

**Das Nidogen-2 Gen der Maus:
Genstruktur und
Funktionsanalyse**

Dissertation der Fakultät Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

**vorgelegt von
Diplombiologe Jürgen Schymeinsky
aus München**

Martinsried 2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 24.01.2002

- 1. Gutachter: Prof. MacWilliams
- 2. Gutachter Prof. Schartau

Tag der mündlichen Prüfung am: 24.07.2002

Prüfungsausschuß:

- | | |
|------------------------------|-------------------|
| Vorsitzender | Prof. MacWilliams |
| 1. Prüfer: | Prof. Schartau |
| 2. Prüfer: | Prof. David |
| 3. Prüfer (Protokollführer): | Prof. Koop |

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde von April 1998 bis Januar 2002 in der Abteilung Proteinchemie des Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter der Anleitung von Herrn Dr. B. L. Bader durchgeführt.

Danksagung:

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Kollegen der Abteilung Proteinchemie für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gebührt jedoch denjenigen Personen, die mit Servicetätigkeiten, fachlichen Anleitungen oder der Bereitstellung von biologischen Materialien zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Dr. William Skarnes für die Bereitstellung der Nid2 Maus

Dr. Ernst Pöschl für die Bereitstellung der Nidogen-2 Genomklone

Dr. David Beier für die Durchführung der chromosomalen Lokalisation

Dr. Nicolai Miosge für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen

Herrn Marius Boicu für die DNA-Sequenzierungen

Frau Vera van Delden und Frau Hildegard „Mischa“ Reiter für die Durchführung des RIA

Ein herzliches Dankeschön richtet sich vor allem an meine ehemaligen Laborkollegen Stefan Benkert, Dr. Markus Keller, Uschi Kuhn, Gerlinde Kulbe, Matti Pöckl, Dr. Sabine Nedbal, Monika Saatze und Viola Westerbarkey für das angenehme Arbeiten an der Laborbank, ihre praktische und moralische Unterstützung und inspirativen Diskussionen.

Mein Dank für die reibungslose Kooperation mit der Ludwig-Maximilians Universität München richtet sich an Prof. Dr. Harry MacWilliams.

Für die hervorragenden Korrekturarbeiten des Manuskripts bin ich ganz besonders Dr. Bernhard L. Bader dankbar, der mir in den intensiven Besprechungen der einzelnen Abschnitte beigebracht hat, wie eine naturwissenschaftliche Dissertation geschrieben werden muss.

Schließlich möchte ich mich bei Dr. Rupert Timpl in dessen Abteilung ich die Arbeit anfertigen konnte für seine Unterstützung während meiner Doktorandenzeit bedanken.

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	zweifach geladenes Kalziumion
CD	Cluster of Differentiation
DEPC	Diethylpyrocarbamit
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EM	Elektronenmikroskopie
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
GAG	Glykosaminoglycan
GT	Genfalle
GST	Sekretorische Genfalle
h	Stunde
hnRNA	heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kDa	Kilodalton
LacZ	β-Galaktosidase
LDL	Lipoprotein mit geringer Dichte
LE	EGF-ähnliches Modul in Laminin
neo	Neomycin

Nid1	Nidogen-1
Nid2	Nidogen-2
Nid2 -	mutiertes Nidogen-2 Allel
Nid2 +	WT Nidogen-2 Allel
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
RHP	Radiation Hybrid Panel
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
TM	Transmembranregion
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
TY	Thyroglobulin
U	Einheiten
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die Basalmembran.....	1
1.2	Der molekulare Aufbau der BM.....	2
1.2.1	Das Kollagen IV.....	3
1.2.2	Die Familie der Laminine.....	5
1.2.3	Nidogen-1 / Entactin-1.....	6
1.2.3.1	Das Glykoprotein Nidogen hat einen modularen Aufbau.....	6
1.2.3.2	Nidogen ist sehr sensitiv gegenüber proteolytischen Abbau.....	8
1.2.3.3	Nidogen-Expression und Lokalisation.....	9
1.2.3.4	Nidogen hat eine zentrale Rolle in der Organisation der BM.....	9
1.2.4	Die Proteoglykane (PG).....	11
1.2.5	Die Proteinfamilie der Fibuline.....	12
1.3	Zelloberflächenrezeptoren.....	12
1.3.1	Integrine.....	13
1.3.2	Dystroglycan.....	13
1.4	Genetische Funktionsanalyse von BM-Proteinen.....	14
1.5	Das murine und humane Nidogen-2 Gen.....	17
1.6	Ziel der Arbeit.....	20
2	ERGEBNISSE.....	21
2.1	Das Nidogen-2 Gen der Maus.....	21
2.1.1	Isolierung von Genomklonen für das Nidogen-2 Gen der Maus aus Genbibliotheken.....	21
2.1.2	Analyse der Genomklone.....	21
2.1.3	Klonierung und DNA-Sequenzierung der Genomklone.....	23
2.1.4	DNA-Sequenz und Genstrukturanalyse des murinen Nidogen-2 Gens.....	25
2.1.4.1	Sequenzierungsstrategie.....	25
2.1.4.2	Klonierung der Region zwischen Exon 17 und 18.....	27
2.1.4.3	Die DNA-Sequenz und Exon-Intron-Grenzen des murinen Nidogen-2 Gens.....	28
2.1.5	Analyse der Promotorregion des Nidogen-2 Gens.....	32
2.1.6	Bestimmung der Introngrößen.....	35
2.1.7	Vergleichende Darstellung der Genstrukturen des murinen Nidogen-1 und Nidogen-2, sowie des humanen Nidogen-2.....	36
2.1.8	Besonderheit des Exon 4 des murinen Nidogen-2-Gens.....	37
2.1.9	Die Analyse der Primärstruktur des murinen Nidogen-2 und der Bezug zur Genstruktur.....	41
2.1.10	Die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens.....	43
2.2	Die genetische Funktionsanalyse des murinen Nidogen-2 Gens.....	46
2.2.1	Genetische Ansätze.....	46
2.2.2	Mutagenisierungsmethode: Genfallen (Gene-trap) Strategie:.....	47
2.2.3	Charakterisierung einer transgenen Genfallen (gene trap)-Mauslinie mit der Mutation nid2 ^{GST(pGT1.8)011Ska}	50
2.2.4	Molekulare Charakterisierung der Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA.....	51
2.2.4.1	Lokalisierung der Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA im Nidogen-2 Gen der Maus durch Southern Blot-Analyse.....	53
2.2.4.2	Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA im mutanten Nid2-Allel: Klonierung und DNA-Sequenzanalyse.....	57
2.2.5	Genotypisierung der mutanten Nid2-Mauslinie.....	60
2.2.6	Genotyp-Verteilung und Fortpflanzungsfähigkeit der Nachkommen von Nid2 +/- Elterntieren.....	61

2.2.7	Expressionsanalysen des Nidogen-2 und Nidogen-1 Gens und anderer BM-Protein-Gene in normalen und mutanten Nid2-Mäusen	63
2.2.7.1	Northern Blot-Analyse	64
2.2.7.2	RT-PCR-Analysen.....	67
2.2.7.3	Western Blot-Analyse mit Proteineextrakten aus Nid2 -/- und WT Mäusen.....	69
2.2.7.4	Quantifizierung der Proteine Nidogen-1, -2 und Laminin γ 1 in Gewebeextrakten aus Nid2 +/-, -/- und WT Mäusen durch einen Radioimmunitest	70
2.2.8	Analysen des Phänotyps der Nid2 -/- Maus	73
2.2.8.1	Allgemeine Beobachtungen und Untersuchung des Körpergewichts und der Körpergewichtszunahme	73
2.2.8.2	Analysen von Nid2 -/- defizienten Geweben	74
2.2.8.2.1	Histologische Untersuchung einzelner Organe von Nid2 -/- Mäusen.....	75
2.2.8.2.2	Analysen der Expression und Lokalisation von BM-Proteinen in Geweben durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	78
2.2.8.2.3	Ultrastrukturelle Analysen.....	82
3	DISKUSSION.....	83
3.1	Das Nidogen-2 Gen der Maus	83
3.1.1	Genlocus und Gensequenz	83
3.1.2	Die Promotorregion des murinen Nidogen-2 Gens	84
3.1.3	Der modulare Aufbau des Nidogen-2 Gens	86
3.1.4	Das Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens	87
3.1.5	Die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens.....	88
3.2	Die genetische Funktionsanalyse des murinen Nidogen-2 Gens.....	89
3.2.1	Die Nidogen-2 Genfallenmaus	90
3.2.2	Expressionsanalysen des Nidogen-2 Gens und anderer BM-Protein-Gene	91
3.2.3	Phänotypische Funktionsanalyse der Nid2 -/- Maus	94
4	ZUSAMMENFASSUNG	99
5	MATERIAL UND METHODEN	101
5.1	Material.....	101
5.1.1	Chemikalien, Kits und Enzyme	101
5.1.1.1	Chemikalien.....	101
5.1.1.2	Kits, Materialien:.....	101
5.1.1.3	Lösungen und Medien	102
5.1.1.4	Enzyme	103
5.1.1.5	Vektoren	103
5.1.1.6	Antikörper	103
5.1.1.7	Oligonukleotide	104
5.1.1.8	Mäuse und Bakterien.....	106
5.1.1.8.1	Mausstämme	106
5.1.1.8.2	Bakterien.....	107
5.1.1.9	Gen-Bibliotheken	107
5.1.1.10	Photomaterial, Computerprogramme	107
5.1.1.10.1	Photomaterial	107
5.1.1.10.2	Computerprogramme	108
5.2	Methoden.....	108
5.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	108
5.2.1.1	Präparation genomischer Maus DNA.....	108
5.2.1.2	Präparation von RNA aus Mausgewebe.....	109
5.2.1.3	Ligation von DNA-Fragmenten in Agarosegelen mit niedrigem Schmelzpunkt.....	109
5.2.1.4	Spezifischer Nachweis von DNA durch Southern Blotting	110
5.2.1.5	Spezifischer Nachweis von RNA durch Northern Blotting	110
5.2.1.6	Isolierung von rekombinanten λ -Phagen aus der Gen-Bibliothek	111

5.2.1.7	Polymerase Kettenreaktionen (PCR).....	112
5.2.1.7.1	Genotypisierung der Nid2- Mäuse.....	112
5.2.1.7.2	PCR zur Detektion des β -Galaktosidase Gens	113
5.2.1.7.3	PCR-DNA-Fragmente für die chromosomale Lokalisation	113
5.2.1.7.4	Weitere PCR-Reaktionen.....	114
5.2.1.8	Reverse Transkriptase-PCR	114
5.2.1.9	Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten.....	114
5.2.1.10	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	115
5.2.2	Proteinchemische Methoden	115
5.2.2.1	Herstellung von Gewebe Gewebeextrakten	115
5.2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Transfer	115
5.2.2.3	Immunblotting.....	116
5.2.2.4	Radioaktive Markierung rekombinanter Proteine	116
5.2.2.5	Radioimmunitest (RIA)	117
5.2.3	Histologie	117
5.2.3.1	Fixierung und Einbetten der Gewebe	117
5.2.3.2	Anfertigung histologischer Schnitte	117
5.2.3.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E)	118
5.2.3.4	Immun-Fluoreszenz-Mikroskopie	118
5.2.3.5	Elektronenmikroskopie	118
6	LITERATURVERZEICHNIS	119
7	ANHANG	133
7.1	DNA-Sequenzierungsstrategie für das murine Nidogen-2 Gen.....	133
7.2	cDNA-Sequenz des EST3.1-Klons	138
7.3	DNA-Sequenzunterschiede zwischen der murinen Nidogen-2 Gensequenz und den bekannten Nidogen-2 cDNA-Sequenzen.....	139
7.4	Intronsequenzen des murinen Nidogen-2 Gens	142
8	LEBENS LAUF.....	147

1 Einleitung

Als extrazelluläre Matrix (ECM) wird die Grundsubstanz bezeichnet, in die tierische Zellen eingebettet sind. Hauptsächlich besteht sie aus Proteinen, die von einem wasserreichen Gel aus Polysacchariden und Proteoglykanen umschlossen werden. Sie wird von den umliegenden Zellen sekretiert und geformt. Je nach Art des Gewebes wird die ECM aus unterschiedlichen Komponenten gebildet und kann so verschiedene biologische und auch strukturelle Funktionen übernehmen. Eine Kalzifizierung der Matrix führt beispielsweise zu sehr harten Strukturen wie Knochen oder Zähne. Sie kann zugfeste, seilartige Strukturen bilden (Sehnen), in amorpher Form auftreten (Knorpel), vollständig durchsichtig sein (Kornea), ein fibrilläres Netzwerk bilden (Bindegewebe) oder als eine dünne, dichte, mattenartige Struktur auftreten, die als Basalmembran (BM) bezeichnet wird.

1.1 Die Basalmembran

BM bilden als dünne, mattenartige Suprastruktur aus Matrixmolekülen die Grenzfläche zwischen Epithelien, bzw. Endothelien und dem Bindegewebe. Sie umgeben weiterhin Muskel-, Schwannsche- und Fettzellen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind BM als schichtartige Strukturen mit einer Dicke von ca. 50-100 nm erkennbar (Abb. 1-1).

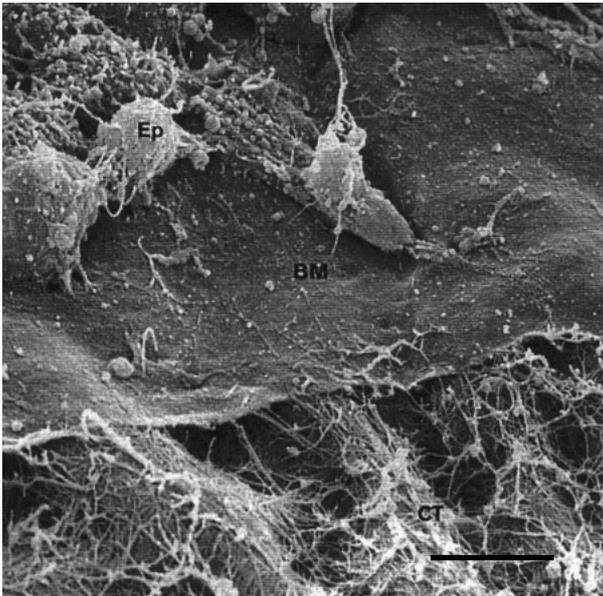


Abb. 1-1 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Basalmembran

in der Hornhaut eines Hühnerembryos. Die Epithelzellen (Ep) stehen im Kontakt mit der Oberfläche der dünnen, mattenartigen BM. Sie trennt das Epithel von darunter liegenden Zellen und dem Bindegewebe (CT). Der schwarze Balken entspricht 10 μ m (Aufnahme aus Alberts *et al.*, 1994; S.990).

Die BM hat wichtige Funktionen in der Kompartimentierung und Erhaltung von Zellphänotypen. BM besitzen mechanische Stabilität und bilden daher eine physikalische Grundlage für die Strukturen, die ihnen aufgelagert sind. Sie ist in diesem Zusammenhang für die Polarisierung der Epithelien von besonderer Bedeutung und liefert morphologische Stimuli für Gewebebildung, -erhaltung und -umstrukturierung. In diesem Zusammenhang ist ihre Fähigkeit diffundierende Substanzen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, zu speichern von besonderer Bedeutung. Weiterhin besitzt sie organisierende und unterstützende Funktionen für wandernde Zellen und Axone. Im allgemeinen stellt sie eine Barriere für Zellen außer Makrophagen, Lymphozyten und metastasierende Tumorzellen dar. In der Niere hat eine ungewöhnlich dicke BM eine Filterfunktion und verhindert das Übertreten von Makromolekülen aus dem Blut in den entstehenden Urin. Hier scheint zusätzlich die hohe negative Ladung der BM beim Filterprozess eine Rolle zu spielen (Lindblom & Paulsson, 1996; Aumailley & Gayraud, 1998).

1.2 Der molekulare Aufbau der BM

Mehr als 20 Gene, die für BM-Komponenten kodieren, sind bisher identifiziert und charakterisiert worden (Timpl & Brown, 1996; Erickson & Couchman, 2000). Die meisten BM-Proteine haben eine Größe von 100-500 kDa mit komplexer, modularer Struktur und sind oft glykosyliert. Sie werden von Endothel-, Epithel- und Mesenchymzellen produziert und sezerniert. Erst im extrazellulären Raum bildet sich die BM durch Verknüpfung der Komponenten zu Netzwerken (Thomas & Dziadek, 1993). Die Zusammensetzung verschiedener BM kann sehr unterschiedlich sein. In allen BM kommen jedoch die Komponenten Laminin, Nidogen, Kollagen IV und Perlecan vor. Laminin (siehe 1.2.2) und Kollagen IV (siehe 1.2.1) treten in verschiedenen Isoformen auf und polymerisieren beide selbständig zu großen Netzwerken. Die beiden Netzwerke werden durch Wechselwirkungen mit den Proteinen Nidogen, Perlecan und Fibulin miteinander verbunden und stabilisiert (Fox *et al.*, 1991; Timpl & Brown, 1996). Im Allgemeinen besitzen die meisten Komponenten der BM die Fähigkeit sich zu einer Überstruktur (Suprastruktur) zu formieren und andererseits Zellen zu organisieren. Wobei erstere Fähigkeit wohl zur letzteren führt (Yurchenco & O'Rear, 1994). Einer Übersicht einiger Wechselwirkungen die zum Aufbau der BM führen ist in Abb. 1-2 dargestellt.

Viele andere Proteine der BM, bzw. der ECM und deren Wechselwirkungen können hier im Detail nicht dargestellt werden. Hierzu zählen beispielsweise das Fibronectin (Schwarzbauer & Sechler, 1999), die Tenascine (Jones & Jones, 2000), das Fibrillin (Handford, 2000), das Elastin (Tatham & Shewry, 2000) und das BM-40/SPARC/ Osteonectin (Lane & Sage, 1994; Brekken & Sage, 2000), welche teilweise einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Struktur und Verknüpfung der BM mit der umliegenden ECM, oder den anliegenden Zellen, haben.

Im folgenden gehe ich auf die häufigsten Proteine der BM ein, beginnend mit dem Kollagen IV aus der Superfamilie der Kollagene (Brown & Timpl, 1995; Ricard-Blum *et al.*, 2000)

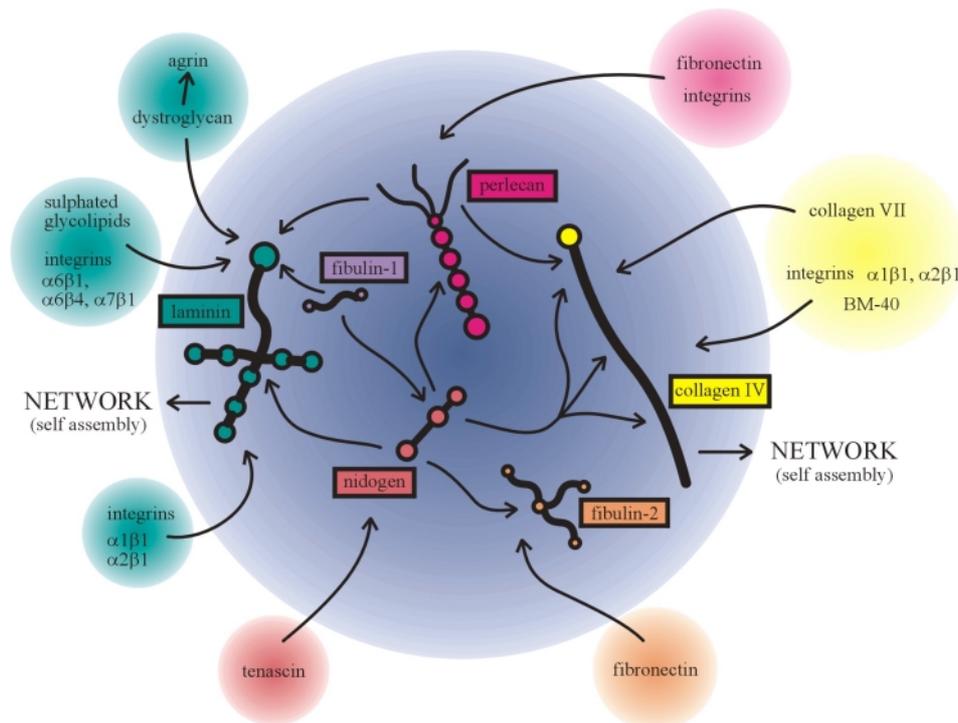


Abb. 1-2 Schematische Darstellung molekularer Wechselwirkungen,

die für die molekulare Architektur der BM sowie die Integration anderer Liganden entscheidend sein können (nach Timpl & Brown 1996).

1.2.1 Das Kollagen IV

Kollagen kann aus dem griechischen Wort für „Leim erzeugen“ abgeleitet werden. Charakteristisch für Kollagene ist, dass sich drei Polypeptidketten, mit mehrfachen Gly-X-Y Wiederholungen, zu einer Dreifachhelix (Tripelhelix) zusammenfügen (Brown & Timpl, 1995). Bei Säugetieren ist es das häufigste Protein und macht ca. $\frac{1}{4}$ des Gesamtproteingewichts aus. Die Familie der Kollagene lässt sich in verschiedene Gruppen einteilen, z.B. bilden manche längliche, fibrilläre Strukturen (Typen I, II, III, V und XI). Es gibt aber auch Kollagene, wie z.B. das Kollagen IV, die keine fibrilläre Struktur bilden und die wiederum in verschiedene Unterklassen aufgeteilt werden. Das Kollagen IV als Hauptbestandteil der BM, polymerisiert zu einem Netzwerk.

Kollagen IV ist ein Heterotrimer, welches meistens aus zwei Kollagen $\alpha 1(\text{IV})$ -Ketten und einer Kollagen $\alpha 2(\text{IV})$ -Kette aufgebaut ist. Jede dieser Ketten hat eine Größe von ~ 180 kDa. (Timpl & Brown, 1996). Die Kollagen $\alpha(\text{IV})$ -Ketten treten als verschiedene Isoformen auf.

Die bisher charakterisierten Kollagen $\alpha 1(\text{IV})$ – $\alpha 6(\text{IV})$ -Ketten zeigen teilweise eine gewebespezifische Expression. Die Ketten werden nach der Sekretion nicht proteolytisch gespalten, sondern behalten Regionen, die keine Dreifachhelix bilden. Jede der Kollagen $\alpha(\text{IV})$ -Ketten ist aus drei unterschiedlichen Domänen aufgebaut:

- 1) Eine 7S-Domäne, welche aus einem N-terminalen, nicht-helikalen Bereich mit einer anschließenden helikalen Region gebildet wird.
- 2) Eine 360nm lange dreifach-helikale Domäne.
- 3) Eine C-terminale globuläre Domäne, welche auch als NC1-Domäne bezeichnet wird (Timpl *et al.*, 1981).

Die helikale Region beinhaltet 20-25 Unterbrechungen der, für die Superfamilie der Kollagene üblichen, Gly-X-Y Wiederholungen, was zu Unregelmäßigkeiten der später, gebildeten dreifach Helix führt. Durch diese Unregelmäßigkeiten besitzt Kollagen IV eine relativ flexible Struktur. Die einzelnen Kollagen $\alpha(\text{IV})$ -Ketten interagieren nach ihrer Translation zuerst über ihre C-terminalen, globulären NC1-Regionen. Diese Verknüpfungen werden durch intermolekulare Disulfidbrücken verstärkt. Die Dreifachhelix wird gerichtet vom C- zum N-terminalen Ende aufgebaut.

Die Kombination verschiedener Wechselwirkungen führt zum Aufbau eines unregelmäßigen Kollagen IV-Netzwerkes (Abb. 1-3). Vier Kollagen IV-Moleküle binden an ihren 7S-Domänen und bilden spinnenförmige Strukturen (Kühn *et al.*, 1981). Jeweils zwei Moleküle können über ihre NC1-Domänen interagieren (Timpl *et al.*, 1981). Der bisher beschriebene Aufbau wird durch intermolekulare Disulfidbrücken und Lysinverknüpfungen stabilisiert (Abb. 1-3; Weber *et al.*, 1988; Siebold *et al.*, 1988). Dieses Netzwerk scheint für die mechanische Stabilität der BM verantwortlich zu sein (Kühn, 1994).

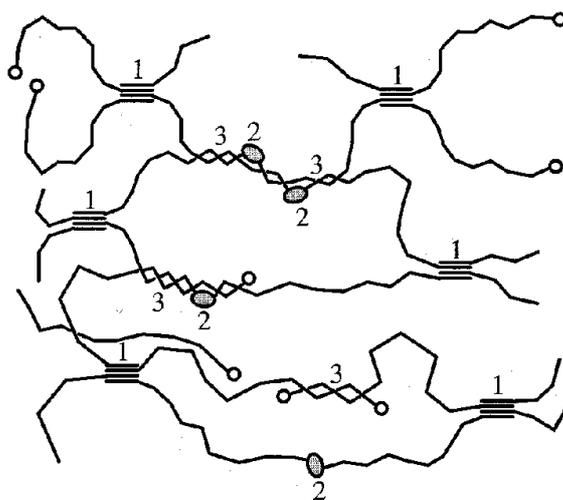


Abb. 1-3 **Das Kollagen IV-Netzwerk**

assembliert, selbständig durch verschiedene Wechselwirkungen. Die N-terminalen 7S-Segmente bilden Tetramere (1). Die C-terminalen NC1-Domänen bilden Dimere (2). Die Struktur wird durch intermolekulare Disulfidbrücken und Lysinverknüpfungen verstärkt (3). (Abb. nach Timpl & Brown, 1996)

1.2.2 Die Familie der Laminine

Laminine sind Heterotrimere aus einer α -, einer β - und einer γ -Kette, welche miteinander zu einer meistens kreuzförmigen Struktur assoziieren. Das Molekulargewicht der Heterotrimere schwankt von unter 500 kDa bis knapp 1.000 kDa. Bisher wurden fünf α -Ketten ($\alpha 1$ – $\alpha 5$), drei β -Ketten ($\beta 1$ – $\beta 3$) und drei γ -Ketten ($\gamma 1$ – $\gamma 3$) im Säugetier beschrieben, wobei mindestens drei Ketten ($\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\gamma 3$) in verschiedenen Spleissformen vorkommen. Von den 45 Kombinationsmöglichkeiten (ohne Spleissvarianten) zur Trimerbildung wurden jedoch erst 12 Isoformen mit gewebespezifischen Expressionsmuster gefunden (Engel, 1992; Timpl, 1996; Aumailly & Gayraud, 1998; Koch *et al.*, 1999; Colognato & Yurchenco, 2000).

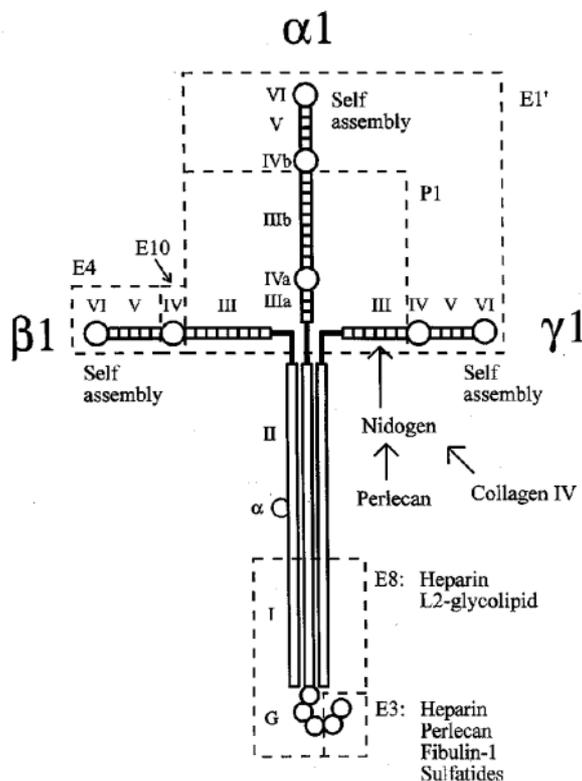


Abb. 1-4 Schematische Darstellung des Laminin-1 Heterotrimers.

Laminin-1 wird aus den Laminin $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Ketten aufgebaut. Einzelne Teilfragmente werden durch die Proteasen Elastase (E) und Pepsin (P) definiert.

Die C-terminalen kurzen Arme sind für die Polymerisierung zu einem Netzwerk verantwortlich. Von besonderer Bedeutung hierfür sind globuläre Regionen die als LN Module bezeichnet werden (Kreise in den E1, E4 und E10-Fragmenten). Die N-terminalen Regionen bilden eine dreifach Helix („coiled-coil“ Domäne). Weiterhin bildet die N-terminale Region der $\alpha 1$ -Kette fünf globuläre (LG) Module, die für vielfältige Bindungseigenschaften, z.B. mit Integrinen, verantwortlich sind (Kreise in E8 Fragment).

Besonders zu berücksichtigen ist hier die Nidogen-Bindungsstelle auf dem proteolytischen Fragment E1/P1. Nidogen bindet hier an ein EGF-ähnliches Modul: $\gamma 1$ III4 der $\gamma 1$ Kette (Pfeil von Nidogen).

Laminin-1 (Abb. 1-4), bestehend aus den Ketten $\alpha 1$ (ca. 400 kDa), $\beta 1$ und $\gamma 1$ (je ca. 300 kDa), war das erste identifizierte, sequenzierte und untersuchte Laminin (Timpl *et al.*, 1979; Engel *et al.*, 1981; Sasaki *et al.*, 1987, 1988). Es wird vorwiegend in der frühen Embryogenese exprimiert, wo es schon in der Blastozyste nachgewiesen werden kann (Dziadek & Timpl, 1985; Shim *et al.*, 1996). Die N-terminalen Enden der $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Kette bilden drei kurze Arme, welche für die reversible, Ca^{2+} -abhängige Polymerisierung verantwortlich sind (Paulsson, 1988; Timpl & Brown 1996). Der lange Arm wird durch die α -helikalen, C-terminalen Abschnitte der einzelnen Ketten gebildet, welche zu einer Dreifachhelix („coiled

coil“-Domäne) assoziieren. Diese Struktur wird durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen sowie intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Die selbstständige Polymerisierung zu einem regelmäßigen, hexagonalen Netzwerk erfolgt *in vitro* bei einer Konzentration von 70-140 nM. Die Polymerisationskonzentration *in vivo* wird sehr wahrscheinlich durch Wechselwirkungen mit membranständigen Rezeptoren herabgesetzt, z.B. durch α -Dystroglycan oder verschiedene Integrine (Cohen *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 1998). Die Polymerisation kann zusätzlich durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, z.B. durch Heparin, Glykosaminoglykane und anliegende Zellmembranen (Colognato & Yurchenco, 2000).

1.2.3 Nidogen-1 / Entactin-1

Die Isolierung des Glykoprotein Nidogen-1, bzw. Entactin-1 erfolgte aus dem Maus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor (Timpl *et al.*, 1983), bzw. aus einer BM-produzierenden Zelllinie (Carlin *et al.*, 1981). Durch komplette Sequenzierung beider Proteine konnte gezeigt werden, dass sie identisch sind (Durkin *et al.*, 1988, Mann *et al.*, 1989); trotzdem werden beide Namen weiterhin getrennt in der Literatur verwendet. Im folgenden wird der Name Nidogen gebraucht. Das murine (Durkin *et al.*, 1988; Mann *et al.*, 1989) und humane (Nagayoshi *et al.*, 1989) Nidogen-1 Gen konnte kloniert und sequenziert werden. Die Proteine haben eine Größe von 1245 (Maus), bzw. 1247 (Mensch) Aminosäuren und sind zu 85% identisch.

Die Genstrukturen und chromosomalen Lokalisationen des humanen und des murinen Nidogen-1 sind bekannt. Sie bestehen aus jeweils 20 Exons, die sich über mindestens 65 kb, im Fall des murinen (Durkin *et al.*, 1995), oder über mindestens 90 kb, im Fall des humanen (Zimmermann *et al.*, 1995) Nidogen-1 Gens, erstrecken. Das murine Nidogen-1 Gen liegt auf dem Chromosom 13, wo es sich in einer Kopplungsgruppe mit der *beige* Mutation befindet. Bei deren entsprechenden orthologen Mutation im Menschen handelt es sich um eine seltene, rezessive Erberkrankung (Jenkins *et al.*, 1993). Das humane Nidogen-1 wurde auf dem Chromosom 1 lokalisiert, wo sich jedoch keine weiteren Orthologien zu dem Maus Chromosom 13 finden lassen (Olsen *et al.*, 1989).

1.2.3.1 Das Glykoprotein Nidogen hat einen modularen Aufbau

Durch Ultrazentrifugation wurde ein Molekulargewicht des nativen Nidogen-1 von 148 kDa gemessen (Paulsson *et al.*, 1986), SDS-PAGE Analysen zeigen eine Größe von 141 kDa (im reduzierten) und 158 kDa (im nichtreduzierten) Zustand. Diese Daten in Verbindung mit elektronenmikroskopischen Experimenten zeigen, dass es sich bei Nidogen-1 um eine

einzelne Polypeptidkette handelt, die sich zu einer länglichen Struktur faltet (Mayer & Timpl, 1994). Es ist ein Glykoprotein mit einem Zuckeranteil von 5% (Carlin *et al.*, 1981). Der Glukosamin- und Galaktosamin-Anteil, lässt auf zwei *N*- und ca. sieben *O*-Glykosylierungsstellen schließen (Fujiwara *et al.*, 1993). Weiterhin findet eine *O*-Sulfatierung von ein bis zwei Tyrosinseitenketten statt (Paulsson *et al.*, 1985).

Durch elektronenmikroskopische Strukturanalysen mit rekombinanten Nidogen-1 konnte gezeigt werden, dass es aus drei globulären Domänen, G1-G3, aufgebaut ist, die von zwei gestreckten Domänen verbunden werden (Fox *et al.*, 1991; Abb. 1-5). Die gestreckte Verbindungsregion zwischen der G1- und der G2-Domäne zeigt eine gewisse Flexibilität, welche die Verbindungsregion zwischen der G2- und G3-Domäne nicht aufweist. Die Gesamtlänge des Proteins wurde in dieser Strukturanalyse auf 30 nm geschätzt. Weiterhin zeigt das Nidogen-Protein einen modularen Aufbau, mit sechs Modulen die eine Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und einem Modul das eine Ähnlichkeit mit Thyroglobulin (TY) zeigt (EGF-ähnliches Modul, bzw. TY-ähnliches Modul; Mann *et al.*, 1989; Mayer & Timpl, 1994). Ein weiteres Modul, welches Ähnlichkeit mit dem Rezeptor für Lipoproteine geringer Dichte (LDLR) zeigt, befindet sich am C-terminalen Ende des Nidogen-Proteins (für eine Übersicht der verschiedenen Module siehe Bork *et al.*, 1996). In dieser LDLR-ähnliche Region befinden sich sechs charakteristische YWTD-Wiederholungen (Springer, 1998).

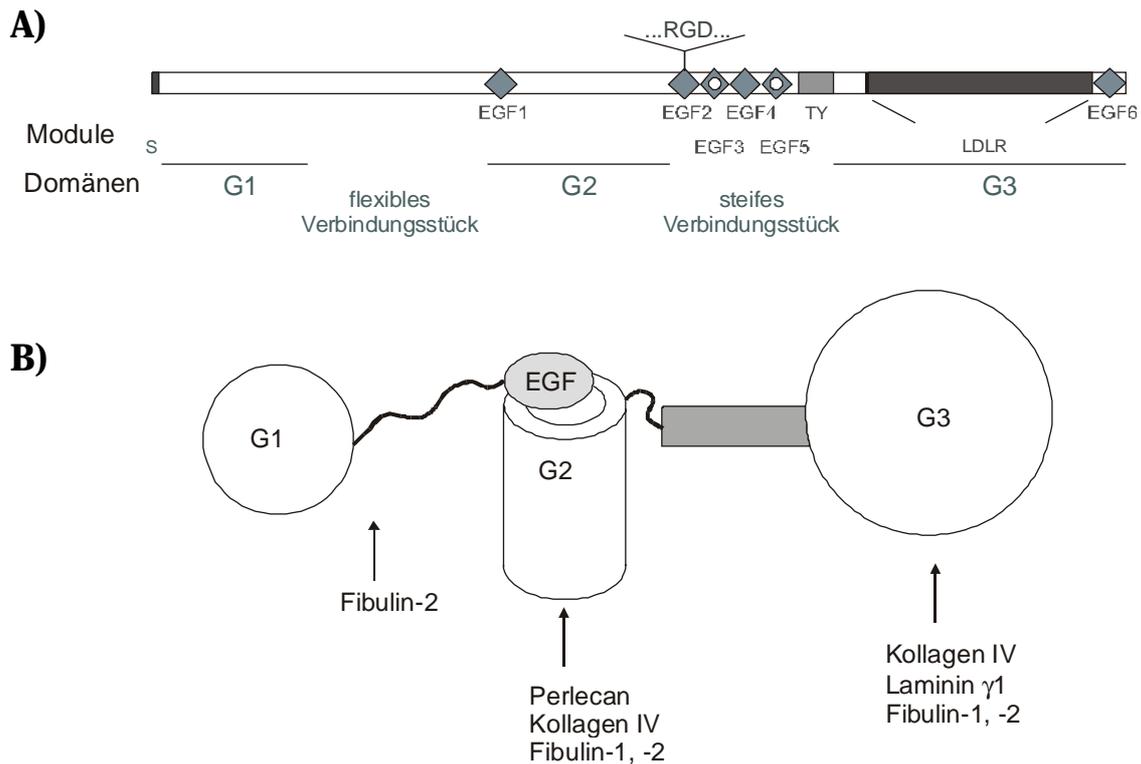


Abb. 1-5 Schematische Darstellung der Primärstruktur und der Bindungseigenschaften des Nidogen-1

A) Schematische Darstellung der Primärstruktur des Nidogen-1 und die Zuordnung der einzelnen Domänen und Module. Das Nidogen-1 ist aus drei globulären Domänen (G1-G3; durch waagrechte Striche markiert) aufgebaut (siehe auch B), die durch zwei stäbchenförmige Domänen (flexibles Verbindungsstück und steifes Verbindungsstück) miteinander verbunden werden. Diese Domänen können in Module unterteilt werden. Im Nidogen-1 befinden sich sechs EGF-ähnliche Module (EGF1-6, graue Rauten), von denen zwei eine Konsensus-Sequenz für Kalzium-Ionen (Ca^{2+})-Bindung tragen (helle Kreise), und ein Thyroglobulin-ähnliches Modul (TY, hellgraues Rechteck). Am C-terminalen Ende befindet sich weiterhin eine Lipoprotein-Rezeptor-ähnliche Region (LDLR; dunkelgraues Rechteck), an welche sich das EGF6- Modul anschliesst. Das EGF-Modul 2 trägt eine RGD-Konsensussequenz, welche für die Bindung mancher Integrine verantwortlich ist. Am N-terminalen Ende befindet sich eine Transport-Signalsequenz (S).

B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Nidogen-1. Die fassförmige G2-Domäne wird durch 11 β -Faltblätter gebildet, durch deren Hohlraum sich eine α -Helix zieht. Sie ist verantwortlich für die Bindung an Perlecan und Kollagen IV. Die G3 Domäne bildet einen sechsblättrigen β -Propeller. Sie bindet Perlecan, Kollagen IV und die Laminin γ 1 Kette. Über die Struktur und Funktion der G1 Region ist kaum etwas bekannt. (Abb. nach Liddington, 2001; Bindungsstellen nach Ries *et al.*, 2001).

1.2.3.2 Nidogen ist sehr sensitiv gegenüber proteolytischen Abbau

Isoliertes und rekombinantes Nidogen-1 zeigt eine starke Sensitivität gegenüber Proteasen. In der flexiblen Verbindung zwischen den globulären Domänen (G1-G3) konnten mehrere Protease-Schnittstellen lokalisiert werden, z.B. für Matrilysin, Thrombin, Plasmin und Stromelysin (Mayer *et al.*, 1993a). Bei Proteinextraktionen treten hauptsächlich zwei große Teilfragmente (130kDa und 100kDa) auf, die durch unbekannte endogene Proteasen generiert werden. Diese Proteolyse kann nur partiell durch Proteaseinhibitoren und stark denaturierenden Lösungsmittel verhindert werden. Diese endogenen Proteasen könnten daher einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität des Nidogen-1 haben. So kann

z.B. durch immunhistologische Untersuchungen maligner Melanome während ihrer Invasion der Haut, ein schneller Verlust der Nidogenepitope im Gegensatz zu den Lamininepitopen gezeigt werden (Schmoekel *et al.*, 1989). Das Nidogen-1 Protein wird jedoch durch seine Bindung an Laminin stabilisiert. Beweise hierfür lieferten *in vitro* Experimenten, in welchen gezeigt werden konnte, dass nach einer Bindung von rekombinanten Nidogen-1 mit Laminin-1, die Spaltung des Nidogen-1 durch Thrombin verhindert und die Aktivität anderer Proteasen in der G3-Domäne herabgesetzt wurden (Mayer & Timpl, 1994).

1.2.3.3 Nidogen-Expression und Lokalisation

Die Nidogenproduktion findet hauptsächlich in mesenchymalen Gewebe statt (Eckblom *et al.*, 1994). Das Protein kann bereits früh in der Mausentwicklung im kompaktierten 8-16 Zellstadium nachgewiesen werden, d.h. kurz nach dem Einsetzen der Laminin-Expression und bevor die erste BM gebildet wird (Dziadek & Timpl, 1985; Dziadek, 1995). Später findet sich das Protein in allen BM die neu gebildet werden und in einigen anderen Gewebekompartimenten (Wu *et al.*, 1983; Dziadek & Timpl, 1985). Während der Embryonalentwicklung kann Nidogen-1 aus unterschiedlichen Geweben als die BM-Proteine Laminin und Kollagen IV sekretiert werden, was eine Kooperation verschiedener Zelltypen bei der Bildung der BM notwendig macht (Mayer & Timpl, 1994).

1.2.3.4 Nidogen hat eine zentrale Rolle in der Organisation der BM

Da sowohl Kollagen IV, als auch Laminin-1, selbständig zu Netzwerken polymerisieren und Nidogen beide Strukturproteine binden kann, wurde dem Nidogen eine wichtige Rolle in der Verknüpfung der beiden Netzwerke zugesprochen. Biochemische Studien zeigen, dass Nidogen mit Laminin einen stabilen, nicht-kovalenten Komplex bildet (Dziadek & Timpl, 1985). Diese Bindung zeigt ein stöchiometrisches 1:1 Verhältnis in der embryonalen Matrix und im EHS Tumor (Dziadek & Timpl, 1985), und einen Überschuss an Nidogen in der BM adulter Tiere (Mohan & Spiro, 1986). Mit einer Dissoziationskonstante (K_d) von $\sim 0,5$ nM hat die Wechselwirkung der beiden Proteine eine sehr hohen Affinität (Fox *et al.*, 1991). Das Nidogen-Epitop auf der Laminin $\gamma 1$ -Kette konnte auf ein einzelnes EGF-ähnliches Modul (LE) eingegrenzt werden: LE $\gamma 1$ III4 (Abb. 1-4; Gerl *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1993 b). Dieses Epitop der Laminin $\gamma 1$ -Kette ist in Mensch und *Drosophila melanogaster* konserviert (Mayer & Timpl, 1994). Ausgehend von der Strukturbestimmung des LE-Moduls konnte durch gerichtete Punktmutationen drei Aminosäuren identifiziert werden, die für die Bindung essentiell sind (Stetefeld *et al.*, 1996). Durch Bindungsstudien mit rekombinanten Nidogen

konnte die G3 Domäne als Bindungsstelle für die Laminin γ 1-Kette identifiziert werden (Abb. 1-5 B). Das sechste EGF-ähnliche Modul ist hier wichtig für die Bindung, da eine rekombinante Nidogen-Form bei der dieses EGF-Modul fehlt, eine 30-fache Reduktion der Bindungsstärke zeigt (Fox *et al.*, 1991). Ob jedoch nur der C-terminale Teil der G3-Domäne für die Laminin Bindung verantwortlich ist, muss überprüft werden (Mayer *et al.*, 1998).

Die Nidogen-Epitope des Kollagen IV konnte mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen des Nidogen-Kollagen IV-Komplexes identifiziert werden. Ein Epitop konnte auf der tripelhelikalen Region, ungefähr 80 nm entfernt von der C-terminalen NC1-Domäne, identifiziert werden. Ein weiteres, schwächeres Epitop befindet sich in einer Entfernung von ca. 200nm (Aumailly *et al.*, 1989). Auf der anderen Seite wurde als Kollagen IV-Epitop des Nidogen-1 die G2-Domäne verantwortlich gemacht (Reinhardt *et al.*, 1993). Die G3-Domäne allein, aber auch mit dem Verbindungsstück, zeigt auch eine Bindung mit Kollagen IV, welche jedoch wesentlich schwächer als die Laminin Bindung ist (Mayer & Timpl, 1994). Durch die räumliche Trennung der Laminin und der Kollagen IV Bindungsstelle ist es somit für Nidogen möglich Dreifach-Komplexe zu bilden (Fox *et al.*, 1991; Aumailley *et al.*, 1993).

Die Summe der *in vitro*-Analysen führte zu einem Modell, in welchem Nidogen eine zentrale Rolle in der Organisation der BM einnimmt (Abb. 1-2). Das Hauptargument hierfür war die Fähigkeit des Nidogens Dreifachkomplexe mit Laminin und Kollagen IV, bzw. Perlecan (Mayer *et al.*, 1995) zu bilden. Dieses vereinfachte Bild wird jedoch der Komplexität der vielfältigen, zusätzlichen Bindungsmöglichkeiten, z.B. mit den Fibulinen (siehe 1.2.5), des Nidogens nicht gerecht (Mayer & Timpl, 1994). Durch *in vivo* Analysen müssen diese Funktionen überprüft werden.

Erste Experimente zur Analyse der biologischen Relevanz der Nidogen-Laminin Wechselwirkung waren zu Beginn dieser Doktorarbeit bekannt. In Organkulturen konnte die Interaktion von Nidogen mit Laminin durch einen spezifischen Antikörper gegen das LE-Epitop verhindert werden. Es traten fehlerhafte Verzweigungen in den Alveolengängen der Lungenanlagen, sowie der Nieren- und Speicheldrüsenkanälchen auf (Eckblom *et al.*, 1994; Kadoya *et al.*, 1997). Dieses Experiment zeigt weiterhin, dass die Nidogen-Laminin Wechselwirkung erst im extrazellulären Bereich stattfindet, da der AK nur dort Aktivität zeigen kann.

Experimente mit mutierten embryonalen Stammzellen-(ES)-Zellen, denen die Gensequenz für das Nidogen-Bindungsepitop der Laminin γ 1-Kette, das LE γ III4-Modul, gezielt entfernt wurde, zeigen ein Laminin-Expressionsmuster, dass der Wildtyp-Form entspricht. Weiterhin ist die Lamininstruktur in EM-Aufnahmen nicht von der WT Form zu unterscheiden. Die

Fähigkeit Nidogen zu binden hat das mutierte Laminin-1 Trimer jedoch verloren (Pöschl *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998). Homozygot mutante ES-Zellen, die nur die mutierte Laminin $\gamma 1$ Kette exprimieren, zeigen keine Unterschiede in der Differenzierung im Vergleich zu WT-ES Zellen. Es bleibt interessant abzuwarten, welche Aufschlüsse über die *in vivo*-Funktion der Nidogen-Bindungsstelle in der Laminin $\gamma 1$ -Kette eine, aus diesen ES-Zellen hergestellte, transgene Maus geben kann (Mayer *et al.*, 1998).

