikogramm |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT | Reverse Transkriptase |
| S | Ser, Serin |
| S | Svedberg, Sedimentationskonstante |
| Shh | Sonic hedgehog |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling |
| U | <i>units</i> , Einheit der Enzymaktivität |
| UTR | <i>Untranslated Region</i> , nicht translatierte Region |
| ü.N. | über Nacht |
| WAP | Whey Acidic Protein |
| WT | Wildtyp |
| ZPA | <i>Zone of Polarising Activity</i> , Zone polarisierender Wirkung |
| ZMMK | Zentrum für Molekulare Medizin Köln |

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Labor von Dr. N. R. Smyth am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln durchgeführt.

Neil möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine fachliche Kompetenz herzlich danken.

Ein grosser Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Mats Paulsson für das hervorragende Arbeitsumfeld und die stete Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Roth möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Prof. Dr. Klein für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Vielen Dank an Wislaw, die Tierpfleger und natürlich Christian für die Unterstützung bei der Tierzucht sowie Histologie.

Ein dickes Dankeschön für den Spaß im Labor, die entspannte Arbeitsatmosphäre und die hilfreichen Diskussionen geht an

die *Smythies featuring Silke*: Anju, *spezielle* Annette, Chrissi-Wi, Lars, Matthew,
Flugbegleiter Sebastian, *Sprüche* Silke, *Kolumna* Susan,
Hammer Uwe

die *Plomänner*: Barbara, *rockbare* Jessica, *bester* Mille, Yeliz

und das *Exil-office*: Andreas, *König* Jörg

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit und vieles mehr gilt mein besonderer Dank Marcel.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, 28. September 2005

(Kerstin Böse)

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Kerstin Böse
 Geburtsdatum/-ort: 9. April 1977 in Bad Cannstatt
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Frille
 1987 – 1996 Städtisches Gymnasium Petershagen
 Abschluss: Abitur

Studium

WS 96/97 – SS 01 Studium an der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster, Fachbereich Biologie
 09/2000 – 07/2001 Diplomarbeit am Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Ch. Klämbt: „Charakterisierung des KETTE-Proteins von *Drosophila melanogaster*“
 21.08.2001 Diplomvergabe
 Seit 01/2002 Bearbeitung des Dissertationsthemas an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, Institut für Biochemie II unter Leitung von Prof. Dr. M. Paulsson im Labor von Dr. R. N. Smyth

Köln, 28. September 2005 _____