
5. Abstract

Interaction of nidogens with laminin has been proposed to be important for BM assembly and maintenance. This interaction has been previously shown to be critical for epithelial morphogenesis in organ cultures and mice lacking the high-affinity nidogen-binding site on the laminin $\gamma 1$ chain showed tissue-specific defects in BMs especially in kidney and lung. In the present study we analyzed skin development in this mouse strain. Skin morphogenesis was normal, however, 50% of the mutant mice had a significantly thicker epidermis and all of them showed increased numbers of proliferating basal keratinocytes. In the mutant mice, nidogen-1 staining of the dermal-epidermal BM was markedly reduced, whereas it was completely absent from the capillary BMs. The remaining nidogen-1 could be shown to co-localize at the dermal-epidermal junction with the laminin $\gamma 3$ chain, which has been shown *in vitro* to bind to nidogen-1, albeit with somewhat lower affinity. In contrast, nidogen-2 staining was not altered. Ultrastructurally the dermal-epidermal and the capillary BMs appeared normal in the mice lacking the nidogen binding site. The latter one is in contrast to results obtained in nidogen double null mice. In these mice ultrastructural analysis revealed complete absence of capillary BMs resulting in microhemorrhages. Taken together our data strongly suggest that *in vivo* nidogen-1 is integrated into the BM exclusively via binding to the nidogen-binding site on laminins containing the $\gamma 1$ or $\gamma 3$ chain. In contrast, nidogen-2 recruitment to and retainment within the BM appears to occur via interaction with another binding site on laminin or another binding partner. In order to get more insight into isoform specific roles of nidogens, the barrier function of endothelial BMs was challenged in nidogen-1 or nidogen-2 deficient mice. In contrast to nidogen-1 deficient mice, nidogen-2 deficient mice showed increased lung metastasis after injection of melanoma cells suggesting that nidogen-2 plays an important role in this process. However, passage of inflammatory cells was not changed by the absence of either nidogen-1 or nidogen-2. This indicates that tumor cells and inflammatory cells use different mechanisms to cross endothelial BMs. Further studies elucidating the molecular mechanisms underlying these specific functions would be instrumental to better understand the contribution of individual isoforms for BM structure and function *in vivo*.

6. Zusammenfassung

Die Interaktion von Nidogen mit Laminin wird als wichtige Interaktion bei der Basalmembran (BM)-Bildung und Stabilisierung betrachtet. So konnte in Organkulturen gezeigt werden, dass diese Interaktion bei der epithelialen Morphogenese eine wichtige Rolle spielt. Mäuse, denen die Nidogen-Bindungsstelle in der Laminin $\gamma 1$ Kette fehlt, zeigten gewebespezifische BM-Defekte insbesondere in der Niere und Lunge. In dieser Studie haben wir nun die Hautentwicklung in diesen Mäusen untersucht. Während der Aufbau der Haut normal war, zeigten 50% dieser Mäuse eine Zunahme der Epidermisdicke und alle eine höhere Anzahl proliferierender, basaler Keratinozyten. Die Nidogen-1 Färbung der dermalen-epidermalen BM war deutlich verringert und in den BM der kleinen Blutgefäße konnte überhaupt kein Nidogen-1 nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die verbliebene Nidogen-1 Färbung mit Antikörpern gegen die Laminin $\gamma 3$ Kette in der dermalen-epidermalen BM kolokalisierte. Die Nidogen-2 Färbung hingegen war nicht verändert. Die Ultrastruktur der dermalen-epidermalen BM und der BM der Gefäße war normal. Letzteres steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die in Mäusen, in denen beide Nidogengene deletiert waren, erzielt wurden. In diesen Mäusen fehlten die BM um die Gefäße fast vollständig. Zusammenfassend legen diese Daten den Schluss nahe, dass Nidogen-1 ausschliesslich über die Interaktion mit der Nidogenbindungsstelle in der Laminin $\gamma 1$ oder $\gamma 3$ Kette in die BM integriert wird. Die Integration von Nidogen-2 dagegen muss über eine andere Bindungsstelle im Lamininmolekül oder aber über einen anderen Bindungspartner erfolgen. Um mehr Einblick in die Isoform spezifischen Funktionen der Nidogene zu erhalten, wurde die Barrierefunktion der endothelialen BM in Nidogen-1 oder Nidogen-2 defizienten Mäusen untersucht. Im Gegensatz zu Nidogen-1 defizienten Tieren, zeigten Nidogen-2 defiziente Tiere eine erhöhte Metastasierungsrate nach der Injektion von Melanomzellen, was darauf hindeutet, dass Nidogen-2 bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielt. Die Passage von inflammatorischen Zellen durch diese BM war jedoch in keinem der beiden Mausstämme verändert. Dies deutet daraufhin, dass Tumorzellen und inflammatorische Zellen sehr wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen für die Passage dieser Barrieren benutzen. Welchen Anteil die individuellen Isoformen an der BMs Struktur und Funktion *in vivo* haben, muss jetzt in weiteren Studien gezeigt werden, die die molekularen Mechanismen aufklären, die diesen Isoform spezifischen Funktionen zugrunde liegen.