1.2.4 Die Proteoglykane (PG)

Als Proteoglykane (PG) werden Proteine bezeichnet, an deren Peptidteil eine oder mehrere Glykosaminykan (GAG)–Seitenketten, an spezifischen Serinseitenketten, kovalent gebunden sind. GAG sind unverzweigte Polysaccharidketten, die alternierend aus Uronsäure und Hexosamin-Molekülen aufgebaut sind. Eine Untergruppe der Proteoglykane wird als BM-Proteoglykane bezeichnet und enthält inzwischen fünf Mitglieder: Perlecan, Agrin, Leprecan, Bamacan und Kollagen XVIII (Iozzo, 1998; Erickson & Couchman, 2000). Letzteres PG ist von besonderem Interesse aufgrund eines 22 kDa-Peptids in seiner C-terminalen Region, welches die Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) hemmt und als Endostatin bezeichnet wird (O'Reilly *et al.*, 1997).

Das häufigste PG ist das Perlecan. Es wurde ursprünglich aus dem Maus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumor, der große Mengen der BM-Proteine produziert, isoliert (Paulsson *et al.*, 1987). Es besteht aus einem 80 nm langen Kernprotein (ca. 400 kDa). Dieses ist aus sechs globulären Regionen, die mit stäbchenförmigen Regionen alternieren, aufgebaut. Drei GAG-Ketten sind kovalent mit dem N-Terminus verknüpft (Abb. 1-6; Iozzo, 1998).

Während der Embryogenese der Maus ist Perlecan bereits im 2-Zellstadium nachweisbar und kann in der fortschreitenden Entwicklung vor allem in Blutgefäßwänden, sich entwickelnden Herzen wie auch Skelettmuskel detektiert werden. Ein signifikanter Anstieg des Expressionsniveaus findet schließlich in der Organogenese von Leber, Lunge, Niere, Milz, dem Gastrointestinaltrakt wie auch Knorpel statt (Handler *et al.*, 1997). Perlecan besitzt aufgrund seiner frühen Expression, der Proteinstruktur und der Gewebelokalisierung eine besondere Bedeutung in der Embryogenese. Hier ist die Fähigkeit des Perlecans Wachstumsfaktoren, z.B. FGF-2 und TGF- β , zu binden und zu sammeln von besonderer Bedeutung (Iozzo, 1998). Weiterhin besitzt das Perlecan eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum und die Beweglichkeit von Tumorzellen, sowie die Permeabilität von BM in den Nierenglomerulie (Iozzo, 1998). Diese Hinweise auf die Wichtigkeit des Perlecans während der

Embryonalentwicklung und in verschiedenen physiologischen Prozessen, machen die *in vivo*-Analyse einer Perlecan-defizienten Mauslinie sehr interessant.



Abb. 1-6 Skizze des Perlecan Moleküls. Es ist aus sechs globulären Domänen aufgebaut die, ähnlich wie eine Perlenkette angeordnet sind (daher auch der Name). Drei GAG-Ketten sind kovalent mit dem N-terminalen Abschnitt verbunden.

1.2.5 Die Proteinfamilie der Fibuline

Die Fibuline (FB) zählen zu den mikrofibrillären Komponenten der ECM. Ihre zentrale, stäbchenförmige Domäne enthält mehrere Kalzium-bindende EGF-ähnlichen-Module. Bisher sind fünf Isoformen beschrieben worden (Kowal *et al.*, 1999 [FB-5]; Giltay *et al.*, 1999 [FB-3 und -4]; Pan *et al.*, 1993 [FB-2]; Kluge *et al.*, 1990 [BM-90, später FB-1]). Fibulin-1 und -2 wurden durch immunhistologische Färbungen in BM und Wänden der Blutgefäße adulter Mäuse nachgewiesen (Kluge *et al.*, 1990; Pan *et al.*, 1993). Im Vergleich mit Fibulin-1 zeigen die Fibuline-3 und -4 eine verschiedene, aber überlappende Verteilung (Giltay *et al.*, 1999), was auf unterschiedliche Funktionen der einzelnen Fibulin schließen läßt. Erste Hinweise auf die biologische Funktion geben *in vitro* Bindungsstudien der Fibuline-1 und -2. Bindungen mit Fibronectin und verschiedenen BM Proteinen, wie Laminin, Kollagen IV und Nidogen konnten nachgewiesen werden (Brown *et al.*, 1994; Adam *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1995). In ihren Bindungseigenschaften unterscheiden sich Fibulin-1 und -2 geringfügig (Utani *et al.*, 1997).

1.3 Zelloberflächenrezeptoren

In Kapitel 1.2 wurde hauptsächlich die Selbstassemblierung („vertikale Verknüpfung“) und der dadurch entstehende molekulare, heteropolymere Aufbau der BM besprochen. Nun soll im folgenden, kurz die Verbindung der BM mit den Zellen über die bekanntesten Rezeptoren („horizontale Verknüpfung“), der Integrine und Dystroglycan, erläutert werden. Die dynamische Verbindung der vertikalen und der horizontalen Verknüpfung führt zum Aufbau der BM (Cognato & Yurchenco, 2000; Schwarzbauer, 1999; Yurchenco & O’Rear, 1994).

1.3.1 Integrine

Integrine sind eine große Familie von membranständigen Rezeptoren. Sie sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut, einer α und einer β Kette, die nicht kovalent miteinander assoziiert sind. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine große extrazelluläre Domäne, ein Transmembran-Segment und einen kurzen intrazellulären Abschnitt. Über zwanzig verschiedene Heterodimere wurden bisher in der Literatur beschrieben (Arcangelis & Georges-Labouesse, 2000). Viele genetische Untersuchungen an Mäusen, bzw. ES Zellen, denen einzelne Integrin-Ketten fehlen, wurden durchgeführt. Die Analysen weisen darauf hin, dass die einzelnen Integrine relativ wenig ähnliche, überschneidende, sondern viele unterschiedliche, begrenzte Funktionen besitzen (Fässler *et al.*, 1996). Zu den BM-Bindungspartnern der Integrine zählen u.a. Kollagen IV (Eble *et al.*, 1993), Laminine (Aumailley *et al.*, 1996; Schwarzbauer, 1999) und Perlecan (Battaglia *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1997). Durch Aminosäuresequenz-Analysen der Integrin-Bindungsstellen verschiedener Proteine konnten eine Reihe bindungsaktiver Regionen (meist drei bis sechs Aminosäuren) identifiziert werden. Eines der bekanntesten Motive ist das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD), welches mit mehreren der bislang gefundenen Integrine interagieren kann (Ruoslahti, 1996). Eine Besonderheit der Integrine ist, dass sie Signale in beide Richtungen der Zellmembran weitergeben können. Die Bindungsaktivität der verschiedenen Integrine wird aus dem Inneren der Zelle reguliert ("inside-out signaling"). Während durch die Bindung mit ECM Molekülen auch Informationen an das Innere der Zelle weitergegeben werden ("outside-in signaling"; Giancotti & Ruoslahti, 1999). Ein wichtiger Schritt in der Signalkette ist das Zusammenlagern mehrerer Integrine, wenn sie ECM Moleküle gebunden haben. Manche Integrine sind über ihre kurzen, zytoplasmatischen C-Termini über verschiedenen Adapterproteinen mit dem Actin-Zytoskelett verbunden. Durch die Wechselwirkungen organisiert sich die ECM auf der einen Seite und das Zytoskelett auf der anderen Seite der Zellmembran (Colognato *et al.*, 1999). Diese strukturierende Eigenschaft der Integrine (daher auch der Name) wird auch eine besondere Bedeutung in der Bildung des polygonalen Netzwerkes der BM zugesprochen (Schwarzbauer, 1999).

1.3.2 Dystroglycan

Ein weiterer, wichtiger Rezeptor für verschiedene BM-Proteine ist das Dystroglycan. Es wurde erstmals aus Skelettmuskel isoliert, wo es ein zentrales Element des Dystrophin-Glykoproteinkomplexes ist (Ervasti *et al.*, 1990). Es besteht aus einer extrazellulären α -Untereinheit (156 kDa), die mit einer transmembranen β -Untereinheit (43kDa) verbunden ist. Die α -Untereinheit bindet an die C-terminalen, globulären Module (LG-Module) der Laminin

α 1-Kette (Gee *et al.*, 1993). Diese Region ist in allen fünf, bekannten Laminin α -Ketten sehr konserviert. Dystroglycan hat somit die Fähigkeit alle bekannten Laminin-Trimere zu binden. Es kann weiterhin noch die LG-Module der Proteoglykane Agrin und Perlecan binden (Timpl *et al.*, 2000). Auf der zytoplasmatischen Seite ist die β -Untereinheit über das Protein Dystrophin mit dem Actin-Zytoskelett verbunden. Eine Verknüpfung der BM mit dem Actin-Zytoskelett, über Dystroglycan konnte im Skelettmuskel nachgewiesen werden (Ervasti & Campell, 1993). In Zellkulturexperimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass differenzierende, Dystroglycan-defiziente ES-Zellen keine funktionsfähige BM bilden können (Henry *et al.*, 1998). In diesem experimentellen Ansatz differenzieren ES-Zellen normalerweise zu kugelförmigen, dreidimensionalen Zellaggregaten (embryoid bodies). Aggregate aus WT ES-Zellen bilden eine BM und weisen verschiedene embryonale Gewebestrukturen auf.

1.4 Genetische Funktionsanalyse von BM-Proteinen

Mit Hilfe der Mausgenetik konnte die Funktion vieler Gene *in vivo* analysiert werden. Transgene Mäuse können als Tiermodelle für Krankheiten des Menschen dienen, mit deren Hilfe z.B. Krankheitsmechanismen untersucht und neue Medikamente getestet werden können. Voraussetzung hierfür ist, neben der biologischen Ähnlichkeit zwischen Maus und Mensch, dass sie vergleichbare, im großen Maße übereinstimmende genetische, bzw. physikalische Karten besitzen (Copeland *et al.*, 1993; Denny & Justice, 2000). So kann aus *in vivo*-Befunden von mutanten-Mauslinien Rückschlüsse und Ansatzpunkte auf die entsprechende Genfunktion im Menschen gezogen werden (Hardouin & Nagy, 2000). Als Modellorganismus hat die Maus aber auch in der Grundlagenforschung für das Verständnis wichtiger biologischer Funktionen und Zusammenhänge einen sehr großen Wert.

Unter der ständig wachsenden Zahl an gentechnisch veränderten Mäusen, befinden sich auch einige mit Mutationen in Genen, die für Proteine der BM, bzw. der ECM kodieren (Aszódi *et al.*, 1998; Gustafsson & Fässler, 2000). Genetische Funktionsanalysen von verschiedenen mutanten Mauslinien, weisen beispielsweise auf die vielfältigen und unterschiedlichen Aufgaben der einzelnen Lamininketten und somit der entsprechenden Laminin-Trimere hin. Untersucht wurden bisher transgene Mauslinien, denen die Laminin α 2-, α 3-, α 5-, β 2- oder γ 1-Kette fehlt (Gustafsson & Fässler, 2000). Die folgende Zusammenfassung soll hier einen kurzen Überblick geben.

Mäuse, denen die Laminin α 2-Kette (d.h. folgende Laminin-Trimere können nicht gebildet werden: Laminin-2, -4 und -12) fehlt, zeigen eine Muskeldystrophie (*dystrophia muscularis*, *dy*, Miyagoe *et al.*, 1997). Die Entfernung der Laminin β 2-Kette (Laminin-3, -4, -7 und -11) führt

zu einer Nierenfehlfunktion (Noakes *et al.*, 1995a) und einer abnormaler Differenzierung neuromuskulärer Verbindungen (Noakes *et al.* 1995b). Die Mäuse sterben bevor sie einen Monat alt werden und haben erhöhte Proteinmengen im Urin (Proteinuria). Die Nierenglomerulie dieser Tiere zeigen jedoch keine auffälligen, morphologischen Veränderungen. Mäuse mit fehlender Laminin $\alpha 5$ -Kette (Laminin-10 und -11) sterben während der Embryonalentwicklung an morphologischen Fehlbildungen des Gehirns, der Gliedmassen (Syndaktylie), der Placenta (Miner *et al.*, 1998) und der Nierenglomerulie (Miner *et al.*, 2000). Mutationen in den jeweiligen Ketten des Laminin-5 ($\alpha 3\beta 2\gamma 2$) bewirken alle eine letale Blasenbildung der Haut (Burgenson & Christiano, 1997). Dieses Krankheitsbild ist beim Menschen als *Epidermolysis Bullosa (EB)* beschrieben (Abb. 1-7). *EB* ist ein Sammelbegriff für erbliche Hauterkrankungen (bisher 23 Subtypen), die durch eine fehlerhafte Verbindung der Dermis mit der Epidermis gekennzeichnet sind. Die Folge ist die Bildung von Blasen nach kleinsten mechanischen Beanspruchungen (Bruckner-Tuderman, 1993). Mäuse mit fehlender $\gamma 1$ -Kette (Laminine 1-4 und 6-11) zeigen den bisher schwerwiegendsten Phänotyp: der Embryo stirbt schon früh nach der Implantation ab (Smyth *et al.*, 1999).

In einem weiteren transgenen Mausmodell wurde gezielt das Gen für die $\alpha 3(\text{IV})$ -Kette (*COL4A3*), eine Isoform der Kollagen $\alpha(\text{IV})$ -Kette (siehe 1.2.1), entfernt. Die Mäuse zeigen einen postnatal-letalen Phänotyp. Bei mutanten Mäusen wurde ein Nierenversagen festgestellt (Cosgrove *et al.*, 1996; Miner *et al.*, 1996). Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen eine fehlerhaft gebildete BM der Nierenglomerulie (GMB). Dieses Bild zeigen auch Menschen mit dem Alport-Syndrom (Flinter, 1997; Abb. 1-7). Es handelt sich hier um die zweithäufigste erbliche Nierenerkrankung, nach der polycystischen Nierenerkrankung, die aber erst im Erwachsenenalter ausbricht. Menschen mit dieser Krankheit tragen Mutationen in den *COL4A3, A4* oder *A5*-Genen (Barker *et al.*, 1990; Mochizuki *et al.*, 1994; Lemmink *et al.*, 1994). Diese Gene kodieren für Isoformen der Kollagen $\alpha(\text{IV})$ -Kette, die besonders in der Niere exprimiert werden. Die meistens männlichen Patienten zeigen eine progressive Nephritis mit Hörverlust und manchmal Läsionen in der Augenlinse. Die BM der Nierenglomerulie (GMB) ist typischerweise lamellenförmig verändert und stellenweise verdünnt. Erste Anzeichen der Krankheit sind Hämaturia und Proteinuria. Im frühen Erwachsenenalter versagen die Nieren dann endgültig. Derzeit gibt es keine spezielle Behandlung (Turner *et al.*, 1996; Flinter, 1997). Beim Menschen wurden Mutationen in verschiedenen Genen identifiziert, welche Veränderungen in der BM hervorrufen und für die daraus resultierenden Krankheitsbilder verantwortlich sind (Bruckner-Tuderman & Bruckner, 1998). Eine kurze Übersicht der bekannten Krankheiten des Menschen zeigt Abb. 1-7. Erbliche Defekte der BM (und der

ECM im Allgemeinen) sind durch ihr eigene biologische Struktur gekennzeichnet:

1. Sie kommt überall im Körper vor und ist allgemein wichtig für Organentwicklung und Funktion.
2. Die Matrix-Makromoleküle besitzen meistens ein großes Molekulargewicht und bilden oft miteinander unlösliche Suprastrukturen mit hohem Ordnungsgrad.
3. Diese Suprastrukturen können in verschiedenen Geweben eine unterschiedliche Zusammensetzung und somit auch andere Eigenschaften haben (Bruckner-Tuderman & Bruckner, 1998).

Die daraus resultierenden Krankheitsbilder sind daher sehr vielgestaltig und oft letal.

Protein	Gen	Lokalisation des Proteins	Krankheit
Kollagen IV	COL4A3-A6	BM der Nierenglomerulie	Alport-Syndrom
Kollagen VII	COL7A1	Komponente der Verankerungsfilamente in der BM-Region der Haut	<i>Dystrophische EB</i>
Kollagen XVII	COL17A1	Epitheliale Hemidesmosomen in der BM-Region der Haut	<i>EB junctionalis</i>
Laminin 2	LAMA2	Dystrophinverknüpfung mit der BM	Muskeldystrophie
Laminin 5	LAMA3 LAMB3 LAMC2	Komponente der Verankerungsfilamente die Hemidesmosomen mit BM der Haut verbinden	Schwere <i>EB junctionalis</i> Herlitz → letal
β4-Integrin	ITRB4	α6β4 Integrin ist der Laminin-5 Rezeptor, in der Haut	Schwere <i>EB</i>

Abb. 1-7 Übersicht einiger bekannter Mutationen in Genen, die hauptsächlich für BM-Proteine, bzw. für BM Rezeptoren kodieren. *Epidermolysis Bullosa (EB)*.

1.5 Das murine und humane Nidogen-2 Gen

Seit der Entdeckung und Beschreibung des humanen (Durkin *et al.*, 1988) und murinen Nidogen-Gens (Timpl *et al.*, 1983; Mann *et al.*, 1989) wurden weitere, homologe Gene in verschiedenen Organismen wie der Seescheide (Ascidie) *Halocynthia roretzi* (Nakae *et al.*, 1993), *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1996) und *Drosophila melanogaster* (Kumagai *et al.*, 1999) gefunden und isoliert. In diesen Organismen konnte jedoch bisher nur ein Nidogen Gen gefunden werden.

Im Jahr 1998 wurde über die Identifizierung und Klonierung einer Nidogen-2/Entactin-2 cDNA der Maus (Kimura *et al.*, 1998) und des Menschen berichtet (Kohfeldt *et al.*, 1998). Im weiteren wird die Bezeichnung Nidogen-2 verwendet. Der Leserahmen der humanen Nidogen-2 cDNA hat eine Größe von 4125 bp, der für ein Polypeptid mit 1375 AS kodiert (Kohfeldt *et al.*, 1998). Die von der kodierenden humanen Nidogen-2 cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt 46% Sequenzidentität mit dem humanen Nidogen-1 (Kohfeldt *et al.*, 1998).

Die murine Nidogen-2 cDNA wurde aus einer Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie isoliert (Kimura *et al.*, 1998). Der 4209 bp lange Leserahmen kodiert für ein Polypeptid mit 1403 Aminosäuren. Das murine Nidogen-2 besitzt eine Aminosäure-Sequenzidentität von 27,4% mit dem murinen Nidogen-1, hat aber viele strukturelle Ähnlichkeiten (Kimura *et al.*, 1998).

Das vollständige humane Nidogen-2 Protein hat eine Molekulargewicht von 200 kDa (Kohfeldt *et al.*, 1998). Ein potentiell Nidogen-2 Abbauprodukt von 179 kDa wurde isoliert und durch Edman-Abbau konnte festgestellt werden, dass dieses Nidogen-2-Fragment am N-terminalen Ende mit der flexiblen Verbindungsregion beginnt. Dies spricht für eine ähnliche Empfindlichkeit des Nidogen-2 gegenüber Proteasen, wie Nidogen-1 (Mayer *et al.*, 1995; Kohfeldt *et al.*, 1998). Bei dem humanen Nidogen-2 Gen handelt es sich um ein Glykoprotein. Eine Analyse der Zuckerreste zeigt, dass Nidogen-2 25 ± 2 Glukosamin- und 19 ± 2 Galaktosaminreste trägt, was ein Hinweis darauf ist, dass die fünf vorhergesagten *N*-Glykosylierungsstellen und viele der *O*-Glykosylierungsstellen besetzt sind (Kohfeldt *et al.*, 1998; siehe auch Nidogen-1 in Kapitel 1.2.3.1.).

Weiterhin haben die beiden humanen Nidogene einen ähnlichen globulären Aufbau (Kohfeldt *et al.*, 1998). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des humanen Nidogen-2 zeigen, dass das Protein mit 40 nm etwas länger als Nidogen-1 ist (Kohfeldt *et al.*, 1998). Es läßt sich jedoch eine sehr ähnliche Proteinstruktur erkennen, mit drei globuläre Domänen (G1-G3), zwischen denen ein flexibles (G1-G2) und ein steifes (G2-G3) Verbindungsstück liegt. Durch Analysen

der Primärstruktur konnte bei beiden Nidogen-2 Formen gezeigt werden, dass in der G2-Domäne ein EGF-ähnliches Modul und in dem steifen Verbindungsstück vier EGF-ähnliche und zwei Thyroglobulin-ähnliche Module (TY) liegen (Kohfeldt *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1998). Das EGF-ähnliche Modul, welches sich am C-terminalen Ende des murinen und humanen Nidogen-1 befindet, fehlt allerdings bei den entsprechenden Formen des Nidogen-2 (Kohfeldt *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1998). Ein weiterer Unterschied ist ein zweites TY-Modul in der gestreckten Verbindungsregion zwischen der G2- und der G3-Domäne. In der entsprechenden Region befindet sich in den humanen und murinen Nidogen-1 nur ein TY-Modul (Mann *et al.*, 1989).

Um die Funktionen des Nidogen-2 Gens zu charakterisieren, wurden *in vitro* Bindungsexperimente mit rekombinanten humanen Nidogen-2 und verschiedenen BM-Proteinen durchgeführt (Kohfeldt *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Nidogen-2 die BM-Proteine Kollagen IV und Perlecan mit vergleichbaren Bindungskonstanten bindet wie Nidogen-1. Allerdings interagiert das rekombinante, humane Nidogen-2 mit dem Fragment γ III3-5 der murinen Laminin γ 1-Kette, welches das Nidogen-1-Bindungsepitop trägt, um einen Faktor 100-1000 schwächer als murines und humanes Nidogen-1 (Kohfeldt *et al.*, 1998). Eine Deletion des Nidogen-1 Bindungsepitops (Laminin-Fragment γ III3-5 Δ 4) führt zu einem Verlust sowohl der Nidogen-1, als auch der Nidogen-2 Bindung, d.h. beide Isoformen haben ein gemeinsames Bindungsepitop. In Bindungstests mit dem kompletten Laminin-1 zeigt rekombinantes Nidogen-2, nach einer Sättigung mit Nidogen-1, jedoch noch eine Bindung (Kohfeldt *et al.*, 1998). Dies ist ein Indiz für ein zusätzliches Nidogen-2 Bindungsepitop. Ein weiterer wichtiger Unterschied, in den *in vitro* Bindungseigenschaften, zum humanen Nidogen-1 ist, dass rekombinantes Nidogen-2 keine signifikante Bindung mit Fibulin-1 und -2 aufweist (Kohfeldt *et al.*, 1998).

Die beiden Nidogen-Formen zeigen weiterhin Unterschiede in Zell-Adhäsions-Tests. Es zeigt sich, dass sich mehr Zelllinien an Nidogen-2, als an Nidogen-1 hefteten (Kohfeldt *et al.*, 1998). Antikörper gegen β 1- und α 3-Integrine und synthetische RGD-Oligopeptide können die Anheftung an Nidogen-1 blockieren, an Nidogen-2 jedoch nicht. Dies spricht für unterschiedliche zelluläre Rezeptoren, die für die jeweiligen Bindungen verantwortlich sind (Kohfeldt *et al.*, 1998). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass beide Nidogen-Formen der Maus eine Integrin RGD-Bindungssequenz tragen, welcher im humanen Nidogen-2 jedoch, als eine YGD-Sequenz auftritt. Die Funktionalität der RGD-Bindungssequenz im murinen Nidogen-2 wurde durch Zell-Bindungstests analysiert (Kimura *et al.*, 1998). Untersucht wurde die Bindung verschiedener Zelllinien an ein in *E.coli* hergestelltes

rekombinantes, murines Nidogen-2 Protein-Fragment, welches hauptsächlich der starren Verbindungsregion zwischen der G2- und G3-Domäne entsprach. In diesem Fragment liegt auch die RGD-Bindungssequenz. Die Bindung verschiedener Zelllinien an dieses Fragment, ist ein Hinweis auf die Bedeutung dieser Nidogen-2 Region, in der Zell-Adhäsion (Kimura *et al.*, 1998).

Die Gewebelokalisation des Nidogen-2 Proteins wurde durch indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit spezifischen Antikörpern untersucht (Kohfeldt *et al.*, 1998). Hier zeigte sich, dass beide Nidogene eine sehr ähnliche Verteilung in den BM verschiedener Gewebe aufweisen. Eine unterschiedliche Färbung mit Nidogen-2-spezifischen Antikörpern wurde allerdings in Muskelgewebe nachgewiesen. In Gewebeschnitten aus Skelett- und Herzmuskulatur war eine starke Nidogen-2 Färbung nur in den BM der Blut-Kapillaren erkennbar, während die BM der Muskelfasern relativ schwach gefärbt sind. Färbungen mit einem Nidogen-1-spezifischen Antikörper zeigen hier keine Unterschiede in der Intensität zwischen den Basalmembranen der Kapillaren und der Muskelfasern (Kohfeldt *et al.*, 1998). Diese Besonderheit der Nidogen-2 Lokalisation läßt vermuten, dass Nidogen-2 in der BM von Blut-Kapillaren dieser Gewebe eine spezifische Funktion haben könnte.

1.6 Ziel der Arbeit

Das 1998 erstmals publizierte Nidogen-2 bildet mit dem schon länger bekannten Nidogen-1 eine kleine Proteinfamilie. Hinweise über die Funktion der Nidogene stammten jedoch zu dieser Zeit von *in vitro* Studien über ihre Bindungseigenschaften und Proteinstrukturen, Organkultur-Experimenten, sowie von Expressionsstudien in verschiedenen Geweben. In vielen Aspekten zeigten die Nidogene eine große Ähnlichkeit, jedoch weisen sie auch charakteristische Unterschiede auf.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst das Nidogen-2 Gen der Maus kloniert und seine Gensequenz, Genstruktur und chromosomale Lokalisation aufgeklärt werden. Aufbauend auf dieser molekularen Grundlage sollte anschließend die biologische Bedeutung des Nidogen-2 Gens *in vivo* durch eine genetische Funktionsanalyse in der Maus untersucht werden. In einem genetischen Mausmodell sollte die Inaktivierung des Nidogen-2 Gens erfolgen und die daraus resultierende Nidogen-2 Defizienz überprüft werden. Die phänotypische Analyse der Nidogen-2-defizienten Mauslinie sollte dann darüber Auskunft geben, ob es in Abwesenheit des Nidogen-2 zur Ausbildung von Basalmembranen kommt und ob eventuell auftretende Defizite der Basalmembran zu pathologischen Situationen während der Embryonalentwicklung oder in postnatalen Stadien der Maus führen.

2 Ergebnisse

2.1 Das Nidogen-2 Gen der Maus

In diesem Ergebnisteil wird zunächst die Isolierung, Klonierung und DNA-Sequenzanalysen des murinen Nidogen-2 Gens beschrieben. Anschließend wird auf die Analyse der Genstruktur und die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens eingegangen.

2.1.1 Isolierung von Genomklonen für das Nidogen-2 Gen der Maus aus Genbibliotheken

Zur Isolierung des murinen Nidogen-2 Gens wurden Genbibliotheken in λ -FIXII-Phagen, welche DNA-Fragmente aus dem Genom von Mäusen des Stammes 129Sv enthalten, nach Nidogen-2-hybridisierungspositiven Phagen durchsucht. Herrn Dr. Bernhard L. Bader (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteinchemie, Martinsried) wurden freundlicherweise von Dr. Ernst Pöschl (Experimentelle Medizin I, Nikolaus-Fiebiger Zentrum, Molekulare Medizin, Universität Erlangen-Nürnberg) hybridisierungspositive, rekombinante λ -FIXII-Phagen für weitere Analysen zur Verfügung gestellt. Diese Analysen zeigten, dass die DNA-Inserts einen Teil der 5'-Region des Nidogen-2 Gens abdecken (siehe 2.1.2).

2.1.2 Analyse der Genomklone

Die DNA der Phagen ND2-13, ND2-21, ND2-19 und ND2-16 wurde präpariert und durch Restriktions- und Southern Blot-Analysen charakterisiert. Um DNA-Fragmente zu identifizieren, die kodierende Sequenzen des Nidogen-2 Gens enthalten, wurden Southern Blot-Analysen unter permissiven Hybridisierungsbedingungen mit der humanen Nidogen-2 cDNA (Kohfeldt *et al.*, 1998; EMBL-Gendatenbank, Registriernummer: AJ223500) als radioaktive Probe durchgeführt. Hybridisierungspositive DNA-Fragmente wurden dann isoliert und in Plasmidvektoren kloniert. Durch DNA-Sequenzierungen und Restriktionsanalysen (siehe 2.1.4) der angefertigten Subklone und DNA-Sequenzvergleiche mit der entsprechenden murinen Nidogen-2 cDNA (Kimura *et al.*, 1998) konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Inserts der Phagen ND2-13, ND2-21, ND2-19 und ND2-16 kodierende Exons des murinen Nidogen-2 Gens tragen (Abb. 2-5). DNA-Sequenzvergleiche mit den einzelnen Exonsequenzen des humanen Nidogen-2 (unveröffentlichte Sequenzen aus der EMBL-Gendatenbank von Ohno *et al.*, 1998 siehe 2.1.7) zeigen weiterhin, dass die hergestellten Subklone murine Nidogen-2 DNA-Sequenzen enthalten, die hohe DNA-Sequenzähnlichkeiten zu den ersten acht kodierenden Exons des humanen Nidogen-2 beinhalten (siehe 5.2.1.10).

Um jedoch das gesamten Nidogen-2 Gen im Rahmen dieser Doktorarbeit zu klonieren, wurde eine weitere Genbibliothek aus rekombinanten λ -DashII-Phagen mit genomischer DNA des Mausstammes 129 Sv mit Hilfe einer radioaktiv markierten *EcoRI/Sad*-Restriktionsfragmentes des cDNA EST3.1-Klons, durchsucht (die Beschreibung des EST3.1-Klons, der die kodierende Region des murinen Nidogen-2 Gens ab der Nukleotidposition 1983 bis zur Polyadenylierungssignal-Sequenz enthält, befindet sich in Anhang 7.2). Dieses cDNA-Fragment enthält auch die kodierenden Regionen (Aminosäuren 662-1412) des murinen Nidogen-2 Gens die in den bisher isolierten Genomfragmenten nicht vorhanden waren.

Die hybridisierungspositiven λ -DashII-Phagen 3-1, 3-3, 3-5, 3-17, 3-82 und 4-72 wurden isoliert und weiter charakterisiert. Um eine physikalische Karte der rekombinanten DNA der Phagen anzufertigen, DNA-Restriktionsfragmente in Plasmidvektoren zu klonieren und Exon-tragende DNA-Fragmente zu lokalisieren, wurde mit der präparierten, rekombinanten Phagen-DNAs Restriktionsanalysen und Southern Blot-Analysen durchgeführt (siehe exemplarisch Abb. 2-1).

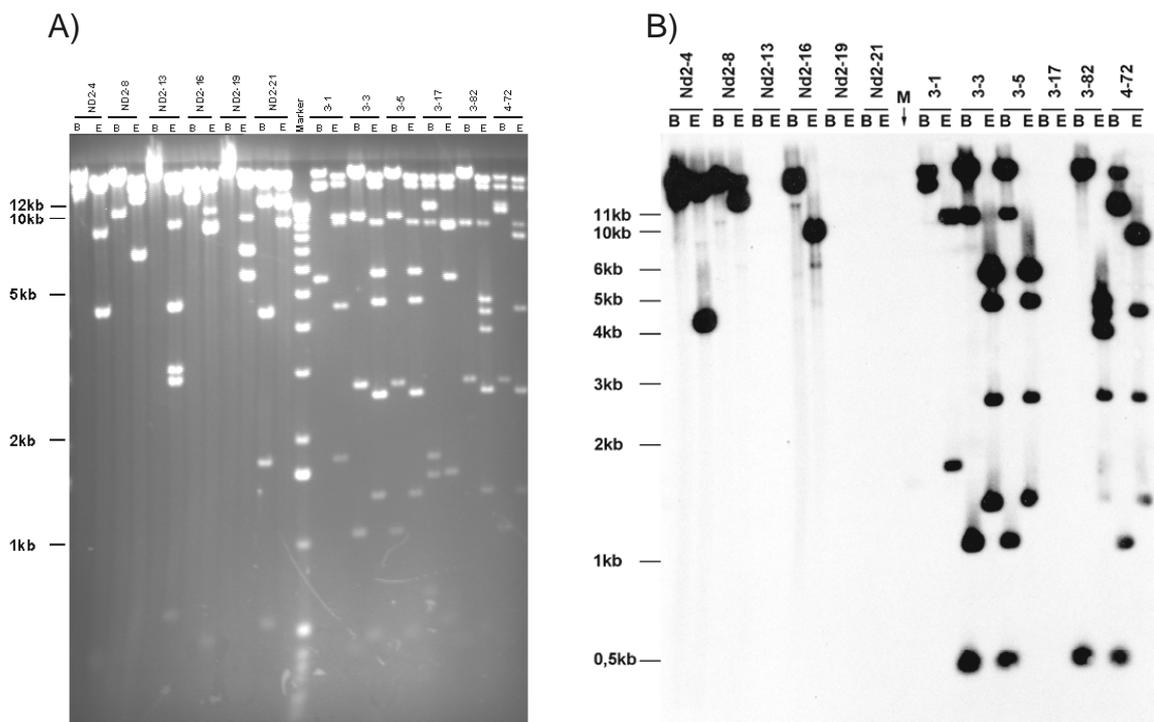


Abb. 2-1 Restriktionskartierung von Nidogen-2 hybridisierungspositiven, rekombinanten λ -Klonen

A) 1 μ g DNA der λ -Phagen ND2-4, ND2-8, ND2-13, ND2-18, ND2-19, ND2- 3-1, 3-3, 3-5, 3-17, 3-82 und 4-72 wurde nach dem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI (B) und *Eco*RI (E), elektrophoretisch auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt B) Nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran durch Southern Blotting erfolgte die Hybridisierung mit einem 32 P-markierten 1,9 kb *Eco*RI/*Sad*-Restriktionsfragment des EST3.1-Klons. Hybridisierungs- und Waschbedingungen siehe 5.2.1.4. Dargestellt ist die Autoradiographie der Southern Blot-Membran. 1 kb-Leiter Größenstandard = Marker (M)

2.1.3 Klonierung und DNA-Sequenzierung der Genomklone

Zur Identifizierung von genomischen DNA-Fragmenten, die Nidogen-2 kodierende Regionen enthalten, wurde eine Southern Blot-Analyse mit Phagen-DNA und einem 1.9kb *EcoRI/SacI*-Restriktionsfragment des EST3.1-Klons als radioaktive Probe durchgeführt (Abb. 2-1). Hybridisierungspositive DNA-Fragmente wurden dann in Plasmidvektoren kloniert. Diese Subklone wurden für weitere Restriktionskartierungen und als Matrizen für DNA-Sequenzierungsreaktionen eingesetzt (siehe 5.2.1.10). Durch eine Kombination dieser Analysen konnte eine vollständige physikalische Karte der Phagen ND2-13, ND2-21, ND2-19, ND2-16, 3-82, 4-72 und 3-1 mit Hilfe der *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen erstellt werden (Abb. 2-2). Weitere Restriktionsenzym-Schnittstellen, z.B. *BamHI* wurden in diesem genomischen Abschnitt, der durch die Phagen abgedeckt wird, kartiert (Daten nicht gezeigt).

Anschließende DNA-Sequenzanalysen zeigten (siehe 2.1.4), dass der gesamte Nidogen-2 Locus, bis auf eine kleine Lücke zwischen Exon 17 und 18 (Abb. 2-2), in den oben angeführten rekombinanten Phagen enthalten ist.

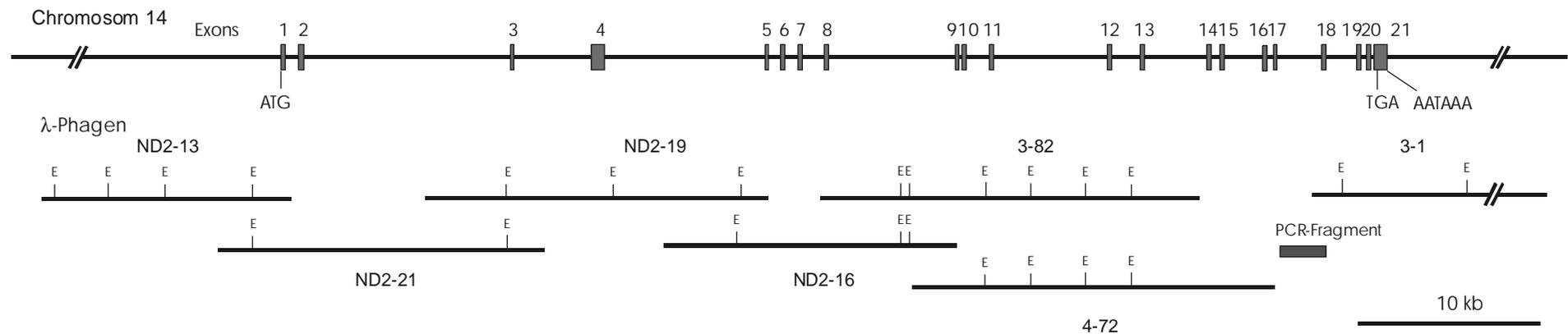


Abb. 2-2 Schematische Darstellung der Genstruktur des Nidogen-2 Gens und physikalische Karten der überlappenden Inserts der rekombinanten λ -Phagen

Der sich über ca. 60kb erstreckende Nidogen-2 Gen-Locus wird von den DNA-Inserts der rekombinanten λ -Phagen ND2-13, ND2-21, ND2-19, ND2-16, 3-82, 4-72 und 3-1 abgedeckt. Die Schnittstellen des Restriktionsenzym *EcoRI* sind dargestellt. Durch Subklonierung spezifischer DNA-Regionen, detaillierte Restriktionskartierungen, sowie DNA-Sequenz- und PCR-Analysen konnten die einzelnen Exons und Introns lokalisiert und die Introngrößen bestimmt werden (siehe Abb. 2-6). Die lineare überlappende Anordnung der DNA-Inserts der λ -Phagen zeigt eine Lücke zwischen Exon 17 und Exon 18 auf. Diese konnte durch ein 2.7 kb PCR-Fragment geschlossen werden (Abb. 2-4): Größenstandard: 10kb

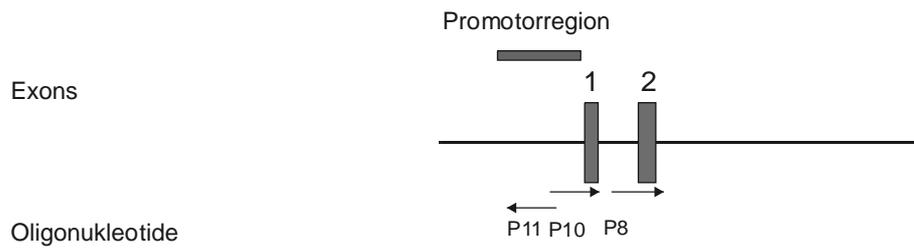
2.1.4 DNA-Sequenz und Genstrukturanalyse des murinen Nidogen-2 Gens

2.1.4.1 Sequenzierungsstrategie

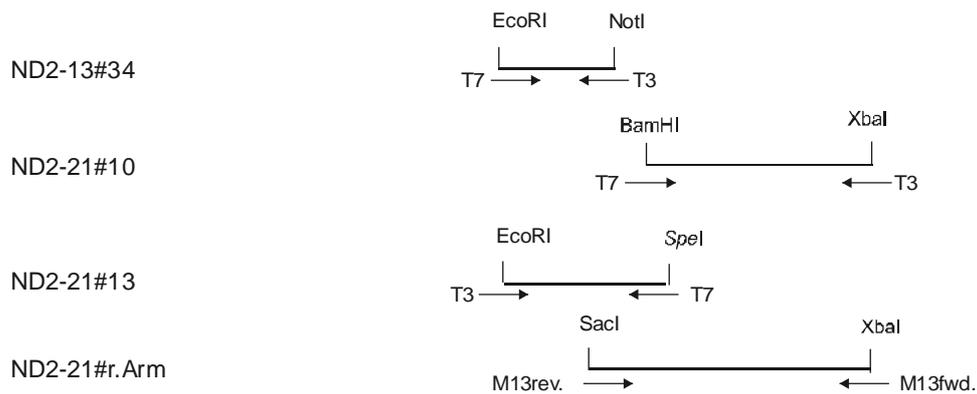
Um die einzelnen Exons komplett und ihre flankierenden Intron-Regionen sequenzieren zu können und somit die Exon-Intron-Übergänge zu bestimmen, wurden Restriktionsfragmente der isolierten rekombinanten Phagen in Plasmidvektoren subkloniert und als Matrizen für DNA-Sequenzreaktionen verwendet (siehe Abb. 2-3). Die Lage der Oligonukleotide, die als Startsignale (Primer) für die Sequenzreaktionen dienten und die verwendeten Matrizen sind in Abb. 2-3, bzw. im Anhang in Abb. 7-1 bis Abb. 7-4 dargestellt. Durch die DNA-Sequenzvergleiche der bekannten murinen Nidogen-2 cDNA Sequenz (Kimura *et al.*, 1998) mit den einzelnen Exonsequenzen des humanen Nidogen-2 (unveröffentlichte Sequenzen von Ohno *et al.*, 1998 siehe 2.1.7) konnten den einzelnen Exons des humanen Nidogen-2 Gens Regionen auf der murinen cDNA zugeordnet werden. Mit Hilfe des GCG-Computerprogramms wurden Oligonukleotidsequenzen in „sense“ (+) Orientierung in der murinen cDNA gesucht, die sich innerhalb dieser Exon-Bereiche befinden. Durch diese gewonnenen DNA-Sequenzdaten konnten anschließende Oligonukleotidsequenzen in „antisense“ (-) Orientierung gewählt werden. Mit entsprechenden Oligonukleotiden und Matrizen wurden dann DNA-Sequenzierungsanalysen durchgeführt (siehe 5.2.1.10). Exemplarisch wird hier die DNA-Sequenzierungsstrategie für die Promotorregion, Exon 1 und Exon 2 des murinen Nidogen-2 Gens beschrieben (Abb. 2-3). Für die weiteren Exons sind die entsprechenden Sequenzierungsschemata im Anhang in den Abb. 7-1 bis Abb. 7-4 zu finden. Für die entsprechenden DNA-Sequenzen wurden DNA-Stränge (+) und Gegenstränge (-) mindestens zweimal sequenziert.

Die DNA-Sequenz und die Exon-Intron Grenzen des murinen Nidogen-2 Gens werden in 2.1.4.3 gezeigt. Die Sequenz der Exons ist in Abb. 2-5 zusammengefaßt. Eine Übersicht der Exon-Intronübergänge ist in Abb. 2-6 gezeigt. Intronsequenzen sind im Anhang gezeigt (siehe 7.4.). Die Exon-Sequenzen mit den flankierenden partialen, bzw. vollständigen Intron-Sequenzen des murinen Nidogen-2 Gens wurden der EMBL-Gendatenbank übermittelt (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK). Die Zusammensetzung der einzelnen Sequenzen und die entsprechenden Registriernummern siehe im Anhang (Abb. 7-5).

A)



Inserts der Phagen:



B)

Matrize	Oligo.	Promotor (P) und Exons (E)	genomische Orientierung
Nd2-13#34	T7	Promotor	+
Nd2-13#34	P11	Promotor	-
Nd2-13#34	P10	E1 + Promotor	+
“	T3	E1	-
Nd2-21#10	T7	E2	+
Nd2-21#13	T7	E2	-
Nd2-21#r.Arm	P8	E2	+

Abb. 2-3 Schematische Darstellung der Lage (A) und tabellarische Übersicht (B) der verwendeten Oligonukleotide und Matrizen zur DNA-Sequenzierung der Promotorregion (P) und der Exons (E) 1 und 2 des murinen Nidogen-2 Gens.

2.1.4.2 Klonierung der Region zwischen Exon 17 und 18

DNA-Sequenzierungsanalysen (siehe 2.1.4.1) ergaben, dass die DNA-Inserts der Phagen 4-72 und 3-1 nicht überlappen, wodurch eine DNA-Sequenz-Lücke zwischen dem noch unvollständigen Exon 17 und Exon 18 entsteht. Durch PCR-Experimente mit den Oligonukleotiden ND-38 (Sequenz aus Exon 17; sense-Orientierung), ND-54 (aus Exon 18; antisense-Orientierung) und genomische DNA von einer WT-Maus (129 Sv) als Matrize konnte ein PCR-DNA Fragment hergestellt werden, welches die genomische Region zwischen dem Exon 17 und Exon 18 enthält (siehe Abb. 2-4).

Die Sequenzierung des generierten 2,7 kb PCR-DNA-Fragmentes bestätigt sowohl seine Position als auch die fehlenden DNA-Sequenzen der Exons 17, bzw. 18. Eine Restriktionsanalyse des subklonierten PCR-DNA-Fragmentes zeigt keine *EcoRI*-Schnittstelle zwischen den beiden Exons (Abb. 2-4).

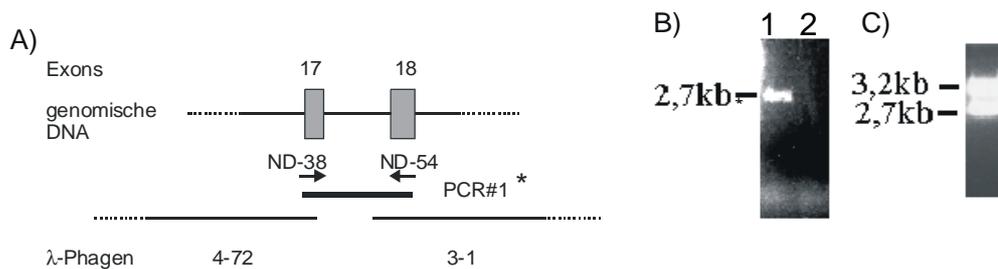


Abb. 2-4 PCR-Klonierung des Nidogen-2 Genabschnittes zwischen Exon 17 – Exon 18

A) Schematische Darstellung des Genabschnitts, der Lage der Oligonukleotide, des zu erwartenden PCR-DNA-Fragmentes (Stern) und die entsprechende Lage der Inserts der rekombinanten λ -Phagen 4-72 und 3-1.

B) Zur PCR-Klonierung des Genabschnitts wurde genomische Mauseber-DNA als Matrize und die Oligonukleotide ND-38 und ND-54 eingesetzt. Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Reaktion in einem 1% Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid. In Spur 1 ist das 2.7 kb PCR-DNA-Fragment sichtbar (PCR#1). In Spur 2 wurde eine Kontroll-PCR-Reaktion aufgetrennt bei der die genomische DNA durch H₂O als Matrize ersetzt wurde (Negativkontrolle).

C) Restriktionsanalyse des klonierten 2.7 kb PCR-DNA-Fragmentes (PCR#1). 1 μ g rekombinante Plasmid-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Das 3,2 kb DNA-Fragment entspricht dem PCR 2.1-TOPO Klonierungsvektor (Invitrogen), in welchem die Klonierungsstelle von *EcoRI*-Schnittstellen flankiert ist. Das 2,7 kb DNA-Fragment entspricht dem in B) amplifizierten PCR-DNA-Fragment. Es trägt keine interne *EcoRI*-Schnittstelle. Größenstandard: 1 kb

2.1.4.3 Die DNA-Sequenz und Exon-Intron-Grenzen des murinen Nidogen-2 Gens

Von den DNA-Sequenzen der einzelnen Exons des Nidogen-2 Gens wurden durch das GCG-Computerprogramm die entsprechenden Aminosäuresequenzen abgeleitet. Die Exon-Intronübergänge konnten durch DNA- und Aminosäure-Sequenzvergleiche dieser Exon-Sequenzen mit den bekannten Sequenzen der murinen Nidogen-2 cDNA (Kimura *et al.*, 1998; AC O88322) identifiziert werden (Abb. 2-6).

