

Zusammenfassung

Nidogen 1 und 2 wird eine Schlüsselfunktion bei der Assemblierung der Basalmembran zugesprochen, sie verknüpfen hierbei das Kollagen IV Netzwerk mit dem Laminin Netzwerk. Bisher ist man davon ausgegangen, dass die Bindungsstellen der Nidogene auf den kurzen Armen der Laminin $\gamma 1$ und $\gamma 3$ Kette lokalisiert sind. Neuere genetische Studien mit Mäusen stellen das klassische Basalmembranmodell jedoch in Frage und weisen auf die Existenz von alternativen Bindungspartnern für die Nidogene hin.

In Haut-organotypischen Kulturen mit Nidogen defizienten Fibroblasten konnten unterschiedliche Bindungseigenschaften der Nidogene und ihrer Domänen identifiziert werden. Nidogen 1 benötigt sowohl seine G2 als auch seine G3 Domäne, um eine Basalmembranbildung zu etablieren, während Nidogen 2 über die rod-G3 Domäne alleine denselben Effekt erreicht. Diese Arbeit liefert eine Erklärung für diesen Befund, da Nidogen 1 die Laminin $\gamma 1$ Kette über seine G3 Domäne und Kollagen IV über seine G2 Domäne binden muss, um die Verknüpfung dieser beiden Moleküle zu erreichen. Dies entspricht somit der klassisch postulierten Funktion der Nidogene. Im Gegensatz dazu kann die rod-G3 Domäne von Nidogen 2 jedoch simultan an die Laminin $\gamma 1$ Kette und Kollagen IV binden, um die beiden Basalmembran-Komponenten zu verknüpfen.

Weiterhin konnten die Laminin $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Ketten als neue Bindungspartner der Nidogene identifiziert werden. Bemerkenswerterweise zeigten dabei beide Laminin-Ketten eine stärkere Bindung an Nidogen 2. Durch Mutagenesestudien konnte die Bindestelle dabei auf ein einziges EGF Modul der $\alpha 4$ bzw. $\alpha 5$ Kette eingegrenzt werden, das analog zum EGF Modul der Laminin $\gamma 1$ und $\gamma 3$ Kette an die G3 Domäne der Nidogene bindet. Die Bindung wird dabei über konservierte Aminosäuren in einer essentiellen Schleifensequenz dieser EGF Module vermittelt. Sequenzvergleiche und Homologiemodelling der Nidogenbindedomänen der $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Kette weisen dabei auf ein konserviertes Nidogenbindeepitop in diesen EGF Modulen hin. Die *in vivo* Relevanz dieser Bindung konnte in Konkurrenzexperimenten auf Gewebeschnitten verifiziert werden. Durch Zugabe von rekombinanten Laminin $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\gamma 1$ Fragmenten konnten die Nidogene aus der extrazellulären Matrix von Hautgewebe herausgelöst werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu einem verbesserten Modell der Basalmembran, mit dem Beobachtungen in verschiedenen KO Mausmodellen zu erklären sind.

Abstract

Nidogen-1 and -2 are considered to fulfill a key function in the assembly of the basement membrane by connecting the collagen IV network with the laminin network. It has been assumed that the nidogen binding sites are localized on the short arms of the laminin $\gamma 1$ and $\gamma 3$ chain. However, recent genetic mouse models challenge this established basement membrane model and suggest the existence of alternative nidogen binding partners.

Previously, it was shown in skin-organotypic cocultures, that nidogens exert their effect on basement membrane assembly through different binding domains. While for nidogen-1 both the G2 and G3 domain are needed to establish a basement membrane, the rod-G3 domain of nidogen-2 alone sufficed to achieve the same effect. This thesis provides an explanation for these findings. Nidogen-1 needs the G3 domain to interact with the laminin $\gamma 1$ chain and the G2 domain to interact with collagen IV to connect the two molecules. This reflects the established mode of (inter)action of the nidogens. However, in contrast, the rod-G3 domain of nidogen-2 is able to bind simultaneously to both the laminin $\gamma 1$ chain and collagen IV and thereby link the two basement membrane components.

Furthermore the laminin $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chain could be identified as new nidogen binding partners. Interestingly, both laminin chains showed stronger binding to nidogen-2. Through site-directed mutagenesis the binding site could be narrowed down to a single EGF module on the laminin $\alpha 4$ and the $\alpha 5$ chain respectively, which bind to the G3 domain of the nidogens. Intriguingly, these EGF modules show homology to the EGF modules of the laminin $\gamma 1$ and $\gamma 3$ chain, which also bind to the G3 domain of the nidogens. Sequence alignments and homology modeling of the nidogen binding modules in the $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains indicate the existence of a conserved nidogen binding site within these EGF modules. The *in vivo* relevance of the interactions could be verified in competition experiments with tissue sections. Here the addition of recombinant laminin $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\gamma 1$ fragments resulted in the extraction of nidogens from the extracellular matrix of mouse skin tissue. In summary, this thesis proposes an improved model of the basement membrane, which might provide explanations for recent observations in KO mouse models.