

ABSTRACT

Introduction: The basement membrane is a highly specialised extracellular matrix found underlying all endothelia and epithelia and surrounding many mesenchymal cells, in particular myocytes, peripheral nerves and adipocytes. Basement membranes have numerous physical and signalling functions that alter with the specific tissue type and stage of development. Nidogens are in mammals a family of two proteins nidogen -1 and 2. *In vitro* studies have indicated that the 150 kDa glycoprotein nidogen-1 may play a central role in the supramolecular organization of basement membranes through binding to a range of extracellular proteins. To elucidate their importance in the basement membrane, mice were generated with mutated alleles of the NID-1 gene. Ultrastructural analysis of kidney and skeletal muscle from mice lacking nidogen-1 failed to reveal differences in morphology and basement membrane structure. However, these mice show signs of neurological impairment with ataxia, especially of the hind limbs, and spontaneous seizure activity. Nidogen-2 staining in these animals is increased in certain basement membranes, particularly in cardiac and skeletal muscle, where it is normally found in scant amounts, suggesting that the loss of nidogen-1 may be compensated by nidogen-2. Mice have been generated lacking nidogen-1 and one or both alleles of NID-2. Mice lacking both nidogen-1 alleles and heterozygous of nidogen-2 show more severe neurological defects, than those lacking only nidogen -1.

Aim of the project: To study the behavioural, electro-physiological, neurological and cellular aspects of the nidogen knockout mice (NID1 - -/NID2 + +) and (NID1 - -/NID2 + -), to gain a further insight into the function of this protein family.

Results: The neurological defects were studied using rotarod tests, *in vivo* EEG recordings and *in vitro* hippocampal and neocortical field potential recordings analysing input/output relationships and short- and long term plasticity (paired-pulse behaviour and LTP). *In vivo*, the animals displayed massive functional deficits in the rotarod test and epileptiform discharges in EEG recordings. *In vitro*, in the hippocampus, 28% of the slices showed spontaneous, and another 33% evoked spontaneous epileptiform activity. Significant increases of the input/output ratio of synaptically evoked responses in CA1 and dentate gyrus, as well as of paired pulse accentuation, and loss of perforant path LTP was observed. By contrast, in the neocortex, the input/output ratio and paired-pulse accentuation were reduced. To augment the *in vivo* studies, mouse and human forms of nidogen-1 and-2 were cloned, recombinantly expressed and purified. Laminin was extracted from both control and nidogen knockout mice and the biochemical aspects of basement membrane deposition which seemed to be altered in the absence of nidogen was studied. A possible down-regulation of laminin and its receptors was investigated.

Discussion: The results reveal the epileptic nature of the mice in the absence of nidogen-1. Alterations in synaptic plasticity and network function in the nidogen-1 null animals are indicative of a novel role for a nidogen-1, a protein found only in basement membranes. Also, it suggests that nidogen-1 is important for maintaining the structural integrity of basement membranes.

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die Basalmembran stellt eine hochspezialisierte extrazelluläre Matrix dar, die unter allen Endo- und Epithelien zu finden ist, sowie viele mesenchymale Zellen, vor allem Myocyten, periphere Nerven und Adipocyten, umgibt. Basalmembranen erfüllen mannigfaltige Gerüst- und Signalfunktionen, die vom Gewebetyp und dem ontogenetischen Reifungsstadium desselben abhängen. In Säugetieren treten Nidogene als eine Familie zweier Proteine auf - Nidogen-1 und -2. *In vitro* Untersuchungen deuten darauf hin, daß das 150 kDa große Glycoprotein Nidogen-1 eine wesentliche Rolle bei der supramolekularen Organisation von Basalmembranen durch Bindungen an eine Reihe unterschiedlicher extrazellulärer Proteine spielt. Um die Bedeutung von Nidogenen in der Basalmembran näher zu beleuchten, wurden Mäuse mit Allelmutationen des Nidogen-1 Genes erzeugt. Ultrastrukturelle Untersuchungen der Nieren und des Skelettmuskels von Mäusen, denen Nidogen-1 fehlt, haben keine Unterschiede in der Morphologie der Basalmembran belegen können. Allerdings zeigen diese Tiere deutliche neurologische Defizite, die vor allem in tonischen Streckungen und Myoklonien der Hinterläufe und spontaner Krampfaktivität bestehen. Der immunhistochemische Nachweis für Nidogen-2 zeigt in einigen Basalmembranen ein stärkeres Signal, vor allem im Herz- und Skelettmuskel, in denen Nidogen-2 unter normalen Bedingungen in nur sehr geringen Mengen anzutreffen ist. Dies deutet darauf hin, daß der Verlust von Nidogen-1 ggf. durch Nidogen-2 kompensiert wird. Neben Nidogen-1 Knockout Tieren wurden auch Mäuse hergestellt, denen Nidogen-1 und eines bzw. beide Allele des Nidogen-2 Genes fehlten. Dabei konnte gezeigt werden, daß der Phänotyp in Mäusen, denen Nidogen-1 fehlte und die darüber hinaus heterozygot für Nidogen-2 waren, deutlich ausgeprägter war als in jenen Tieren, denen nur Nidogen-1 fehlte.

Ziel des Projektes: Um einen tieferen Einblick in die Funktion der Proteinfamilie zu erlangen, sollen die Nidogen Knockout Mäuse (NID1 - -/NID2 + + und NID1 - -/NID2 + -) elektrophysiologisch, neurologisch und auf zellulärer Ebene charakterisiert werden.

Ergebnisse: Funktionell ist sowohl bei - -/+ - als auch bei - -/+ + Tieren eine signifikant verminderte Leistung im Rotarod-Test nachzuweisen. Im epikorticalen 24h-EEG der betroffenen Mäuse zeigten sich praktisch ununterbrochen epileptische Potentiale, während dies in keinem der Kontrolltiere auftrat. *In vitro* waren in 2/7 Präparaten von - -/+ - Mäusen spontane epileptiforme Entladungen im Hippocampus zu beobachten; bei afferenter Stimulation der Moosfasern traten zudem in 2/6 Schnitten epileptiforme Potentiale auf. Dabei war das Verhältnis zwischen Reizintensität und Signalamplitude in - -/+ -, und weniger in - -/+ + Präparaten, signifikant zu größeren Potentialen verschoben (Schaffer-Kollateral- und Tractus perforans Stimulation). In beiden Eingängen war auch die Doppelpuls-Potenzierung in - -/+ - Schnitten vergrößert, ebenso wie die Langzeitpotenzierung bei Tractus-perforans-Aktivierung. Um die *in vivo* Untersuchungen noch zu erweitern, wurden sowohl Maus als auch humanes Nidogen-1 und -2 kloniert, rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Ausserdem wurde aus Nidogen Knockout Mäusen und Kontrolltieren Laminin extrahiert und die Zusammensetzung der Basalmembran biochemisch charakterisiert, die bei Abwesenheit von Nidogen-1 verändert scheint.

Diskussion: Bei Abwesenheit von Nidogen-1 zeigen die Mäuse einen epileptischen Phänotyp. Veränderungen in der synaptischen Plastizität und der Vernetzung lassen auf eine neue Rolle des Nidogen-1, einem Protein, das nur in Basalmembranen gefunden wird, schliessen. Weiterhin deuten unsere Ergebnisse auf eine Beteiligung von Nidogen-1 an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Basalmembranen hin.