Um die gesamte, kodierende Sequenz des murinen Nidogen-2 Gens darzustellen, wurden die einzelnen Exonsequenzen mit Hilfe des GCG-Computerprogramm zusammengesetzt und die entsprechende Aminosäuresequenz abgeleitet (Abb. 2-5). Der Leserahmen der so erzeugten kodierenden DNA-Sequenz enthält 4209 Nukleotide, die für ein Protein mit 1403 AS kodieren (Abb. 2-5). Mit Hilfe des GCG-Computerprogramm PeptideSort wurde ein Molekulargewicht des Nidogen-2 Polypeptids (ohne Modifikationen) von 153910,67 g/mol errechnet, was 153,9 kDa entspricht. Die Grenzen der genetischen Module wurden durch die Internetdatenbank SMART bestimmt (Simple Modular Architecture Research Tool; www//SMART.embl-heidelberg.de; Schultz *et al.*, 2000). Die 3'-nichttranslatierte Region (3'-UTR) hat eine Länge von 575 bp.

DNA-Sequenzvergleiche der kodierenden Regionen der Nidogen-2 Gensequenz mit der murinen Nidogen-2 cDNA-Sequenz (Kimura *et al.*, 1998) ergaben Unterschiede an 36 Nukleotidpositionen. Dabei führten 9 Unterschiede jeweils zu einem Austausch in einer Aminosäure. Weitere DNA-Sequenzvergleiche zeigten, dass in der Nidogen-2 cDNA-Sequenz von Kimura *et al.* eine DNA-Duplikation einer Region in der 3'UTR vorhanden ist, welche weder in dem sequenzierten EST3.1-Klon (welcher die Nidogen-2 cDNA-Sequenz ab der kodierenden Nukleotidposition 1983 bis zum Polyadenylierungssignal trägt; 7.2) noch in der genomischen Nidogen-2 Sequenz auftreten (siehe 7.1). Die Unterschiede zwischen der Nidogen-2 Gensequenz mit der veröffentlichten cDNA Sequenz (Kimura *et al.*, 1998), bzw. dem sequenzierten EST3.1-Klons (siehe 7.2) sind im Anhang aufgelistet. (siehe Anhang 7.3).

In der Umgebung des Translationsstart-Codon ATG befindet sich normalerweise eine DNA-Sequenz die eine optimale Translation gewährleistet. Diese Konsensus-Sequenz in der mRNA lautet: GCCRCCAUGG (R=Purin; A oder G) und wird oft als Kozak-Sequenz bezeichnet (Kozak, 1987). Die entsprechenden Nukleotide der Nidogen-2 mRNA lauten: GUGAGCAUGT und zeigen 66,7% DNA-Sequenz-Identität mit der Kozak-Sequenz. Von besonderer Bedeutung ist weiterhin, dass sich auf der NT-Pos. -3 ein Purin befindet (Kozak, 1987). Dies ist in der Nidogen-2 Gensequenz mit einem Adenin (A) an dieser NT-Pos. der Fall.

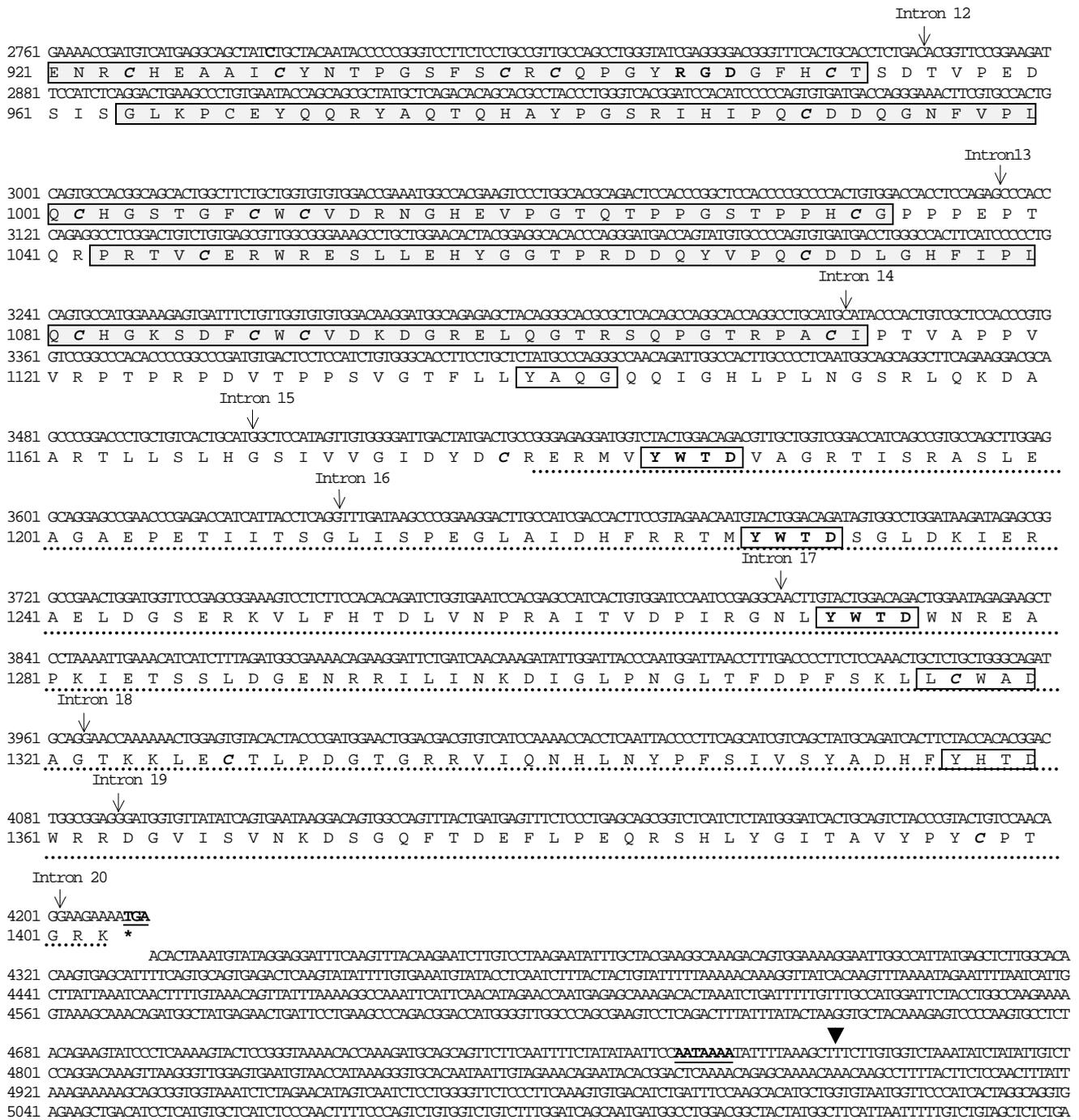


Abb. 2-5 Gen- und abgeleitete Proteinsequenz des Nidogen-2 Gens.

Die proteinkodierende Region vom Translationsstart-Codon ATG (Pos.:1-3) bis zum Stopp-Codon TGA (Pos.:4210-12) enthält 4209 Nukleotide, die für ein Protein mit 1403 AS kodieren. Das Signalpeptid (AS 1-30) ist unterstrichen und kursiv geschrieben. Die Cysteine sind fett und kursiv gedruckt. Das Polyadenylierungssignal AATAAAA (Pos.:4757-4764) in der 575 bp langen 3'UTR ist unterstrichen. Die Polyadenylierungsstelle (Pos.: 4778) ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Insertionsstellen der Introns sind durch senkrechte nach unten gerichtete Pfeile markiert. Die fünf EGF-ähnlichen Module (EGF-1: AS 507-547, EGF-2: AS 782-823, EGF-3: AS 824-866, EGF-4: AS 871-914, EGF-5: AS 915-953) und die zwei Thyroglobulin-ähnlichen Module (TY-1: AS 964-1034, TY 2: AS 1043-1113) sind durch schattierte Rahmen markiert und befinden sich jeweils auf einzelnen Exons. Die Lipoprotein-Rezeptor-ähnliche Region, die mit einer gepunkteten Linie unterstrichen ist; verteilt sich auf die Exons 16-21. Sechs YWTD-Konsensussequenzen (nach Springer, 1998) sind durch Kästen in dieser Region gekennzeichnet.

DNA-Sequenzanalysen zeigen, dass das Nidogen-2 Gen aus 21 Exons aufgebaut ist. Die Exons haben verschiedene Größen und variieren zwischen 113 bp (Exon20) und 728 bp (Exon4). Die Introns haben eine Größe von 119 bp (Intron20) bis 14 kb (Intron 2). Alle Exon-Introngrenzen befolgen die GT/AG-Regel (Abb. 2-6; Sharp & Burge, 1997). Introns, die Codon-Triplets nicht unterbrechen, werden mit Phase 0 bezeichnet, die Unterbrechung nach dem ersten Nukleotid des Triplets als Phase 1 und die Unterbrechung nach dem dem zweiten Nukleotid als Phase 2. 14 der 20 (70%) Introns trennen die Codons zwischen dem 1. und 2. Nukleotid, d.h. sie befinden sich in Phase I.

Exon Nr.	Exongröße (bp)	5' Spleiss-Donorseite Exon	3' Spleiss-Akzeptorseite Exon	Intron Nr.	Introngröße	Codon phase	Aminosäure an der Spleiss-Seite (Codon)
1	(a) 228	<u>C TAC</u> <i>gaag</i> <i>tagtag</i> <u>GTG G</u>	1	675bp ^{Seq}	0	Y (76)/ V (77)
2	309	<u>A GAG</u> <i>gaag</i> <i>acag</i> <u>CTG A</u>	2	~14kb ^R	0	E(179)/ L(180)
3	233	<u>AC CA</u> <i>gaag</i> <i>tttag</i> <u>G CTA</u>	3	~4,5kb ^R	2	Q (257)
4	728	<u>CAA G</u> <i>gaag</i> <i>dttag</i> <u>TC TTC</u>	4	~9kb ^R	1	V (500)
5	150	<u>GAA G</u> <i>ggatt</i> <i>tttag</i> <u>GG GCA</u>	5	593bp ^{Seq}	1	G (530)
6	246	<u>ACA G</u> <i>ggag</i> <i>dgag</i> <u>GT GCT</u>	6	~1kb ^R	1	G (632)
7	201	<u>TCA G</u> <i>gatg</i> <i>ttacag</i> <u>TC GTG</u>	7	~1,5kb ^R	1	V (699)
8	231	<u>GAA G</u> <i>gatg</i> <i>acatag</i> <u>TG GAC</u>	8	~3,5kb ^R	1	V (776)
9	144	<u>GTG G</u> <i>ggag</i> <i>gtag</i> <u>AT GTC</u>	9	463bp ^{Seq}	1	D (824)
10	129	<u>ATC T</u> <i>ggag</i> <i>ttccag</i> <u>TG ATC</u>	10	~1,5kb ^{PCR}	1	L (867)
11	144	<u>TCT G</u> <i>ggag</i> <i>dgag</i> <u>AT GTT</u>	11	~ 5,5kb ^{PCR}	1	D (915)
12	119	<u>TCT G</u> <i>gaag</i> <i>ctcag</i> <u>AC ACG</u>	12	~2kb ^R	1	D (955)
13	234	<u>CCA G</u> <i>ggag</i> <i>dttag</i> <u>AG CCC</u>	13	~4kb ^{PCR}	1	D (1038)
14	222	<u>GCA T</u> <i>gaag</i> <i>aaacag</i> <u>GC ATA</u>	14	~0,9kb ^{PCR}	1	C (1112)
15	170	<u>G CAT</u> <i>gaaac</i> <i>tcaag</i> <u>GGC T</u>	15	~2,5kb ^{PCR}	0	H(1168)/ G(1169)
16	130	<u>TCA G</u> <i>gcag</i> <i>ttcag</i> <u>GT TTG</u>	16	415bp ^{Seq}	1	G (1212)
17	172	<u>GA GG</u> <i>gtag</i> <i>acag</i> <u>C AAC</u>	17	~2,5kb ^{PCR}	2	G (1269)
18	158	<u>GCA G</u> <i>gaaata</i> <i>taaaag</i> <u>GA ACC</u>	18	~1,7kb ^{PCR}	1	G (1322)
19	124	<u>GG AG</u> <i>ggag</i> <i>tatag</i> <u>G GAT</u>	19	849bp ^{Seq}	2	R (1363)
20	113	<u>ACA G</u> <i>ggag</i> <i>tcag</i> <u>GA AGA</u>	20	119bp ^{Seq}	1	G (1401)
21	(a) 11						
b) Konsensus-Sequenz		<u>KAG</u> gtragt00	Yyyoyag <u>Goo</u>				

Abb. 2-6 Darstellung der Exon-Intronübergänge, Codonphasen, Exon- und Introngrößen

Die Exonsequenzen sind in Großbuchstaben und unterstrichen und Intronsequenzen in Kleinbuchstaben und kursiv gedruckt, dargestellt. Die Länge der 5'UTR in Exon 1 und der 3'UTR in Exon 21 sind nicht angegeben (a). Die Exongrößen reichen von 113bp (Exon20) bis 728 (Exon4) und die Introngrößen von 119bp (Intron 20) bis ~9kb (Intron 4). Die Introngrößen wurden durch Restriktionsanalyse (^R), Sequenz- (^{Seq}) oder PCR-Reaktionen (PCR) bestimmt. b) Konsensussequenz für U2-Typ GT-AG Introns (Sharp & Burge, 1997)(k= A oder C; y= Pyrimidin, (T oder C); r = Purin (A oder G); o kein Konsens vorhanden). Aminosäuren, die an Spleiss-Seiten des Gens kodiert werden, sind im Einbuchstaben-Code und ihre Sequenzposition in Bezug zum ersten Translationsstart-Codon aufgeführt.

2.1.5 Analyse der Promotorregion des Nidogen-2 Gens

Proteinkodierende Gene werden durch die RNA-Polymerase II transkribiert, deren Wechselwirkungen mit der DNA ihre Aktivität und Regulation im 5'Vorschaltbereich (Promotorregion) dieser Gene erfolgt. Jeder Promotor zeichnet sich durch eine charakteristische Auswahl kurzer, konservierter Sequenzelemente aus, die von passenden Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen erkannt werden. Ausgeprägte Sequenzvariationen und der modulare Aufbau der Promotoren ermöglichen unterschiedliche Kombinationen von Regulationselementen. Der Ausgang für die Untersuchung eines Promotors ist die Festlegung des Startpunktes der Transkription, an welchem die Synthese der mRNA(-Vorläufer RNA) beginnt. Im Rahmen dieser Arbeit stand die funktionelle Charakterisierung der Promotorregion des murinen Nidogen-2 Gens nicht im Vordergrund, deshalb wurde der Transkriptionsstartpunkt experimentell nicht ermittelt, wohingegen die DNA-Sequenzen flussaufwärts des Translationsstart-Codons des murinen Nidogen-2 Gens (NT-Pos. 1-3; siehe Abb. 2-5) durch DNA-Sequenzierung bestimmt wurden (siehe 2.1.4.1). Um diese Region als mögliche Promotorregion zunächst aufgrund von bedeutsamen Promotor-Sequenzelementen, wie z.B. TATA-Box, CCAATT-Box, GC-Box zu charakterisieren (Bucher, 1990), wurde in einer 481bp flussaufwärts gelegenen Region mit dem Computerprogramm MatInspector (Quandt *et al.*, 1995) nach konservierten DNA-Sequenzen gesucht, die eine signifikante DNA-Sequenzidentität mit den Konsensussequenzen von entsprechenden Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (Motiv) zeigen. Weiterhin wurden DNA-Sequenzvergleiche mit den Promotor-Sequenzen des humanen Nidogen-2 Gens und des murinen Nidogen-1 Gens durchgeführt.

Durch das Computerprogramm MatInspector (<http://genomatix.gsf.de>) konnten 30 DNA-Sequenzen gefunden werden, die mindestens 90% DNA-Sequenzidentität mit Konsensus-Sequenzen bestimmter, charakteristischer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen haben. Eine Auswahl der gefundenen Elemente wird nachfolgend kurz zusammengefasst und ist in Abb. 2-7 dargestellt:

Von den drei Grundelementen eines eukaryontischen Promotors, TATA-Box, CCAATT-Box und GC-Box konnten die letzten zwei bis jetzt nur aufgrund der hohen Sequenzidentitäten in der o. a. untersuchten Nidogen-2 Gensequenz identifiziert werden, jedoch fehlt in dieser Region ein TATA-Box ähnliches Sequenzelement. Eine GC-Box-Motiv mit einer DNA-Sequenzidentität von 91,9% mit der charakteristischen SP1-Konsensussequenz (stimulating protein 1) wurde 107bp flussaufwärts des Translationsstart-Codons gefunden. Daran anschließend an Position - 111bp befindet sich eine CCAAT-Box-Motiv mit einer sehr hohen

DNA-Sequenzidentität von 99,7% zu der entsprechenden Konsensus-Sequenz (Bucher, 1990; Positionen in der Sequenz siehe Abb. 2-7). Weiterhin wurden zwei AP1-Motive (activating protein-1; in antigenomischer Orientierung) in der untersuchten Promotorregion (siehe Abb. 2-7) identifiziert. An AP-1 Motive können Hetero- bzw. Homodimere der Proteine Fos und Jun, sowie verschiedene andere Transkriptionsfaktoren binden, die einen Einfluss auf viele biologische Funktionen haben (für eine kurze Übersicht siehe Michael *et al.*, 1997). Schließlich wurden auch potentielle DNA-Sequenzelemente mit sehr hohen DNA-Sequenzidentitäten zu Bindungsstellen für die weniger charakterisierten Transkriptionsfaktoren deltaEF1 (Sekido *et al.*, 1994), IK-2 (Molnar *et al.*, 1994), v-ErbA (Subauste *et al.*, 1995), c-Myb (Howe *et al.*, 1991), Gfi1 (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996) und Th1/E47 (Hollenberg *et al.*, 1995) in der Promotorregion des murinen Nidogen-2 Gens gefunden (siehe Abb. 2-7).

Um durch DNA-Sequenzvergleiche zu sehen, ob bestimmte DNA-Sequenzelemente in der Promotor-Region des murinen und humanen Nidogen-2-Gens bzw. des murinen Nidogen-1 Gens konserviert sind, wurde das GCG-Computerprogramm BestFit, für die Bestimmung der optimalen Anordnung zweier Sequenzen eingesetzt. Dadurch zeigte sich über eine 1088 bp lange Region eine Sequenzidentität von signifikanten 70,5 % zwischen den Promotoren des murinen und des humanen Nidogen-2 Gens (Ohno *et al.*, unveröffentlichte Sequenzen EMBL-Genbank Registriernummer: AB009777). Die Promotorregionen des murinen Nidogen-1 (Durkin *et al.*, 1993; EMBL-Genbank Registriernummer: L17322) und des Nidogen-2 Gens zeigen eine DNA-Sequenzidentität von 37,3% über 779 bp.

Durch das Computerprogramm MatInspector (Quandt *et al.*, 1995) wurden weiterhin potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der entsprechenden humanen Nidogen-2 Promotorregion gesucht. Wie schon für die murine Nidogen-2 Promotorregion beschrieben, fehlt in der untersuchten humanen Promotorregion eine typische TATA-Box, jedoch sind CCAAT- und GC-Boxen und eine Reihe anderer Motive erhalten geblieben. Folgende Motive konnten identifiziert werden:

- 1) zwei CCAAT-Boxen (CCAAT-BOX 1: NT-Pos. -107 bis -97 in genomischer Orientierung (+); CCAAT-Box2: NT-Pos. -129 bis -117 in antigenomischer Orientierung (-)),
- 2) drei SP1-Motive (SP1, NT-Pos.: -71 bis -58 (-); SP2, NT-Pos.: -78 bis -64 (-); SP3, NT-Pos.: -264 bis -252 (+)), wobei aber zwei SP1-Motive (SP1 und SP2) überlappen -
- 3) vier AP4-Motive, jedoch keine AP1-Motiv.
- 4) ein Gfi1-Motiv (NT-Pos.: -138 bis -115 (-)
- 5) zwei Ik2-Motive: (Ik2 1, NT-Pos.: -78 bis -68 (-); Ik2 2, NT-Pos.: -394 bis -382
- 6) ein c-Myb-Motiv (NT-Pos.: -465 bis -449)

A)

-481 aggcctctagcgagaggggtacccccggaccctagggcagggcggaactccagtggttc -422
-421 attacctccctcgctctgccaacccagtgcgcacagtcgctcctgccagagctgcacg -362

AP1 (-)

-361 cgcgccgagggctctgccagcccttgaggtcaccctcctgcagcgtcgtagcctacactgg -302
v-ErbA (+)
...cctgccagcccttgaggtcacctcc...

IK-2 (+)

-301 agagttgggggtagcccaggagtagttgggacagccctagaccagaccgggccaacggcct -242
cMyb (-)
...gggccaacggcct

deltaEF1 (+)

-241 caccttccagcccggccactccagcaaacctacagcagtccttagaaaacctaataagagaacc -182
caccttcc...

AP-1 (-)

-181 acatgtagaggccgctggcgaactttctcagagtcgctgattgtcaggtggccgagagct -122
Gfi-1 (-)
...ctcagagtcgctgattggtcagt...

CCAAT-BOX (+) SP-1 (+) TH1/E47 (+)

-121 gtagccaatcagcgcgctgggcgggccccgtattgctggaccagaggtccaagttggagtcct -62

-61 ggcgggcagagtgggcccgagagacttgctggagtgaggggcagagccagggaggagtgag - 2

1 **Exon1**

-1 **cATG**TTTCGGGACCCGACAGCCGGGTGGCTAACACCGCCATCACCGCTATCGCTGCTGGT 59
M F R D P T A G W L T P P S P L S L L V

B)

Transkriptionsfaktoren Bindungsstelle	NT-Pos.	DNA-Sequenzidentität mit der Konsensussequenz
CCAAT-Box	-122 bis -111	99,7%
delta EF1	-243 bis -235	96,4%
Ik-2	-279 bis -268	95,8%
v-ErbA	-342 bis -326	95,2%
2 x AP1	-331 bis -329 -144 bis -134	94,8% 92,3%
c-Myb	-255 bis -235	92,8%
Gfi-1	-156 bis -134	92,1%
Th1/E47	-71 bis -56	92,0%
SP-1	-107 bis -95	91,9%

Abb. 2-7 Promotorregion des murinen Nidogen-2 Gens mit potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen.

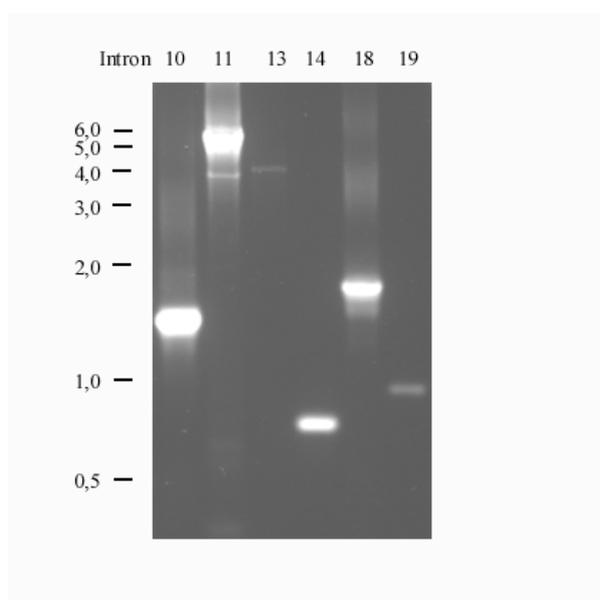
A) 481 Nukleotide der Promotorsequenzen (-481 bis -1; Kleinbuchstaben) und 59 Nukleotide der kodierenden Region (1-59; Großbuchstaben) des Nidogen-2 Gens sind dargestellt. Das Translationsstart-Codon ATG des Exon 1 ist fett gedruckt. Die Konsensus-Sequenzen für potentielle Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren sind in der Promotorregion unterstrichen. Innerhalb dieser markierten Regionen werden für die Bindung des Transkriptionsfaktors besonders wichtige Nukleotide durch einen Rahmen hervorgehoben.

B) Tabellarische Übersicht der mit dem Computerprogramm gefundenen Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen, die Sequenzidentitäten mit den entsprechenden Konsensussequenzen und den NT-Pos. Die NT-Pos. sind hier relativ zu dem Translationsstart-Codon ATG mit den NT-Pos 1-3 definiert.

2.1.6 Bestimmung der Introngrößen

Durch DNA-Sequenzanalysen konnten die Introns 5, 9, 16, 19 und 20 komplett sequenziert und aus den DNA-Sequenzdaten die Introngrößen ermittelt werden (siehe Abb. 2-6 und 7.4). Durch Restriktionskartierung und DNA-Sequenzanalysen wurden annäherungsweise die Introngrößen für die Introns 1-4, 6-8 und 12 bestimmt (siehe Abb. 2-6). Die Größen der Introns 10, 11, 13, 14, 18 und 19 wurden annäherungsweise durch PCR-Reaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden ermittelt (siehe Abb. 2-8 und Abb. 7-2). Dadurch wurde auch eine eindeutige Anordnung der Exons 10, 14 und 18 möglich. Die ermittelten Introngrößen erlauben eine eindeutige Anordnung der einzelnen Exons des murinen Nidogen-2 Gens auf der physikalische Karte der rekombinanten λ -Phagen möglich (siehe Abb. 2-2).

A)



B)

Intron	Oligonukleotid-paar	Lage	Matrize	Intron Größe (kb)	Kommentar
10	ND33/ND50	Exon 10 und 11	4-72#51	~1,5	Sequenz
11	ND34/ND51	Exon 11 und 12	4-72#51	~5,5	
13	ND36/ND95	Exon 13 und 14	4-72#51	~4,0	
14	ND37/ND96	Exon 14 und 15	4-72#51	~0,7	Sequenz
18	ND39/ND55	Exon 18 und 19	3-1#57	~1,7	Sequenz
19	ND40/ND97	Exon 19 und 20	3-1#57	~1,0	

Abb. 2-8 Bestimmung der Introngrößen durch PCR-Technik

Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Reaktionsprodukte in einem 1% Agarosegel. Die ungefähren Größen der Introns 10, 11, 13, 14, 18 und 19 konnten nach Auswertung der PCR-Reaktionsprodukte ermittelt werden.

B) Übersicht der in PCR-Experimenten zur Analyse der Introngrößen verwendeten Oligonukleotide und Matrizen. Positionen der verwendeten Matrizen und Oligonukleotide sind im Anhang 7.1 in Abb. 7-3 und Abb. 7-4 gezeigt. Die Lage der Introns 10, 14 und 18 konnte durch DNA Sequenzanalysen bestätigt werden (siehe Anhang 7.4.)

2.1.7 Vergleichende Darstellung der Genstrukturen des murinen Nidogen-1 und Nidogen-2, sowie des humanen Nidogen-2

Die Kombination der Restriktions- (Abb. 2-1 A), Southern Blot- (Abb. 2-1 B), PCR- (Abb. 1-7) und Sequenzanalysen (siehe Kapitel 2.1.4.1-2.1.4.3 und 2.1.5) erlaubten in der erstellten physikalische Karte der rekombinanten λ -Phagen (siehe Kapitel 2.1.2 - 2.1.3) die 21 Exons und 20 Introns des Nidogen-2 Gens eindeutig anzuordnen (siehe Abb. 2-2). Der Gen-Locus des murinen Nidogen-2 Gens erstreckt sich über ca. 60 kb. Dies entspricht der Größe des humanen Nidogen-2 Gen-Locus. Die Genstruktur des humanen Nidogen-2 wurde aus nichtveröffentlichten DNA-Sequenzen der einzelnen Exons und Introns abgeleitet (EMBL-Gendatenbank Registriernummern der einzelnen DNA-Sequenzen des Nidogen-2 (Osteonidogen)-Gens: AB009778 (Exon 1) - AB009799 (Exon 22), AB009800 (Intron 1) - AB009820 (Intron 20), eingereicht am 6.1.1998 von Ohno *et al.*). Die Genstrukturen des murinen und humanen Nidogen-2 weisen eine sehr starke Ähnlichkeit auf (Abb. 2-9), d.h. die Lage und Zahl der Exons und Introns der beiden Nidogen-2-Gene stimmt mit einer Ausnahme überein. Das humane Nidogen-2 Gen weist ein Exon und ein Intron mehr als das Nidogen-2-Gen der Maus auf. Dieser Unterschied betrifft das Exon 4 des Nidogen-2-Gens der Maus und die Exons 4 und 5, einschließlich das Intron 4 des humanen Nidogen-2 Gens. Dieser besondere Aspekt der Genstrukturen wird in 2.1.8 beschrieben. Der murine Nidogen-1 Genlocus ist mit mindestens 65 kb (Durkin *et al.*, 1995) und der humane mit mindestens 90 kb (nicht dargestellt; Zimmermann *et al.*, 1995) länger als der murine Nidogen-2 Locus (Abb. 2-9).

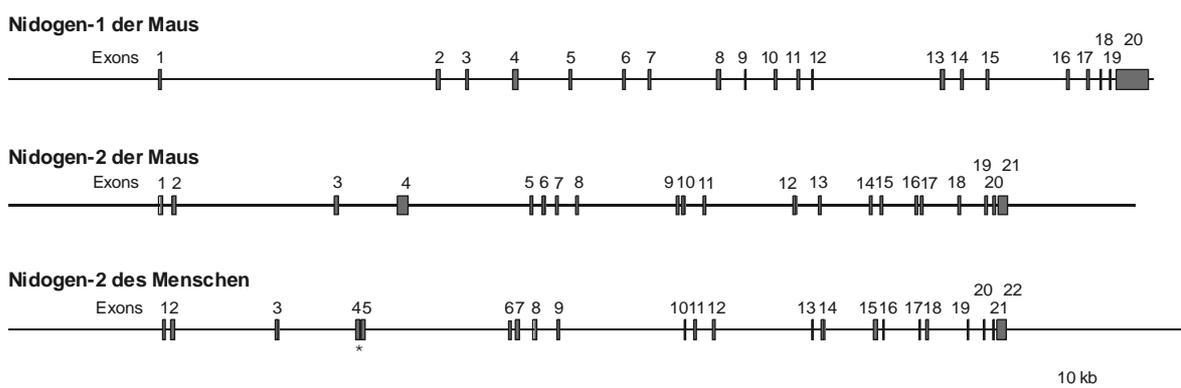


Abb. 2-9 Schematische Darstellung der Genstrukturen der murinen Nidogene 1 und 2, sowie des humanen Nidogen-2. Größenstandard 10 kb.

2.1.8 Besonderheit des Exon 4 des murinen Nidogen-2-Gens

Der DNA-Sequenzvergleich von genomischen Exon4 DNA-Sequenzen des Nidogen-2 Gens der Maus mit der publizierten cDNA-Sequenz für Nidogen-2 (Kimura *et al.*, 1998) zeigt eine vollständige Sequenzübereinstimmung ohne Unterbrechung (kein Intron) über die entsprechende Region. Das Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens stellt mit 728 bp ein relativ großes Exon dar und die Ableitung der Aminosäuresequenz von der Exon 4 DNA-Sequenz zeigt, dass das Exon 4 für die komplette 243 AS große flexible Verbindungsregion zwischen den globulären G1- und G2-Domänen kodiert. Es stellte sich die Frage, ob die flexible Verbindungsregion auch im humanen Nidogen-2 Gen auch auf einem großen Exon kodiert ist. DNA-Sequenzvergleiche der kompletten Exon 4-Sequenz des murinen Nidogen-2 mit den entsprechenden genomischen DNA-Sequenzen des humanen Nidogen-2-Gens (von Ohno *et al.*, unveröffentlicht. EMBL-Genbankregistriernummern: Exon 4 = AB009781, Intron 4 = AB009803, Exon 5 = AB009782, siehe 2.1.7) führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Im humanen Nidogen-2-Gen sind die Sequenzen, die für die flexible Verbindungsregion kodieren und der homologen DNA-Sequenz des kompletten murinen Exon 4 entsprechen, nicht auf einem Exon, sondern auf zwei Exons, Exon 4 und 5 verteilt (Abb. 2-10 A). Die DNA-Sequenzidentitäten der Exons des humanen Nidogen-2 Gens mit den homologen Regionen des murinen Exon 4 betragen 72,6% (Exon 4; 301 bp) und 65, 8% (Exon 5; 360 bp). Die Aminosäure-Sequenzidentität der beiden humanen Exons in der flexiblen Verbindungsregion mit dem murinen Exon 4 sind 67, 3% (Exon 4) und 48, 2% (Exon 5).

2. Das 81 bp kurze Intron 4 des humanen Nidogen-2-Gens zeigt überraschenderweise eine signifikante DNA-Sequenzidentität von 62,5 % zu Exon 4-Sequenzen des murinen Nidogen-2 Gens. Die Identität dieser Intron 4-Sequenzen im humanen Nidogen-2 Gen als funktionelles Intron wird bestätigt durch:

- a) ihre Abwesenheit in der publizierten (Kohfeldt *et al.*, 1998, EMBL-Gendatenbank Restriernummer: AJ223500) und der nichtpublizierten (Ohno *et al.*, unveröffentlichte mRNA-Sequenz für Nidogen-2 (Osteonidogen); EMBL-Gendatenbank, 9.7.1996, Registriernummer: D86425) cDNA-Sequenz für das humane Nidogen-2 und
- b) die Anwesenheit von Donor- und Akzeptor-Spleiss-DNA-Sequenzen, die eine DNA-Sequenzidentität von 68% mit den Spleiss-Konsensussequenzen für U2-Typ Introns aufweisen (Sharp & Brugge, 1997).

Aus den o.a. Sequenzanalysen ergaben sich folgende Fragen und Antworten:

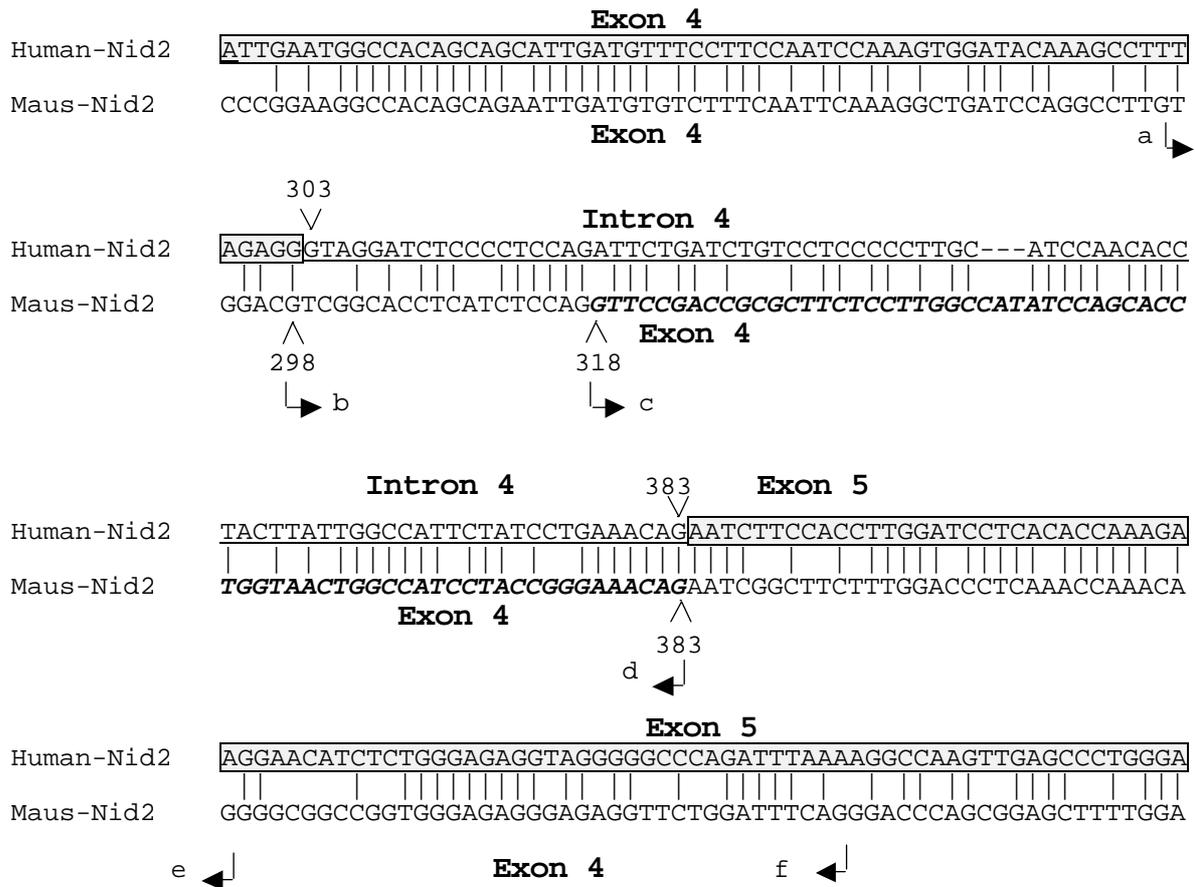
1. Kann die Intron 4-Sequenz auch beim Ausbleiben des Spleissvorgangs eine alternative Funktion als Exon-Sequenz haben und dabei den natürlichen Leserahmen des Nidogen-2 erhalten?

Die Ableitung der Aminosäuresequenz von den DNA-Sequenzen des Exon 4, Intron 4 und Exon 5 im durchgängigen Leserahmen zeigt, dass der Leserahmen in dieser Region durch die Anwesenheit der Intron-Sequenzen nicht geändert wird. Somit könnte man die gesamte Region (Exon 4, Intron 4 und Exon5) alternativ als ein potentiell durchgängiges Exon betrachten. Das würde die Anwesenheit von zusätzlich 27 AS in der flexiblen Verbindungsregion des humanen Nidogen-2 Genprodukts zur Folge haben (Abb. 2-12 B). Damit wäre die gesamte flexible Verbindungsregion des humanen Nidogen-2 auf einem Exon kodiert, wie es für das murine Nidogen-2 Gen gezeigt wurde. Das Vorhandensein dieser möglichen alternativen mRNA-Sequenz für das humane Nidogen-2 könnte durch RT-PCR-Technologie mit verschiedenen RNAs und anschließenden DNA-Sequenzanalysen experimentell überprüft werden. Diese Experimente wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht durchgeführt.

2. Können DNA-Sequenzen im Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens, die eine signifikante DNA-Sequenzidentität mit den Intron 4 Sequenzen des orthologen humanen Gens aufweisen, alternativ auch als Intron funktionell sein?

Um diese Frage zu beantworten wurde zunächst die betreffende Region des Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens auf potentielle Spleiss-Donor- und Akzeptor-Seiten untersucht (Abb. 2-10 A). Von den sechs identifizierten potentiellen Spleiss-Stellen eignet sich jedoch nur eine bestimmte Spleiss-Donor- und Akzeptor-Kombination (Kombination c-d; Abb. 2-9). Diese schließt eine 66 bp kurze potentielle Intronsequenz im Exon4 ein und würde den Leserahmen der alternativen Nidogen-2 mRNA nach dem Spleissen dieser Intronsequenz nicht verändern. Die Entfernung dieser 66 bp Exon 4-Sequenzen aus der murinen hnRNA würde die flexible Verbindungsregion des Nidogen-2 Genprodukts um 22 AS verkürzen (Abb. 2-10 B). Die DNA-Sequenzen an Spleissdonor- und Akzeptorseite der Kombination (c-d) zeigen jedoch eine schwache DNA-Sequenzidentität von nur 44% mit den Spleiss-Konsensussequenzen für U2-Typ Introns (Sharp & Brugge , 1997).

A) DNA-Sequenzvergleich



B)

Mensch *nidogen-2-alt.* .QSKVDTKPLEGRISPPDSLSSPLHPTPTYWPFYPETESSTLDPHTKEG

Mensch NIDOGEN-2 QSKVDTKPLE.....ESSTLDPHTKEG

Maus NIDOGEN-2 NSKADPGLVDVGTSSP**GS**DRASPWPYPAPGNWPSYRET**ES**ASLDPQTK

Maus *nidogen-2-alt.* NSKADPGLVDVGTSSP.....ESASLDPQTK

Abb. 2-10 A) Ausschnitt eines DNA-Sequenzvergleichs des murinen Nidogen-2 Exon4 (Maus-Nid2; NT-Pos. relativ zum 5'-Ende des Exon 4) mit der entsprechenden Region des humanen Nidogen-2 Gens (Exon4, Intron4 und Exon5; NT-Pos. relativ zum 5'-Ende des Exon 4).

Die Sequenzen der humanen Exons 4 und 5 (mit Rahmen formatiert) werden durch das Intron 4 (unterstrichen) getrennt (NT-Pos 303-383; Kohfeldt *et al.*, 1998). Im Exon 4 des Maus Nidogen-2-Gens befindet sich ein Sequenzabschnitt (NT-Pos. 298-383; siehe Abb. 2-5), der eine signifikante DNA-Sequenzidentität zum humanen Intron 4 aufweist. Potentielle Spleiss-Donor (a,b,c) und -Akzeptorseiten (d,e,f) in dieser Sequenz sind durch Pfeile markiert. Innerhalb dieser Region liegt eine 66 bp DNA-Sequenz (fett und kursiv gedruckt), die von einer potentiellen Spleiss-Donor (c) und -Akzeptorseite (d) flankiert wird. Die Entfernung dieser 66 NT als Intronsequenz in einer hnRNA würde den natürlichen Nidogen-2-Leserahmen nicht verschieben.

B) Der Aminosäuresequenz-Ausschnitt aus der flexiblen Verbindungsregion des Nidogen-2 von Mensch (Mensch NIDOGEN-2; Kohfeldt *et al.*, 1998) und Maus (Maus NIDOGEN-2; Kimura *et al.*, 1998, siehe Abb. 2-11 in diese Arbeit) und potentielle alternative Nidogen-2 Isoformen (**Mensch *nidogen-2-alt.***, **Maus *nidogen-2-alt.***) sind im Vergleich dargestellt. Die entsprechenden alternativen Aminosäuresequenzen in den Nidogen-2 Isoformen sind fettgedruckt und unterstrichen. In einer alternativen humanen Nidogen-2 Isoform (**Mensch *nidogen-2-alt.***) würde eine Insertion von 28 AS durch die Anwesenheit der Intron 4-Sequenzen in der mRNA erfolgen. Wohingegen die Entfernung von 66 NT aus dem Exon 4 als alternative Intronsequenzen in der murinen Nidogen-2 hnRNA, eine Deletion von 22 AS in der Verbindungsregion der bekannten Nidogen-2 Sequenz (Maus NIDOGEN-2) zur Folge hätte. Somit würde eine alternative Maus Nidogen-2 Isoform (**Maus *nidogen-2-alt.***) entstehen.

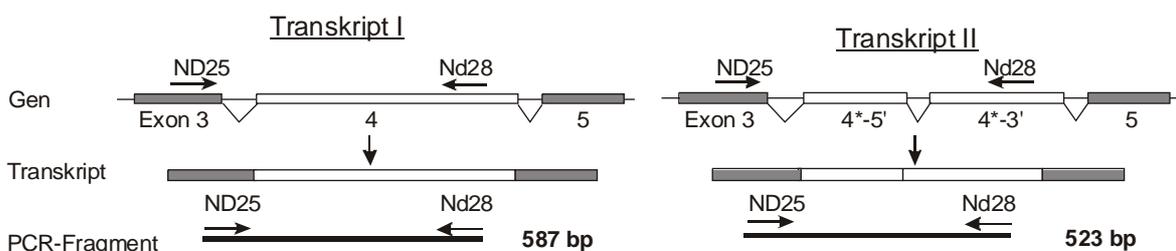
Zur Überprüfung der Annahme, dass das murine Exon 4 alternativ intern gespleisst werden kann, wurde polyA⁺-RNA von verschiedenen Organen der Maus durch RT-PCR-Technik auf die Anwesenheit dieser potentiell alternativen Nidogen-2 mRNA-Sequenz in der entsprechenden RNA-Region untersucht.

Die verwendeten Oligonukleotide flankieren die potentiell gespleiste Region (Abb. 2-11). Als Matrize wurden je 10 ng polyA⁺-RNA aus Herz, Lunge, Niere und Skelettmuskel aus C57/Bl6 Mäusen verwendet. Folgende RT-PCR-DNA-Fragmente sind theoretisch zu erwarten:

1. Die bekannte murine Nidogen-2 mRNA (Transkript I) als Matrize sollte mit dem Oligonukleotidpaar ND25/ND28 ein 587bp großes RT-PCR-DNA-Fragment ergeben.
2. Falls das Exon 4 intern alternativ gespleisst werden kann, entsteht ein alternatives Nidogen-2-Transkript (Transkript II). Unter der Voraussetzung, dass dieses Transkript in der entsprechenden mRNA ausreichend vorhanden ist, würde man mit dem Oligonukleotidpaar ND25/ND28 ein verkürztes RT-PCR-DNA-Fragment von 523bp erwarten.

Mit den gewählten Oligonukleotiden und mit verschiedenen polyA⁺-RNAs konnte unter den durchgeführten RT-PCR-Reaktionsbedingungen jedoch nur ein ~580 bp RT-PCR-DNA-Fragment nachgewiesen werden. Der Nachweis eines 523 bp RT-PCR-DNA-Fragments von einem potentiell alternativen Transkript II war nicht möglich. Das ~580 bp DNA-Fragment entspricht dem erwarteten RT-PCR-Produkt von Transkript I.

A)



B)

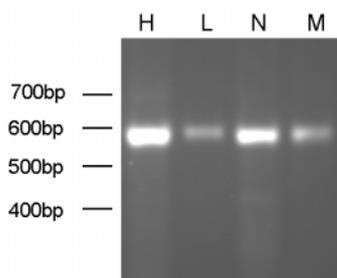


Abb. 2-11 RT-PCR-Analyse. A) Schematische Abbildung der Nidogen-2-Genregion, die für die flexible Verbindungsregion kodiert. Die Lage der Oligonukleotide ist durch Pfeile markiert (ND25 „sense“-Orientierung; ND28 in „antisense“-Orientierung). Das zu erwartende RT-PCR-DNA-Fragment von Transkript I hat eine Größe von 587bp. Falls das Exon 4 intern gespleisst werden sollte (alternatives Intron-4), entsteht eine kürzere mRNA (Transkript II). Infolgedessen sollte ein 523bp RT-PCR-DNA-Fragment entstehen.

B) Die RT-PCR-Reaktionsprodukte wurden elektrophoretisch in einem 1.5% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Mit dem Oligonukleotidpaar ND25/ND28 und mit verschiedenen PolyA⁺-RNAs als Matrize war nur ein ~580bp RT-PCR-DNA-Fragment im Agarosegel sichtbar, das dem Transkript als Matrize entspricht. H=Herz, L=Lunge, N=Niere, M=Skelettmuskel. Größenstandard 100bp.

2.1.9 Die Analyse der Primärstruktur des murinen Nidogen-2 und der Bezug zur Genstruktur

Die modulare Genstruktur des murinen Nidogen-2 Gens hat eine Entsprechung in der resultierenden Proteinstruktur. Durch Vergleiche mit den bekannten Strukturen des humanen und murinen Nidogen-1 (siehe auch Einleitung 1.2.3.1; Durkin *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 1995), unter Berücksichtigung der Primärstruktur-Analyse der von der humanen Nidogen-2 cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz und der elektronenmikroskopischen Strukturanalysen des rekombinant hergestellten Proteins (Kohfeldt *et al.*, 1998), lassen sich die globulären G1-, G2- und G3-Domänen, sowie die flexible (zwischen G1 und G2) und die starre Verbindungsregion (zwischen G2 und G3) des murinen Nidogen-2 Proteins bestimmten Exons zuordnen. Als Domäne werden strukturelle Einheiten der Proteine bezeichnet, die eine eigenständige Faltung aufweisen (Bork *et al.*, 1996). Die Exons 1-3 kodieren für die G1-Domäne, die den Exons 5 bis 8 kodieren für die G2-Domäne und die Exons 15 bis 21 kodieren für die G3 Domäne (Abb. 2-12). Die flexible Verbindung zwischen der G1- und G2-Domäne wird im murinen Nidogen-2, aber auch im murinen Nidogen-1 (Durkin *et al.*, 1995) und humanen Nidogen-1 (Zimmermann *et al.*, 1995), von einem Exon, dem Exon 4 kodiert, wohingegen sie im humanen Nidogen-2 von zwei Exons kodiert wird, dem Exon 4 und 5 (unveröffentlichte Sequenzen von Ohno *et al.*, 1998 siehe 2.1.7).

