

Abstract

Basement membranes are specialized sheet-like extracellular matrices, which are essential for tissue compartmentalization and differentiation during development. Their major components are laminins, collagen IV, perlecan and nidogens. The nidogen family consists of two members, nidogen-1 and -2. Both nidogens are suggested to act as extracellular matrix linkers, connecting the independent networks of laminins and collagen IV. A functional complementarity of both nidogens is suggested by the normal basement membrane establishment in tissues of *Nid1*^{-/-} and *Nid2*^{-/-} mice, and is supported by the perinatal lethality of mutants null for both nidogens (*Nid dKO*). However, some tissues of the *Nid dKO* mutants still have the basement membranes, suggesting that the impact of nidogen-deficiency could be tissue-specific. The central nervous system, for example, could be affected by the deficiency of nidogen-1, as many *Nid1*^{-/-} mice exhibit seizure-like behavior.

This study aimed at characterizing the developmental and behavioral abnormalities of nidogen-deficient brains. To delineate the functional roles of nidogen-1 and -2 in the brain development, various nidogen-deficient embryos at E12.5 and E15.5 were studied. The contribution of nidogens in laminin binding and hence laminin deposition in the mutant brains was evaluated by the difference in the immunoreactivity for different laminins in the endothelial and pial basement membranes. The preponderance of nidogen-2 in the endothelial basement membrane was revealed by the delay of laminin deposition in *Nid2*^{-/-} and *Nid1*^{+/-}*Nid2*^{-/-} embryonic brain capillaries during development. However, the delay of laminin deposition in capillaries had no adverse effect on the blood-brain-barrier function in the nidogen-deficient adult mice. Interestingly, capillaries without endothelial basement membranes could still be formed in the *Nid dKO* embryos.

Using the same approach, both nidogen-1 and -2 were inferred to be important for the pial basement membranes on the cortical surfaces. The pial basement membranes are important for the attachment of radial glial fiber endfeet and subsequent neuronal migration across the neocortex. They were not formed in the *Nid dKO* embryos and

therefore no attachment of fiber endfeet and disorganized radial glial fibers were seen. In the nidogen-deficient ($Nid1^{-/-}$, $Nid2^{-/-}$ and $Nid1^{+/-}Nid2^{-/-}$) mutants, the pial basement membranes were maintained but the radial glial fibers did not align their endfeet in the orderly manner seen in *WT* embryos. These imperfections in the alignment of endfeet appeared to correlate with the decreased number of reelin-expressing Cajal-Retzius neurons in the nidogen-deficient neocortices. Dramatically, these neurons were almost absent from the *Nid dKO* neocortices. Additional abnormalities attributed to the absence of the pial basement membrane in the *Nid dKO* cerebral cortices included ectopic proliferative cells and the reduction in the proliferative pool of neuroprogenitors.

Mutant mice deficient of nidogen-1 ($Nid1^{-/-}$ and $Nid1^{-/-}Nid2^{+/-}$) show seizure-like behavior. This behavior, however, could not be classified as spontaneous epilepsy by implanted electroencephalography. Among various adult nidogen-deficient mice tested by injecting kainate, $Nid1^{-/-}Nid2^{+/-}$ animals were the most susceptible to seizure induction. Apparently, their higher seizure susceptibility is related to the significantly fewer parvalbumin-immunoreactive interneurons in their hippocampi after the kainate-induced seizures.

In summary, basement membranes are critically important for normal brain development. It is believed that nidogens play not just a structural role for the maintenance of the pial basement membranes but also a signaling role in the fine coordination of neocortical and hippocampal development.

Zusammenfassung

Basalmembranen sind spezialisierte blattartige Strukturen der Extrazellulärmatrix, die essentiell für die Gewebekompartimentierung und Differenzierung während der Entwicklung sind. Ihre Hauptkomponenten sind Laminine, Collagen IV, Perlecan und Nidogene. Die Familie der Nidogene umfasst die beiden Mitglieder Nidogen-1 und -2, die die unabhängigen Laminin- und Collagen IV-Netzwerke in der Extrazellulärmatrix verknüpfen. Die normale Anlage von Basalmembranen in Geweben von *Nid1*^{-/-} und *Nid2*^{-/-} Mäusen deutet auf die funktionale Komplementarität beider Nidogene hin. Dies wird weiter unterstützt durch die perinatale Letalität von Mutanten, in denen beide Nidogen Gene inaktiviert sind (*Nid dKO*). Einige Gewebe der *Nid dKO* Mutanten besitzen allerdings noch Basalmembranen, was darauf hindeuten könnte, daß der Einfluß der Nidogen-Defizienz gewebespezifisch ist. Beispielsweise könnte das zentrale Nervensystem von Nidogen-1 defizienten Tieren betroffen sein, da mehrere *Nid1*^{-/-} Mäuse unter Anfällen leiden.