Als Module werden Untereinheiten von Domänen bezeichnet, die sich in verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen befinden können und eine Konsensussequenz besitzen (Bork *et al.*, 1996). Die fünf Epidermal Growth Factor (EGF)-ähnlichen (EGF-1: AS 507-547; EGF-2: AS 782-823; EGF-3: AS 824-866; EGF-4: AS 871-914; EGF-5: AS 915-953) und die zwei Thyroglobulin (TY)-ähnlichen Module (TY-1: AS 964-1034; TY-2: AS 1043-1113) werden von einzelnen Exons des murinen Nidogen-2 Gens kodiert. Die Lipoprotein-Rezeptor-ähnliche Region mit sechs charakteristische YWTD Motiven (Springer, 2000) wird von den Exons 15-21 kodiert.

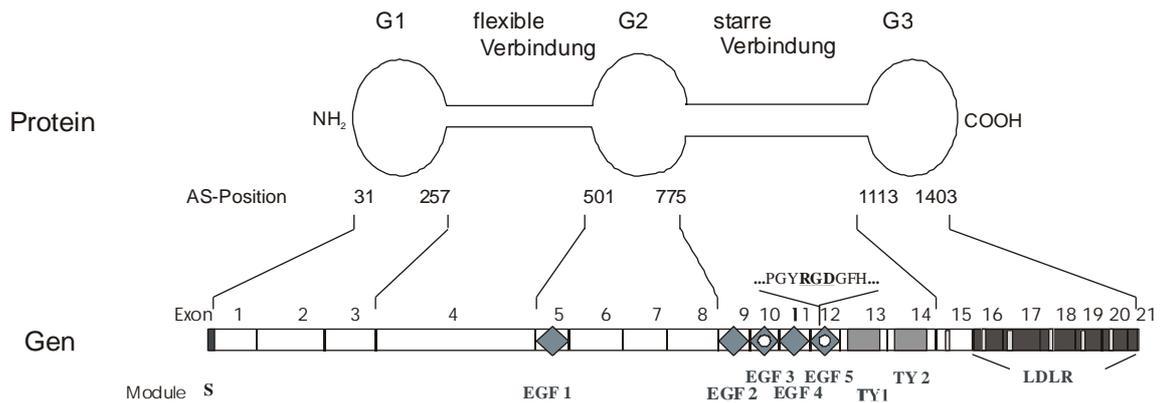


Abb. 2-12 Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen der modularen Genstruktur (unten) und der Proteinstruktur des murinen NIDOGEN-2 (oben).

In der schematisch dargestellten Genstruktur sind die Exons als Rechtecke und Introns als dünne, senkrechte Balken zu sehen. Die hypothetischen Aminosäure-(AS)-Positionen der Grenzen der globulären Domäne G1-, G2- und G3-Domänen ergeben sich aus Sequenz- und Strukturvergleichen mit Nidogen-1, sowie der Positionen der EGF-ähnlichen, bzw. Thyroglobulin-ähnlichen Modulen. Die Nidogen-2 Gensequenzen, die für die fünf EGF-ähnlichen (EGF1-5 graue Rauten; EGF-3 und -5 mit Ca²⁺ Bindungsstelle; weißer Punkt) und die 2 Thyroglobulin-ähnlichen Module (TY1 und -2; hellgraue Rechtecke) kodieren, befinden sich auf einzelnen Exons in der Codonphase 1. Die LDL-Rezeptor ähnliche Regionen (LDLR; dunkelgraue Rechtecke) werden von den Exons 15-21 kodiert. Diese beinhalten auch sechs charakteristische YWTD-Motive (nach Springer, 1998; helle Rechtecke). Das Integrin-Bindungsmotiv -RGD- wird in Exon 12 kodiert. Die flexible Verbindung zwischen den globulären G1- und G2-Domänen im Nidogen-2 der Maus ist auf einem einzigen großen Exon 4 kodiert, wohingegen im humanen Nidogen-2Gen die Exons 4 und 5 für die entsprechende Verbindungsdomäne kodieren.

Die modularen Genstrukturen des murinen Nidogen-1 und -2 wurden miteinander verglichen (Abb. 2-13). Alle EGF-ähnlichen, sowie Thyroglobulin-ähnlichen Module werden in beiden murinen Nidogen-Genen von einzelnen Exons kodiert. Auffallend ist, dass sich alle Exons, die für diese Module kodieren von Introns in der Phase I unterbrochen werden (siehe Abb. 2-6). Weiterhin wird die gesamte LDLR-ähnliche Regionen von Introns flankiert, die sich in Phase 1 befinden, obwohl sich innerhalb dieser Region Introns in unterschiedlichen Phasen befinden.

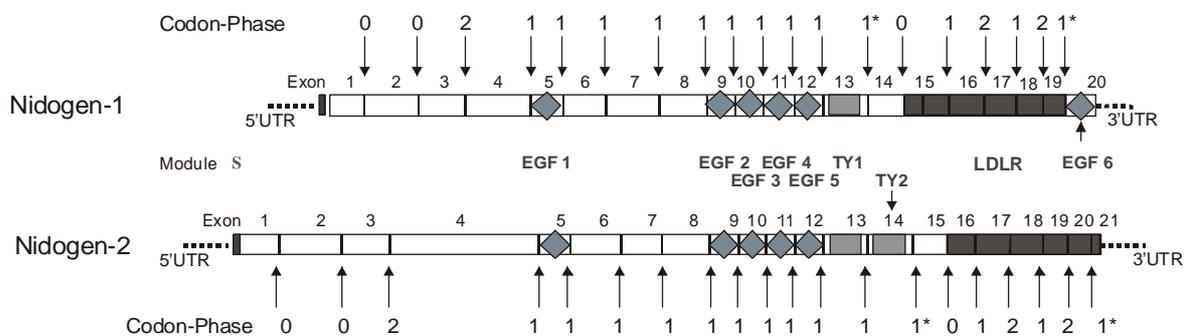


Abb. 2-13 Schematische Darstellung der modularen Struktur der murinen Nidogen-1 und Nidogen-2 Gene.

Die EGF-ähnlichen Module (Rauten) und Thyroglobulin-ähnlichen Module (hellgraue Kästen) werden von einzelnen Exons kodiert. Alle diese Exons sind von Introns der Phase 1 flankiert. Die LDL-Rezeptor-ähnliche Region (dunkelgrauer Kasten) erstreckt sich über mehrere Exons die von Introns mit verschiedenen Codon-Phasen getrennt werden. Die gesamte Region wird aber von Introns in der Codon-Phase 1 flankiert (durch Sterne gekennzeichnet).

2.1.10 Die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens

Die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens war im Gegensatz zu den beschriebenen humanen und murinen Nidogen Genen (siehe 1.2.3) bisher noch unbekannt, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit bestimmt werden. Als Genlocus wird ein Ort im Genom bezeichnet, der durch kartierte Genmarker bestimmt wird. Bei den Markern muss es sich nicht unbedingt um Gensequenzen handeln, es können auch intergenische, nichtkodierende DNA-Segmente sein, z.B. D13Mit44 (DNA Segment, Chromosome 13, Massachusetts Institute of Technology, 44).

Um die chromosomale Lokalisation von Genen zu bestimmen, können Hybridzelllinien aus radioaktiv bestrahlten ES-Zellen von einer 129 WT-Maus und A23 Hamsterzellen verwendet werden (einer Auswahl dieser Zellen wird als T31-"Radiation hybrid panel"-(RHP) bezeichnet, McCarthy *et al.*, 1997; Flaherty & Herron, 1998). Die einzelnen Hybridzelllinien tragen durchschnittlich 20-25% Maus-DNA, die durch die Bestrahlung (3.000 rad) fragmentiert vorliegt. Durch die Verteilung bekannter muriner Genmarker in den einzelnen Zelllinien kann eine genetische Karte erstellt werden. Das ist möglich, da die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Genmarker in derselben Zelllinie befinden mit ihrem Abstand korreliert. Die bestmögliche Anordnung der Marker wird aus den Verteilungsmustern durch ein Computerprogramm bestimmt. Diese Karte unterliegt einer kontinuierlichen Verfeinerung und kann für die Lokalisierung gewünschter Gene verwendet werden (Elliott *et al.*, 1999; Van Etten *et al.*, 1999).

Zu diesem Zweck wird ein DNA-Fragment aus einem nichtkodierenden Bereich des zu lokalisierenden Gens mit der DNA des T31-RHP hybridisiert. Aus dem Hybridisierungsmuster kann durch Computerprogramme die Genlokalisierung mit einer Genauigkeit von durchschnittlich 145 kb bestimmt werden (McCarthy *et al.*, 1997). Die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens wurde in Zusammenarbeit mit Dr. David Beier (Harvard Medical School, Division of Genetics, Brigham and Womans Hospital, Boston, MA, USA) durchgeführt. Voraussetzung für die Durchführung, der Hybridisierungsexperimente, ist die Herstellung von Gen-spezifischen DNA-Proben, bzw. die Ausarbeitung von Gen-spezifischen PCR-Protokollen.

Um das murine Nidogen-2 (Nid2) Gen zu lokalisieren, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein 234 bp Nidogen-2-spezifisches PCR-DNA-Fragment aus der Promotorregion mit den Oligonukleotiden P10 und P11, bzw. ein 223 bp PCR-DNA-Fragment aus dem Intron 1 mit den Oligonukleotiden P8 und P9 hergestellt (Abb. 2-14 A). Als Matrize für die Reaktion dienten 5 bzw. 50 ng genomische DNA aus der Leber einer Maus des WT-Stammes 129 Sv (Reaktionsbedingungen siehe 5.2.1.7.3).

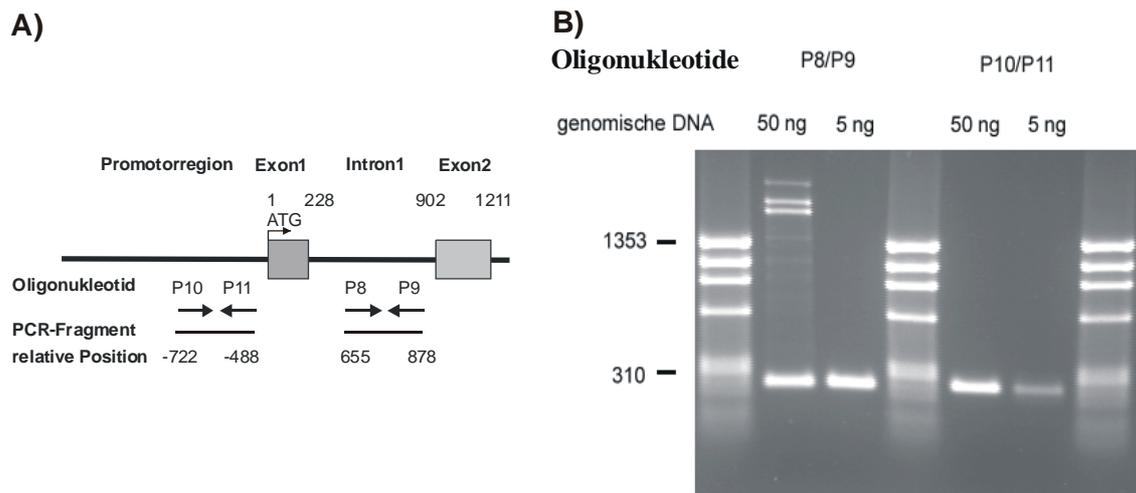


Abb. 2-14 PCR-Strategie und DNA-Proben zur chromosomalen Lokalisierung des Nidogen-2 Gens der Maus.

A) Schematische Darstellung der Promotorregion und den Exons 1 und 2 des murinen Nidogen-2 Gens. Lage der Oligonukleotide; P10/P11 in der Promotorregion, P8/P9 im Intron1. B) Mit dem Oligonukleotidpaar P8/P9 wird ein 234bp und mit dem Paar P10/P11 ein 223 bp DNA-Fragment durch PCR-Technik amplifiziert. Die PCR Reaktionsprodukte wurden in einem 1.5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Größenstandard in bp (Φ X174 DNA-*Hae*II Verdau; NEB).

Mit den oben besprochenen Nidogen-2-spezifischen Proben und dem RHP-T31 konnte Dr. David Beier das murine Nidogen-2 Gen auf dem proximalen Bereich des Chromosoms 14 der Maus in einer Kopplungsgruppe mit dem DNA Marker D14Mit221 (DNA Segment, Chr.14, Massachusetts Institute of Technology 221) lokalisieren. Der DNA-Marker liegt auf der genetischen Position 6.5 cM des Chromosom 14.

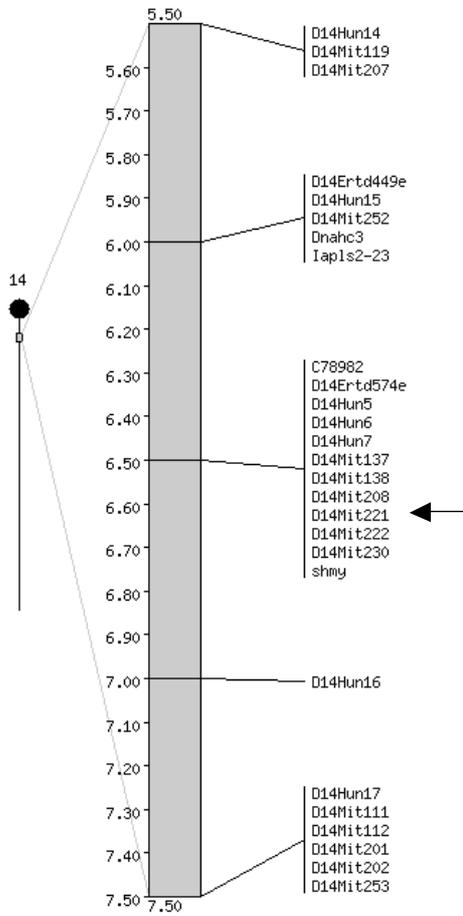


Abb. 2-15 Die Chromosomale Lokalisation des Nidogen-2 Gens der Maus

Übersichtsschema der Kopplungsgruppen des proximalen Abschnittes des Chromosom 14 (Mouse Chromosome 14 Linkage Map <http://www.informatics.jax.org> of the Jackson Laboratory). Das murine Nidogen-2 Gen befindet sich mit dem DNA Marker D14Mit221 (Pfeil) in einer Kopplungsgruppe (cM 6.5).

2.2 Die genetische Funktionsanalyse des murinen Nidogen-2 Gens

2.2.1 Genetische Ansätze

Auf dem Gebiet der Mausgenetik, wurde durch die molekulare Gentechnologie die theoretischen Grundlagen und experimentelle Methoden geschaffen, um Mauslinien mit Veränderungen und Neukombinationen in Genstrukturen herzustellen und analysieren zu können (siehe auch 1.4). Durch diese Ansätze kann die *in vivo*-Funktion eines Gens untersucht werden. Zwei prinzipiell verschiedene Vorgehensweisen lassen sich hier unterscheiden.

1) Zunächst wird der Phänotyp einer mutierten Maus beschrieben und dann die verantwortliche Mutation im Genom lokalisiert (forward genetics). Im Rahmen dieser Vorgehensweise werden Mauslinien mit zufälligen Mutationen im Genom hergestellt, z.B. durch mutagene Chemikalien wie N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (Ethylnitrosurea ENU; Balling, 2001), oder durch die zufällige Insertion der DNA eines Genfallen-Konstruktes in das Genom (siehe auch 2.2.2). Durch diese Methoden werden in großangelegten Forschungsprojekten viele mutante Mauslinien generiert, die der wissenschaftlichen Gemeinschaft oft in Rahmen von Kooperationen zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt werden (Justice, 2000; Stanford *et al.*, 2001).

2) In einer gegensätzlichen Vorgehensweise werden zunächst spezifische Genstrukturen gezielt verändert, um dann den daraus resultierenden Phänotyp zu untersuchen (reverse genetics). Eine Methode der Genmanipulation hier ist die Technik der homologen Rekombination (für eine detaillierte Beschreibung der Methode siehe, Capecchi, 2001; George & Hynes, 1994; Zhang, 1994). Im folgenden wird auf diese Technik kurz eingegangen, da zu Beginn dieser Doktorarbeit in das Nidogen-2 Gen der Maus in ES-Zellen gezielt eine Mutation eingeführt wurde um das Gen zu inaktivieren und seine Funktion untersuchen zu können (J.Schymeinsky und B.L. Bader, unveröffentlichte Arbeit).

Eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung eines mutanten Nidogen-2 Gens war die Klonierung und Charakterisierung der Genstruktur des Nidogen-2 Gens. Für die gezielte Inaktivierung des Gens musste ein Mutagenese- („Gene-Targeting“-) Vektor hergestellt werden, der homologe Regionen des murinen Nidogen-2 Gens und Selektionsmarker-Gene enthält. Durch die Integration der DNA des Mutagenese-Vektors in das Nidogen-2 Gen, mittels der homologen Rekombinations-Technik in ES-Zellen, sollen die ersten 107 Nukleotide der kodierenden Region des Gens deletiert und durch das β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) von *E.coli* ersetzt werden. Multiple Transkriptions-Terminationssignale am 3'-Ende des transgenen *lacZ*-Reportergens und die Verschiebung des endogenen Leserahmens des

Nidogen-2 Gens sollen sicherstellen, dass durch diese Mutation kein funktionelles Nidogen-2 Genprodukt mehr entsteht (Null-Mutation). Die Integration des transgenen *lacZ*-Reporter-Gens flussabwärts des Nidogen-2-Gen Promotors soll gleichzeitig die Voraussetzungen für Expressionsstudien der Nidogen-2 Genaktivität schaffen. ES-Zellen wurden mit der DNA des Gen-Targeting-Vektors transfiziert und nach verschiedenen Selektionsschritten kloniert. Durch Southern Blot-Analysen konnten ES-Klone identifiziert werden, bei denen ein Allel des Nidogen-2 Gens wie geplant mutiert wurde (J. Schymeinsky und B.L. Bader, unveröffentlichte Daten).

Anschließend führte Dr. B.L. Bader mit diesen ES-Zellen Blastozysten-Injektions-Experimente durch, um chimäre Mäuse und anschließend mutante Mauslinien zu etablieren. Die hergestellten chimären Mäuse haben das mutante Nidogen-2 Allel zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch nicht an ihre Nachkommen weitergegeben. Während dieser Phase der Doktorarbeit erhielt Dr. B.L. Bader von Dr. W.C. Skarnes (Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, California 94720, USA) eine mutante Mauslinie zur weiteren Analyse. Bei dieser Mutation handelte es sich möglicherweise um eine Mutation im Nidogen-2 Gen, die nach der Genfallen-Strategie entstanden ist (siehe 2.2.2).

2.2.2 Mutagenisierungsmethode: Genfallen (Gene-trap) Strategie:

Von Dr. William C. Skarnes und Dr. Rosa S.P. Beddington wurde auf dem Prinzip der Genfalle aufbauend (Gene-Trap; GT), eine spezielle Mutagenisierungsmethode weiterentwickelt, mit welcher bevorzugt Gene, die für sekretierte oder membranständige Proteine kodieren, mutagenisiert und identifiziert werden können (Skarnes *et al.*, 1992; Skarnes *et al.*, 1995). Bei dieser Methode wird zunächst die DNA eines bestimmten Genfallen-(GT)-Konstruktes (Abb. 2-16) durch Elektroporation in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transferiert. Diese DNA kann zufällig in das Genom der ES-Zellen integrieren (Abb. 2-16). Eine stabile Integration führt dann zu einer Insertionsmutation an dieser Genstelle und kann die Inaktivierung eines Gens bewirken. Die Natur des Gens ist jedoch zunächst völlig unbekannt. Konventionelle GT-Konstrukte enthalten einen Genabschnitt mit Intronsequenz und 3'-Spleissakzeptorseite des *Engrailed-2* Gens an den beispielsweise ein *βgeo*-Reporter gen (Fusion des *lacZ*-Gens von *E.coli* mit dem *Neomycin-Phosphotransferase* Selektionsmarker-Gen) und eine Polyadenylierungskassette kloniert sind (Abb. 2-16 A; für ein allgemeinen Überblick siehe auch Stanford *et al.*, 2001). Wenn das Konstrukt in genomischer Orientierung in einem Intron eines Gens inseriert, kann nach der Transkription dieser Genregion durch die Verwendung der artifiziellen Spleiss-Akzeptorsequenz und der endogenen Spleiss-

Donorsequenz eine Fusions-hnRNA generiert werden, die den 5'-Teil des endogenen Gens bis zur Insertion und Sequenzen des GT-Konstruktes enthält. Eine funktionelle Chimär-mRNA kann nur dann gebildet werden, wenn die einzelnen kodierenden DNA-Sequenzen im Leserahmen nicht verschoben werden (Abb. 2-16, D).

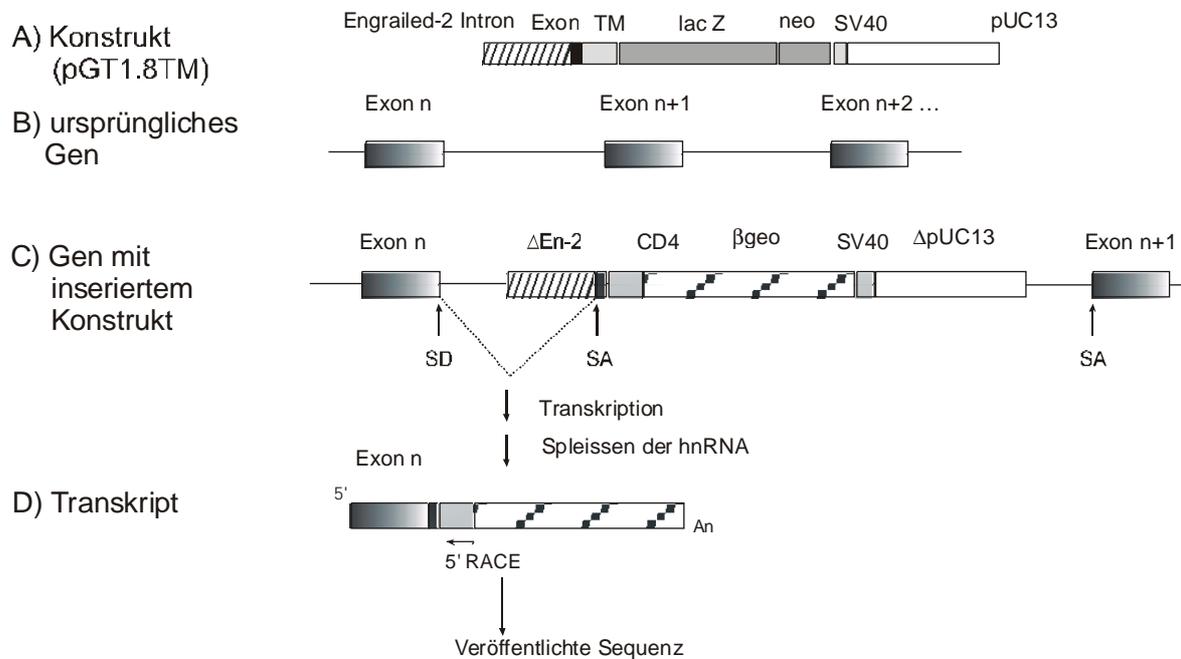


Abb. 2-16 Schematische Darstellung der Strategie der modifizierten Genfallen-, oder Sekretionsfallen.

A) Sekretionsfallen (GST)-Konstrukt pGT1.8TM. Das Plasmid pGT1.8TM besteht aus: DNA-Sequenzen der Spleiss-Akzeptorsequenz (SA) eines Introns des Engrailed-2 Gens (gestreiftes Kästchen), und einem kurzen DNA-Fragment des anschließenden Exons des Engrailed-2 Gens (schwarzes Kästchen), der Transmembranregion des CD4-Gens der Ratte (TM; hell grau), dem β geo-Fusionsgen (Fusion aus dem *E.coli lacZ*-Gens und dem *Neo^R*-Gen; dunkel grau) und einer Polyadenylierungskassette des Affen Virus SV40 (SV40; hellgrau). Als Plasmid-Vektor dient pUC13 (weisses Kästchen; für detaillierte Angaben der Klonierungsstrategie siehe Skarnes *et al.* 1992, und Skarnes *et al.*, 1995.)

B-C) ES-Zellen werden mit der Konstrukt-DNA durch Elektroporation transfiziert. Die Insertion (C) erfolgt zufällig in einen Genlocus (B). Bei der Transkription des Gens verwendet die RNA-Polymerase nun auch die GST-Konstrukt-DNA als Matrize und stoppt nach dem Terminationssignal der SV 40 PolyA-Kassette. Bei der posttranskriptionellen Modifikation der hnRNA zur mRNA entsteht durch die Verwendung der transgenen Spleiss-Akzeptorsequenz eine Chimär-mRNA aus der 5'Region des ursprünglichen Gens (Exon n) und der GST-Konstrukt Sequenz (D).

Die An- oder Abwesenheit einer Signalpeptidsequenz in dem chimären Genprodukt ist für die weitere Selektion und Identifizierung der Gene wichtig. Hat die Integration der GST-Konstrukt-DNA in einem Gen stattgefunden, das für eine Signalpeptidsequenz kodiert, trägt das Fusionsprotein eine Transport-Signalpeptid und es erfolgt ein Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER). Von hier gelangen Proteine üblicherweise über den Golgiapparat an ihren Zielort, beispielsweise der Zellmembran oder in den extrazellulären Raum. Das modifizierte GT-Konstrukt, auch Sekretionsfallen-(GST)-Konstrukt genannt (Abb. 2-17), enthält auch eine hydrophobe Transmembranregion (TM; Teile des CD4 TypI

Membranproteins der Ratte). Diese TM-Region verhindert jedoch eine vollständige Translokation des Fusionsproteins, d.h. sie wirkt als Stoppsignal, und der β geo-Abschnitt des Fusionsproteins bleibt im Zytoplasma. In diesem Zellkompartiment ist die β -Galaktosidase aktiv und eine Identifizierung der Zellen durch X-Gal-Färbung kann erfolgen (Orientierung I Abb. 2-17).

Erfolgt die Insertion des GST-Konstruktes in ein Gen, das für ein zytosolisches Protein kodiert, fehlt das Transportsignalpeptid. Die TM-Region wirkt jetzt als Translokations-Startsignal und das β geo-Protein wird in das Lumen des ER transportiert, wo die β -Galaktosidase inaktiv ist (Orientierung II Abb. 2-17).

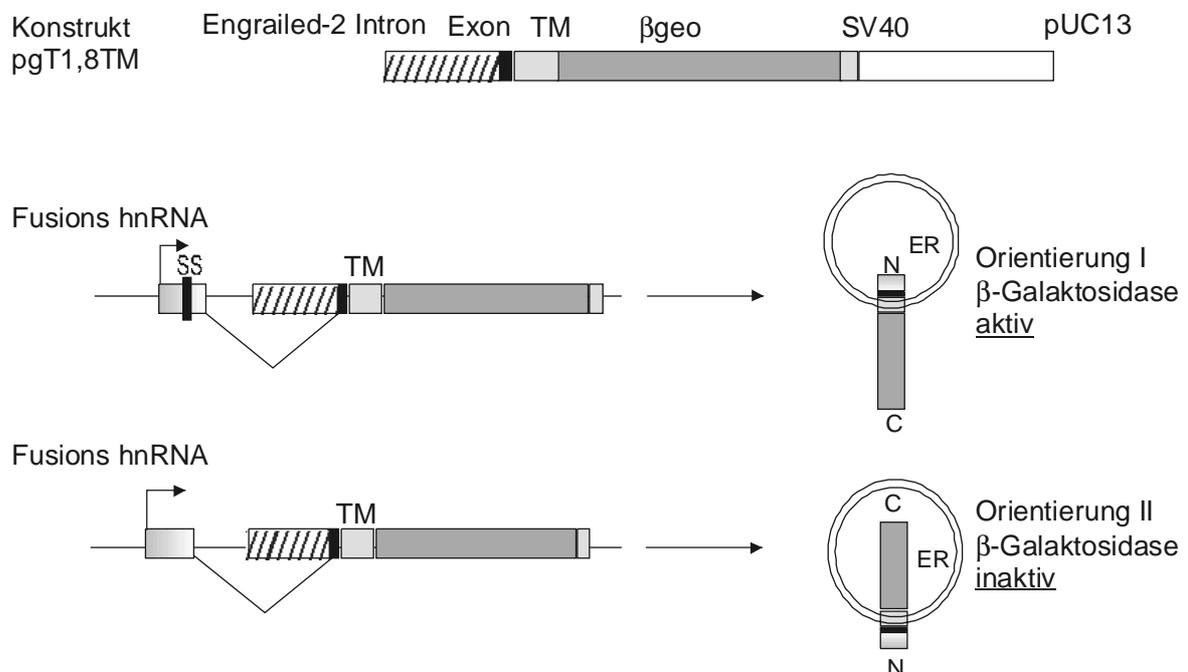


Abb. 2-17 Schematische Darstellung der zwei möglichen Orientierungen des Chimärproteins im ER-Lumen.

Orientierung I: Falls eine Signalpeptidsequenz (SS) im Chimärprotein vorhanden ist, erfolgt die Translokation des Proteins in N-terminaler Orientierung in das endoplasmatische Retikulum (ER). Die Translokation wird jedoch durch die Transmembranregion (TM) des CD-4 Proteins der Ratte gestoppt. Der Proteinanteil mit der β -Galaktosidase verbleibt im Zytoplasma, nur dort kann das Enzym aktiv sein. Die SS wird durch spezifische Proteasen im ER abgespalten.

Orientierung II: Fehlt eine SS im Chimärprotein wirkt die TM-Region als Startsignal der Translokation und das Chimärprotein wird in C-terminaler Orientierung in das ER transportiert. Im Lumen des ER ist die β -Galaktosidase inaktiv (Abb. nach Skarnes *et al.*, 1995).

Um das Genom von ES Zellen zu mutieren, wurden sie zunächst mit der DNA des GST-Konstrukts durch Elektroporation transfiziert (Skarnes *et al.*, 1995). Zur Identifizierung und Isolierung von ES-Zellklonen, in denen eine erfolgreiche Insertion (Abb. 2-17 Orientierung I) stattgefunden hat, ist eine Selektion mit Neomycin (G418) notwendig. Durch diesen

Selektionsschritt überleben nur ES-Zellen in denen das *Neomycin-Phosphotransferase (neof)*-Gen exprimiert wird, d.h. das mutagenisierte Gen muss in ES-Zellen auch transkriptionell aktiv sein. Diese notwendige Expression des Gens in undifferenzierten ES-Zellen ist ein limitierender Faktor dieser Mutagenisierungsmethode. Durch X-Gal-Färbung werden dann ES-Zellklone mit funktionsfähiger und nicht-funktionsfähiger β -Galaktosidase identifiziert. Zur Identifizierung der mutierten Gene wird aus den ES-Zellen RNA gewonnen, die durch 5'RACE-Technik (rapid amplification of complementary DNA ends, RACE) und cDNA Sequenzierung analysiert wird (Townley *et al.*, 1997). Dabei wird zunächst die cDNA der chimären mRNA des jeweiligen ES-Zellklons generiert und die DNA-Sequenz ermittelt. Diese Methode erlaubt dann einen ersten Hinweis auf die entsprechende genomische Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA.

2.2.3 Charakterisierung einer transgenen Genfallen (gene trap)-Mauslinie mit der Mutation $nid2^{GST(pGT1.8)01Ska}$

Bei der von Skarnes *et al.* (Skarnes *et al.*, 1995) beschriebenen Mutagenisierungsmethode und Herstellung von einer großen Anzahl von mutanten Mauslinien, ergab sich bei der vorläufigen Analyse der RNA verschiedener ES-Zellklone (Townley *et al.*, 1997) Gensequenzen von noch unbekannt Genen (Mitchell *et al.*, 2001). Diese waren natürlich besonders interessant, um davon mutante Mauslinien herzustellen und ihre Phänotypen zu charakterisieren. Das Gen für die 5'RACE-Sequenzen der hier beschriebenen mutanten Mauslinie war zunächst unbekannt. Erst durch die Veröffentlichung der murinen und der humanen Nidogen-2 cDNA-Sequenz (Kimura *et al.*, 1998, Kohfeldt *et al.*, 1998) konnten die 5'RACE-Sequenzdaten eindeutig dem murinen Nidogen-2 Gen zugeordnet werden. Die Insertionsstelle des GST-DNA-Konstruktes im Genom, sowie die Genstruktur und spezifische DNA-Proben für das murine Nidogen-2 Gens waren der Arbeitsgruppe von Dr. William C. Skarnes nicht bekannt.

Die in dieser Arbeit in Ergebnis-Teil 2.1 beschriebene Klonierung und Charakterisierung des murinen Nidogen-2 Gens ergaben die experimentellen Voraussetzungen diese Mauslinie sowohl molekular als auch phänotypisch zu charakterisieren. Dr. W.C. Skarnes (Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA) stellte Herrn Dr. B.L. Bader (Abteilung Proteinchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) dann freundlicherweise die Mauslinie zu weiteren Analyse zur Verfügung. Folgende Fragen waren zu Beginn der Untersuchung dieser Mauslinie noch ungeklärt und sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit experimentell geklärt werden:

1. Welchem Exon des murinen Nidogen-2 Gens entsprechen die 5'RACE-DNA-Sequenzen?

2. Wo befindet sich die genomische DNA-Integrationsstelle des Genfallen-Konstruktes?
3. Welche spezifischen DNA-Proben erlauben die Unterscheidung von WT, heterozygot- und homozygot mutanter Tiere?
4. Sind homozygot mutante Tiere lebensfähig?
5. Führt die Mutation zur Nidogen-2-Defizienz in den homozygot mutanten Tieren?
6. Können Nidogen-2 defiziente Mäuse eine BM ausbilden und zeigen diese Mäuse phänotypische Veränderungen?

Die molekularen und phänotypischen Analysen werden in dem anschließenden Ergebnisteilen 2.2.4 - 2.2.8 beschrieben.

Zur Vereinfachung der ursprünglichen Benennung des mutanten Nidogen-2 Allels *nid2*^{GST(pGT1.8)011Ska} wird in Zukunft das mutierte Allel mit Nid2 und der Genotypbezeichnung (-) abgekürzt. Das Wildtyp-Allel Nid2 wird im Text auch mit der Genotypbezeichnung WT und der Genotypenbezeichnung (+)-Allel abgekürzt. Daraus ergeben sich folgende Genotypbezeichnungen bezogen auf das Nidogen-2 Gen, bzw. dem mutierten Allel:

Wild-Typ Maus: +/+ , bzw. WT; heterozygote Maus: +/-; homozygote Maus: -/-

Mit Nid2 mutanten Mäusen konnte eine Mauskolonie mit einem gemischten, genetischen Mausstamm-Hintergrund (129/Ola; C57/Bl6), am Max-Planck-Institut für Biochemie, in Martinsried, aufgebaut werden. Bei den Nachkommen von mutanten Nid2-Elterntieren wurde die Anwesenheit eines mutierten Allels anfänglich durch X-Gal-Färbung eines Stückes der Schwanzspitze oder durch eine PCR-Analyse mit *lacZ*-spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen (siehe 5.2.1.7).

2.2.4 Molekulare Charakterisierung der Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA

Zur molekularen Charakterisierung der Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA wurden die 5'-RACE-Sequenzdaten von Dr. W.C. Skarnes (<http://socrates.berkeley.edu>; Skarnes *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2001) zunächst mit den genomischen Nidogen-2-Gensequenzen verglichen. Dabei ergab sich eine hohe DNA-Sequenzidentität von 87,1 % mit DNA-Sequenzen zwischen dem Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens und den 5'-RACE-DNA-Sequenzen über eine Region von 283 bp (siehe Abb. 2-17). Folgende DNA-Sequenzunterschiede wurden festgestellt:

a) Die vollständige DNA-Sequenzidentität (Exon 4, Pos. 422-550) wird auf einer Länge von 38 bp (Exon 4 , Pos. 551- 558) unterbrochen, da in der 5' RACE-Sequenz keine entsprechende DNA-Sequenz vorhanden ist, die möglicherweise auf eine unauswertbare Sequenzreaktion in dieser Region zurückzuführen ist.

b) Die 5' RACE-Sequenz weist sechs zusätzliche Cytosine auf, die sich in dem Sequenzabschnitt von Pos. 149- 283 befinden. Die DNA-Sequenzidentität beträgt in dieser Region 97%.

Die sehr hohe Sequenzidentität der beiden Sequenzen zeigt jedoch, dass in der RNA, die als Matrize für die 5'-RACE Experimente diente, eine Chimär-RNA vorhanden ist, die Exon 4 DNA-Sequenzen des Nidogen-2 Gens trägt. Dies deutet darauf hin, dass eine Insertion der GST-Konstrukt-DNA im Intron 4 des Nidogen-2 Gens stattgefunden hat. Diese Annahme wurden dann experimentell durch die in 2.2.4.1 und 2.2.4.2 beschriebenen Versuche untersucht.

```

Nid2 Exon 4-Sequenz      GCGGCCGGTGGGAGAGGGAGAGGTTCTGGATTT 450
                        |||
Nid2 5'-RACE-Sequenz    ...CCCGTGGGAGAGGGAGAGGTTCTGGATTT 30
                        .
451 CAGGGACCCAGCGGAGCTTTTGGACCAGATGGGTACCAGAGCCCCAGCTC 500
                        |||
31  CAGGGACCCAGCGGAGCTTTTGGACCAGATGGGTACCAGAGCCCCAGCTC 80
                        .
501 CTCCAGAGGCAGATGCAGCTCTCCTAACTCCAGTCAACGAAGACCTTGGG 550
                        |||
81  CTCCAGAGGCAGATGCAGCTCTCCTAACTCCAGTCAACGAAGACCTTGGG 130
                        .
551 GGCAGAAACACCCAGTCCTATCCAGAGGCAGGGCCAGTGCCTTCAGAG.C 599
                        |
131 .....GCAGTNNNGCCTTCAGAGCC 150
                        |
600 CAGATGTTCTGTCCC.TCCTCT.GGAAGGAGAAGTCCTTCC.TCATT.A 645
                        |||
151 CAGATGTTCTGTCCCTCCTCTCGGAAGGAGAAGTCCTTCCCTCATTAC 200
                        .
646 CCCCAGTCTGGTCACGTTCCG.CCCCTGAGAGGAGGGAAGTATGTGATA 694
                        |||
201 CCCCAGTCTGGTCACGTTCCGCCCCCTGAGAGGAGGGAAGTATGTGATA 250
                        .
695 GGACTGGAGGACCACGTGGGATCTAATGATCAA 727
                        |||
251 GGACTGGAGGACCACGTGGGATCTAATGATCAA 283

```

Abb. 2-18 DNA-Sequenzvergleich der Nid2-GST-Sequenz (5'RACE)

Die Nid2-GST-DNA Sequenz zeigt mit der Exon-4-Sequenz des Nidogen-2 Gens (Nid2; siehe Abb. 2-5) eine hohe DNA-Sequenzidentität.. Die beiden DNA-Sequenzen stimmen, bis auf eine Lücke in der Exon-4-Sequenz fast überein (Region Pos. 551-588), fünf überzählige Cytosine in der 5'-RACE-Sequenz sind unterstrichen (Exon-4 Region Pos. 588-728).

2.2.4.1 Lokalisierung der Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA im Nidogen-2 Gen der Maus durch Southern Blot-Analyse

Die in Abb. 2-18 gezeigten DNA-Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass das GST-DNA-Konstrukt in Intron 4 des Nidogen-2 Gens inseriert ist. Um diese Annahme zu bestätigen und die Insertionsstelle zu lokalisieren, wurden zahlreiche Southern Blot-Analysen mit verschiedenen DNA-Proben, die aus dem DNA-Plasmidklon ND2-19#24 hergestellt wurden, durchgeführt (siehe Abb. 2-19). Diese DNA-Proben decken einen großen Teil des Introns 4 ab (Daten nicht gezeigt). Isolierte genomische DNA von Wild-Typ und transgenen Mäusen wurden in den Southern Blot-Analysen eingesetzt, ihre Hybridisierungsmuster analysiert und mit den Daten der physikalischen Karte des Nid2-Gens ausgewertet.

Mit einem 436bp *EcoRI/PstI*-Restriktionsfragment aus Intron 4 als DNA-Hybridisierungsprobe (weiterhin als 3'-Probe bezeichnet; Abb. 2-19) wurden in der genomischen DNA von transgenen Tieren, im Vergleich zu WT-Tieren, erwartungsgemäß die WT-spezifischen Fragmente und zusätzliche DNA-Fragmente identifiziert. Anhand der auftretenden hybridisierungspositiven Fragmente ließ sich dann der Insertionsort der GST-Konstrukt-DNA charakterisieren. Die 3'-Probe hybridisiert mit folgenden genomischen DNA-Fragmenten einer transgenen Nid2-Maus:

ein 7 kb *EcoRI*-Fragment (entspricht ND2-19#24); zwei *HindIII*-Fragmente (4 kb=WT Allel / >15kb = mutiertes Allel), zwei *KpnI*-Fragmente (6 kb = WT Allel / 7 kb = mutiertes Allel), zwei *PstI*-Fragmente (1.5 kb = WT Allel / 3.2 kb = mutiertes Allel), zwei *SacI*-Fragmente (8 kb = WT Allel / 3.3 kb = mutiertes Allel) und zwei *XbaI*-Fragmente (5 kb = WT Allel / 3.2 kb = mutiertes Allel; Abb. 2-19).

Alle DNA-Fragmentgrößen des WT-Allels stimmen mit Restriktionsanalysen der rekombinanten Phagen-DNA in diesem Bereich überein. Die Analysen der durch die Insertion der DNA des GST-Konstruktes zusätzlich entstehenden hybridisierungspositive-DNA-Fragmente weisen darauf hin, dass durch die Insertion der Klonierungsvektor pUC13 des GST-Konstruktes um ungefähr 0.9 kb deletiert ist. Der Bereich der Insertion läßt sich durch die Auswertung der Southern Blot-Analyse und Anfertigung einer physikalischen Karte des mutierten Allels auf die 530 bp große Region zwischen dem 3'Ende des Exon4 und der flussabwärts folgenden *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle eingrenzen (siehe Abb. 2-19 A).

Als eine weitere DNA-Hybridisierungsprobe diente ein 345 bp *PstI/KpnI*-Fragment aus Exon 4 (5'-Probe). Auch mit dieser Probe lassen sich DNA-Restriktionsfragmente des WT-Allels und des mutierten Allels eindeutig unterscheiden (Abb. 2-19). Die 5'-Probe erkennt in der genomischen DNA von transgenen Nid2-Mäusen folgende Fragmente: zwei *EcoRI*-Fragmente

(5.5 kb = WT Allel/10 kb = mutiertes Allel), zwei *Hind*III-Fragmente (4 kb = WT Allel / > 15kb = mutiertes Allel), ein *Kpn*I-Fragment (WT Allel und mutiertes Allel = 1.6 kb; die Signalintensität deutet darauf hin, dass es sich um ein Doppelfragment handelt), zwei *Pst*I-Fragmente (1.5 kb = WT Allel / 2.0 kb = mutiertes Allel), zwei *Sac*I-Fragmente (8 kb = WT Allel / 7 kb = mutiertes Allel) und zwei *Xba*I-Fragmente (5.5 kb = WT Allel / 9 kb = mutiertes Allel). Auch hier stimmen die WT-DNA-Fragmentgrößen mit Restriktionsanalysen der rekombinanten λ -Phagen-DNA in diesem Bereich überein. Die hybridisierungspositiven DNA-Fragmente des mutierten Allels weisen auf eine Deletion von ~500bp des Engrailed-2 Introns hin.

In Southern Blot-Analysen mit genomischer DNA von Nid2 +/+ Mäusen (Abb. 2-19) und mit weiteren genomischen DNAs aus Mäusen der WT-Stämme C57/Bl6 und 129 Sv (Daten nicht gezeigt), wurde mit der 3'- und der 5'-Hybridisierungsprobe-Probe nur jeweils ein DNA-Fragment pro Restriktionsverdau erkannt (Abb. 2-19). Die Größen der durch die Southern Blot-Analysen markierten DNA-Fragmente stimmten mit den entsprechenden DNA-Fragmentgrößen aus den angefertigten Restriktionsanalysen, der rekombinanten λ -Phagen und deren DNA-Subklone, die sich in dieser Region befinden, überein. Diese Befunde zeigen auch, dass nur eine Kopie des murinen Nidogen-2 Gens im Genom vorhanden ist (single copy gene).

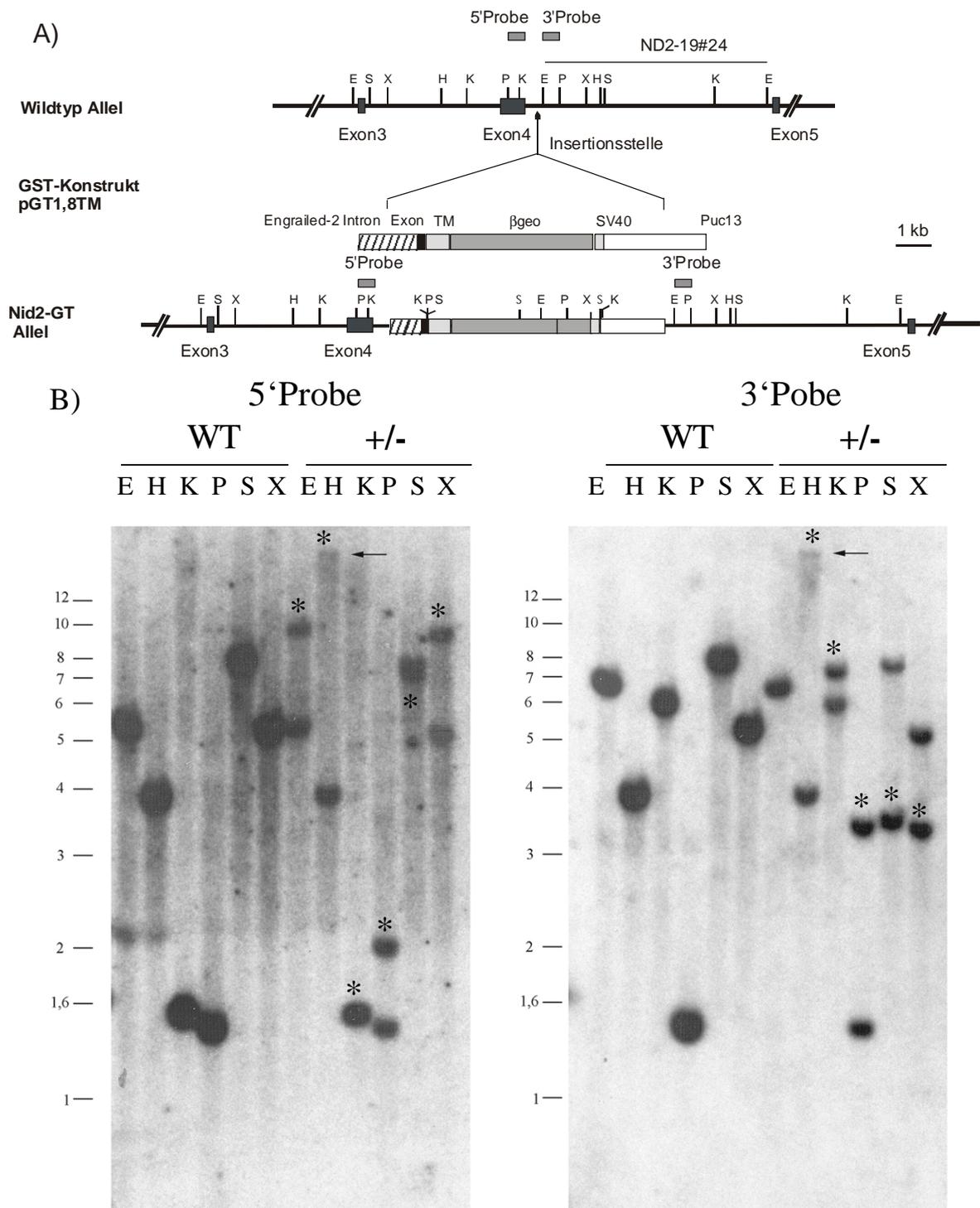


Abb. 2-19 Southern Blot-Analysen

A) Schematische Darstellung des WT- bzw. mutierten- Allels und des GST-Konstruktes pGT1,8TM und die Lage der Hybridisierungsproben (3'- und 5'-Probe). Die 3'-Probe ist aus dem *EcoRI* Fragment ND2-19#24 kloniert. Durch die Insertion wurde das GST-DNA-Konstrukt an beiden Seiten deletiert. Zur übersichtlicheren Darstellung sind nur die Restriktionsenzymstimmstellen innerhalb des GST-Konstruktes angegeben, durch die ein markiertes DNA-Fragment erzeugt wird. B) Autoradiographien der Southern-Blot Membran hybridisiert mit der 3'-, bzw. 5'-Probe. Je 30 µg genomische DNA aus einer WT-Maus und einer Nid2 +/- Maus wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *KpnI* (K), *PstI* (P), *SacI* (S) und *XbaI* (X) verdaut und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch Southern Blotting auf eine Nylonmembran transferiert. Die Größen der hybridisierungspositiven DNA-Fragmente der WT-DNA können durch Restriktionsanalysen subklonierter DNA-Fragmente des rekombinanten λ -Phagen ND2-19 bestätigt werden. Zusätzliche hybridisierungspositive DNA-Fragmente, die in der genomischen DNA von Nid2 +/- Tieren im Vergleich zur DNA von WT-Tieren auf die Insertion der DNA des GST-Konstruktes hinweisen, sind über den entsprechenden Fragment mit einem Stern markiert (genaue Größen siehe Text). Größenstandard 1 kb.

Um die Insertion der GST-Konstrukt-DNA durch GST-spezifische interne Proben zu bestätigen, wurden Southern Blot-Analysen mit *lacZ*-Gen-spezifischen und *neo*-Gen-spezifischen Hybridisierungsproben durchgeführt (*lacZ*-Probe = ~800bp *Bam*HI/*Cl*aI-Restriktionsfragment des *β -Galaktosidase*-Gens; *neo*-Probe = ~900 bp *Pst*I/*Xba*I-Restriktionsfragment des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens). Die verwendete genomische DNA wurde aus einer Nid2 +/- Maus präpariert (Nid2-GST-Mauslinie, die über sechs Generationen mit jeweils C57/Bl6 WT-Mäusen rückgekreuzt wurde, um einen definierten genetischen Hintergrund zu etablieren). Die Southern Blot-Analysen zeigen, dass durch die *lacZ*- und *neo*-Probe genomische DNA-Fragmente markiert werden, welche die Insertion des GST-Konstruktes im Nidogen-2 Gen bestätigen (Abb. 2-20). Es werden jedoch noch zusätzliche DNA-Fragmente markiert, die auf eine Insertion einer zweiten Kopie des GST-Konstruktes hinweisen, die möglicherweise als Tandem in dem beschriebenen Insertionsort vorliegt. Da aus den einzelnen der sechs Rückkreuzungen nur die Nachkommen mit heterozygoten Genotyp Nid2 +/- für anschließende Rückkreuzungen mit C57/Bl6 WT-Mäusen selektiert wurden, befindet sich die weitere Insertion der GST-Konstrukt-DNA mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von 98% ebenfalls auf dem Chromosom 14. Einer eindeutigen Klärung dieser Annahme durch molekularbiologische Methoden konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht nachgegangen werden.

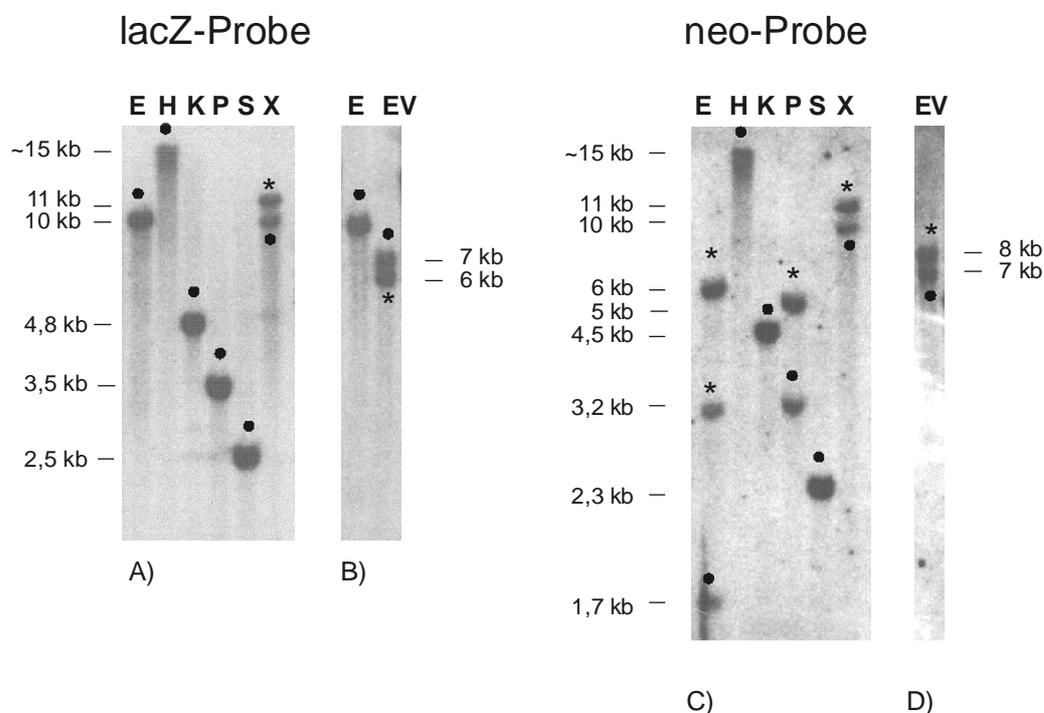


Abb. 2-20 Southern Blot-Analyse von genomischer DNA einer Nid2 +/- Maus mit *lacZ* und *neo*-Proben

Für das Experiment wurden jeweils 30µg genomische DNA aus einer Nid2 +/- Maus mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Southern Blot-Membranen wurden mit Proben gegen *lacZ* (A, B) und gegen *neo* (C, D) hybridisiert. DNA-Fragmente welche die Insertion des GST-Konstruktes in den Nidogen-2 Locus bestätigen, sind mit einem Punkt, zusätzliche DNA-Fragmente sind mit einem Stern markiert. Die Proben erkennen keine DNA-Fragmente der entsprechend geschnittenen WT-DNA (Daten nicht gezeigt)

E = *Eco*RI, EV = *Eco*RV, H = *Hind*III, K = *Kpn*I, P = *Pst*I, S = *Sad*, X = *Xba*I. Größenmarker: 1 kb.

2.2.4.2 Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA im mutanten Nid2-Allel: Klonierung und DNA-Sequenzanalyse

Um die exakte Insertionsstelle der DNA des GST-Konstrukts im mutanten Nidogen-2 Gen zu identifizieren und die flankierenden genomischen DNA-Sequenzen zu klonieren, wurden zunächst PCR-Analysen an genomischer DNA von Nid2^{-/-} Mäusen mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Anschließend wurden spezifische PCR-Reaktionsprodukte, die flankierenden Insertionsregionen am 5'- und 3'-Ende des GST-Konstruktes beinhalten können, in Plasmidvektoren kloniert.

Die Oligonukleotidpaare P1/ND100 und P1/ND101 wurden in PCR-Experimenten eingesetzt um die 5'-Region der Insertionsstelle zu klonieren. Die entsprechenden PCR-Reaktionsprodukte ergaben eine DNA-Fragmentlänge von 1.3 kb bzw. 1.8 kb (Abb. 2-21). Das Oligonukleotidpaar N6/ND70 (Abb. 2-21) führte in PCR-Experimenten zu einem 2,5 kb PCR-DNA-Fragment (siehe Abb. 2-21), das die 3'-Region der Insertionsstelle beinhalten sollte. Die o.a. PCR-DNA-Fragmente wurden erfolgreich in Plasmidvektoren kloniert und ihre DNA-Sequenz ermittelt.

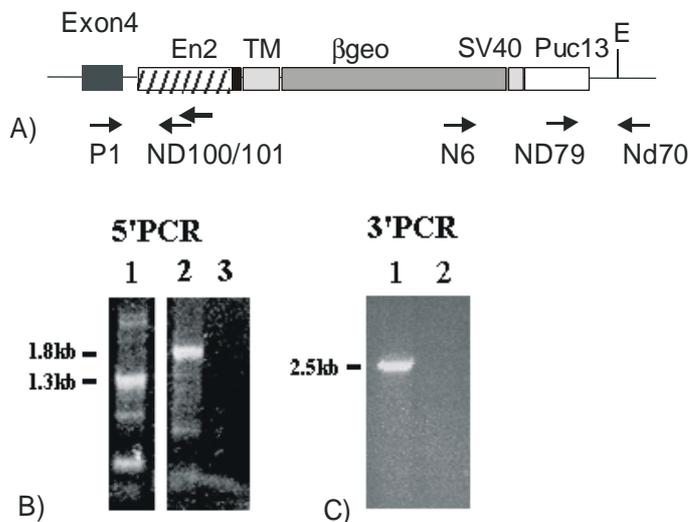


Abb. 2-21 Klonierungsstrategie und Analyse der PCR-Reaktionsprodukte zur Lokalisierung des GST-Konstruktes im mutanten Nidogen-2-Gen.

Schematische Darstellung des insertierten GST-Konstruktes im mutanten Nid2-Allel und der Lage der Oligonukleotide.

B, C) PCR-Reaktionsprodukte wurden elektrophoretisch in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

B) 5'PCR:

Spur 1: Das Oligonukleotidpaar P1/ND100 liefert ein 1.3kb DNA-Fragment.

Spur 2: Das Oligonukleotidpaar P1/ND101 ergibt ein 1.8kb DNA-Fragment.

Spur 3: Kontrolle ohne Matrize.

C) 3'PCR:

Spur 1: Das Oligonukleotidpaar N6/Nd70 liefert ein 2.5 kb Fragment.

Spur 2: Kontrolle ohne Matrize.

Anschließend wurden mit diesen DNA-Sequenzen Sequenzvergleiche mit DNA-Sequenzen des GST-Konstrukts pGT1.8TM (DNA-Sequenz des pGT1.8TM-Konstruktes siehe Internetseite von Dr. W. Skarnes: <http://socrates.berkeley.edu>) und der genomischen WT-DNA-Sequenz des Nidogen-2 Gens (Abb. 2-5) in dieser Region durchgeführt. Die

flankierenden genomischen Nidogen-2- und GST-Konstrukt-DNA-Sequenzen (*Engrailed-2* Intron, neo-Resistenz-Gen und pUC13-Vektor) in der 5'- und 3'-Region der Insertion im mutanten Nidogen-2-Allel sind in Abb. 2-22 ausschnittsweise dargestellt. Die DNA-Sequenzanalyse bestätigte die erfolgreiche Klonierung der flankierenden Region der Insertionsstelle und erlaubte die genaue Lokalisation der Insertion im Intron 4 des murinen Nidogen-2-Gens:

Das *Engrailed-2*-Intron liegt erwartungsgemäß in der 5' Region der Insertion, die von dem Exon 4/Intron 4-Übergang in 3'-Richtung 414 bp entfernt liegt (Abb. 2-22 A). Durch das Integrationsereignis wurde die *Engrailed-2*-Intronsequenz um 0,75 kb am 5'-Ende verkürzt. Weiterhin zeigte die DNA-Sequenzanalyse, dass durch die Insertion der Klonierungsvektor pUC13 des GST-Konstruktes am 3'-Ende um 0,9 kb deletiert wurde. Das 3'-Ende des GST-Konstruktes liegt 18 bp 5' der schon im Text beschriebenen *EcoRI*-Schnittstelle des Intron 4 (siehe Abb. 2-22 B).

A)

Exon4 **Intron4**

... GAGGACCACGTGGGATCTAATGATCAAG GTAAGTGCATTGAACAACCTTGGCATTGGGAT 32
 33 TTTGTTTAAAGAAAATGTAGCAGAGTTGACAAAACCTAGAAAATGGTCAATCAACTGTGCTCA 92
 92 TTTCTCTACTGGGCAGGCTGAGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGGGCAGGCTG 152
 153 GGGCAGGCTGGGCAGGCTGAGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGGGTAGGCTGGGGCAGACTCG 212
 213 GGTAGGCTGGGCAGGCTGAGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGG 272
 273 CAGACTGGGGCAGGCTGGGCAGACTGGGGCAGGCTGGGGCAGACTCGGGTAGGCTGGGCA 332
 333 GGCTGAGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGGCAGGCTGGGGCAGGCTGGGGCAGGCTGAGGCTG 392

5'-Insertionsstelle

↓

Intron 4 **Δ engrailed-2 Intronsequenz**

393 GAGGATTATCTAGGTTTAAGCAagtaggaccctgacaaagagaccctct...
 414

B)

neomycin-Resistenz-Gen

...tggatatctgcagaattcgcccttatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctg
accgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcacgccttctatc
gccttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcgac
gccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggttgggctt
cggaatcgttttccgggacgcyggtgatcctccagcgcggggatctcatgctggag

SV40

ttcttcgcccacccccggatctaagctctagataagtaatgatcataatcagccatatac
acatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaa
cataaaatgaatgcaattgttgttgaactgtttattgcagcttataatggttacaaa
taaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagttgt
ggtt....

ΔpUC13...aaaaggaataagggcgacacggaaatggtgaatact
catatgaaccttgtgaccctaaatacattttctaatacattttctaatacattttctaa

3'-Insertionsstelle

↓₄₁₅ **Intron 4** **EcoRI**

atacattttctaaataaataTAGCATAGGCTATATAGAGAAATCGCAGGCCAGCCTGG 452
 453 ATTATAGAGTGAACTTCTTCCAAAACAAAACAAAATAACAGCTGTGGTTTTCTTCTGA 512
 513 GTGAATAGGTGAAAAGTTTAGCAAGCAGATTGGAAGTGAATTTTTCTCCTTGTGTTT...

Abb. 2-22 DNA-Sequenz-Ausschnitt der Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA im mutanten Nidogen-2-Gen der Maus.

Durch DNA-Sequenzvergleiche mit der entsprechenden WT-DNA-Sequenz in dieser Region und der GST-Konstrukt-DNA-Sequenz (pGST1.8TM) konnte die Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA 414 bp 3' des Exon 4 des Nidogen-2 Gens lokalisiert werden.

A) Die dargestellte DNA-Teilsequenz des 1,3 kb 5'-PCR-DNA-Fragmentes (Sequenz nicht vollständig dargestellt) zeigt den Übergang von Exon4/Intron 4 DNA-Sequenzen (Großbuchstaben) des Nidogen-2 Gens zu DNA-Sequenzen (Kleinbuchstaben), die durch das Insertionsereignis entstanden sind. Die Insertionsstelle ist durch einen senkrechten Pfeil (5'Insertionsstelle) gekennzeichnet. DNA-Sequenzen des *engrailed-2*-Introns und des GST-Konstruktes sind unterstrichen. 6 Nukleotide an der 5'-Insertionsstelle zeigen weder DNA-Sequenz-Identität mit der GST-Konstrukt-DNA noch mit der Intron 4-Sequenz des Nidogen-2 Gens.

B) DNA-Teilsequenz des 2,5 kb 3'-PCR-DNA-Fragmentes (Sequenz nicht vollständig dargestellt): DNA-Sequenzen des *neo*-Resistenz-Gens, der SV40-Polyadenylierungskassette und des Plasmidvektors pUC13 des GST-Konstruktes sind nur ausschnittsweise dargestellt (Kleinbuchstaben). Die 3'-Insertionsstelle ist mit einem senkrechten Pfeil gekennzeichnet (3'Insertion). Die flankierende Intron 4-DNA-Sequenz (Großbuchstaben) wird von der DNA-Sequenz des Plasmidvektors pUC13 des GST-Konstruktes (Kleinbuchstaben und unterstrichen) durch 68 Nukleotide (nicht unterstrichen) getrennt, die weder zum GST-Konstrukt noch zum Intron 4 eine DNA-Sequenzidentität aufweisen. Diese sind wahrscheinlich durch das Integrationsereignis entstanden.

2.2.5 Genotypisierung der mutanten Nid2-Mauslinie

Zur Genotypisierung der mutanten Nid2-Mauslinie mit molekularbiologischen Mitteln wurde eine DNA-Hybridisierungssonde ausgearbeitet, die in Southern Blot-Experimenten mit genomischer DNA das WT-Nid2-Allel (+) und das mutante Nid2-GST-Allel (-) spezifisch erkennt (Abb. 2-23). Weiterhin wurde eine spezifische PCR-Reaktion etabliert, die erlaubt mit drei verschiedenen Oligonukleotiden das WT-Allel (+) und das mutante Allel (-) in genomischer DNA von heterozygoten Mäusen im gleichen Reaktionsansatz nachzuweisen.

Für die Genotypisierung der Nid2 Mäuse durch Southern Blot-Analyse wurden ~30 µg genomische DNA (siehe 5.2.1.1) mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaut. Als radioaktive 3'-Probe dient das schon in Kapitel 2.2.4.1 beschriebene 345 bp *Eco*RI/*Pst*I-Fragment (siehe Abb. 2-19 A). Die hybridisierungspositiven *Pst*I-DNA-Fragmente haben eine Größe von 1,5 kb (entspricht dem WT Allel) und 3,5 kb (entspricht dem mutierten Allel; Abb. 2-23 B).

Die spezifische PCR-Reaktion mit den drei Oligonukleotiden P1, ND79 und ND70 wurde vorrangig zur Bestimmung der Genotypen der Nid2-Mäuse verwendet (Abb. 2-23 A). Durch die Oligonukleotide P1 und ND70 wird ein 1.1kb DNA-Fragment amplifiziert, falls ein WT-Allel in der Matrize vorliegt. Das mutierte Allel kann durch die Oligonukleotide ND79 und ND70 detektiert werden und ergibt ein 0.7kb DNA-Fragment (siehe 5.2.1.7). Die Reaktionsbedingungen für eine eindeutige Genotypisierung sind in Kapitel 5.2.1.7.1 beschrieben.

Um die Verteilung der Genotypen zu untersuchen, wurden Nid2 +/- Tiere miteinander verpaart. Die Nachkommen wurden nach 3-4 Wochen von der Mutter getrennt und die Genotypen eine Southern Blot- oder PCR-Analysen bestimmt (Abb. 2-23).

Geschlechtsverteilung:

Gesamtzahl der Tiere n = 321		
Geschlecht	n	Prozent
Männchen	158	48,20%
Weibchen	163	50,80%

Verteilung der Genotypen:

Genotyp	n=321	Prozent
WT	67	20,90%
+/-	174	54,20%
-/-	80	24,90%

Abb. 2-24 Verteilung der Geschlechter und Genotypen. Tabellarisch Darstellung der bestimmten Geschlechter und der Genotypen von 321 Nachkommen im Alter zwischen 3 und 4 Wochen aus Kreuzungen von Nid2 +/- Elterntieren.

321 Nachkommen von heterozygoten Elterntieren wurden untersucht (Abb. 2-24). Die Geschlechtsverteilung entspricht mit 158 (48,2%) Männchen und 163 (50,8%) Weibchen der einer normalen WT-Maus Kolonie. Die Verteilung der Genotypen mit 67 (20,9%) WT, 174 (54,2%) Nid2 +/- und 80 (24,9%) Nid2 -/- Mäusen zeigt, dass das mutierte Allel sich ungefähr nach der 2. Mendelschen Regel verteilt und homozygote Tiere lebensfähig sind. Nid2 -/- Mäuse weisen keine äußerliche Auffälligkeiten auf und sind fortpflanzungsfähig. Ein Mauskolonie aus Nid2 -/- Tieren konnte aufgebaut werden und zeigte weiterhin, dass aus Verpaarungen von Nid2 -/- Mäusen fertile Nachkommen entstehen können. Die durchschnittlichen Wurfgrößen von bisher 11 Würfen aus Verpaarungen von Nid2 -/- Elterntieren ($5,7 \pm 2,3$ Nachkommen/Wurf) wurde mit einer entsprechenden, zufälligen Stichprobe von Würfen aus Verpaarungen von Nid2 +/- Elterntieren ($6,8 \pm 2,8$ Nachkommen/Wurf) verglichen und zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 2-25). Eine statistisch signifikante Aussage über die Fruchtbarkeit von Nid2 -/- im Vergleich zu Nid2 +/- Elterntieren kann jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht getroffen werden.

Art der Kreuzung	Nid2 +/- x Nid2 +/-	Nid2 -/- x Nid2 -/-
Zahl der untersuchten Würfe	11	11
Zahl der Nachkommen	75	63
Durchschnittliche Wurfgröße	$6,8 \pm 2,8$	$5,7 \pm 2,3$

Abb. 2-25 Durchschnittliche Wurfgrößen aus Kreuzungen mit Nid2 +/- und Nid2 -/- Mäusen

2.2.7 Expressionsanalysen des Nidogen-2 und Nidogen-1 Gens und anderer BM-Protein-Gene in normalen und mutanten Nid2-Mäusen

Die Existenz von homozygot-mutanten Nid2 Mäusen konnte eindeutig nachgewiesen werden (siehe 2.2.6). Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Mutation zur Abwesenheit des Nidogen-2 Proteins, d.h. zu einer Nidogen-2-Defizienz führt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Expressionsanalysen durchgeführt.

Es wurden u.a. die Nidogen-2-Genaktivität in bezug auf die Transkriptionsprodukte (RNA) in Geweben von homozygoten (Nid2 -/-) und normalen Mäusen (WT, +/+) untersucht. Durch die Insertion sollte zwar das Gen noch transkriptionell aktiv sein, aber es wird angenommen, dass nur die ersten vier Exons und β geo-Sequenzen des GST-Konstruktes transkribiert werden. Die Termination der Transkription erfolgt in der PolyA-Region des GST-Konstruktes. Die in 3'-Richtung nachfolgenden Nidogen-2-Sequenzen können dann nicht mehr transkribiert werden.

Zur Überprüfung dieser Annahmen wurden:

- a) Northern Blot-Experimente mit einer Nidogen-2 spezifischen Hybridisierungsprobe aus der 3' untranslatierten Region des Nidogen-2 Gens und einer *lacZ*-spezifischen Probe durchgeführt (siehe Abb. 2-26 und Abb. 2-27).
- b) RT-PCR- Experimente mit spezifischen Oligonukleotiden wurde durchgeführt, um selbst geringste Mengen von Nidogen-2 mRNA-Sequenzen nachzuweisen, die evtl. von der 3'-Gen-region nach der GST-Insertion stammen (siehe Abb. 2-29).
- c) Zur Expressionsanalyse auf Proteinebene wurden Proteinextrakte aus verschiedenen Geweben von WT, heterozygoten (Nid2 +/-) und homozygoten (Nid2 -/-) Mäusen in Western Blot-Experimenten (siehe Abb. 2-30) und Radioimmunitests (RIA; siehe Abb. 2-31 und Abb. 2-32) eingesetzt.

Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Expressionsanalysen beschrieben.

2.2.7.1 Northern Blot-Analyse

Durch Northern Blot-Analysen wurden PolyA⁺-RNA aus verschiedenen WT- und Nid2^{-/-}-Mausgeweben (Herz, Lunge, Niere und Skelettmuskel) daraufhin untersucht, ob Nidogen-2 mRNA in den Nid2^{-/-}-Gewebe exprimiert wird. Als Hybridisierungsprobe wurde ein 476bp *SacI/HindIII*-Restriktionsfragment aus dem EST3.1-Klon (dieses DNA-Fragment entspricht mit ~600bp fast der gesamten 3'UTR der murinen Nidogen-2 mRNA) mit ³²P-dCTP radioaktiv markiert. Die Northern Blot-Analysen ergaben für die WT-Nidogen-2 mRNA ein diskretes Signal bei 5.5kb. In den isolierten PolyA⁺-RNAs aus Geweben von homozygoten Mäusen konnte kein Nidogen-2 spezifisches Hybridisierungssignal nachgewiesen werden (Abb. 2-26). Das war auch bei einer längeren Expositionszeit des Autoradiogramms der Fall (Daten nicht gezeigt).

Nach Entfernen der radioaktiven Nidogen-2 Hybridisierungsproben von den Northern Blot-Membranen, wurden dieselben Northern Blot-Membranen in Experimenten mit Nidogen-1- und GAPDH-spezifischen Proben benutzt. In allen untersuchten mRNAs konnte ein ~6.0kb große mRNA mit einem 1kb *BamHI/EcoRI*-Restriktionfragment aus der murinen Nidogen-1 cDNA (Mann *et al.*, 1989) als radioaktive Hybridisierungsprobe nachgewiesen werden (Abb. 2-26). Als Positiv-Kontrolle und zur Standardisierung der geladenen mRNA-Mengen diente ein 1.2 kb DNA-Fragment der murinen GAPDH-cDNA. Diese Probe erkennt die 2.5 kb große GAPDH-mRNA (Abb. 2-26).

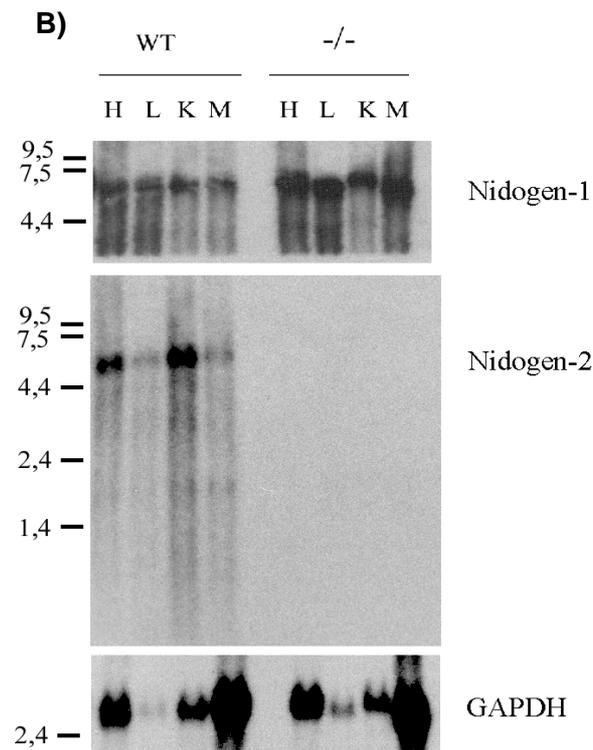
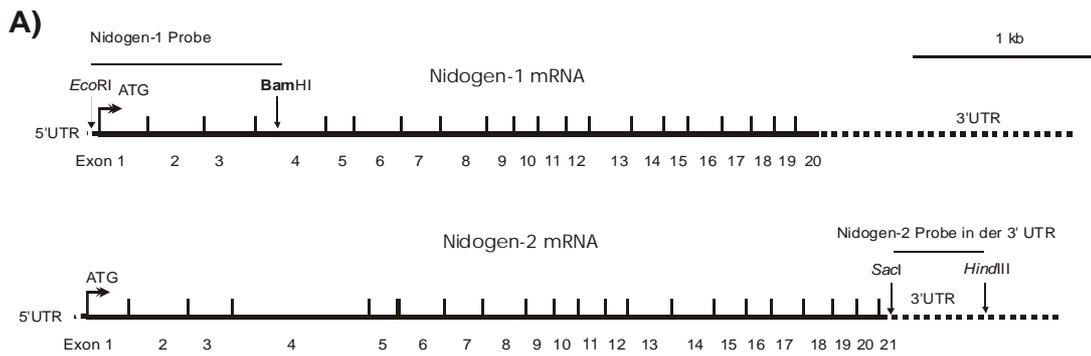


Abb. 2-26 Northern Blot-Analyse von PolyA⁺-RNA aus verschiedenen Geweben

A) Schematische Darstellung der Lage der Hybridisierungsproben für den spezifischen Nachweis der Nidogen-1 und -2 mRNA. Größenstandard 1 kb.

B) Die Autoradiogramme der hybridisierten Northern Blot-Membranen sind abgebildet. Es wurden je 4 µg PolyA⁺-RNA aus verschiedenen Geweben auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde durch Northern Blotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde für drei verschiedene Hybridisierungsexperimente mit unterschiedlichen Hybridisierungsproben eingesetzt. Zwischen jedem Experiment wurde die vorangegangene radioaktive Hybridisierungsprobe von der Membran entfernt (siehe 5.2.1.5)

Folgende hybridisierungspositive mRNAs konnten nachgewiesen werden.

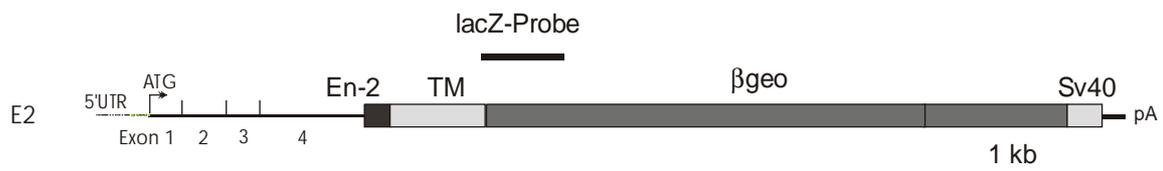
Nidogen-1: Die Nidogen-1 mRNA hat eine Größe von ca. 6kb und ist in jedem Gewebe vorhanden. Nidogen-2:

Die Nidogen-2 mRNA hat eine Größe von ca. 5.5kb. In den Spuren mit den PolyA⁺-RNAs aus den Geweben der Nid2^{-/-} Maus konnte diskretes Nidogen-2 Signal beobachtet werden. RNA-Größenstandard: kb.

Zur Kontrolle wurde eine Probe für GAPDH verwendet. (H=Herz, L=Lunge, K=Niere, M=Skelettmuskel).

Zum Nachweis der schon beschriebenen Chimär-mRNA (siehe 2.2.4) wurde eine ~800 bp großes *Bam*HI/*Cl*aI-DNA-Fragment des *E.coli lacZ*-Gens als radioaktive Hybridisierungrobe in Northern Blot-Analysen eingesetzt (Abb. 2-27). Die *lacZ*-Probe erkennt in den PolyA⁺-RNAs von verschiedenen Geweben von homozygoten Mäusen spezifisch eine distinkte mRNA mit einer Größe von ca. 6,5 kb (Abb. 2-27). Dieser Wert stimmt gut mit der errechneten Größe der mRNA überein, wenn zu der kodierenden Region des Chimärtranskriptes mit 6225 bp (diese theoretische Größe ergibt sich, aus den Längen der Exons 1 –4 des Nidogen-2 Gens und den entsprechenden Längen der kodierenden Region des GST-Konstruktes), noch Sequenzen der 3'- und 5' –UTR, sowie Poly-A-Schwanz-Sequenzen, berücksichtigt werden. Die PolyA⁺-RNA von Wild-Typ Geweben hingegen weist diese Hybridisierungssignale nicht auf (Abb. 2-27).

A)



B)

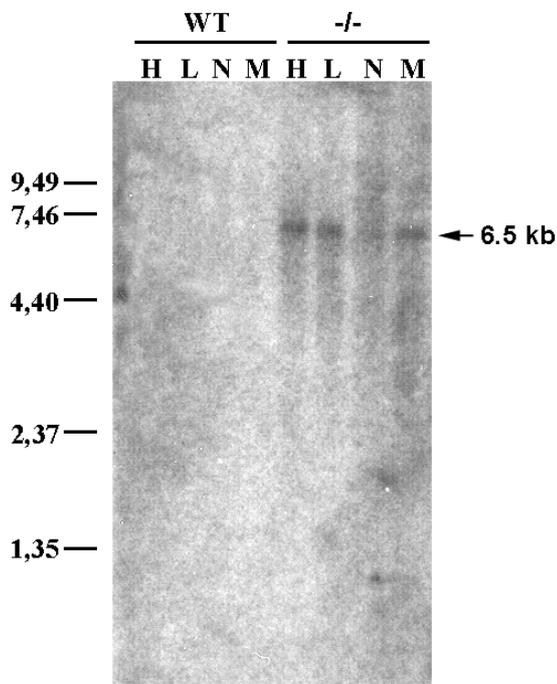


Abb. 2-27 Nachweis der Nidogen-2-Chimär mRNA durch Northern Blot-Analyse.

- A) Schematische Darstellung der Chimär-mRNA. Lage der *lacZ*-Probe (ein 0,8 kb *Bam*HI/*Cl*aI DNA-Fragment des *E.Coli β-Galaktosidase*-Gens)
- B) Abbildung des Autoradiogramms der mit der *lacZ*-Probe hybridisierter Northern Blot-Membran. Es wurden je 4μg PolyA⁺-RNA aus verschiedenen Geweben aus WT und Nid2^{-/-} Mäusen elektrophoretisch in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die hybridisierungspositive mRNA (aus Nid2^{-/-} Geweben) hat eine Größe von ca. 6,5 kb (Pfeil). In der WT mRNA ist kein *lacZ*-Signal zu erkennen. H=Herz, L=Lunge, N=Niere und M=Skelettmuskel.

2.2.7.2 RT-PCR-Analysen

Zum Nachweis von geringsten Mengen an Nidogen-2-spezifischen RNA Sequenzen, die evtl. von Gensequenzen in 3'-Richtung von der Insertionstelle der GST-Konstrukt-DNA liegen können, wurde die RT-PCR-Methode angewandt. Bei dieser Methode wird zunächst von RNAs einzelsträngige cDNAs durch das Enzym Reverse Transkriptase hergestellt. Diese cDNA-Stränge dienen dann als Matrizen für die anschließenden PCR-Reaktionen, die nun entsprechend den gewählten Oligonukleotiden eine starke Amplifikation von spezifischen Sequenzen erlauben (Bustin, 2000).

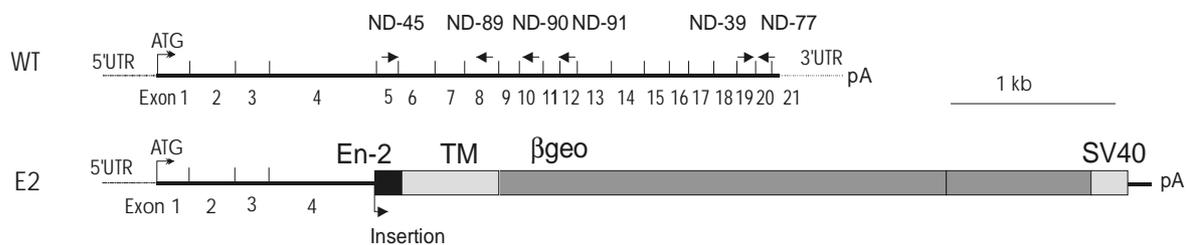
Die RNA aus Nieren adulter heterozygoter und homozygoter Nid2-Mäusen wurde daher durch sehr sensitive RT-PCR-Reaktionen auf die Anwesenheit von Nidogen-2- und Nidogen-1-spezifischen RNAs untersucht. Dabei diente die Nidogen-1 spezifische Reaktion als interne Positiv-Kontrolle. Für die nachfolgenden RT-PCR-Analysen wurden Oligonukleotidpaare und PCR-Reaktionsbedingungen ausgearbeitet, durch die kodierende Regionen, die von mehreren Exons stammen, amplifiziert werden können. Damit sollte sichergestellt werden, dass die RT-PCR-DNA-Produkte mit bestimmter Größe auf eine RNA als Matrize zurückzuführen sind. Wohingegen sich PCR-DNA-Produkte, die durch eventuelle Kontaminationen genomischer DNA als Matrize entstehen, durch die Anwesenheit von Introns sich von den o.a. RT-PCR-DNA-Produkten durch ihre Größe unterscheiden lassen.

Durch die Kombinationen des genomisch-orientierten Oligonukleotids ND45 (Exon 5) mit den antigenomisch-orientierten Oligonukleotiden ND89 (Exon 8), ND90 (Exon10) oder ND91 (Exon 12) können jeweils RT-PCR-DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Größen aus der Nidogen-2 mRNA amplifiziert werden (Tab. 2-5; Abb. 2-29). Das Oligonukleotidpaar ND39/ND77 liefert ein kleines RT-PCR-DNA-Fragment am 3' Ende der mRNA (Abb. 2-29). Mit Nid2 +/- RNA als Matrize werden alle RT-PCR-DNA-Fragmente der Nidogen-2 mRNA (N2a-N2d Abb. 2-29) mit den erwarteten Größen generiert. In den Reaktionen mit Nid2 -/- RNA als Matrize werden mit den Oligonukleotiden ND39/ND77 und ND45/ND89 RT-PCR-DNA-Fragmente, die von der Größe den beiden RT-PCR-DNA-Fragmenten N2a (230bp) und N2b (334bp) entsprechen könnten, in sehr geringfügigen Mengen amplifiziert. Die Spezifität der schwach amplifizierten RT-PCR-DNA-Fragmente läßt sich aber mit diesem Experiment nicht eindeutig bestimmen. Die beiden größeren RT-PCR-DNA-Fragmente N2c und N2d sind nicht detektierbar. Das als interne Positiv-Kontrolle amplifizierte RT-PCR-DNA-Fragment aus der Nidogen-1 mRNA wird in allen Reaktionen vergleichbar verstärkt.

Oligonukleotid Paar	RT-PCR-Produkte		Lage der Oligonukleotide	
	Abkürzung/Genspezifität	Größe (bp)	Genomische Orientierung (Exon)	Antigenomische Orientierung (Exon)
ND-61/ND-62	N1/Nidogen-1 *	334	1	2
ND-39/ND77	N2a/Nidogen-2	230	5	8
ND45/ND89	N2b/Nidogen-2	624	5	10
ND45/ND90	N2c/Nidogen-2	1007	5	12
ND45/ND91	N2d/Nidogen-2	1252	19	20

Abb. 2-28 Übersichtstabelle der verwendeten Oligonukleotidpaare und theoretisch erwartete RT-PCR-DNA-Fragmentlängen.

A)



B)

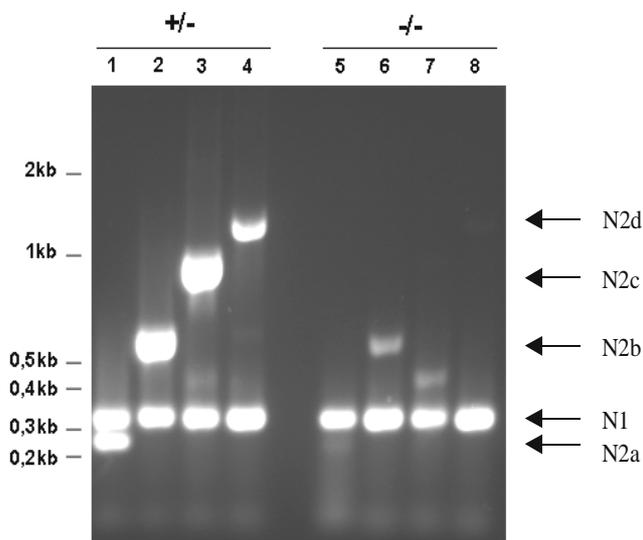


Abb. 2-29 RT-PCR Analyse.

A) Schematische Darstellung der WT Nidogen-2 mRNA (oben) und der chimären Nid2 mRNA (unten). Lage und Orientierung der Oligonukleotide (Pfeile). Größenmarker 1 kb
 B) In einem 1% Agarosegel aufgetrennte, mit Ethidiumbromid gefärbte RT-PCR Reaktionsprodukte.

Eingesetzte Oligonukleotidpaare:

Spuren 1, 5: ND-39/ND-77; ND-61/ND-62

Spuren 2, 6: ND-45/ND-89; ND-61/ND-62

Spuren 3, 7: ND-45/ND-90; ND-61/ND-62

Spuren 4, 8: ND-45/ND-91; ND-61/ND-62

Als RT-Matrize diente Gesamt-RNA aus der Niere Nid2 +/- (Spuren 1-4), bzw. Nid2 -/- (Spuren 5-8) Mäusen.

RT-PCR-Produkte mit Nid2 +/- RNA als Matrize: Alle Nidogen-2 RT-PCR-DNA-Fragmente (N2a-N2d) werden stark und mit der erwarteten RT-PCR-DNA-Fragmentlänge

amplifiziert. RT-PCR-Produkte mit Nid2 -/- RNA als Matrize: Keine spezifische Amplifizierung der kurzen Nidogen-2 mRNA RT-PCR-DNA-Fragmente (N2a, N2b; Spuren 5, 6). Sonst sind keine entsprechenden RT-PCR-DNA-Fragmente detektierbar (Spuren 7 und 8). Das Oligonukleotidpaar ND-61/ND-62 führt erwartungsgemäß in allen RT-PCR-Reaktionen zu einem Nidogen-1 spezifischen Produkt N1 (Positivkontrolle Spur 1-8).

2.2.7.3 Western Blot-Analyse mit Proteinextrakten aus Nid2^{-/-} und WT Mäusen

Das GST-Konstrukt ist im Intron 4 des murinen Nidogen-2 Gens inseriert (siehe 2.2.4) und kann zu einer Chimär-mRNA führen (Abb. 2-27). Diese besteht theoretisch aus den Sequenzen von Exon 1-4 und den Sequenzen der GST-Konstruktmodule, die unter anderen für das β geo-Segment kodierenden. Die Exons 1-4 des Nidogen-2 Gens kodieren für die globuläre G1-Domäne und die flexible Verbindungsregion zwischen den G1- und G2-Domänen (Abb. 2-12). Abberante mRNA-Moleküle und fehlerhaft gespleisste RNAs sind oft von nur sehr kurzer Lebensdauer oder werden in der Regel nicht translatiert, d.h. von diesen RNA-Molekülen sollten keine Polypeptide entstehen. Theoretisch können trotzdem unvollständige Transkripte oder Chimär-mRNAs, die Nidogen-2 Sequenzen von dem mutanten Nid2-Allel beinhalten, in homozygoten Tieren zu verkürzten Nidogen-2-Sequenzen enthaltenden Peptiden translatiert werden. Um dies zu überprüfen, wurden Western-Blot Analysen mit Proteinextrakten aus Herz, Lunge, Niere und Skelettmuskel von adulten WT- und Nid2^{-/-} Mäusen durchgeführt.

Zum spezifischen Nachweis und zur Unterscheidung von Nidogen-1 und Nidogen-2 wurden entsprechend spezifische polyklonale Antikörper eingesetzt (siehe 5.1.1.6). Herstellung und Überprüfung der Spezifität dieser polyklonalen Seren erfolgte in der Abteilung für Proteinchemie von Dr. R. Timpl (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried). Die Antikörper wurden Herrn Dr. B.L. Bader freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das Kaninchen anti-Nidogen-1 Antiserum erkennt das vollständige Nidogen-1 Protein mit einem Molekulargewicht (M_r) von ca. 150 kDa und die typischen Abbauprodukte, besonders das 97 kDa, aber auch das 120 kDa Polypeptid-Fragment (Abb. 2-30). Das anti-Nidogen-2 Antiserum erkennt in den Nid2^{+/+} Proteinextrakten von Herz, Lunge und Skelettmuskel das vollständige Nidogen-2 Protein mit einem M_r von 200 kDa. Außerdem werden die entsprechenden Abbauprodukte von Nidogen-2 bei 150 kDa und bei 116 kDa, erkannt. In dem Nid2^{+/+} Proteinextrakt aus der Niere wird im Gegensatz zu den übrigen WT-Extrakten nur das 116 kDa Abbauprodukt des Nidogen-2-Proteins markiert. In Nid2^{-/-} Proteinextrakten können diese Nidogen-2-spezifischen Polypeptide nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beschriebene Mutation im Nidogen-2 Gen die Expression eines funktionellen Nidogen-2 Produktes verhindert.

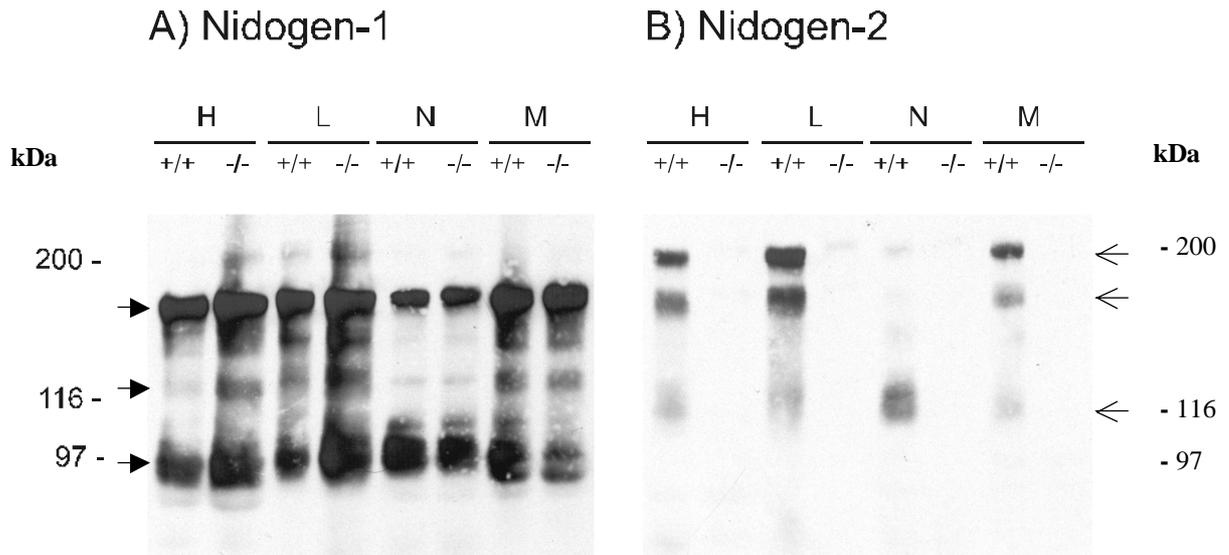


Abb. 2-30 **Western-Blot-Analyse: Expression von Nidogen-1 und -2 in verschiedenen Geweben**

Jeweils 60 μ g Protein aus Herz (H), Lunge (L), Niere- (N) und Skelettmuskel-(M)-Proteinextrakten von *Nid2* $-/-$ und WT Mäusen wurde in einem nicht-reduzierenden 7.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Antikörperinkubations- und Waschschrritten wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch das ECL-Reagenz auf den Membranen nachgewiesen.

A) Der polyklonale Antikörper gegen murines Nidogen-1 erkennt das vollständige Protein mit einer Größe von ca. 150 kDa und die typischen, proteolytischen Abbauprodukte von ca. 116 kDa und 97 kDa (geschlossene Pfeile). B) Der polyklonale Antikörper gegen Nidogen-2 erkennt das vollständige murine Nidogen-2 mit einer Größe von ~200 kDa und die typischen Abbauprodukte von 150 kDa und 116 kDa (offene Pfeile). In den Extrakten von *Nid2* $-/-$ Mausgeweben sind keine entsprechenden Signale für Nidogen-2 erkennbar. Als Standard diente ein Gemisch aus Proteinen mit definiertem Molekulargewicht (BioRad).

2.2.7.4 Quantifizierung der Proteine Nidogen-1, -2 und Laminin γ 1 in Gewebeextrakten aus *Nid2* $+/-$, $-/-$ und WT Mäusen durch einen Radioimmunitest

Der Radioimmunitest (RIA) wird verwendet, um Proteinmengen im Piko- bis Nanogrammbereich zu messen (Timpl & Risteli, 1981). Das Prinzip des Test beruht auf einer kompetitiven Bindung eines radioaktiv markierten und dem gleichen, unmarkierten Protein mit einem spezifischen Antikörper. Mit radioaktiv markierten und unmarkierten rekombinanten Protein (Nidogen-1, -2 und Laminin γ 1) wird eine Verdrängungs-Standardkurve, durch die Messung der Radioaktivität des präzipitierten Antikörper-Antigenkomplexes, erstellt. Mit Hilfe dieser Protein-spezifischen Standardkurven können die entsprechende Proteinmengen aus den Extrakten mittels der o.a. Verdrängungsreaktionen bestimmt werden.