In dieser Arbeit sollten die Entwicklungs- und Verhaltensabnormalitäten in Nidogen-defizienten Maushirnen charakterisiert werden. Um die funktionelle Rolle von Nidogen-1 bzw. -2 in der Hirnentwicklung zu studieren, wurden verschiedene Nidogendefiziente Embryonen an den Tagen E12.5 und E15.5 untersucht. Der Beitrag der beiden Nidogene zur Lamininbindung und somit der Lamininablagerung in den mutierten Hirnen wurde über Unterschiede der Immunreaktivität verschiedener Laminine in endothelialen und pialen Basalmembranen analysiert. Das Übergewicht von Nidogen-2 in der endothelialen Basalmembran wurde über die verzögerte Lamininablagerung in embryonalen Hirnkapillaren von *Nid2*^{-/-} und *Nid1*^{+/-}*Nid2*^{-/-} Tieren während der Entwicklung aufgedeckt, jedoch hatte diese Verzögerung keine nachteiligen Auswirkungen auf die Funktion der Blut-Hirn Schranke in Nidogen-defizienten erwachsenen Tieren. Interessanterweise wurden Kapillaren auch ohne Basalmembranen in den *Nid dKO* Embryonen gebildet.

Über vergleichbare Versuche wurde abgeleitet, daß sowohl Nidogen-1 als auch -2 wichtig für piale Basalmembranen in der Cortexrinde sind. Sie werden für die Anheftung von Endfüßen der radialen Gliafasern und die nachfolgende Migration der Neurone

entlang des Neocortex benötigt. In *Nid dKO* Embryonen werden die pialen Basalmembranen nicht gebildet, daher können die Endfüsse nicht verankert werden und die radialen Gliafasern erscheinen unorganisiert. In den Nidogen-defizienten Mutanten (*Nid1^{-/-}*, *Nid2^{-/-}* und *Nid1^{+/-}Nid2^{-/-}*) blieb die piale Basalmembran erhalten, allerdings erschienen die Endfüsse der radialen Gliafasern nicht so geordnet wie die der *WT* Embryonen. Diese Unregelmässigkeiten in der Anordnung der Endfüsse korrelierten mit der verringerten Anzahl Reelin-exprimierender Cajal-Retzius Neurone in Nidogendefizienten Neocortices. Diese Neurone fehlten fast vollständig in *Nid dKO* Neocortices. Als weitere Abnormalitäten aufgrund der fehlenden pialen Basalmembran in *Nid dKO* cerebralen Cortices wurden ektopische proliferative Zellen und ein verringerter Pool an neuronalen Progenitorzellen beobachtet.

Nidogen-1-defiziente Mausmutanten (*Nid1^{-/-}* and *Nid1^{-/-}Nid2^{+/-}*) zeigen Verhaltensauffälligkeiten. Mit Hilfe der implantierten Elektroenzephalographie konnte dieses Verhalten allerdings nicht als spontane Epilepsie eingestuft werden. Unter den unterschiedlichen adulten Nidogen-defizienten Mäusen, die mittels Kainatinjektionen getestet wurden, reagierten die *Nid1^{-/-}Nid2^{+/-}* Tiere am sensitivsten auf die Anfallinduktion. Deren höhere Anfallsempfindlichkeit beruht auf der signifikant geringeren Anzahl an Parvalbumin-immunreaktiver Interneurone in den Hippocampi nach kainat-induzierten Anfällen.

Zusammenfassend wurde gezeigt, daß Basalmembranen essentiell für die Gehirnentwicklung sind. Man vermutet, daß Nidogene nicht nur eine strukturelle Rolle für die Erhaltung der pialen Basalmembranen spielen, sondern auch in Signalwegen bei der empfindlichen Koordination der Neocortex- und Hippocampusentwicklung involviert sind.