Durch einen RIA wurden die Proteinmengen an Nidogen-1, -2 und Laminin γ 1 in Proteinextrakten von Niere und Skelettmuskel von *Nid2* $-/-$, $+/-$ und WT-Mäusen bestimmt werden. Mit Hilfe dieses Tests soll untersucht werden, ob a) sich Nidogen-2 spezifische Polypeptide in den Extrakten von homozygoten Mäusen nachweisen lassen und b) sich die Mengen an Nidogen-1 bzw. Laminin γ 1 in den *Nid2* $-/-$ Proteinextrakten gegenüber den

Extrakten von WT und Nid2 +/- Mäusen ändern. Für die Durchführung dieser Tests wurden aus je fünf Nid2 -/-, +/- und WT-Mäusen Proteinextrakte aus Niere und Skelettmuskel angefertigt (siehe 5.2.2.1). Die Ergebnisse der RIAs sind in Abb. 2-31 zusammengefaßt und in Abb. 2-32 grafisch dargestellt.

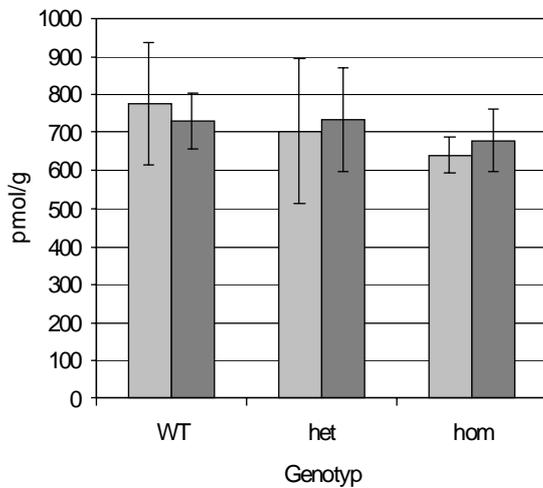
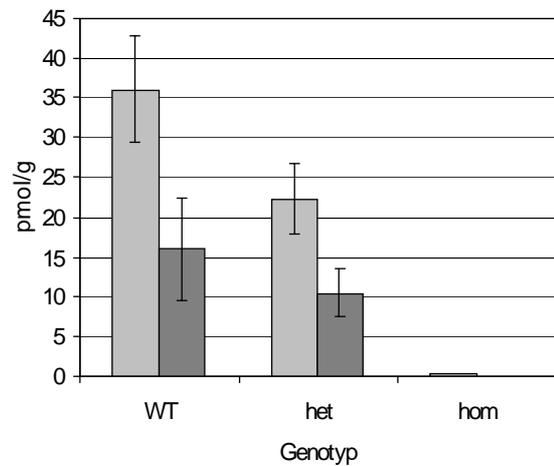
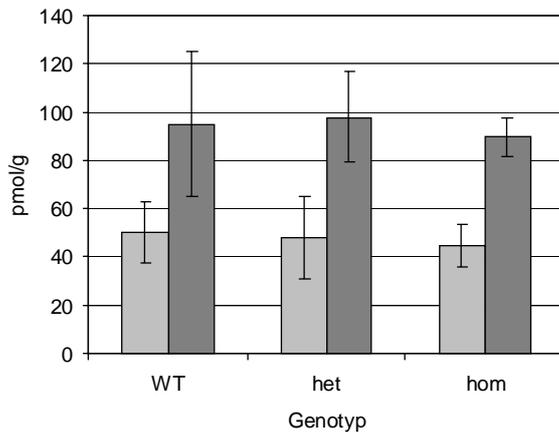
Genotyp	#	pmol/g Frischgewebe					
		Niere			Skelettmuskel		
		Nidogen-1	Nidogen-2	Laminin γ 1	Nidogen-1	Nidogen-2	Laminin γ 1
WT	1	636	25.2	41	858	17.7	138
	2	823	39.4	41	706	16.5	101
	3	739	39.2	47	700	8.2	83
	4	1032	42.7	51	677	12.7	62
	5	657	34.4	71	719	25.3	92
M \pm SD		777 \pm 160	36 \pm 6.7	50.2 \pm 12.4	732 \pm 72	16 \pm 6.4	95.2 \pm 30
+/-	6	644	23.2	59	832	12.8	105
	7	543	15.0	35	691	8.5	96
	8	702	25.7	42	870	14.2	120
	9	604	21.2	32	522	7.0	68
	10	1029	25.8	73	760	10.0	101
M \pm SD		703 \pm 192	22.2 \pm 4.4	48.2 \pm 17.4	735 \pm 137	10.5 \pm 3	98 \pm 19
-/-	11	632	< 0.15	33	634	< 0.5	97
	12	655	< 0.15	57	734	< 0.05	78
	13	593	< 0.4	42	566	< 0.05	93
	14	709	< 0.4	48	773	< 0.05	86
	15	605	< 0.4	43	688	< 0.05	96
M \pm SD		639 \pm 46	< 0.3	44.6 \pm 8.8	679 \pm 82	< 0.1	90 \pm 8

Abb. 2-31 **Ergebnisse des Radioimmunitest (RIA).**

Gemessen wurden die Proteinmenge (in pmol/g Gewebe) der Laminin γ 1 Kette, Nidogen-1 und -2 in Nieren- und in Skelettmuskelextrakten aus Nid2 +/-, -/- und WT Mäusen. Die Einzelwerte von jeweils 5 Mäusen pro Genotyp und die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichungen (M \pm SD) sind in der Tabelle zu sehen. Gewebespezifische Unterschiede für die entsprechenden Proteine zeigen sich in den WT-Geweben: Nidogen-1 (777 pmol/g) ist in der Niere um einen Faktor 20 stärker vorhanden als Nidogen-2 (36 pmol/g) und im Skelettmuskel um einen Faktor 45. (Nidogen-1:732 pmol/g, Nidogen-2:16 pmol/g)

In den Proteinextrakten von Nid2 +/- Geweben entspricht die Nidogen-2 Menge 61% (Niere), bzw. 65% (Skelettmuskel) der entsprechenden WT-Menge. Die Werte für Nidogen-1 und Laminin unterscheiden sich nicht signifikant von den Werten der Kontrolltiere.

In der Niere von Nid2 -/- Mäusen liegen <0.3 pmol/g und im Skelettmuskel <0.1 pmol/g Nidogen-2 vor. Das entspricht <0.8% bzw. <0.6% der Nidogen-2 Menge in einer WT-Maus. Die Nidogen-1 und Laminin γ 1 Mengen sind in der Nid2 -/- Maus im Vergleich zu den Kontrolltieren ungefähr gleich.

A)**B)****C)****Abb. 2-32 Grafische Darstellung der Daten des RIA**

Quantifizierung der Proteine Nidogen-1 (A), Nidogen-2 (B) und Laminin γ 1-Kette (C) in Proteinextrakten von aus Niere (hellgraue Säulen) und Skelettmuskel (dunkelgraue Säulen). Die Proteinmengen sind in pmol/g angegeben. Die einzelnen Proteinmengen sind aus Abb. 2-31 zu ersehen.

Die ermittelten Werte der RIAs zeigen, dass die Nidogen-2 Menge in der Niere (<0.3 pmol/g) bzw. in Skelettmuskel (<0.1 pmol/g) sehr niedrig sind. Sie entsprechen nur noch $<0.8\%$, bzw. $<0.6\%$ des WT-Proteingehaltes. Diese Werte liegen unter dem Bereich der Nachweisgrenze des RIAs und können nicht mehr als signifikante Werte betrachtet werden. Die Abwesenheit von Nidogen-2-spezifischen Polypeptid spricht für eine Nidogen-2 Defizienz, d.h. die GST-Mutation im Nidogen-2 Gen ist eine molekulare Nullmutation. Der Nidogen-2-Gehalt ist in Nid2 +/- Proteinextrakten reduziert: in der Niere auf 61% und des Skelettmuskels auf 65% des WT-Proteingehaltes (Abb. 2-32 B). Der Nidogen-1, bzw. Laminin γ 1 Gehalt zeigt hingegen keine signifikanten Änderungen in Gewebeextrakten aus Nid2 +/- oder Nid2 -/- Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen (Abb. 2-32 A und C).

2.2.8 Analysen des Phänotyps der Nid2 -/- Maus

Als Phänotyp bezeichnet man die Gesamtheit der Merkmale (Erscheinungsbild) eines vollentwickelten Organismus. Hierbei spielt die Wechselwirkung zwischen den erblichen, genetischen Informationen, und den inneren, bzw. äußeren Einflüssen während der Entwicklung eine bedeutende Rolle. Die Inaktivierung eines Gens führt zur Abwesenheit (Defizienz) des entsprechenden Genprodukts. Wie sich diese Defizienz auf das äußere Erscheinungsbild und die funktionellen Eigenschaften eines Organismus *in vivo* auswirkt, wird durch Analysen der genetisch veränderten Tiere im Vergleich zu WT-Tieren untersucht.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine erste Charakterisierung von Nidogen-2 defizienten Mäusen durchgeführt. Diese Phänotyp-Analyse beschränkte sich auf folgende Aspekte:

1. Allgemeine Beobachtungen der Tiere
2. Bestimmung des Körpergewichts
3. Allgemeine Histologie von ausgewählten Organen
4. Nachweis von typischen BM-Proteinen in Gewebeschnitten von Organen durch Immunfluoreszenzmikroskopie
5. Ultrastrukturelle Darstellung der Basalmembranen in bestimmten Organen

Die unter 5. beschriebene Analyse wurde in einer Kooperation mit Dr. Nicolai Miosge, (Zentrum Anatomie, Abteilung Histologie, Universität von Göttingen) durchgeführt.

2.2.8.1 Allgemeine Beobachtungen und Untersuchung des Körpergewichts und der Körpergewichtszunahme

Das Körpergewicht ist von vielen inneren und äußeren Faktoren abhängig, z.B.: Körpergröße, Alter, Ernährung, verschiedener endokriner Faktoren. Da sich physiologische Störungen und Krankheiten oft im Körpergewicht widerspiegeln, kann eine signifikante Abweichung des Körpergewichts gegenüber den Normalwerten ein Hinweis auf eine krankhafte Veränderung des Organismus sein (für ein Beispiel siehe Pomp, 1997).

Nidogen-2-defiziente Tiere zeigen keine Auffälligkeiten während der normalen Käfighaltung. Durch Wiegen wurde untersucht, ob es Unterschiede im Körpergewicht oder in der Körpergewichtszunahme zwischen gleichaltrigen Nid2 -/- , +/- und +/+ -Mäusen gibt. 42 Nachkommen aus Verpaarungen mit Nid2 +/- Elterntieren wurden im Alter zwischen 3 und 11 Wochen gewogen (Abb. 2-33). Es lassen sich durch diese vorläufige Untersuchung keine

signifikanten Unterschiede der Gewichtszunahme entdecken (Abb. 2-33). In stichprobenartig, zusammengesetzten Gruppen aus adulten (alle älter als 9 Monate) männlichen und weiblichen Nid2 -/-, +/- und +/+ Mäusen (Gesamt n=48) wurde das Körpergewicht durch drei Wägungen im Abstand von je einem Monat bestimmt. Die Gruppen mit den männlichen und weiblichen Nid2 -/- Tieren zeigen keine signifikanten Gewichtsunterschiede zu den entsprechenden Kontrollgruppen.

A)

A) Geschlecht	Alter (Wochen)	Genotyp (Zahl der Mäuse, n=42)		
		+/+ (5)	+/- (5)	-/- (6)
Weibchen	3	14,2 ± 2,5	14,5 ± 0,4	13,3 ± 1,0
	4	17,9 ± 1,3	19,0 ± 1,4	17,1 ± 0,6
	5	19,5 ± 1,2	20,2 ± 0,7	18,7 ± 1,2
	11	23,4 ± 0,9	25,9 ± 0,4	22,2 ± 1,6
			+/+ (5)	+/- (15)
Männchen	3	16,3 ± 2,7	16,4 ± 1,9	15,1 ± 1,3
	4	20,8 ± 1,3	21 ± 1,5	20,1 ± 1,3
	5	22,6 ± 0,5	22,6 ± 1,8	22 ± 2
	11	28,9 ± 1,7	27,4 ± 2,3	26,9 ± 3

B)

Geschlecht	Genotyp (Zahl der Mäuse n=48)		
	+/+	+/-	-/-
Weibchen	34,1 ± 3,4 g (10)	29,8 ± 1,6 g (6)	29,9 ± 0,6 g (11)
Männchen	33,1 ± 1,8 g (8)	36,7 ± 2,7 g (6)	35,1 ± 2,7 g (7)

Abb. 2-33 Bestimmung des Körpergewichts von Nid2 -/-, +/- und +/+ Mäusen

A) Tabellarische Übersicht des Körpergewichts von Nachkommen aus Nid2 +/- Elterntieren. n= 42 Mäuse aus sechs Würfen von Nid2 +/- Elterntiere wurden im Alter von 3 bis 11 Wochen gewogen. Angegeben sind die bestimmten Gewichte (g) mit den entsprechenden Standardabweichungen.

B) n= 48 ältere, adulte Tiere wurden dreimal im Abstand von einem Monat gewogen. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt des ersten Wiegens ca. 9 Monate alt.

2.2.8.2 Analysen von Nid2 -/- defizienten Geweben

Die normale Ausbildung, Entwicklung (Organogenese) und Funktion von Organen bestimmt die Vitalität und den Gesundheitszustand (Phänotyp) eines Organismus. Organe bilden eine funktionelle Einheit aus Zellen und Geweben, die spezifische Aufgaben erfüllen können. Auf die Beteiligung von BM, bzw. der ECM an der Ausbildung und der Aufrechterhaltung verschiedener Gewebearten in physiologischen und pathologischen Situationen wurde bereits in der Einleitung hingewiesen (siehe 1.4). Mutationen in verschiedenen ECM-Proteinen können, z.B. zu Muskeldystrophien, Hauterkrankungen und Nierenschädigungen führen. Diese Krankheitsbilder können durch histologische Untersuchungen der betroffenen Organe und Darstellungen der Zellen und der BM, durch indirekte Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie genauer beschrieben werden.

Um einen ersten Einblick zu erhalten, ob eine Schädigung von Geweben oder Organen durch die Nidogen-2-Defizienz in Nid2 $-/-$ Mäusen vorliegt, wurde die makroskopische Anatomie und die Lage ihrer Organe, wie z.B. Herz, Lunge, Niere, Milz, Leber, Sexual- und Fortpflanzungsorgane untersucht. Dabei zeigten sich bei den Präparationen von Nid2 $-/-$ Mäusen keine Auffälligkeiten im Vergleich zu Wild-Typ Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Zur histologischen Untersuchung von Geweben der Nid2 $-/-$ Mäuse wurden zunächst ausgewählte Organe (Herz, Skelettmuskel, Nieren, Haut, Zunge und Lunge) entnommen und histologische Präparate angefertigt. Gefrier- und Paraffinschnitte von diesen Organen wurden dann entsprechend a) für die Analyse der mikroskopischen Anatomie mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt (siehe 2.2.8.2.1) und b) für indirekte Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt (siehe 2.2.8.2.2). Die hier gezeigten Abbildungen wurden zur Dokumentation von Dr. B.L. Bader zur Verfügung gestellt. Die Präparate für ultrastrukturelle Untersuchungen wurden durch eine spezielle Präparationsmethode von Dr. N. Miosge, Universität Göttingen, hergestellt (Miosge *et al.*, 2000 b).

2.2.8.2.1 Histologische Untersuchung einzelner Organe von Nid2 $-/-$ Mäusen

Für die Analyse der Gewebeanatomie wurden verschiedene Organe von Nid2 $-/-$ und Kontrolltieren (nid2 $+/-$ und $+/+$) im Alter von 3 Monaten präpariert, Gewebeschnitte angefertigt und H&E gefärbte Schnitte unter dem Lichtmikroskop miteinander verglichen. Die vorläufigen histologischen Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf Herz, Skelettmuskel, Niere, Lunge, Zunge, Haut. In den Abbildungen sind exemplarisch Herz und Skelettmuskel (Abb. 2-34), Niere und Lunge (Abb. 2-35) dargestellt. Es konnten keine pathologischen Veränderungen in diesen Geweben festgestellt werden.

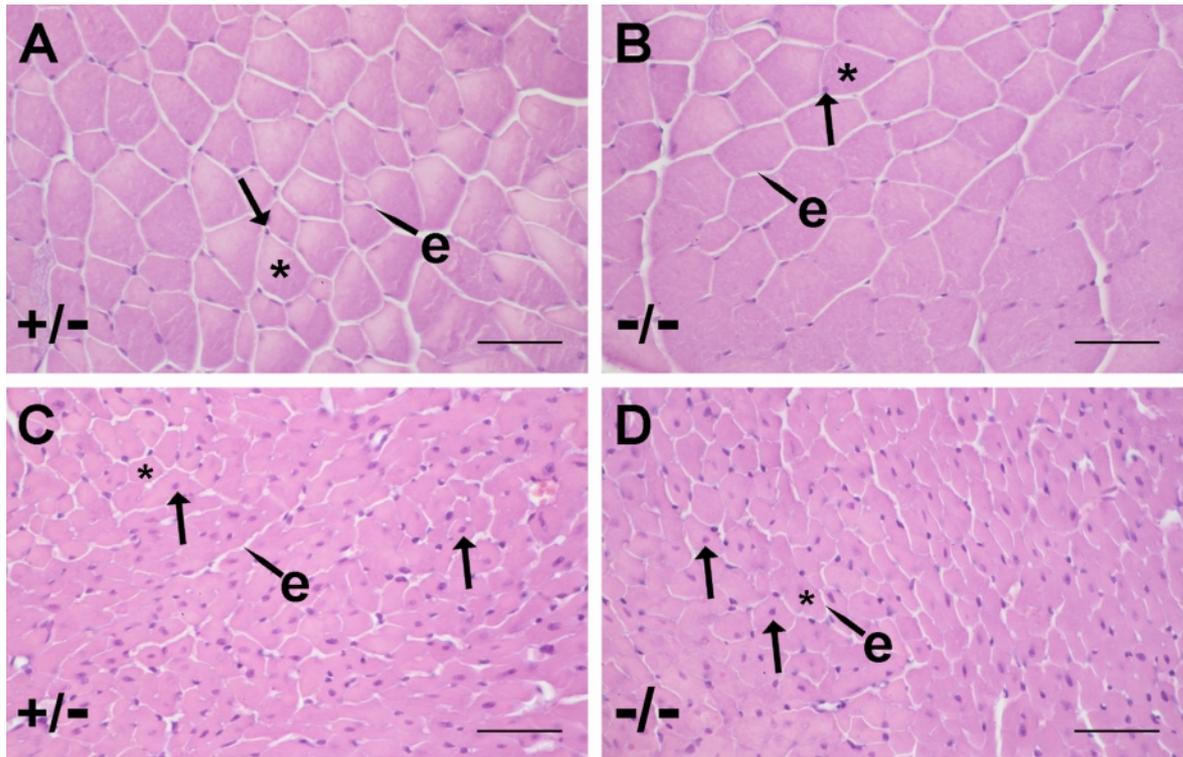


Abb. 2-34 Lichtmikroskopische Darstellung von H&E-gefärbten Paraffinschnitten der quergestreiften Skelettmuskulatur (A,B) und der Herzmuskulatur (C,D) aus adulten Nid2^{-/-} (B, D) und Kontrollmäusen (A, C). Die Querschnitte zeigen die typische, periphere Position der Muskelfaserkerne (Pfeil) in den einzelnen Skelettmuskelfasern (Stern). Das Endomysium (e) umschließt als feines Netz von Bindegewebsfasern die Muskelzellen (heller Zwischenraum). In diesem Hüllgewebe liegen Kapillaren und Nervenfasern, welche bei dieser Vergrößerung kaum zu erkennen sind. Im Herzmuskel haben die Muskelfaserkerne (Pfeil) eine mehr zentrale Position in den Muskelfasern (Stern). Größenstandard 50µm.

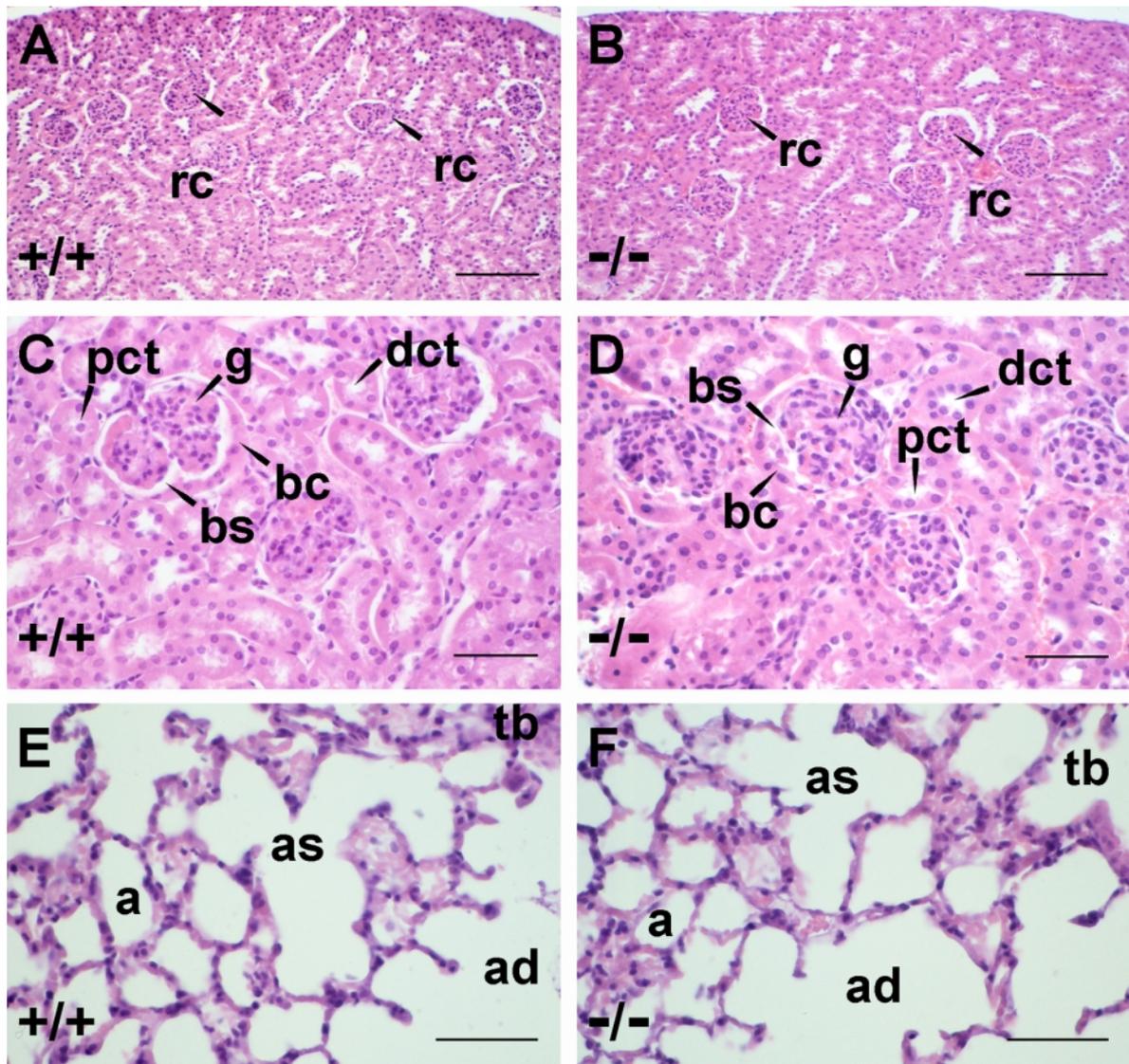


Abb. 2-35 Lichtmikroskopische Darstellung von H&E-gefärbten Paraffinschnitten der Niere (A-D) und der Lunge (E, F) aus Nid2^{-/-} (B, D, F) und Kontrollmäusen (A, C, E). Die dargestellten Querschnitte (A,B) zeigen den Bereich der Nierenrinde (*Cortex renalis*). Das sogenannte Rindenlabyrinth besteht aus den Nierenkapseln (*Corpusculum renale*, rc) und gewundenen Kanälchenabschnitte (*Tubuli contorti*), die sich in einen proximalen (*T.c proximalis*, pct) und einen distalen (*T.c distalis*, dpt) Abschnitt aufteilen. Eine Detailaufnahme der Nierenkapsel zeigen die Bilder C und D. Eine Nierenkapsel wird aus einem Kapillarknäuel (*Rete capillare glomerulare*, Glomerulum, g) gebildet, der in einer sogenannten Bowman Kapsel (*Capsula glomerulie*, bc) eingefasst ist. Der Glomerulus wird aus den Endothelzellen der Kapillarwände, dem Mesangium und den Podozyten aufgebaut. Als Mesangium wird das Gewebe bezeichnet, das zwischen den Glomerulumkapillaren liegt und aus Mesangiumzellen und der Mesangiummatrix (*Lamella hyalina*) besteht. Die Bowman Kapsel wird aus einem flachen, einschichtigen Plattenepithel gebildet. Vom inneren (viszeralen) Blatt der Kapsel leiten sich die Podozyten ab, welche die Glomerulus-Kapillaren außen abdecken und für die Bildung des Primärharns von besonderer Bedeutung sind. Der Primärharn wird in den Bowman-Kapselraum (bs) abgegeben (dieser Raum ist durch die Gewebefixierung vergrößert) und über den *T.c proximalis* (pct) abgeleitet. Zwischen den pct und dem dct liegen Blutgefäße die mit Erythrozyten gefüllt sind.

Die dargestellten Querschnitte E und F zeigen einen Ausschnitt der Lunge. Die Endbronchiolen (*Bronchioli terminales*, tb) sind bei dieser Vergrößerung nur Ausschnittsweise zu erkennen. Sie enden in Gängen (*Ductus alveolares*, ad) deren Wände vollständig mit Lungenbläschen (*Saculi Alveolares*, a) bedeckt sind. Zwischen benachbarten Alveoli liegt eine Wand (Alveolares Septum), die aus den Epithelien der beiden Alveolaren, Blutgefäßen und einer speziellen, elastischen ECM (mit Kollagen und Elastin als Hauptbestandteil) gebildet wird. Größenstandard: 100µm

2.2.8.2.2 Analysen der Expression und Lokalisation von BM-Proteinen in Geweben durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung der Expression und Lokalisation von Nidogen-1 und Nidogen-2, sowie der Hauptkomponenten der BM, die Laminin γ 1-Kette, Kollagen IV und Perlecan in Geweben von verschiedenen Organen wurden Gewebeschnitte (Gefrier- und Paraffinschnitte) von Nid2 +/+ , +/- und -/- Mäusen zunächst mit folgenden spezifischen Antikörpern (AK) inkubiert:

1. Monoklonaler Ratten anti-Maus Nidogen-1 AK: AK # BE1/4
2. Polyklonaler Kaninchen anti-Maus Nidogen-2 AK: AK # 1130 + E
3. Polyklonaler Kaninchen anti-Maus Laminin γ 1 AK: AK # 1083 + E
4. Polyklonaler Kaninchen anti-Maus Kollagen IV AK: AK # 1119 + E
5. Polyklonaler Kaninchen anti-Maus Perlecan AK: AK # 1056 + E

Für Fluoreszenzfärbungen wurden Gewebeschnitte aus Nid2 -/- und Kontrollmäusen untersucht. Gewebeschnitte aus Niere (Abb. 2-36 und Abb. 2-37), Herz- (Abb. 2-40 und Abb. 2-41) und Skelettmuskel (Abb. 2-38 und Abb. 2-39) wurden mit primären Antikörpern (AK) gegen Maus Nidogen-1 und -2, Laminin γ 1, Kollagen IV und Perlecan inkubiert. Der Färbungsnachweis der Lokalisation der primären Antikörper erfolgte durch entsprechende sekundäre AK, die mit einem roten (CY3), bzw. grünen (CY2) Fluoreszenzfarbstoff konjugiert waren. Durch Doppelfärbungen mit AK gegen Nidogen-1 und Nidogen-2 konnte die Gewebelokalisationen der beiden Proteine im gleichen Gewebeschnitt miteinander verglichen werden (Abb. 2-36, Abb. 2-38 und Abb. 2-40). Um die Expression und die Verteilung anderer BM-Proteine in derselben Geweberegion zu untersuchen, wurden Einzelfärbungen mit AK gegen Laminin γ 1, Kollagen IV und Perlecan in den entsprechenden, nachfolgenden Gewebeschnitten angefertigt (alle rot, Abb. 2-37, Abb. 2-39 und Abb. 2-41). Die gezeigten Abbildungen wurden hier zur Dokumentation von Dr. B.L. Bader zur Verfügung gestellt.

In der Niere ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Nidogen-1 und -2 Lokalisation erkennbar (Abb. 2-36). Eine unterschiedliche Verteilung der beiden Isoformen zeigt sich aber in muskulären Gewebe (Abb. 2-38 und Abb. 2-40). Die Nidogen-1-spezifische Färbung ist für die BM der Muskelfasern (Endomysium) und der Kapillaren gleich stark. Intensive Nidogen-2-spezifische Färbungen sind hauptsächlich in den BM der Kapillaren zu beobachten, wohingegen die Färbung des Endomysiums deutlich schwächer ist. Keines der aus Nid2 -/- Mäusen präparierten Gewebe zeigt ein diskretes Signal mit dem AK gegen Nidogen-2. Dies bestätigt die Nidogen-2 Defizienz. Die Negativkontroll-Färbungen von Schnitten, d.h. ohne primären AK, aber mit sekundärem AK, zeigen keine spezifischen Färbungen (Daten nicht

gezeigt). Die Verteilungen der BM-Proteine Kollagen IV, Laminin $\gamma 1$ und Perlecan in Geweben von Nid2 $-/-$ im Vergleich zu WT Mäusen waren nicht voneinander zu unterscheiden (Abb. 2-37, Abb. 2-39 und Abb. 2-41).

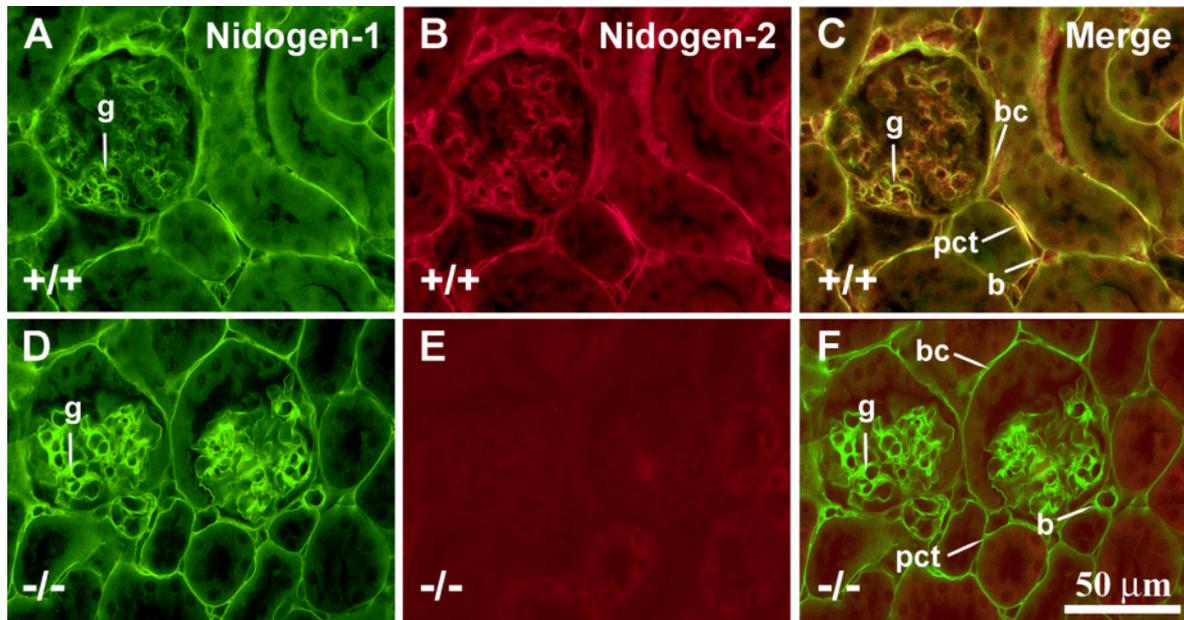


Abb. 2-36 Indirekte Immun-Fluoreszenz-Doppelfärbung von transversalen Schnitten der Niere einer Nid2 $-/-$ (D-F) und einer Kontrollmaus (A-C) mit Nidogen-1-spezifischen AK (grün; A, D) und Nidogen-2-spezifischen AK (rot; B, E). Die Bilder in C und F zeigen die Überlagerung (Merge) der jeweiligen Einzelaufnahmen pro Gewebeschnitt. Die übereinstimmende Lokalisation der beiden Nidogene in WT Gewebe der Einzelaufnahmen (A, B) erscheint in (C) durch die Überlagerung der beiden Einzelaufnahmen als gelbe Färbung. In dem Gewebeschnitt von der Nid2 $-/-$ Maus ist keine Nidogen-2-spezifische Färbung vorhanden (F). Größenstandard 50 μ m.

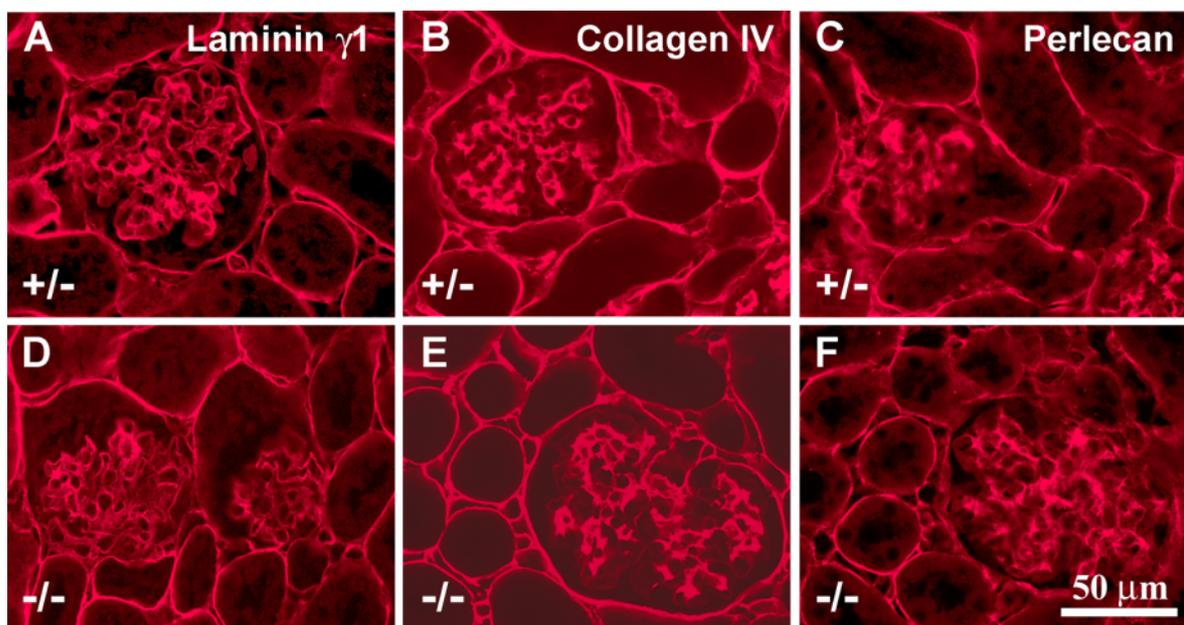


Abb. 2-37 Indirekte Immun-Fluoreszenzaufnahmen von aufeinanderfolgenden Gewebequerschnitten aus der Region der Nierenrinde von Nid2 $-/-$ (D-F) und Kontrollmäusen (A-C). Als primäre AK wurden AK gegen Laminin $\gamma 1$ (A, D), Kollagen IV (B, E) und Perlecan (C, F) eingesetzt. Die sekundären AK sind mit CY3 konjugiert. Starke Fluoreszenz zeigt sich in den Basalmembranen der Nierentubuli, der Blutgefäße und der Nierenkörperchen. Die Signalstärken und Lokalisationen zeigen keine Unterschiede zwischen WT und Nid2 $-/-$ Gewebe. Größenstandard: 50 μ m.

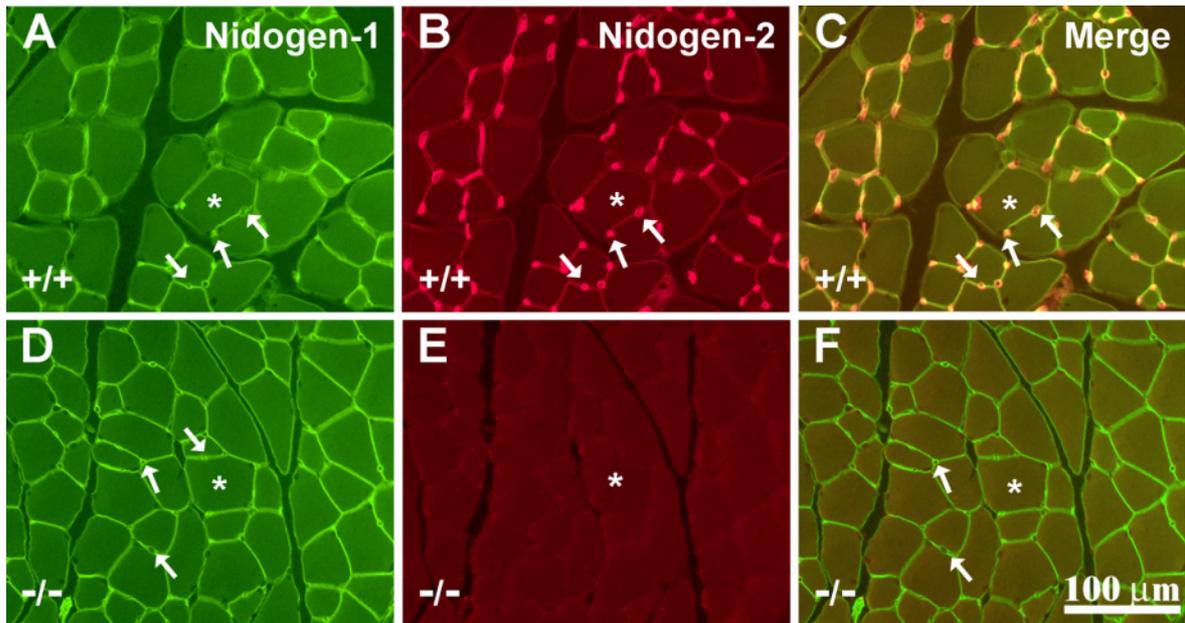


Abb. 2-38 Indirekte Immun-Fluoreszenz-Doppelfärbung von Schnitten des Skelettmuskels von Nid2 $-/-$ (D-F) und Kontrollmäusen- (A-C) mit Nidogen-1-spezifischen AK (grün; A, D) und Nidogen-2-spezifischen AK (rot; B, E). Die Bilder in C und F zeigen die Überlagerung (Merge) der jeweiligen Einzelaufnahmen pro Gewebeschnitt. Die übereinstimmende Lokalisation der beiden Nidogene in WT Gewebe der Einzelaufnahmen (A, B) erscheint in (C) durch die Überlagerung der beiden Einzelaufnahmen als gelbe Färbung. Eine starke Nidogen-1-spezifische Färbung ist in den BM der Muskelfasern (Stern) und der BM der Kapillaren (Pfeil) der Nid2 $-/-$ (D) und der Kontrollmaus (A) erkennbar. Die Nidogen-2-spezifische Färbung (B) ist stark in der BM der Kapillaren (Pfeil) und wesentlich schwächer in der BM der einzelnen Muskelfasern (Stern) vorhanden. Dieser Aspekt wird in Bild C verdeutlicht. In dem Gewebeschnitt aus der Nid2 $-/-$ Maus ist keine Nidogen-2-spezifische Färbung nachweisbar (F). Größenstandard: 10 μ m.

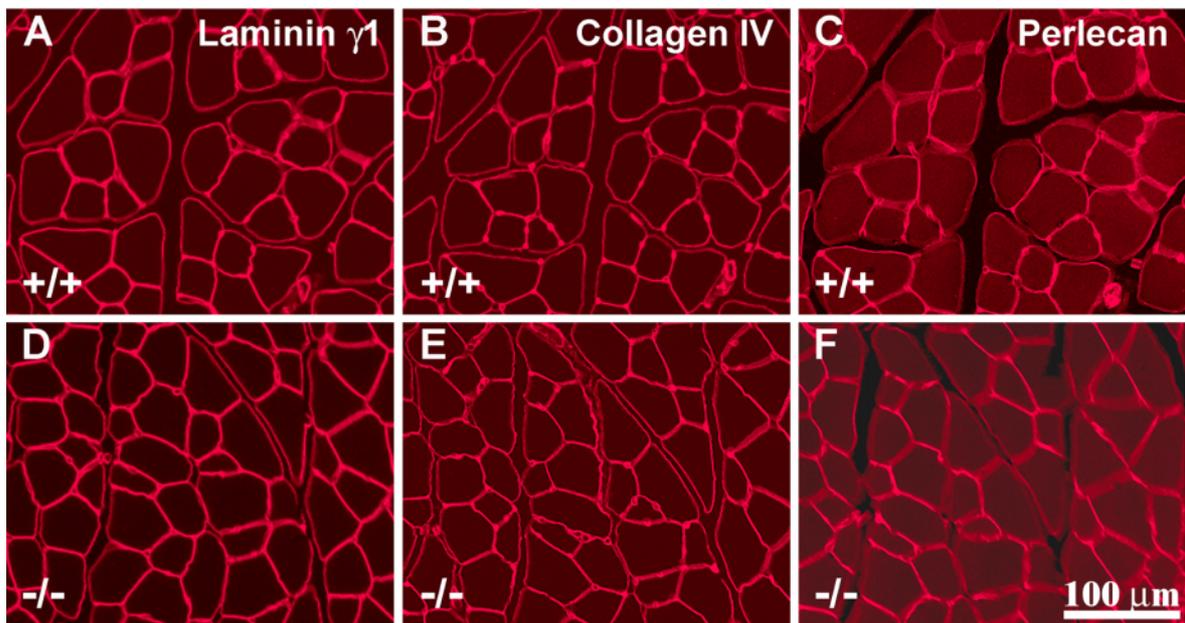


Abb. 2-39 Indirekte Immun-Fluoreszenzaufnahmen von aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten aus dem Skelettmuskel von Nid2 $-/-$ (D-F) und Kontrollmäusen (A-C). Als primäre AK wurden AK gegen Laminin γ 1 (A, D), Kollagen IV (B, E) und Perlecan (C, F) eingesetzt. Eine starke Fluoreszenz zeigt sich für alle drei Proteine in der BM von Muskelfasern und Kapillaren in Nid2 $-/-$ und Kontrollschnitten. Die Signalstärken und Lokalisationen zeigen keine Unterschiede zwischen WT und Nid2 $-/-$ Gewebe. Größenstandard: 100 μ m.

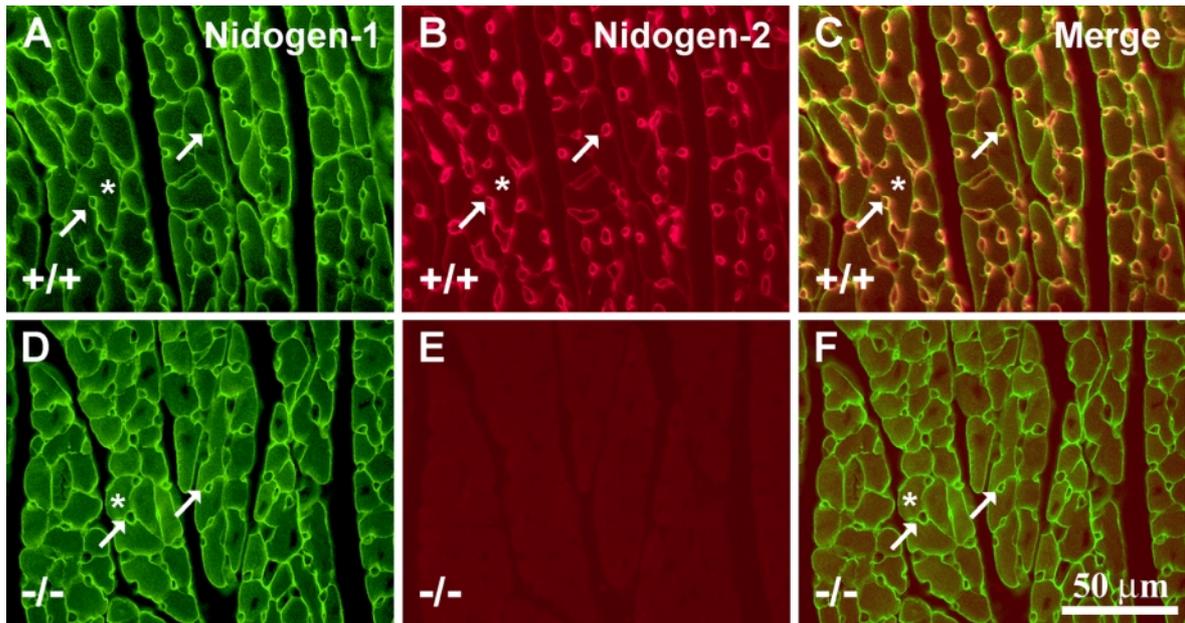


Abb. 2-40 Indirekte Immun-Fluoreszenz-Doppelfärbung von Schnitten des Herzmuskels von einer Nid2^{-/-} (D-F) und einer Kontrollmaus (A-C), mit Nidogen-1-spezifischen AK (grün; A, D) und Nidogen-2-spezifischen AK (rot; B, E). Die Bilder in C und F zeigen die Überlagerung der jeweiligen Einzelaufnahmen pro Gewebeschnitt. Die übereinstimmende Lokalisation der beiden Nidogene in WT Gewebe der Einzelaufnahmen (A, B) erscheint in (C) durch die Überlagerung der Aufnahmen als gelbe Färbung. Eine starke Nidogen-1-spezifische Färbung ist in der BM der Herzmuskelfasern (Stern) und der BM der Kapillaren (Pfeil) in dem WT (A) und dem Nid2^{-/-} (D) Gewebeschnitten erkennbar. Eine starke Nidogen-2-spezifische (C) Färbung ist in der BM der Kapillaren (Pfeil) und wesentlich schwächer in der BM der Herzmuskelfasern (Stern) erkennbar. In dem Gewebeschnitt aus der Nid2^{-/-} Maus ist keine Nidogen-2-spezifische Färbung nachweisbar (F). Größenstandard 10µm.

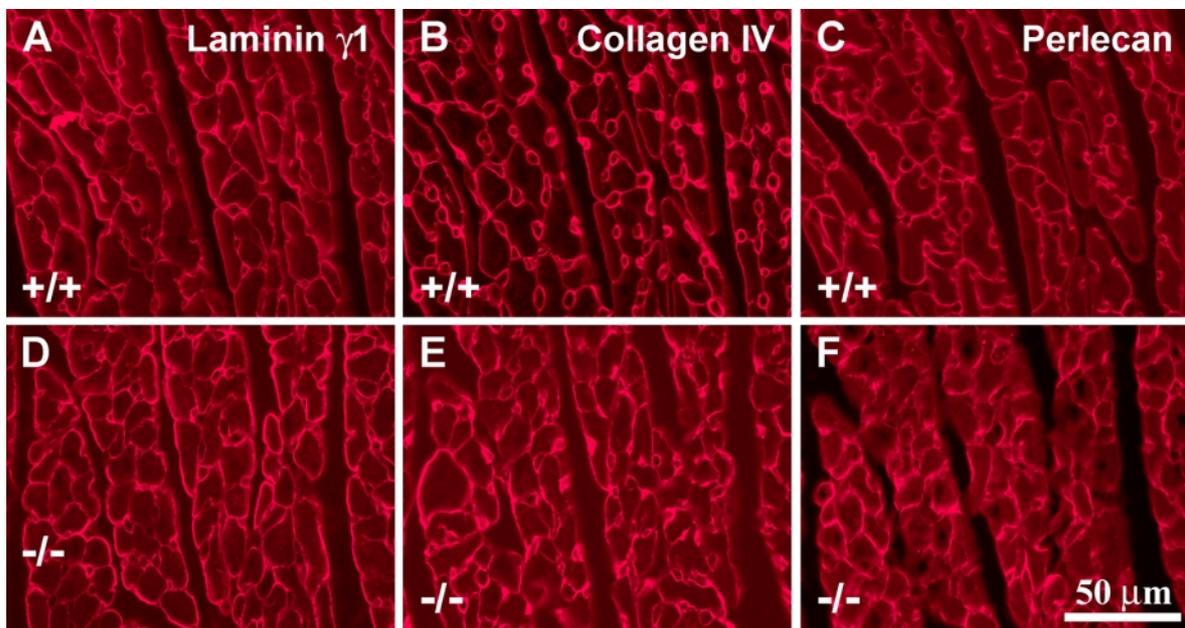


Abb. 2-41 Indirekte Immun-Fluoreszenzaufnahmen von aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten des Herzens von Nid2^{-/-} (D-F) und Kontrollmäusen (A-C). Als primäre AK wurden AK gegen Laminin γ 1 (A, D), Kollagen IV (B, E) und Perlecan (C, F) verwendet. Eine starke Fluoreszenzfärbung zeigt sich für alle drei Proteine in der BM von Herzmuskelfasern und Kapillaren in Nid2^{-/-} und Kontrollschnitten. Die Signalstärken und Lokalisationen zeigen keine Unterschiede zwischen WT und Nid2^{-/-} Gewebe. Größenstandard 100 µm.

2.2.8.2.3 Ultrastrukturelle Analysen

Die BM stellt eine besondere Organisationsform der ECM dar. Die gewöhnlich 50-100 nm dünne, schichtartige Struktur lässt sich nur durch das Transmissionselektronenmikroskop (EM) strukturell analysieren. Die nachfolgenden EM-Analysen wurden im Rahmen einer Kollaboration im Labor von Dr. N. Miosge (Universität Göttingen Zentrum für Anatomie, Abteilung Histologie) durchgeführt und die Abbildungen hier zur Dokumentation zur Verfügung gestellt.

Ultradünnschnitte aus verschiedenen Geweben von Nid2 ^{-/-} und WT-Mäusen wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop (EM) untersucht. Ausschnitte der Ultrastruktur der Nierenrinde, des Soleusmuskels und einer Kapillare sind in Abb. 2-42 dargestellt und beschrieben. Auch in ultrastrukturellen Untersuchungen verschiedener, anderer Gewebe (Herz, Muskel, Testis, Nieren) zeigten sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den BM der Nid2 ^{-/-} und der Kontrollmaus.

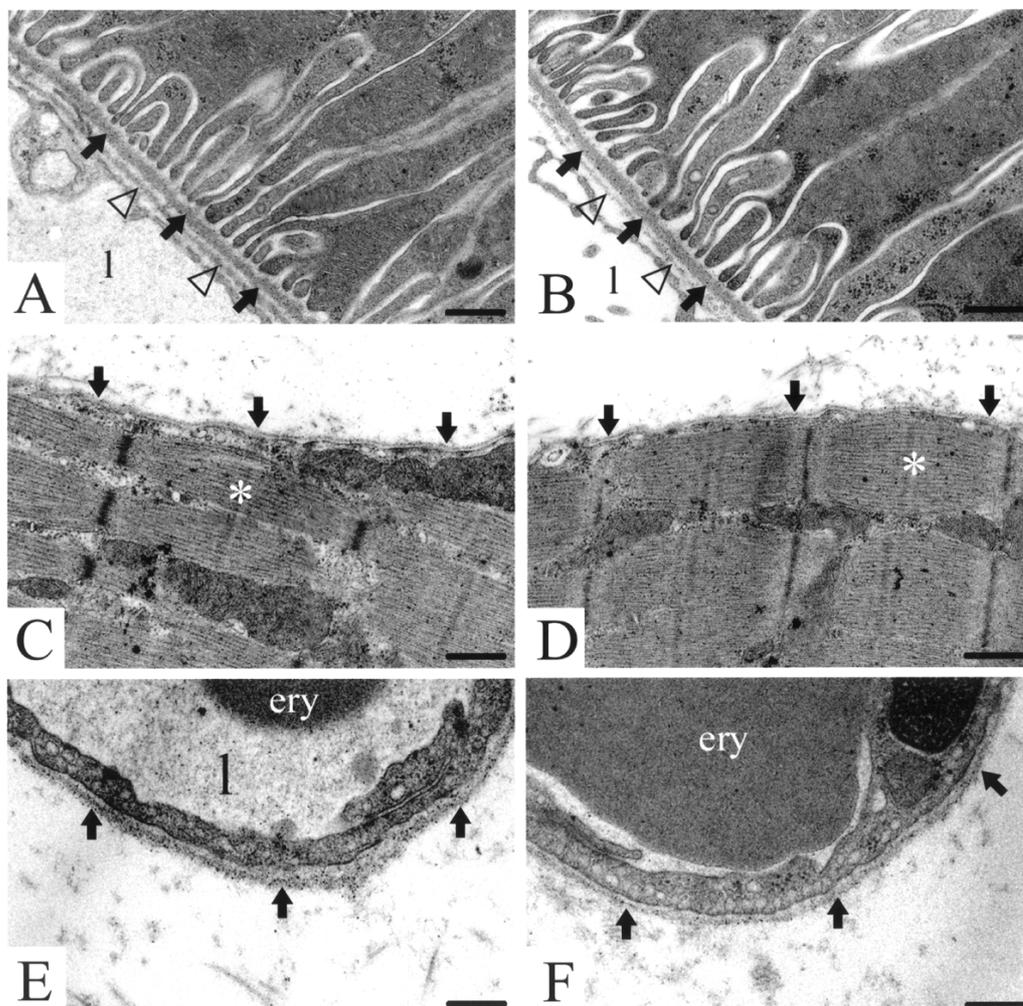


Abb. 2-42 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten aus der Nierenrinde (A, B), dem Soleusmuskel (C, D) und einer Kapillare (E, F), aus Nid2 ^{-/-} (A, C, E) und Kontrollmäusen (B, D, F). (A, B) Erkennbar ist die dicke BM eines proximalen Tubulus (Pfeil) und die BM der Endothelzellen (Dreieck). Lumen der Kapillare (l). (C, D) Die Muskelfaser wird von einer BM umschlossen (Pfeil). Muskelsarkomer (Stern). (E, F) BM einer Kapillare aus dem Soleusmuskel. Erythrozyte (ery), Lumen der Kapillare (l). Größenstandard (A-D) 0,25μm, (E, F) 0,2μm.

3 Diskussion

3.1 Das Nidogen-2 Gen der Maus

Das extrazelluläre Matrix Protein Nidogen ist eine typische BM-Komponente und wird während der frühen Embryonalentwicklung exprimiert (Dziadek & Timpl, 1985). Es bindet Laminine, Kollagen IV, Perlecan, Fibuline und Kalzium. Nidogen wird als ein essentielles Protein angesehen, um Laminin- und Kollagen-Netzwerke in der BM zu verbinden (Fox *et al.*, 1991; Aumailley *et al.*, 1993).

Zu Beginn dieser Doktorarbeit waren die murine (Kimura *et al.*, 1998) und die humane (Kohfeldt *et al.*, 1998) Nidogen-2 cDNA-Sequenz, sowie die daraus abgeleiteten, entsprechenden Aminosäuresequenzen zwar bekannt, es gab jedoch keine Daten über die DNA-Sequenz, Genstruktur, chromosomale Lokalisation und *in vivo* Funktion des murinen Nidogen-2 Gens. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt.

3.1.1 Genlocus und Gensequenz

Um die Genstruktur des murinen Nidogen-2 Gens charakterisieren zu können, wurde der komplette Genlocus durch überlappende rekombinante λ -Phagen aus Genbibliotheken (siehe 2.1.1) und einem genomischen PCR-Reaktionsprodukt (siehe 2.1.4.2) isoliert und kloniert. Die durchgeführten DNA-Sequenz-Analysen führten zur Aufklärung der DNA-Sequenz der proteinkodierenden Exons und ihrer flankierenden Regionen, sowie der genomischen Struktur des murinen Nidogen-2 Gens (siehe 2.1.4). Die einzelnen Exon/Intron-Grenzen des murinen Nidogen-2 Gens konnten identifiziert und analysiert werden (siehe Abb. 2-6). Sie erfüllen die GT/AG-Regel, d.h. sie zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Konsensussequenz für U2-Typ GT-AG Introns (Sharp & Burge, 1997). Das murine Nidogen-2 Gen hat mit 21 Exons (siehe Abb. 2-6) ein Exon mehr als das murine Nidogen-1 (20 Exons; Durkin *et al.*, 1995) und ein Exon weniger als das humane Nidogen-2 (22 Exons; unveröffentlichte Sequenzen von Ohno *et al.*, 1998 siehe 2.1.7). Dieser Unterschied zwischen den beiden orthologen Nidogen-2 Genen wurde dann auch durch einen DNA-Sequenzvergleich des Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens mit den entsprechenden DNA-Sequenzen des humanen Nidogen-2 Gens (Kohfeldt *et al.*, 1998) weiter untersucht und stellt eine Besonderheit des Exons 4 dar (siehe 3.1.4).

Auf der angefertigten physikalischen Karte der isolierten rekombinanten λ -Phagen konnten dann die einzelnen Exons und Introns des murinen Nidogen-2 Gens, deren Größen bestimmt wurden (2.1.4.3 und 2.1.6), eindeutig angeordnet werden (Abb. 2-2). Daraus ergab sich, dass in

der klonierten Genomregion der Genlocus des murinen Nidogen-2 Gens sich auf einer Länge von ca. 60 kb erstreckt und von mind. 10 kb genomischer DNA flussauf- und abwärts dieser Region flankiert wird (siehe Abb. 2-2 und Kapitel 2.1.7). Der durchgeführte Vergleich der Genstrukturen des murinen und des humanen Nidogen-2 Gens weisen eine große Ähnlichkeit in der Größe und in der Verteilung der einzelnen Exons und Introns auf (siehe 2.1.7). Die beiden orthologen Nidogen-2 Gene sind jedoch ein wenig kleiner als das auf mindestens 65 kb geschätzte murine Nidogen-1 Gen (Durkin *et al.*, 1995) und das auf mindestens 90 kb geschätzte humane Nidogen-1 Gen (Zimmermann *et al.*, 1995).

Der Leserahmen der 21 kodierenden Exons des Nidogen-2 Gens enthält 4209 Nukleotide, kodiert für 1403 AS und stimmt in der Größe mit dem Leserahmen der murinen Nidogen-2 cDNA überein (Kimura *et al.*, 1998). Dieser ist jedoch 87 Nukleotide länger als der Leserahmen des humanen Nidogen-2 Gens (4125 Nukleotide; Kohfeldt *et al.*, 1998). Die 3'-nichttranslatierte Region hat eine Länge von 575 bp.

Eine Gegenüberstellung der kodierenden Sequenzen des murinen Nidogen-2 Gens und eines Nidogen-2 EST-Teilkmons der Maus mit der publizierten murinen cDNA-Sequenz (Kimura *et al.*, 1998) zeigte Sequenzunterschiede auf, die wahrscheinlich auf Sequenzfehler in der publizierten cDNA-Sequenz beruhen, da die genomische Sequenz und die EST-Teilsequenz größtenteils übereinstimmen. Sequenzunterschiede könnten auch auf die unterschiedlichen Mausstämme aus denen die verschiedenen DNAs isoliert wurden, zurückzuführen sein. Gegen die Überlegung, dass es mehr als ein funktionelles Nidogen-2 Gen pro haploides Genom der Maus gibt, sprechen eindeutig die durchgeführten Southern Blot-Experimente (siehe Abb. 2-19).

3.1.2 Die Promotorregion des murinen Nidogen-2 Gens

Um den 5'-Vorschaltbereich des murinen Nidogen-2 Gens aufgrund von DNA-Sequenzmotiven als Promotorregion zu charakterisieren, wurden durch DNA-Sequenzanalysen 480 bp der 5'-Vorschaltregion nach potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht, welche bekannt dafür sind die Funktion der RNA-Polymerase II regulieren zu können (siehe 2.1.5). Da im Rahmen dieser Arbeit der Transkriptionsstart nicht bestimmt wurde, kann keine eindeutige Aussage über die Initiator-Sequenz getroffen werden. Es ließen sich in der untersuchten DNA-Region jedoch DNA-Sequenzabschnitte finden, die eine hohe Identität mit den entsprechenden Konsensus-Sequenzen verschiedener charakteristischer Transkriptionsfaktoren zeigten. Gefunden wurden eine CCAAT-Box, eine SP1-Box und zwei AP1-Boxen (siehe 2.1.5). CCAAT-Boxen, welche in unterschiedlicher Zahl und Orientierung

häufig in basalen Promotoren vorkommen, sind normalerweise in einer Region $-80/-100$ des Transkriptionstarts lokalisiert (Mantovani, 1998). Nach dieser Box folgt eine typische GC-reiche SP1-Box. Sowohl die CCAAT-Box, als auch die SP1-Box kommen häufig in den Promotoren von Haushaltsgenen vor, in welchen sich außerdem häufig keine TATA-Box befindet (Bucher, 1990). Ein ähnliches Bild zeigt sich in der 5'-Vorschaltregion des humanen Nidogen-2 Gens. Hier konnten zwei CCAAT-Boxen, drei SP1-Motive und keine TATA-Box in der entsprechenden Region identifiziert werden (siehe 2.1.5). Im murinen Nidogen-2 Gen wurden im untersuchten Vorschaltbereich zwei AP1-Boxen in antigenomischer Orientierung gefunden. An diese Konsensus-Sequenz können Hetero-, bzw. Homodimere der Proteine Fos und Jun, sowie verschiedene andere Transkriptionsfaktoren binden, die einen Einfluss auf viele biologische Funktionen haben, z.B. auf die Zellproliferation und -differenzierung (Michael *et al.*, 1997).

Der murine Nidogen-1 Promotor, in welchem jedoch eine TATA-Box-ähnliche Sequenz gefunden wurde, zeigt auch Merkmale eines Haushaltsgen-Promotors. So wurden mehrere Transkriptionsstart-Punkte für das murine Nidogen-1 Gen und in der zugehörigen Promotor-Sequenz zwei CCAAT-Boxen, zwei SP1-, bzw. aber keine AP1-Motive gefunden (Zimmermann *et al.*, 1995; Durkin *et al.*, 1993). Vergleichbare Bindungsstellen für AP1- und AP2-Transkriptionsfaktoren, die sich im Intron 4 des murinen Nidogen-1 Gens befinden (Durkin *et al.*, 1993), konnten im entsprechenden Intron des murinen Nidogen-2 Gens nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Da aber Nidogen-1 und Nidogen-2 hauptsächlich in mesenchymalen Zellen gebildet wird (Miosge *et al.*, 2000; Dziadek, 1995; Mayer & Timpl, 1994), ist anzunehmen, dass eine spezifische Regulation der Transkription stattfindet. In einer Analyse der Promotorregion des humanen Nidogen-1 Gens konnten u.a. DNA-Regionen identifiziert werden, die eine Hemmung der Nidogen-Transkription bewirken, z.B. wurde eine Bindungsstelle für einen unbekanntes negativen Transkriptionsfaktor in eine Region -1333 bis -1322 lokalisiert (Zedlacher *et al.*, 2000). Einen Beitrag zur positiven Regulation der Transkription *in vitro* konnte für die Transkriptionsfaktoren Sp1, aber auch Sp3 nachgewiesen werden (Zedlacher *et al.*, 2000). Eine ähnliche Analyse der Promotorregion des murinen Nidogen-2 Gen muss jedoch noch durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit ergaben sich auch Anhaltspunkte für regulatorische Elemente in der Promotorregion des murinen Nidogen-2 Gens durch die Identifizierung von Bindungsmotive für weniger häufig vorkommende Transkriptionsfaktoren (siehe 2.1.5). Über die biologisch relevante Funktionen dieser Faktoren ist jedoch noch relativ wenig bekannt. Beispielsweise handelt es sich bei den Proteinen v-ErbA, Gfi-1 und c-Myb um Onkoproteine, bzw. Proto-Onkogene (Subauste, *et al.* 1995; Nakagoshi *et al.*, 1990; Zweidler-McKay *et al.*,

1996). Für das Protein Th1 aus der Familie der basischen Helix-Schleife-Helix-Proteinen (bHLH), welches mit dem E47 Protein interagiert, wurde während der Embryonalentwicklung der Maus ein komplexes, spezifisches Expressionsmuster in verschiedenen Geweben nachgewiesen (Hollenberg *et al.*, 1995). Bei dem Faktor deltaEF1 handelt es sich um ein Zinkfinger-Protein, welchem eine Rolle in der Regulation der embryonalen Muskelentwicklung zugesprochen wird (Sekido *et al.*, 1994). Dem Protein Ik-2 wird eine besondere Rolle in der Entwicklung von Lymphozyten zugesprochen (Molnar *et al.*, 1994).

3.1.3 Der modulare Aufbau des Nidogen-2 Gens

Von der Nidogen-2 Gen-Sequenz wurde die Aminosäuresequenz mit einer Länge von 1403 AS abgeleitet und ausgewertet. In der Primärstruktur konnten die für Nidogen-1 (Durkin *et al.*, 1995) und Nidogen-2 (Kimura *et al.*, 1998) charakteristischen EGF-ähnlichen, Thyroglobulin-ähnlichen und LDLR-ähnlichen Proteinmodule identifiziert werden (siehe Abb. 2-5). Dieser modulare Aufbau ist charakteristisch für Proteine der ECM, in denen ca. 50 verschiedene Module identifiziert wurden, die in unterschiedlichen Proteinen der ECM vorkommen (Engel, 1991; Doolittle, 1995; Bork *et al.*, 1996; Hutter *et al.*, 2000). Die Analyse zeigte weiterhin, dass ähnlich wie bei den murinen (Durkin *et al.*, 1995) und humanen Nidogen-1 (Zimmermann *et al.*, 1995), die einzelnen EGF- und Thyroglobulin-ähnlichen Module (Bork *et al.*, 1996) von jeweils einem Exon kodiert werden. Einen modularen Aufbau, wenn auch mit unterschiedlichen Zusammensetzungen, teilt das murine Nidogen-2 mit bekannten weiteren Nidogenen aus Invertebraten; der Seescheide *Halocynthia roretzi* (Nakae *et al.*, 1993), dem Rundwurm *Caenorhabditis elegans* (Kim *et al.*, 2000) und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Kumagai *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2000). Bei diesen Nidogenen wurde aber der Domänenaufbau mit den drei globulären G1-, G2- und G3-Domänen sowie den Verbindungsstücken durch Ultrastrukturanalysen noch nicht direkt nachgewiesen. DNA-Sequenzanalysen der bekannten globulären G2-Domäne im Rahmen der Bestimmung der Kristallstruktur der murinen G2-Domäne weisen jedoch auf ein sehr ähnliches Faltungsmuster dieser Domäne in den verschiedenen Spezies hin (Hopf *et al.*, 2001). DNA-Sequenzvergleiche zeigten weiterhin, dass die Regionen, welche den globulären Regionen entsprechen, die größten DNA-Sequenzidentitäten aufweisen (Kimura *et al.*, 1998; Kohfeldt *et al.*, 1998). Weniger konserviert sind die zwischen den globulären Domänen liegenden Verbindungsregionen (Kim *et al.*, 2000; Nakae *et al.*, 1993). Weitere Analysen unter besonderer Berücksichtigung der EGF-ähnlichen und Thyroglobulin-ähnlichen Module wiesen darauf hin, dass bei der Evolution dieser Proteine, sowie bei den bekannten Nidogen-1 Proteinen der Vertebraten (Zimmermann *et al.*, 1993; Durkin *et al.*, 1993), Prozesse der Exon-Duplikation und deren Austausch (Exon shuffling) eine bedeutende

Rolle spielten. Hinweise hierfür gibt es neben der modularen Struktur auch für das murine Nidogen-2.

Der Austausch dieser genetischen Module wird als Exon-Shuffling bezeichnet, was die Insertion und Duplikation einzelner Exons beinhaltet. Die Voraussetzung hierfür ist, dass sich die flankierenden Introns in der gleichen Phase befinden (Patthy, 1999). 70% der Introns des Nidogen-2 Gens befinden sich in der Codonphase 1 (Abb. 2-6). Dies sind Hinweise auf eine Rolle des Exon-Shufflings bei der Evolution von Nidogen-2 aus einer ursprünglichen Form. Ob Nidogen-1 oder Nidogen-2 die ursprünglichere Form darstellt, konnte bisher durch einen Vergleich der modularen Struktur des Nidogen von *C.elegans* mit den beiden humanen Formen, jedoch noch nicht geklärt werden (Kim *et al.* 2000). Die LDLR-ähnlichen Region, mit ihren sechs YWTD-Motiven (Springer, 1998), wird durch Exons kodiert, die von Introns in unterschiedlichen Phasen unterbrochen werden (Abb. 2-13), was einen Austausch einzelner Module verhindert. Die gesamte LDLR-ähnliche Region wird jedoch von Introns der Phase 1 flankiert, was zu einer Beweglichkeit der gesamten Region führen kann (Springer, 1998). Für die gesamte Domäne gibt es eine theoretische Strukturvorhersage für eine sogenannte sechsblättrige β -Propeller-Struktur, die der globulären G3-Domäne des Nidogen-2 entspricht (Springer, 1998; Jeon *et al.*, 2001).

3.1.4 Das Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens

Wie schon eingangs erwähnt, weist das murine Nidogen-2 Gen ein Exon weniger als das humane Nidogen-2 Gen auf und dieser Unterschied liegt in der Besonderheit der Verteilung der Exon 4-Sequenzen. Das mit 728 bp relativ große Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens kodiert für die flexible Verbindungsdomäne zwischen der G1- und der G2-Domäne. Auch im humanen und murinen Nidogen-1 wird diese Domäne von nur einem Exon, dem Exon 4 kodiert. Interessanterweise wird diese Domäne im humanen Nidogen-2 jedoch von zwei Exons, den Exons 4 und 5, kodiert. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens über die gesamte Länge eine hohe DNA-Sequenzidentität (68,8%) mit dem Exon 4, Intron 4 und Exon 5 des humanen Nidogen-2 Gens aufweist (Abb. 2-10). Die veröffentlichte (Kohfeldt *et al.*, 1998) und die unveröffentlichte (Nidogen-2 (Osteonidogen) cDNA-Sequenz EMBL-Gendatenbank eingereicht am 9.7.1996, Registriernummer: D86425; Ohno *et al.*, unveröffentlicht) humane Nidogen-2 cDNA Sequenzen weisen erwartungsgemäß die 81 Nukleotide des Intron 4 nicht auf (Abb. 2-10), was auf ein korrektes Spleissen hindeutet. Weiterhin zeigen die DNA-Sequenzen der Spleissdonor-

und -akzeptorseite des humanen Intron 4 eine relativ hohe DNA-Sequenzidentität mit der ermittelten Konsensussequenz für U2-Typ GT-AG Introns (Sharp & Burge, 1997). Interessanterweise befindet sich nun im murinen Exon 4 des Nidogen-2 Gens eine Region, die eine hohe DNA-Sequenzidentität (62,5%) mit den 81 Nukleotiden des humanen Intron 4 aufweist (Abb. 2-10). Diese Region ist jedoch vollständig in der veröffentlichten murinen cDNA-Sequenz vorhanden (Kimura *et al.*, 1998). In dieser Region des Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens befindet sich weiterhin eine 66 NT umfassende DNA-Region, die von Spleiss-Donor- und Akzeptorstellen-ähnlichen Sequenzen eingerahmt wird (Abb. 2-10). Diese Region könnte als internes Intron betrachtet werden, welches nach alternativen internen Spleissen auch den Leserahmen nicht verschieben würde. Aufgrund dieser Besonderheit wurde begonnen experimentell zu überprüfen, ob die murine Exon 4-Sequenzen intern alternativ gespleisst werden können.

Das Ergebnis der durchgeführten RT-PCR-Experimente mit den untersuchten PolyA⁺-RNAs spricht jedoch gegen ein alternatives, internes Spleissen des Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gens (siehe 2.1.8). Ob in anderen Geweben oder in anderen Entwicklungsstadien alternative murine Nidogen-2 Spleissvarianten gebildet werden, kann jedoch formal nicht ausgeschlossen werden. Allerdings zeigen die DNA-Regionen an der Spleiss-Donor- und -Akzeptorseite des potentiellen Intron 4, nur eine geringe DNA-Sequenzidentität mit der Konsensussequenz für U2-Typ GT-AG Introns (nach Sharp & Burge, 1997), was weiterhin gegen ein effizientes alternatives Spleissen spricht. Die experimentelle Klärung der analogen Frage nach einem alternativ gespleisst humanen Nidogen-2 (Abb. 2-10) wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.1.5 Die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens

Gene sind nicht gleichmäßig im Genom verteilt. In einigen Bereichen befinden sich keine transkriptionell aktive DNA-Regionen, z.B. in der aus Heterochromatin aufgebauten Zentromerregion, während sich in anderen viele Gene befinden. Gelegentlich sind Genfamilien in Gruppen angeordnet, z.B. die α - und β -Globulin Gene, oder die Homeobox (Hox)- Gene, welche eine besondere Bedeutung für die Embryonalentwicklung haben (Alberts *et al.*, 1994). Als Genlocus wird ein Ort im Genom bezeichnet, der durch kartierte Genmarker bestimmt wird. Nach der Analyse der Genstruktur wurde im Verlauf dieser Doktorarbeit auch die chromosomale Lokalisation des murinen Nidogen-2 Gens (Kooperation mit Dr. David Beier, Harvard Medical School, Division of Genetics, Brigham and Womans Hospital, Boston, MA, USA) auf den proximalen Region des Maus-Chromosoms 14 bestimmt. Das Gen befindet

sich hier in einer Kopplungsgruppe mit dem Marker D14Mit221, das entspricht einer Region von 6.5 cM. Die chromosomale Lokalisation des Nidogen-2 Gens des Menschen wurde von Ohno *et al.* (Ohno *et al.*, aus EMBL-Gendatenbank 1998; unveröffentlicht) ebenfalls auf dem Chromosom 14 angegeben.

Durch Southern Blot-Analysen mit genomischer DNA verschiedener WT-Mausstämme konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich nur eine Kopie des murinen Nidogen-2 Gens im Genom befindet (siehe 2.2.4.1). Da das Nidogen-1 Gen der Maus sich auf dem Chromosom 13 befindet (Olsen *et al.*, 1989) liegen die beiden Nidogen-Gene auf verschiedenen Chromosomen. Aus genetischer Sicht kann nun eine Maus, die defizient für Nidogen-1 und -2 sein soll, experimentell durch Verpaaren der einzelnen mutanten Mauslinien hergestellt werden. Wären beide Gene auf demselben Chromosom anwesend, wäre die Herstellung einer doppelt Nidogen-1 und 2-defizienten Maus wesentlich aufwendiger. Die Geninaktivierung durch homologe Rekombination in ES-Zellen beider Nidogen-Gene wäre notwendig. Aus diesem Grund ist die Kenntnis der unterschiedlichen chromosomalen Lokalisation der beiden Nidogen-Gene für den weiteren Verlauf der genetischen Funktionsanalyse von großer Bedeutung.

3.2 Die genetische Funktionsanalyse des murinen Nidogen-2 Gens

Die Funktionsanalysen des Nidogen-2 Gens wurde bislang *in vitro* anhand von Zellkulturstudien und Bindungsanalysen (Kimura *et al.*, 1998; Kohfeldt *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 1999; Hopf *et al.*, 1999) mit rekombinanten Protein durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Nidogen-2 mutante Mausmutante (siehe Nidogen-2 Genfallenmaus) molekular, genetisch und histologisch untersucht, um die biologische Bedeutung des Nidogen-2 Gens *in vivo* aufzuklären. Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde in einem ersten genetischen Versuchsansatz eine Nullmutation in das murine Nidogen-2 Gen in embryonalen Stammzellen durch die Technik der homologen Rekombination einführt, um dann in Folgeexperimenten eine Nidogen-2 mutante Maus herzustellen (Capecchi, 2001 und die darin enthaltenen Referenzen). Es konnte in verschiedenen unabhängigen ES-Zellklonen ein Allel des Nidogen-2 Gens gezielt inaktiviert werden. Da durch diese veränderten ES-Zellklone bisher noch keine mutante Mauslinie etabliert werden konnte, wurde auf dieses Experiment hier nicht weiter eingegangen (J. Schymeinsky und B.L. Bader., unveröffentlichte Arbeiten).

Im gleichen Zeitraum eröffnet sich jedoch ein zweiter unabhängiger genetischer Versuchsansatz, um die biologische Funktion des Nidogen-2 Gens der Maus studieren zu können. Dieser beruhte zunächst auf einen experimentellen Hinweis auf eine mögliche Mutation im Nidogen-2-Gen einer Mauslinie, die im Rahmen eines großangelegten Genfallen-Mutageneseprojektes

mit murinen embryonalen Stammzellen durch die Skarnes *et al.* hergestellt wurde (Skarnes *et al.*, 1995). Da es sich bei vielen der generierten mutanten Mauslinien in diesem Mutagenese-Projekt (Skarnes *et al.*, 1995) um stark hypomorphe oder gar Nullmutationen handelt (Mitchell *et al.*, 2001), war diese Maus von sehr großem Interesse und wurde Dr. B.L. Bader von Dr. W.C. Skarnes für die molekulare und phänotypische Analysen zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Die Nidogen-2 Genfallenmaus

Der Hinweis auf eine Mutation im Nidogen-2 Gen beruhte zunächst auf cDNA-Sequenz-Daten aus 5' -RACE-Experimenten (persönliche Mitteilung und auf der Internetseite von Dr. W. C. Skarnes). Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Nidogen 2 Gen-Sequenz- und Struktur konnten dann durch DNA-Sequenzvergleiche für die 5'-RACE-cDNA-Sequenz eine hohe DNA-Sequenzidentität mit einer 283 bp große Region des Exon 4 des murinen Nidogen-2 Gen festgestellt werden (Abb. 2-18). Die Charakterisierung der Genstruktur des Nidogen-2 Gens (siehe 2.1) ermöglichte somit den ersten Hinweis auf die Insertionsstelle der DNA des GST-Konstruktes im Intron 4 des Nidogen-2 Gens. Für die weitere eindeutige molekulare Charakterisierung der mutanten Mauslinie war anschließend eine genaue Lokalisierung der Genfallen-Konstrukt-DNA und damit eine Bestätigung der Mutation im Nidogen-2 Genlocus notwendig. Die in dieser Arbeit gewonnene Kenntnis der Genstruktur (siehe 2.1) und gut charakterisierte Nidogen-2-spezifische genomische DNA-Hybridisierungsproben, welche auch die Intron 4-Region beinhalten, stellten dann eine grundlegende Voraussetzung dar, damit die Insertionsstelle des GST-Konstrukt im Intron 4 des murinen Nidogen-2 Gens lokalisiert, kloniert und sequenziert werden konnte (siehe 2.2.4). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass durch das Insertionsereignis kurze Bereiche an den flankierenden Enden der GST-Konstrukt-DNA deletiert wurden (siehe 2.2.4.2). Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die mutagene Wirkung der insertierten GST-Konstrukt-DNA (siehe unten).

Die durchgeführten Southern-Blot Experimente gaben allerdings auch Hinweise auf die Insertion einer möglichen weiteren Kopie des GST-Konstruktes. Die dafür durchgeführten Southern-Blotanalysen und genetische Rückkreuzungsexperimente (C57/Bl6-Hintergrund) schließen ihre Existenz im Nidogen-2 Genlocus nicht vollständig aus und sprechen für die Lokalisation auf dem Chromosom 14 (siehe Abb. 2-20). Die Insertion mehrerer GST-Konstrukte in das Genom konnte bei 20% der selektierten ES-Zellen festgestellt werden, die im Rahmen eines deutschen Mutagenesprojektes (The Gene Trap Project of the German Human Genome Project; <http://tikus.gsf.de>) hergestellt wurden. Die Inaktivierung zweier Gene durch

diese Mutagenisierungsmethode wird im allgemeinen als sehr unwahrscheinlich angesehen (Wiles *et al.*, 2000), kann aber formal nicht ausgeschlossen werden. Zwei Ergebnisse sprechen allerdings gegen eine weitere Genmutation, die durch die Insertion einer weiteren Kopie des GST-Konstrukts in ein Intron eines anderen beliebigen Gens nach dem in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Mechanismus entstanden ist:

- 1) In der transgenen ES-Zelllinie (Skarnes *et al.*, 1995) mit der die Nid2-Mauslinie etabliert wurde (Mitchell *et al.*, 2001), konnte mittels 5'-RACE nur eine Nidogen-2-spezifische cDNA-Sequenz gefunden werden.
- 2) Durch eine *lacZ*-DNA-Hybridisierungsprobe konnte in Northern Blot-Analysen nur eine diskrete mRNA markiert werden (siehe 2.2.7.1).

Die Spekulation, ob eine Tandeminsertion zweier GST-Konstrukte im Nidogen-2 Locus vorliegt, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht eindeutig geklärt werden. Die Analysen der DNA von Nid2 $-/-$ Maus zeigen jedoch eindeutig, dass die DNA eines GST-Konstruktes im Nidogen-2 Locus insertiert ist.

Aufgrund der genauen Charakterisierung der DNA-Region der Insertionsstelle der GST-Konstrukt-DNA im Nidogen-2 Gen konnte sowohl eine Southern-Blot-Analyse mit einer spezifischen 3'-Probe als auch eine spezifische PCR-Reaktion etabliert werden (siehe 2.2.5), mit der die verschiedenen Nidogen-2 Genotypen der Nid2-Mauslinie eindeutig und zuverlässig bestimmt wurden. Es zeigte sich nach der Auswertung der Genotypen der Nachkommen aus Kreuzungen von Nid2 $+/-$ Elterntieren, dass homozygot Nid2 mutante Tiere geboren werden. Die Verteilung des mutierten Allels, entsprach der 2. Mendelschen Regel mit einer Verteilung der Genotypen von nahezu 1:2:1 (siehe Abb. 2-24). Bei den untersuchten Nid2 $+/-$ - und Nid2 $-/-$ Mäusen konnten bisher keine äußerlich erkennbaren Unterschiede zu WT-Mäusen gefunden werden. Homozygote Mäuse sind fruchtbar und aus Verpaarungen von Nid2 $-/-$ Elterntieren entstehen weiterhin fertile Nachkommen, so dass auch eine Nid2 $-/-$ Mauskolonie aufgebaut werden konnte (siehe 2.2.6). Diese Ergebnisse waren überraschend und führten zur nächsten wichtigen Frage, ob in Nid2 $-/-$ Mäusen auch eine Nidogen-2-Defizienz (Nullmutation) bezüglich des Genprodukts vorliegt. Aus diesem Grund wurden Expressionsstudien des Nidogen-2 Gens in verschiedenen Geweben von Nid2 $-/-$ Mäusen und Kontrolltieren durchgeführt.

3.2.2 Expressionsanalysen des Nidogen-2 Gens und anderer BM-Proteingene

Ein Nachteil bei der Mutagenisierungsmethode durch GST-Konstrukte ist aufgrund ihrer experimentell bedingten bevorzugten Insertion in Introns (siehe 2.2.2), dass in sehr seltenen

Fällen ein Überlesen der Transkriptionsterminationssignale des GST-Konstruktes gefolgt von einem alternativen Spleissen stattfinden kann. Dies könnte dann zu einem sehr niedrigen Gehalt an WT-Transkripten bzw. funktionellem Genprodukt und somit zu hypomorphen Mutationen führen (Stanford *et al.*, 2001). Daher ist bei einer solchen Mutation der Nachweis, ob in der homozygoten, transgenen Maus ein WT-Transkript oder ein funktionelles Genprodukt gebildet wird von essentieller Bedeutung. Zur Klärung dieser Frage wurden in der vorliegenden Arbeit für die Nidogen-2 Mutation verschiedene Arten der Expressionsanalysen angewendet. In den zunächst durchgeführten Northern Blot-Analysen mit RNA aus verschiedenen Geweben von Nid2 $-/-$ Mäusen und Kontrolltieren konnte gezeigt werden, dass keine Nidogen-2-spezifische Transkripte in den untersuchten RNAs aus Nid2 $-/-$ Mäusen mit den entsprechenden Proben (flussabwärts gelegen von der Mutation gelegen) nachzuweisen waren. Dies ist ein sehr starker Hinweis darauf, dass es sich bei der Mutation um eine Nullmutation handelt. Dieses Ergebnis konnte durch eine RT-PCR-Analyse bestätigt werden, welche als sensitivste Nachweismethode für eine spezifische mRNA gilt (Wang *et al.*, 1999; Bustin, 2000). Mit dieser Methode konnten keinerlei längere Nidogen-2-spezifischen PCR-DNA-Fragmente amplifiziert werden (Abb. 2-29). Kurze PCR-DNA-Fragmente, die in sehr geringen, unspezifischen Maße amplifiziert wurden, könnten auf fehlerhaftes Spleissen zurückgeführt werden (Chelly *et al.*, 1989), da keine langen Nidogen-2 spezifischen PCR-DNA-Fragmente nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse der besprochenen Northern Blot- und RT-PCR-Analysen weisen sehr stark darauf hin, dass in den Geweben von Nid2 $-/-$ Mäusen keine funktionellen Nidogen-2 mRNAs transkribiert werden. In RNAs von Kontrollmäusen, z.B. in Nid2 $+/-$ Tieren konnte erwartungsgemäß die Nidogen-2 mRNA als ein diskretes Signal auf Northern Blot-Membranen mit einer Größe von ca. 5,5 kb detektiert werden (siehe Abb. 2-26). Diese Größe stimmt mit der für die humane Nidogen-2 mRNA bestimmten Größe überein (Kohfeldt *et al.*, 1998). Interessanterweise wird durch die in dieser Arbeit klonierten Nidogen-2-spezifische Hybridisierungsprobe (3'-untranslatierte Region) nur eine diskrete 5,5 kb Nidogen-2-spezifische mRNA erkannt, während in Kimura *et al.* mit einem proteinkodierenden 1,3 kb Nidogen-2 cDNA-Fragment (Nukleotidpositionen 1-1300), ein 6 kb und ein 4 kb große mRNA markiert wird (Kimura *et al.*, 1998). Hier könnten die proteinkodierenden Sequenzen zu Kreuzreaktionen mit sequenzverwandten RNAs geführt haben. Mit einer *lacZ*-Gen-spezifischen Hybridisierungsprobe konnte in den RNAs von transgenen Nid2-Mäusen eine 6,5 kb mRNA nachgewiesen werden (Abb. 2-27). Diese entspricht der aufgrund der Genfallkonstruktes zu erwartenden Chimär-mRNA.

Anschließend ergab sich die Frage, ob nun funktionelle Nidogen-2 spezifische Polypeptide in den Geweben nachzuweisen waren. Sie konnte in verschiedenen Gewebe-Proteinextrakten aus Nid2 +/- und Nid2 -/- Mäusen durch Western Blot-Analysen und Radioimmun-Tests (RIA) geklärt werden. In den durchgeführten Western Blot-Analysen konnte mittels eines polyklonalen Nidogen-2-spezifischen AK-Serums kein WT-Nid2 Protein in den untersuchten Protein-Extrakten von Nid2 -/- Mäusen nachgewiesen werden, wohingegen dort erwartungsgemäß die Anwesenheit von Nidogen-1 bestätigt werden konnte. Die in den Kontroll-Proteinextrakten ermittelten Proteingrößen für das murine Nidogen-1 und Nidogen-2, sowie für die durch endogene Proteasen hergestellten Teilfragmente stimmten mit den bekannten Literaturwerten überein (Kohfeldt *et al.*, 1998; Mayer & Timpl, 1994). Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen konnte durch einen äußerst sensitiven Radioimmun-Test (RIA) bestätigt werden (siehe 2.2.7.4). Durch diese Methode können Proteinmengen im Piko- bis Nanogramm-bereich gemessen werden (Timpl & Risteli, 1981). Die ermittelten Nidogen-2 Menge in den Proteinextrakten von der Niere und dem Skelettmuskel aus Kontrolltieren entsprachen den normalen Werten, wohingegen die Werte für die Extrakte aus Geweben von Nid2-/- Mäusen mit weniger als 0,3 pmol/g Frischgewebe (Niere), bzw. sogar weniger als 0,1 pmol/g Frischgewebe (Muskel) an der Nachweisbarkeitsgrenze (ähnlich den Negativ-Kontrollwerten) des Tests liegen. Diese äußerst geringen Werte für Nidogen-2 in den Proteinextrakten von der Niere und dem Skelettmuskel von Nid2-/- Mäusen würden weniger als 0,8%, bzw. 0,6% der Menge aus den Geweben von WT-Mäusen entsprechen. Diese Expressionsanalysen belegen, dass die beschriebene Mutation im Nidogen-2 Gen in homozygot mutanten Mäusen zur Nidogen-2 Defizienz führt.

Signifikante Veränderungen in den Mengen der BM-Proteine Nidogen-1 und Laminin $\gamma 1$ in Nieren und Skelettmuskelextrakten von Nid2-defizienten und Kontroll-Tieren konnten in parallel durchgeführten RIA-Tests jedoch nicht festgestellt werden (siehe Abb. 2-31 und Abb. 2-32). Dies wäre zumindest für den Nidogen-1 Gehalt zu erwarten gewesen, falls eine Kompensation für das fehlende Nidogen-2 angenommen wird. Vielleicht ist jedoch die in den Geweben vorhandene große Nidogen-1 Proteinmenge im Vergleich zur Nidogen-2 Menge (in der Niere um einen Faktor 20 und im Skelettmuskel um einen Faktor 45) für diesen Zweck ausreichend. Die Summe der Expressionsanalysen dokumentieren, dass in den Nid2 -/- Mäusen keine WT-mRNA und auch keine funktionelle Nidogen-2 spezifische Polypeptide gebildet werden und somit eine Nidogen-2 Defizienz vorliegt.

3.2.3 Phänotypische Funktionsanalyse der *Nid2* $-/-$ Maus

Verschiedene Untersuchungen wurden unternommen, um einen Phänotyp aufgrund der Mutation im Nidogen-2 Gen und der daraus resultierenden Nidogen-2-Defizienz zu beschreiben. Soweit konnten keine Unterschiede im Aussehen, der Vitalität, des Gewichts (siehe 2.2.8.1) und der makroskopischen Anatomie zwischen *Nid2* $-/-$, *Nid2* $+/-$ und WT-Kontrolltieren festgestellt werden. Diese Ergebnisse gaben keinen Hinweis für eine essentielle Funktion des Nidogen-2 Gens in der Maus. Daraufhin wurden histologische Untersuchungen verschiedener Gewebe der *Nid2* $-/-$ Maus durchgeführt, da sie indirekt Information über den Zustand der BM geben können. Es ist bekannt, dass eine fehlerhafte BM zu schwerwiegenden Defekten in der Organmorphogenese führen können (Gustafsson & Fässler, 2000; Aszódi *et al.*, 1998). In dieser Arbeit konnten in den bisher analysierten Gewebeschnitten von Organen, wie beispielsweise Niere, Herz und Skelettmuskel keine Unterschiede zwischen *Nid2* $-/-$ und Kontrollgeweben gefunden werden (siehe 2.2.8.2.1). Dies ist ein Indiz dafür, dass die BM-Struktur in diesen Geweben nicht schwerwiegend geschädigt sein kann. Auch in den mit dem Transmissionselektronenmikroskop durchgeführte Ultrastrukturanalysen, die einen direkten Hinweis auf Veränderungen in der BM ermöglichen, konnten bisher keine Unterschiede zwischen BM in Gewebeproben aus *Nid2* $-/-$ und Kontrollmäusen beobachtet werden (siehe 2.2.8.2.3). Die Ergebnisse der bisherigen anatomischen, histologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen der Gewebe von *Nid2* $-/-$ Mäusen ergeben keine Hinweise auf Veränderungen gegenüber von Kontrolltieren. In dieser Hinsicht führt die Nidogen-2 Defizienz in der Maus zu keinem offensichtlichen Phänotyp. Auch Nidogen-1 homozygot mutante Mäuse sind lebens- und fortpflanzungsfähig und zeigen in der mikroskopischen Anatomie keine Unterschiede zu Kontrollmäusen (Murshed *et al.*, 2000; Diskussion siehe unten).

Interessanterweise wurde der Phänotyp einer *C.elegans* Mutante beschrieben, bei der das Fehlen des einzigen, bekannten Nidogens zu auffallenden Unterschieden in der Lage und Orientierung bestimmter Nervenfaserbündel führt (Kim *et al.*, 2000). Das durch Ethylmethansulfat (EMS) mutierte Nidogen Allel *ur41* ist als Nullmutation beschrieben, die aber keinen Einfluss auf die Struktur der BM hat. Weiterhin sind die Tiere äußerlich nicht von WT-Kontrollen zu unterscheiden (Kim *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang bietet eine vergleichbare Untersuchung des zentralen und peripheren Nervensystem der *Nid2* $-/-$ Maus, wie auch der *Nid1* $-/-$ Maus weitere, komplexe experimentelle Ansätze für zukünftige Analysen. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass Nidogen-defiziente *C.elegans*-Stämme eine verringerte Fruchtbarkeit gegenüber WT-Stämmen zeigten (Kang *et al.*, 2000). Nidogen-defiziente Hermaphroditen hatten 32% weniger Nachkommen als WT-Kontrollen.

Die Ursache dieses Effektes ist noch unklar, da in Untersuchungen die mutanten Tiere im Vergleich zu WT-Kontrollen die gleiche Spermienzahlen, die gleiche Zahl an befruchteten Eiern und keine pathologischen Unterschiede in den Spermatheken oder den Uterie aufwiesen (Kang *et al.*, 2000). Statistische Untersuchungen der Fruchtbarkeit von Nid2^{-/-} Mäusen wurde begonnen. Es konnten bisher jedoch noch keine signifikanten Unterschiede in den Wurfgrößen von Nid2^{-/-} und Kontrolltieren, gefunden werden (Abb. 2-25). Hier sind jedoch noch weiterführende, statistische Experimente notwendig.

Weitere Ansätze für Untersuchungen ergeben sich aus den *in vitro* Bindungseigenschaften des Nidogen-2 mit den zwei bekannten Formen des Angiogeneseinhibitors Endostatin (Sasaki *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2000; Miosge *et al.*, 1999) und dem Tropoelastin (Sasaki *et al.*, 1999). Analysen der Angiogenese in Nid2^{-/-} Mäusen im Zusammenhang mit der Wundheilung (Bloch *et al.*, 2000) und der Tumorgenese (Read *et al.*, 2001; Joki *et al.*, 2001) wären hier von besonderem Interesse. Weitere interessante *in vivo* Experimente in *C.elegans* zeigen, dass Endostatin hier unter anderen eine regulatorische Wirkung auf die Zellwanderung und Morphogenese, sowie der Zielfindung von Axonen zeigt (Ackley *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2001). Da durch die begonnen, histologischen Untersuchungen bisher keine pathologischen Strukturen in Nid2^{-/-} Mäusen gefunden wurden, gilt es nun auch potentielle physiologische Funktionen des Nidogen-2 Gens *in vivo* zu analysieren. Messungen des Proteingehalts im Urin wären hier beispielsweise als Funktionsanalyse der Nieren bzw. der BM der Nierenglomerulie denkbar. Das Auftreten von Protein im Urin ist bei erbbedingten Nierenerkrankungen, z.B. dem Alport-Syndrom (Flinter, 1997), häufig festzustellen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass in verschiedenen Geweben unterschiedlich aufgebaute BM vorkommen. Manche Mutationen von BM-Proteinen zeigen eine ausgeprägte pathologische Veränderung in bestimmten Geweben, z.B. der Haut (Burgenson & Christiano, 1997), der Niere (Noakes *et al.*, 1995; Miner *et al.*, 2000) oder des Muskels (Miyagoe *et al.*, 1997). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass in bestimmten Geweben noch eine Veränderung der BM in Nid2^{-/-} Mäusen gefunden wird.

Im allgemeinen besitzt das Nidogen-2 *in vitro* ähnliche Bindungseigenschaften wie das Nidogen-1 (Kohfeldt *et al.*, 1998, Sasaki *et al.*, 1999). Daher wurde ihm eine wichtige Rolle in der Organisation der BM zugesprochen (Kohfeldt *et al.*, 1998). Das Hauptargument für die zentrale Funktion des Nidogen-1 ist seine Fähigkeit Dreifachkomplexe mit Laminin und Kollagen IV, bzw. Perlecan zu bilden (Aumailley *et al.*, 1993; Hopf *et al.*, 1999). Um die Frage zu klären, ob das Nidogen-2 Protein eine ähnliche Funktion *in vivo* besitzt, wurde die Verteilung der BM Proteine Nidogen-1, Nidogen-2, Laminin γ 1, Kollagen IV und Perlecan durch indirekte

Fluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern in verschiedenen Geweben von Nid2^{-/-} und Kontrolltieren untersucht. Eine diskrete Nidogen-2-spezifische Färbung war in den Gewebeschnitten von Nid2^{-/-} Mäusen nicht nachweisbar und bestätigte die bisherigen Ergebnisse, dass hier eine Nidogen-2 Defizienz vorliegt. Diese hat offensichtlich keine Unterschiede in der Gewebeverteilung noch in der Intensität der Fluoreszenzfärbung für die BM-Proteine Kollagen IV, Laminin und Perlecan zwischen den Nid2^{-/-} und den Kontrollmäusen zur Folge (siehe 2.2.8.2.2). Eine außergewöhnliche Parallele zeigt sich auch hier in den oben erwähnten Nidogen-defizienten *C.elegans*-Stamm. Da sich keinerlei Unterschiede in der Kollagen IV-Verteilung zwischen Mutanten und WT-Tieren zeigt, kann hier davon ausgegangen werden, Nidogen-1 nicht essentiell für den Aufbau der BM ist (Kang *et al.*, 2000). Da die Nidogen-2 defiziente Mauslinie weder Defekte in der Entwicklung noch strukturelle Veränderungen in der BM zeigt, führt zu der Schlussfolgerung, dass Nidogen-2 entweder keine essentielle Funktion in der Organisation und Struktur der BM besitzt, oder die Abwesenheit durch andere Proteine, wie z.B. durch Nidogen-1 oder Perlecan kompensiert werden kann.

Nidogen-1 erscheint besonders geeignet die Nidogen-2-Defizienz kompensieren zu können, da es vergleichbare Bindungseigenschaften und eine sehr ähnliche Gewebeverteilung aufweist (Mayer & Timpl, 1994; Kohfeldt *et al.*, 1998; siehe auch 1.5). Diese gemeinsamen Bindungseigenschaften konnten durch weiterführende neue Untersuchungen mit rekombinanten murinen Nidogen-2 bestätigt werden (Miosge *et al.*, unveröffentlicht). In diesen Analysen zeigte sich, dass die Laminin γ 1-Kette von beiden murinen Nidogenen mit vergleichbaren Dissoziationskonstanten gebunden wird. Weiterhin konnte eine Bindung zu den Fibulinen-1 und -2 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigten eine weitaus höhere Übereinstimmung der Bindungseigenschaften zwischen rekombinanten murinen Nidogen-1 und -2, als bisher von Studien mit humanen Nidogenen angenommen wurde (Kohfeldt *et al.*, 1998; persönliche Mitteilung von Dr. Timpl, Miosge *et al.*, unveröffentlicht).

Auch wurde für beide Proteine eine sehr ähnliche Gewebeverteilung nachgewiesen (Kohfeldt *et al.*, 1998). Unterschiede zeigten sich bisher nur in Herz- und Skelettmuskelgewebe, wobei Nidogen-2 verglichen mit Nidogen-1 dort mit moderater Intensität in allen BM vorhanden ist, aber eine auffällig starke Lokalisation in der BM von Blutkapillaren zeigt. Nidogen-1 hingegen weist eine eher gleichmäßige und kräftige Expression in weitgehend allen BM auf. Durch Doppelfluoreszenzfärbungen für Nidogen-1 und -2, konnte in dieser Arbeit die typische Verteilung von Nidogen-1 und -2 in Herz- und Skelettmuskel bestätigt werden (siehe 2.2.8.2.2). Eine stärkere Nidogen-1-spezifische Färbung war in den Geweben der Nid2^{-/-} Maus nicht erkennbar und spricht daher gegen eine kompensationsbedingte verstärkte Einla-

gerung dieses Proteins in die BM. Im Fall der Nidogen-1-mutanten Maus wurde interessanterweise eine deutliche Umverteilung des Nidogen-2 im Skelett- und Herzmuskel beschrieben (Murshed *et al.*, 2000). In nachfolgenden Experimenten konnte in Herz- und Skelettmuskel-Proteinextrakten von Nidogen-1-mutanten Mäusen eine 3-7 fache Erhöhung der Nidogen-2-Menge im Vergleich zu WT-Extrakten gemessen. Weiterhin wurde in verschiedenen Geweben eine verstärkte Nidogen-2-spezifische Fluoreszenzfärbung festgestellt (persönliche Mitteilung, Dr. R. Timpl; Miosge *et al.*, unveröffentlicht). Diese Daten sprechen für eine Kompensation des fehlenden Nidogen-1 in der mutanten Nidogen-1-Maus von Murshed *et al.* (Murshed *et al.*, 2000) durch Nidogen-2 (persönliche Mitteilung, Dr. R. Timpl; Miosge *et al.*, unveröffentlicht; Murshed *et al.*, 2000). Zusätzlich konnten beide Nidogene auch elektronenmikroskopisch durch Immungoldfärbungen lokalisiert werden. Sie sind ubiquitäre BM-Proteine, die z.B. in globulären, tubulären und kapillaren Kompartimenten sowie in den Bowman Kapseln der Maus Niere gefunden werden. Weiterhin ist ein Großteil beider Nidogene mit Laminin-1 assoziiert (Miosge *et al.*, 2000). Diese übereinstimmende Lokalisation erleichtert natürlich einen möglichen kompensatorischen Effekt des Nidogen-1 in der Nidogen-2-defizienten Maus und umgekehrt.

Es wäre aber auch denkbar, dass andere Proteine der BM für das fehlende Nidogen-2 teilweise kompensieren. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre beispielsweise das Perlecan, dessen Heparansulfatketten (GAGs) auch mit den BM-Komponenten Laminin-1 und Kollagen IV interagieren. Perlecan ist an der Kontrolle der glomerulären Filtration (Timpl, 1993), wie auch der Bindung und Freisetzung von Zytokinen (FGF-2) beteiligt. Letzteres impliziert eine regulatorische Funktion von Perlecan in komplexen biologischen Prozessen wie Angiogenese, Wundheilung und Metastatisierung, bzw. Tumordinvasion (Avizier *et al.*, 1994; Olsen, 1999). Die Protein-Komponente von Perlecan bindet eine Vielzahl an Molekülen, darunter: Laminin-1, Fibronectin, Heparin, Integrine, Nidogen-1 und -2 (Olsen, 1999; Hopf *et al.*, 1999). Für Perlecan konnte weiterhin gezeigt werden, dass beide Nidogenformen das gleiche Bindungsepitop haben (Hopf *et al.*, 2001). Eine Nullmutation des Perlecan-Gens führt allerdings zu einem pränatal-letalen Phänotyp. Ein hoher Prozentsatz an Embryonen stirbt an Herzdefekten und zeigt andere pathologische Veränderungen (Costell *et al.*, 1999; Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999). Es wurde angenommen, dass Perlecan eine essentielle Rolle in der Erhaltung und Stabilität der BM einnimmt, da in den Perlecan-mutanten Mäusen BM gebildet wurden. Es wäre nun denkbar, dass Nidogen-2 vergleichbare Funktionen in der BM besitzt, diese jedoch erst in älteren Tieren eine Rolle spielen. Untersuchungen an älteren Mäusen könnten hier aufschlussreich sein. Weiterhin ist die Funktion des Nidogen-2 in der BM in pathologischen Situationen wie z.B. während der Tumorbildung, Invasion und Metastasierung noch völlig

ungeklärt und kann nun durch die Nidogen-2 defiziente Mauslinie experimentell untersucht werden.

Ob im Gewebe die beiden Nidogene sich gegenseitig kompensieren können, kann durch die Analyse einer Mauslinie, die für beide Proteine defizient ist, untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung durch eine genetische Funktionsanalyse stellen die charakterisierte Nidogen-1 mutanten Mauslinie (Murshed *et al.*, 2000) und die hier in dieser Arbeit angefertigte molekulare Charakterisierung des Nidogen-2 Gens und die charakterisierte Nidogen-2-defiziente Mauslinie eine hervorragende experimentelle Voraussetzung dar. Im Rahmen einer Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen von Dr. Roswitha Nischt (Universität Köln) und der Arbeitsgruppe von Dr. B. L. Bader (Max-Planck-Institut, Martinsried) konnte durch Kreuzungsexperimente mit den Nidogen-defizienten Mauslinien Mäuse hergestellt werden, die für beide Nidogen-Gene doppelt homozygot mutant sind. Diese einfache experimentelle genetische Vorgehensweise ist möglich, da sich die beiden Nidogen-Gene auf verschiedenen Chromosomen befinden, d.h. das Nidogen-1-Gen liegt auf dem Chromosom 13 und das Nidogen-2-Gen auf dem Chromosom 14 (siehe 2.1.10). Eine Vererbung der einzelnen Allele ist somit nicht aneinander gekoppelt. Aus entsprechende Kreuzungsexperimenten konnten dann Nachkommen identifiziert werden, die doppelt homozygot mutant für die Nidogen-1 und Nidogen-2 Gene waren. Die Ergebnisse aus vorläufigen Untersuchungen dieser Mäuse zeigen, dass es sich hier um einen perinatal letalen Phänotyp handelt (persönliche Mitteilung Dr. B.L. Bader). Die Ursache der Letalität der Mäuse ist jedoch noch nicht geklärt. Ergebnisse aus der phänotypischen Analyse von Nidogen-1- und 2-doppeldefizienten-Mäusen werden Auskunft über die essentielle *in vivo*-Funktionen dieser Nidogene geben.

4 Zusammenfassung

Die Basalmembran (BM) stellt eine Sonderform der extrazellulären Matrix (ECM) dar. Die supramolekulare Organisation der BM entsteht aus den vielfältigen Wechselwirkungen unterschiedlichster Moleküle. Eine Vielzahl biochemischer und struktureller Daten, sowie *in vitro*-Funktionsstudien deuten daraufhin, dass die BM-Proteine Nidogen-1 (Nid1) und Nidogen-2 (Nid2) eine zentrale Stellung in der Organisation der BM einnehmen können. Die Klonierung, Ermittlung der DNA-Sequenz und Genstruktur des Nid2-Gens der Maus und die Überprüfung der postulierten Funktion des Nid2 durch genetische Funktionsanalysen im Mausmodell waren das Ziel dieser Arbeit.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde zunächst das komplette Nid2-Gen der Maus isoliert und charakterisiert. Nukleinsäuresequenzanalysen ermöglichten detaillierte Aussagen sowohl über die Genorganisation als auch die primäre Proteinstruktur des murinen Nid2. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen aus 21 Exons und 20 Introns aufgebaut ist, die sich über eine Länge von 60 kb erstrecken. Die chromosomale Lokalisation des murinen Nid2-Gens, welches im Genom der Maus als Einzelkopie vorliegt, konnte auf dem proximalen Bereich des Chromosoms 14 ermittelt werden. Vergleichende Analysen des Nid2-Gens der Maus und des Menschen mit den entsprechenden Nid1-Genen zeigten eine hohe Erhaltung sowohl der Genorganisation als auch der Proteinstruktur. Für das Nid2-Gen konnte eine für Nidogene charakteristische, modulare Struktur mit fünf EGF-ähnlichen und zwei TY-ähnlichen Modulen, die von einzelnen Exons kodiert und von Introns in der Codon-Phase I flankiert werden, festgestellt werden. Besonders auffällig war das Exon 4 des Nid2-Gens der Maus, das für die komplette flexible Verbindungsregion zwischen den globulären Domänen G1 und G2 kodiert. Im Gegensatz dazu wird, im orthologen humanen Nid2-Gen diese Verbindungsregion jedoch von 2 Exons (Exon 4 und 5) kodiert. Aufgrund dieser Besonderheit und der signifikanten DNA-Sequenzidentität des Intron 4 des humanen Nid2-Gens zu murinen Nid2 Exon 4-Sequenzen wurde folgende Annahmen formuliert:

- a) Das Intron 4 des humanen Nid2-Gens wird einerseits natürlicherweise gespleisst, aber könnte andererseits auch alternativ ungespleisst komplett als Exon-Region kodieren ohne den bestehenden Leserahmen zu ändern. Somit würde auch in diesem Gen die Verbindungsdomäne nur von einem großen Exon kodiert.
- b) Umgekehrt könnte das murine Exon 4 intern alternativ gespleisst werden ohne den bestehenden Leserahmen zu ändern. Die experimentelle Überprüfung dieser Annahmen wurden zum Teil durchgeführt. Eindeutige Aussagen können jedoch nicht getroffen werden.

Im allgemeinen zeigen die Analysen der Sequenzen des Nid2-Gens und der anderen Nidogen-Gene andere Spezies, dass die Nidogen-Gene sowohl in ihrer Gen- und Proteinstruktur während der Evolution sehr stark erhalten wurden, als auch bestimmte Intron-Sequenzen und Sequenzen des 5'-Vorschaltbereichs (Promotors), was auf einen Signalcharakter und eine Regulationsfunktion dieser Sequenzelemente hindeutet. In dem 5'-Vorschaltbereich des Nid2-Gens konnte durch Sequenzvergleiche charakteristische Konsensussequenzen für DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z.B. CCAAT-Box, SP1-Box und AP1-Box gefunden werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde dann die genetische Funktionsanalyse des Nid2-Gens in der Maus durchgeführt. Hierfür stand eine Mauslinie von Dr. W.C. Skarnes zur Verfügung, die durch eine Genfallen-Mutagenisierungsmethode hergestellt wurde und eine zu dieser Zeit nicht näher charakterisierte Mutation im Nid2-Gen aufwies. In dieser Arbeit wurde die Mutation zunächst molekular im Intron 4 des Nid2-Gens kartiert und die Insertionsstelle kloniert. Die Anfertigung spezifischer DNA-Proben für dieses mutante Nid2 Allel erlaubte die genotypische Charakterisierung von heterozygoten und homozygot mutanten Nid2 Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass homozygot-mutante Nid2 (-/-)-Mäuse lebens- und fortpflanzungsfähig sind und die Verteilung der Genotypen der F1-Generation aus Kreuzungen mit heterozygoten Nid2 (+/-)-Tieren der 2. Mendelschen Regel entsprach. Die durchgeführten Gen- und Protein-Expressionsanalysen der untersuchten Gewebe von homozygoten (-/-) Nid2- und Kontrollmäusen zeigten, dass die Genfalleninsertion zur Nid2-Defizienz führt, d.h. die Abwesenheit eines funktionellen Nid2 Polypeptids. Die Nid2-defizienten Mäuse weisen soweit keinen erkennbaren Phänotyp auf. Die bisherigen histologischen und ultrastrukturellen Analysen von Nid2-defizienten Gewebe belegen, dass in der Abwesenheit von Nid2 sich BM ausbilden können und es zu keinen erkennbaren pathologischen Veränderungen kommt. Die Verteilungsmuster anderer BM-Proteine wie z.B. Kollagen IV, Laminin $\gamma 1$, Nid1 und Perlecan entsprachen denen von Kontrollgeweben. Insgesamt führten diese Untersuchungen zu der Schlussfolgerung, dass Nid2 nicht essentiell für die Bildung und Erhaltung der BM ist. Die Ergebnisse dieser Funktionsstudien führt zu der Annahme, dass in Abwesenheit von Nid2 die andere Nidogen-Isoform Nid1 aufgrund der charakteristischen Kolo-kalisation beider Nidogene in BM die Funktionen von Nid2 übernehmen könnte. Durch die erstmalige Charakterisierung der beschriebenen Nid2-defizienten Mausmutante in dieser Arbeit und der Nid1-mutanten Mauslinie von Murshed *et al* (Murshed *et al*, 2000) können nun aufgrund der Lokalisation der beiden Nidogen-Gene auf verschiedenen Chromosomen durch Kreuzungsexperimente Mäuse generiert werden, die für beide Nidogene defizient sind. Diese Nidogen-defizienten Mäuse werden Aufschlüsse darüber geben, ob Nidogene überhaupt eine essentielle Funktion für die BM-Organisation *in vivo* haben und wenn ja, welche?

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Kits und Enzyme

5.1.1.1 Chemikalien

Alle handelsüblichen Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Buchler GmbH (Braunschweig), In-vitrogen Ltd. (Leek/NL), Merck (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Schwalbach), Pharmacia Fine Chemicals AG (Freiburg), Roche (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Stratagene GmbH (Heidelberg), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Riedel-de Häen (Seelze), Serva (Heidelberg) sowie Fluka (Buchs, CH) bezogen.

5.1.1.2 Kits, Materialien:

Produkt	Hersteller	Ort
[α - ³² P] -dCTP (3000Ci/mMol) [γ - ³² P] -dATP (5000Ci/mMol) ¹²⁵ I (1mCi/mMol) Hybond-N ⁺ -Membran	Amersham Life Science	Braunschweig
GeneClean III Kit	Bio101	Vista, California, USA
Zeta-Probe GT Genomic, Tested Blotting Membranes	Bio-RAD	München
Bact Peptone	Difco	Detroit, Michigan, USA
Sea Plaque GTG Agarose	FMC Bio Products	Rockland, Maine, USA
TRIZol, DNA Größenmarker (1kb Leiter, 100bp Leiter)	GibcoBRL	Karlsruhe
TOPO TA Cloning	Invitrogen	Leek, NL
Oligonukleotide	Metabion	Martinsried
ECL-Detection Reagents	Pharmacia Biotech	Freiburg
BCA Protein Assay Reagent A und B	Pierce	Rockford, Illinois, USA
TransFast Transfection Kit	Promega	Mannheim
Qiagen Maxiprep, Lambda DNA, RNA Polytex, One Step RT- PCR Kit	Qiagen	Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche	Mannheim
Tri-Reagent	Sigma	Deisenhofen
Optitran BA-S 85	Schleicher&Schuell	Dassel

Prime-it II, Random Primer Labeling Kit	Stratagene	Heidelberg
Glass Microbire Filters GF/C 3 MM Chromatography Paper	Whatman	Maidstone, UK

5.1.1.3 Lösungen und Medien

Standardlösungen wurden nach Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) angefertigt. Das verwendete Wasser wurde durch ein Milli-Q Plus Filtersystem (Millipore, Eschborn) gereinigt. Alle Medien wurden entweder autoklaviert (bzw. sterilfiltriert) oder ihre Komponenten bereits steril bezogen.

Häufig verwendete Puffer und Medien	Zusammensetzung
Coomassie Lsg.	0.25g Coomassie brilliant blue R-250, in 45ml Methanol, 45ml H ₂ O, 10ml Eisessig
Entfärbelsg.	(1l) 475 ml Methanol, 75 ml Eisessig, 450ml H ₂ O
Depurinisierungslösung: Denaturierungslösung: Neutralisierungslösung:	0,25 N HCl 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH 1M Tris-Cl, 1.5M NaCl pH=7.4
DEPC-Wasser	0.1% Diethylpyrocarbam (DEPC) in H ₂ O (unter dem Abzug), ü.N. schütteln, autoklavieren
FSB	10mM Kaliumacetat pH=7.5, 45mM MnCl ₂ ·2H ₂ O, 10mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 100mM KCl, 3mM Hexamminkobaltchlorid, 10% Glycerin
HBS	25mM Hepes, 134 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na ₂ PO ₄ , pH=7,1
Luria-Bertani (LB) Medium	1% (w/v) Trypton (Difco), 0.5% (w/v) Hefeextrakt (Difco), 0.5% (w/v), NaCl 0.01% 10 M NaOH
LB-Agar Platten	LB-Medium mit 0,75 % (w/v) Agar versetzen, autoklavieren. Optional Zugabe von Ampicillin (100µg/ml) nach Abkühlen des Mediums auf 50°C.
LB-Agarose (Top-Agarose)	Für 200ml: 2g Trypton (Difco), 1g Hefeextrakt (Difco), 2g NaCl, 1.4g Agarose
MOPS (10x)	0.2M MOPS, 50mM NaAc, 10mM EDTA pH=5.5-7.0
PBS 1x	137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5mM KH ₂ PO ₄ pH=7,4
Proteinase-K Puffer	<u>Für Southern-Blots:</u> 0.2% SDS, 100mM Tris pH8.0, 200mM NaCl, 5mM EDTA <u>Für PCR:</u> 0.1% SDS, 20mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, jeweils 250µg/ml ProteinaseK (Merck, Darmstadt)
Proteinextraktionspuffer	150mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7.4, 1% NP40, 0.5% Natriumdesoxycholat, 0.05% Triton X-100, 10mM EDTA Proteaseinhibitoren: 1µg/ml Leupeptin, 4µg/ml Pepstatin, 1mM Benzamidin, 2mM PMSF, 5mM N-Ethylmaleimid
SM	100ml: 0.58g NaCl, 0.2g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1M Tris-Cl (pH=7.5) → sterilfiltriert
SOC-Medium	2% (w/v), Trypton (Difco), 0.5% (w/v) Hefeextrakt (Difco), 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 2.5 mM KCl, 0,02% (w/v) Glucoselösung
SSC (10x)	1.5 M NaCl, 0.15 M Trinatriumcitrat
SSPE (20x)	3M NaCl, 0,2M NaH ₂ PO ₄ , 0,02 M EDTA, pH=7,4
TAE (50x)	2 M Tris-HCl, 250 mM Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH=8.0
TBS	50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl
TE 10x	10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA
TENS	100mM NaOH, 0.5% SDS in TE Puffer
Denhardts-Lösung (50x)	1 % Rinderserumalbumin, 1 % Polyvinyl-pyrrolidin, 1 % Ficoll 400
(Vor)Hybridisierungspuffer:	<u>Für Southern-Blot:</u> 0.2 M NaPO ₄ pH=7.2, 7% SDS, 1mM EDTA

	<u>Für Northern-Blot:</u> (für 100ml) 50 ml deionisiertes Formamid, 20ml 20xSSPE, 10ml 10% SDS, 5ml Lachssperma-DNA (10mg/ml), 10ml 50xDenhardts Lsg., 5ml H ₂ O (Aliquots bei -20°C)
Probenpuffer	<u>Für DNA (6x):</u> 30%Glycerol, 0.01% Bromphenolblau, 0.01% Xylencyanol <u>Für RNA (10x):</u> 50% Glycerol, 0.5mM EDTA, 0.01% Bromphenolblau, 0.01% Xylencyanol <u>Für Protein (2x):</u> 100mM Tris-Cl (pH6.8), 4% SDS, 0.2% Bromphenolblau, 20% Glycerol

5.1.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen,	New England Biolabs (NEB; Schwalbach), Roche (Mannheim)
Alkalische Phosphatase der Garnele	Roche (Mannheim)
T4 DNA Ligase	NEB (Schwalbach)
Taq DNA Polymerase	Sigma (Deisenhofen)
Trypsin (EC 3.4.21.4)	Worthington (Lakewood, NJ, USA)
ProteinaseK	Merck (Darmstadt)

5.1.1.5 Vektoren

Vektor	Firma	Verwendung	Selektions antibiotikum
Pbluescript Sk ⁻	Stratagene	Klonierung, Sequenzierung	Ampicillin
Pbluescribe	Stratagene	Klonierung, Sequenzierung	“
PCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen	aus TOPO TA Kloning Kit Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten	“

5.1.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper:

Alle primären Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. Rupert Timpl (Abteilung für Proteinchemie am Max-Planck-Institut für Biochemie, in Martinsried) zur Verfügung gestellt.

Antigen	Name	Wirt	Verdünnung für Western Blot-Analyse	Verdünnung Für Immunfluoreszenz
Nidogen-1, monoklonal anti-Maus	BL1/4	Ratte	-	1:80
Nidogen-1, polyklonal anti-Maus	1001+E	Kaninchen	1:1000	1:150
Nidogen-2, polyklonal anti-Maus	1130+E	Kaninchen	-	1:200
Nidogen-2, polyklonal Anti-Mensch	1080+E	Kaninchen	1:400	1:100
Laminin γ 1, polyklonal anti-Maus	1083+E	Kaninchen	-	1:150
Kollagen IV, polyklonal anti-Maus	1119+E	Kaninchen	-	1:50
Perlecan, polyklonal anti-Maus	1056+E	Kaninchen	-	1:150

Sekundäre Antikörper:

Antigen	Konjugat	Wirt	Verdünnung	Firma/Kit
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	CY2	Ziege	1:500	Dianova
Anti-Ratten IgG (H+L)	CY2	Kaninchen	1:500	Dianova
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	CY3	Ziege	1:500	Dianova
Anti-Ratten IgG (H+L)	CY3	Kaninchen	1:500	Dianova
Anti-Kaninchen IgG (H+L)*	HRP	Ziege	1:2000	NEB

Der Fluoreszenzfarbstoff Cy2TM hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=482\text{nm}$;

Cy3TM hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=552\text{nm}$.

Die Farbstoffe sind Produkte der Firma Jackson ImmunoResearch Inc., USA.

*Für Western Blot-Analysen wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Anti-Kaninchen IgG Antikörper aus der Ziege verwendet. Alle Antikörper sind gegen die schwere (H) und die leichte (L) IgG-Kette gerichtet.

5.1.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (Martinsried) oder in der Abteilung Membranbiochemie, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried synthetisiert. Alle Oligonukleotid-DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms GCG gewählt.

Oligonukleotide für Polymerase Kettenreaktionen (PCR):

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung
G1	GCA TCG AGC TGG GTA ATA AGC GTT GGC AAT
G2	GAC ACC AGA CCA ACT GGT AAT GGT AGC GAC
G3	AGG ACT GGG TGG CTT CCA ACT CCC AGA CAC
G4	AGC TTC TCA TTG CTG CGC GCC AGG TTC AGG
N6	ATATTGCTGA AGAGCTTGGC G
ND70	CTG CTT GCT AAA CTT TTC ACC
ND100	TGT CCC TCT CAC CTT CTA CC
ND101	TGT GTG TGT GAA AAT GAG ATG G
ND33	TGT CAA TGA GTG TGC CAC TG
ND34	TGC TTC GAT GGC AGT CAC AC
ND36	GAC TGA AGC CCT GTG AAT ACC
ND37	GGA AAG CCT GCT GGA ACA CTA C
ND38	AAG GAC TTG CCA TCG ACC AC
ND39	TTA GAT GGC GAA AAC AGA AGG
ND40	ACA CTA CCC GAT GGA ACT GGA C
ND50	CCT GTT CTC TTT CAG CAA TCC C
ND51	ACT GAG AAG AAT CCA GAG CC
ND54	ATG CTA CAC AGT CCA GCC TC
ND55	GCA AGC AAC ACC CAA TAA ACC
ND70	CTG CTT GCT AAA CTT TTC ACC
ND79	CAA CGA TCA AGG CGA GTT AC
ND95	TCCACACACCAACAGAAATCAC
ND96	TTCTGAAGCCTGCTGCCATTG
ND97	GCCACTGTCTTATTCCTG
P1	AGC TAC ACC GAG GAC AGT TTC C
P10	AGG GGG TCA CAC AAA GTA G
P11	CGG ATA AAG AAT CAA AGG AG
P8:	ACA ATA GGT GGA ACG GTAG
P9:	AGA CAG TTC AGC AGG TAA G

Abb. 5-1 Übersicht der für PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotide für Reverse Transkriptase Reaktionen

Oligo.	Sequenzen 5'-3'-Richtung	Kommentar
ND-61	GCT GTA GTT GGG CGA TGT GG -	Kimura <i>et al.</i> , 1998 (Entactin ENT-1/ENT-2)
ND-62	CAG GCC ATC GGT TGT GTC CA	
ND-39	TTA GAT GGC GAA AAC AGA AGG	Lage und Orientierung siehe Abb. 2-29
ND-77	GCC ACT GTC CTT ATT CAC TG	
ND-45	CAA CCT GGA AAC CTG CGA AC	
ND-89	GAA CCA GAA GTG AGA GAG AAA C	
ND-45	CAA CCT GGA AAC CTG CGA AC	
ND-90	ACA CAG AAT TAG GGC CAC AG	
ND-45	CAA CCT GGA AAC CTG CGA AC	
ND-91	TCG GTT TTC CGC ACA TTC	
ND-25	CCC AAA GAG TCC TAC AAT GTC C	
ND-28	AAA TCC AGA ACC TCT CCC	

Abb. 5-2 Oligonukleotide die für RT-PCR Experimente verwendet wurden.

Oligonukleotide für DNA-Sequenzreaktionen

Oligo.	Sequenz in 5'-3'-Richtung
M13fwd	CAT TTT GCT GCC GGT
M13rev	AAC AGC TAT GAG CAT G
ND31	CCT ACC ACA TTG ACC AGA AC
ND32	TGT TAC GAC GGA AGC CAC AC
ND34	TGC TTC GAT GGC AGT CAC AC
ND35	CAT GAG GCA GCT ATT TGC TAC
ND36	GAC TGA AGC CCT GTG AAT ACC
ND38	AAG GAC TTG CCA TCG ACC AC
ND40	ACA CTA CCC GAT GGA ACT GGA C
ND42	TGG GGA TTG ACT ATG ACT GC
ND43	GTG GCC AGT TTA CTG ATG AGT
ND45	CAA CCT GGA AAC CTG CGA AC
Nd46	AGT GAA TGG GAA AGT GAG TGG
ND47	AGA GGA GAG GGT TTG TAT CAC
ND48	GAT TTC ACC ACA GGC AGA AC
ND49	ACT TCA GAA ACG CTA CAC AC
ND50	CCT GTT CTC TTT CAG CAA TCC C
ND52	CCA TTC TGT CCC TTG ACT CC
ND54	ATG CTA CAC AGT CCA GCC TC
ND55	GCA AGC AAC ACC CAA TAA ACC
ND57	AGA AAC AAA ATC ATC CGC AGA G
ND58	GGC ATC ACG TCC ATT TTA CAG
ND92	TGA GAA CTG ATT CCT GAA GCC
ND93	AGC TCT TCT ATG TGC AGC AAC C
ND97	GCCACTGTCCATTACTG
P1	AGC TAC ACC GAG GAC AGT TTC C
P10	AGG GGG TCA CAC AAA GTA G
P2	GGT AGG ATG GCC AGT TAC CAT GAG CTG
P4	TTC TGG CAG GCA GTG CTT CC
P8	ACA ATA GGT GGA ACG GTAG
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AG
T7	TTA TGC TGA GTG ATA TC

Abb. 5-3 Übersicht der für Sequenzreaktionen eingesetzten Oligonukleotide. Für Lage und Orientierung siehe Abb. 2-3, bzw. Abb. 7-1 - Abb. 7-4.

5.1.1.8 Mäuse und Bakterien

5.1.1.8.1 Mausstämme

Die Mäuse wurden unter streng kontrollierten artgerechten und hygienischen Bedingungen gehalten. Futter und Wasser war den Tieren frei zugänglich. Der Tag-Nacht Rhythmus war 12h/12h. Die Züchtung der Mäuse erfolgte nach Hogan *et al.*, 1994.

WT-Stämme:

Name	Ursprünglicher Inzuchtstamm	Kommentar	Referenz
C57/Bl6	C57; Little 1921	Schwarze Fellfarbe	Rikke <i>et al.</i> , 1995
Balb/cj	Balb; Bagg 1913 Balb/c; Snell 1932	Albino	Potter, 1988
129/Sv	129; Dunn 1928	Agouti Fellfarbe	Festing <i>et al.</i> , 1999
129/Ola			Jackson Laboratorys

Detaillierte Informationen über die einzelnen Inzuchtstämme können auf der Internetseite der Jackson Laboratorys, USA, gefunden werden (<http://www.informatics.jax.org>). Ein Stammbaum der Mäuse und Referenzen befindet sich auf der Internetseite <http://genetics.nature.com/mouse>.

Der transgene Maus Stamm Nid2^{GST(pGT1.8TM)011Ska} (Nid2)

Der transgene Mausstamm mit einem GST-Konstrukt im Nidogen-2 Locus wurde von Dr. W.C. Skarnes *et al.* (Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, California 94720, USA) im Rahmen eines Mutageneseprojektes hergestellt (Skarnes *et al.*, 1995; für weitere Information siehe auch <http://socrates.berkeley.edu>). Die Elektroporation der DNA des GST-Konstruktes pGT1.8TM erfolgte in E14 Tg2a ES-Zellen aus 129/Ola Mäusen. Selektionierte Zellen wurden in C57/Bl6 Blastozysten injiziert, welche in Ammen transferiert wurden. Chimäre, männliche Nachkommen wurden mit C57/Bl6 WT-Weibchen verpaart und agoutifarbig Nachkommen aus dieser Kreuzung wurden ein weiteres mal mit C57/Bl6 WT-Mäusen rückgekreuzt. Das mutierte Allel Nid2^{GST(pGT1.8TM)011Ska} (Terminologie nach <http://www.informatics.jax.org>) wird in dieser Arbeit zur Vereinfachung der Schreibweise mit der Genotyp-Bezeichnung Nid2 (-) abgekürzt (Mitchell *et al.*, 2001).

5.1.1.8.2 Bakterien

Für die Subklonierung von DNA-Fragmente und Präparation von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm DH5 α (Abkömmling des *E.coli* Sicherheitsstammes K12) verwendet. Genotyp: F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, sup E 44, Δ (lac-proAB), [F⁻, traD36, proAB, lacIqZ Δ M15]

Für die Vermehrung der rekombinanten λ -Phagen wurde der *E.coli* Stamm PLK-17 (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

Genotyp: hsdR-M0, mcrA⁻, mcrb⁻, supE44, LacZ, galK2, galT22, metB1, hsdR2

5.1.1.9 Gen-Bibliotheken

Von Dr. Ernst Pöschl (Experimentelle Medizin I, Nikolaus-Fiebiger Zentrum, Molekulare Medizin, Universität Erlangen-Nürnberg) wurde eine 129SVJ genomische Maus-Genbibliothek der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Die 15-20 kb langen DNA-Fragmente eines (*Sau*3AI)-Teilverdaus von genomischer DNA wurden in die Polylinkerregion des Vektors Lambda FIXII kloniert. Zur Isolierung von Nidogen-2 spezifischen rekombinanten Phagen wurden 1.2x10⁶ pfu (plaques forming units) mit einer Mensch-Nidogen-2-spezifischen Probe unter permissiven Bedingungen untersucht.

Die in dieser Arbeit verwendete Gen-Bibliothek des Mausstammes 129 SvJ enthält 15-20 kb lange DNA-Fragmente eines (*Mbo*I) Teilverdaus von genomischen DNA, die in die Polylinkerregion des Vektors Lambda DashII kloniert wurden. Die Genbibliothek wurde im Labor von Dr. T. Doetschman (University of Cincinnati, Ohio, USA) hergestellt und von Dr. Beate Lanske (Max-Planck-Institut für Biochemie, Molekulare Endokrinologie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Zur Isolierung von Nidogen-2 spezifischen rekombinanten Phagen wurde 6.8x10⁵ unabhängige pfu (plaques forming units) mit Nidogen-2-spezifischen Proben untersucht.

5.1.1.10 Photomaterial, Computerprogramme

5.1.1.10.1 Photomaterial

Für die Dokumentation der Ergebnisse wurden Kodak Ektachrom 64T Dia Filme und Biomax Autoradiographie Filme verwendet (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA).

5.1.1.10.2 Computerprogramme

Für Textverarbeitung und Erstellung der Tabellen wurden die Microsoft Programme Word 97 und Excel 97 verwendet (Microsoft Corporation). Graphiken wurden mit dem Computerprogramm Corel Draw 8 angefertigt (Corel Corporation und Corel Corporation Limited). Für die Bildbearbeitung wurde das Computerprogramm Photoshop 5 verwendet (Adobe Systems Incorporated). Die Auswertung der Sequenzdaten aus den Sequenzierungsreaktionen, sowie die Suche nach Oligonukleotiden und die Anfertigung von Sequenzvergleichen erfolgte mit dem Computerprogramm Packet GCG (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wisconsin, USA).

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden unter Beachtung entsprechender Sicherheitsvorschriften (z.B. Gentechnikgesetz) durchgeführt. Reagenzien und Proben für die Vorbereitung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Molekularbiologische Standardmethoden wie z.B. Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus *Escherichia coli* Bakterien, Präparation von λ -Phagen-DNA, Isolierung von Poly(A)⁺-RNA, DNA-Agarose-Gelelektrophorese, Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, DNA-Restriktionsenzymverdaus, Dephosphorylierungs-, Kinasierungs-, T4-Polymerase, radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten und Klenow-Reaktion erfolgten nach Protokollen von Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) oder gemäß den Angaben des Herstellers.

5.2.1.1 Präparation genomischer Maus DNA

Präparation der DNA aus Schwanzbiopsien

Mäusen im Alter von 3-6 Wochen, wurden ~0,5 cm der (noch knorpeligen) Schwanzspitze entnommen und in 300 μ l ProteinaseK-Puffer ü.N. bei 56 °C inkubiert. Die Lösung wurde 10min bei RT abzentrifugiert und die DNA aus dem Überstand mit 200 μ l Isopropanol ausgefällt, nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol in 200 μ l TE Puffer aufgenommen und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

Präparation der DNA aus Leber

Leberstückchen wurden entnommen, mit Skalpellklingen zerkleinert und ü.N. bei 56°C in ProteinaseK-Puffer inkubiert. Die DNA wurde mit (ca. 70%-des Volumens) Isopropanol ausgefällt. Nach einem Waschschrift in 70% Ethanol wurde die DNA kurz getrocknet, in TE Puffer aufgenommen. Zur Beseitigung verunreinigender Proteine wurden die DNA-Präparationen nach Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) Phenol-Chloroform extrahiert und anschließend wie oben beschrieben ausgefällt. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

5.2.1.2 Präparation von RNA aus Mausgewebe

Bei Arbeiten mit RNA ist es besonders wichtig die Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Deshalb wurden alle Puffer mit 0.1% DEPC Wasser hergestellt. Mit diesem Wasser wurden die Gelkammer und Käbme gereinigt. Alle verwendeten Glasgefäße wurden in einem Ofen bei 180°C ü.N. gebacken.

Nach der Organentnahme (Herz, Nieren, Lunge, Skelettmuskel aus der Wade) wurden die Gewebe zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren dann bei -80°C gelagert. Je 100 mg Gewebe wurde zu 1ml Trizol® (GibcoBRL), bzw. Tri-reagent® (Sigma), in einem stabilen Polypropylenröhrchen gegeben und durch einen Homogenisator (Ultra-Turax T25) zerkleinert. Nach 5min. Inkubation wurde zu dem Homogenisat 200µl Chloroform pro 1ml Trizol hinzupipettiert, kurz geschüttelt und weitere 2min inkubiert. Die Trennung der wässerigen und der organischen Phase erfolgte durch Zentrifugation. Der klare, wässrige Überstand wurde vorsichtig überführt und die RNA mit 500µl Isopropanol gefällt. Nach dem Waschen der RNA mit 75% Ethanol wurde sie kurz getrocknet und in 50µl Wasser gelöst. Die RNA-haltig Lsg. wurde bei -80°C gelagert.

5.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten in Agarosegelen mit niedrigem Schmelzpunkt

Für DNA-Ligationen wurden die entsprechenden DNA-Fragmente und Plasmidvektoren in einem Agarosegel aufgetrennt, das für diesen Zweck aus 0.8-1% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (GTG-Agarose) hergestellt wurde. Die DNA-Fragmente wurden auf einem Transilluminator mit niederenergetischer UV-Strahlung (354nm) mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Die Vektorkonzentration wurde mit TE-Puffer auf 20ng/µl eingestellt und das zu klonierende DNA-Fragment mit 20-40µl TE Puffer verdünnt. Die DNA-Fragmentlösungen wurden bei 70°C für 10 min inkubiert und bei 37°C bis zur Reaktion

gehalten. Für die Ligasereaktion sollte die Agarosekonzentration nicht mehr als 0,2% betragen. 5µl Vektor (\cong 100 ng DNA) wurden mit der 2-3 fache Kopienzahl des zu klonierenden DNA-Fragments gemischt. Die Reaktion erfolgte mit 1U T4-DNA-Ligase und 4µl Ligasepuffer (Gibco, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 40µl. Nach 3-4 h wurde der 1/2 Ansatz für 10min bei 70°C inkubiert. Danach erfolgte die Transformation mit kompetenten *E.coli* DH5 α -Zellen nach einem Standardprotokoll (Sambrook & Russell, 2001).

5.2.1.4 Spezifischer Nachweis von DNA durch Southern Blotting

Für die Analyse wurden 30µg genomische DNA ü.N. mit 100U Restriktionsenzym verdaut. Bei der Analyse der Phagen und Plasmid DNA wurden jeweils 1-2 µg DNA verwendet. Die Reaktionsansätze wurden dann in einem 0.8-1%-igem Agarosegel aufgetrennt

Um die Transfereffizienz von langen DNA-Fragmenten (>5kb) zu erhöhen wurden entsprechende Gele nach der Elektrophorese 10 min mit Depurinierungspuffer behandelt. Die Gele wurden dann für 30min mit Denaturierungspuffer und schließlich für 30min mit Neutralisationspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA auf die Membran (Zeta-Probe, Biorad, Richmond, USA; Hybond N⁺, Amherham Life Science, Braunschweig) erfolgte nach dem Standardprotokoll für kapillare Blots nach Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) mit 10xSSC als Transferpuffer. Die transferierte DNA wurde mit einem UV-Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) auf dem Filter fixiert.

Um unspezifische Bindungstellen auf der Membran abzusättigen wurden sie in einem Puffer nach Church (200mM Na₂PO₄ pH=7.2, 1mM EDTA, 7% SDS) für mind 2 h, bei 65°C vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte dann für 12-16h bei 65°C, nachdem der Puffer mit der radioaktiven Probe versetzt wurde. Das Waschen der Filter erfolgte zweimal mit 2xSSC, 1%SDS und zweimal mit 0.5-0.2xSSC, 1%SDS für je 30 min bei 65°C. Die Membranen wurden dann mit dem Geigerzähler kontrolliert, mit Haushaltsfolie bedeckt, und durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Kodak Biomax MS, X-Omat) mit einer Kodak Biomax MS Verstärkerfolie bei -80°C wurde eine Autoradiografie erzeugt.

5.2.1.5 Spezifischer Nachweis von RNA durch Northern Blotting

10-20µg Gesamt-RNA, oder 2-4 Poly(A)+-RNA wurden in einem 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (Für 100ml wurden 1g Agarose, 10ml 10xMOPS und 85ml DEPC-Wasser, 5,4ml 37% Formaldehyd und 2µl Ethidiumbromid). Die RNA-Proben wurden vorher lyophyllisiert und dann in 10µl Proben-Puffer gelöst (1ml Proben-Puffer: 100µl MOPS, 166µl 37% Formaldehyd, 500µl deionisiertes Formamid, 234µl H₂O). Nach der Zugabe von 1µl

RNA-Ladepuffer wurde die RNA für 5min auf 65°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen zu lösen. Die RNA wurde dann bei einer Spannung von 60V für 3-5h gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1xMOPS.

Vor dem Northern-Transfer wurde das Gel für 30min in 10xSSC äquilibriert. Der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran) erfolgte mit 10xSSC ü.N. nach dem Standardprotokoll für kapillare Blots nach Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001). Die Membran wurde am nächsten Tag für 1-2h bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken.

Für die Hybridisierung wurden die Nitrozellulosemembran mind. 2 Stunden bei 42°C in Hybridisierungspuffer (für 100ml: 50 ml deionisiertes Formamid, 20ml 20xSSPE, 10ml 10% SDS, 5ml Lachssperma-DNA (10mg/ml), 10ml 50xDenhards Lsg., 5 ml H₂O) vorhybridisiert und dann nach Zugabe der radioaktiven Probe für 12-18h, bei 42°C hybridisiert. Das Waschen der Filter erfolgte zweimal mit 2xSSC, 1%SDS und zweimal mit 0.5-0.2xSSC, 1%SDS für je 30 min bei 65°C. Die Membranen wurden dann mit dem Geigerzähler kontrolliert, mit Haushaltsfolie bedeckt und durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Kodak Biomax MS, X-Omat) mit einer Kodak Biomax MS Verstärkerfolie bei -80°C wurde eine Autoradiografie erzeugt.

Damit die angefertigten Northern Blot-Membranen für ein bis zwei weitere Hybridisierungsexperimente wieder benutzt werden konnten, wurden die radioaktiven Hybridisierungsproben durch zweimaliges Waschen mit 100°C H₂O mit 1%SDS entfernt. Somit konnte die gleiche Northern Blot-Membran mit unterschiedlichen Proben hybridisiert werden.

5.2.1.6 Isolierung von rekombinanten λ -Phagen aus der Gen-Bibliothek

Eine Genbibliothek (siehe 5.1.1.9) wurde nach der von Sambrook & Russell (Sambrook & Russell, 2001) beschriebenen Methode auf rekombinante λ -Phagen untersucht. Es wurden Rund-Nylon-Membranenfilter (BA 85, Schleicher & Schuell, Dassl) verwendet. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA-Probe erfolgte wie unter 5.2.1.4 beschrieben.

Nach der Exposition von Röntgenfilmen wurden die entsprechenden hybridisierungspositiven Bereiche aus Agarplatten gestochen, die Phagen in SM-Puffer extrahiert, verschiedene Verdünnungen ausplattiert und Membranreplikas hergestellt, die wie oben beschrieben prozessiert wurden.

Diese Experimente wurden so oft wiederholt, bis Einzelplaques isoliert werden konnten, die in einer weiteren Runde zu 100% positiven Plaques führten.

5.2.1.7 Polymerase Kettenreaktionen (PCR)

Mit Hilfe der PCR können in einem zyklischen Prozess, katalysiert von der hitzestabilen Taq-Polymerase, mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide PCR-DNA-Fragmente von DNA-Matrizen selektiv amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1988). Die Taq-Polymerase sowie die Puffer wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Für Reaktionen wurde ein TRIO-Thermoblock (BIOmetra, Göttingen) verwendet. Folgende PCR-Reaktionen wurden in dieser Arbeit durchgeführt:

5.2.1.7.1 Genotypisierung der Nid2- Mäuse

Reaktionsansatz:

Matrize: 100 ng genomische Maus DNA,

Oligonukleotide: P1 200ng, ND70 100ng, ND79 50ng

dNTPs: Endkonzentration 0,2mM

Puffer: 10X Puffer mit 13 mM MgCl₂ (Mischung aus 10X Puffer mit 15 mM MgCl₂ und 10X Puffer ohne MgCl₂)

DMSO: Endkonzentration 10%

Polymerase: 0,125 U Taq/Ansatz,

Reaktionsvolumen: mit H₂O auf 30µl

Temperaturprogramm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten:

Zyklus	Temperatur	Schritt	Zeit(min)	Anzahl
Initiales Schmelzen	94°C	Denaturierung	4'	1 Zyklus
Amplifikation	94°C	Denaturierung	1'	10 Zyklen
	60°C	mit 1°C Inkrement/Zyklus	2'	
	72°C	Anlagerung	4'	
	94°C	Denaturierung	1'	
	56°C	Anlagerung	2'	
Auffüll-Zyklus	72°C	Kettenverlängerung	4'	25 Zyklen
	72°C	Kettenverlängerung	10'	
	72°C	Kettenverlängerung	10'	

Für die Analyse der Reaktion wurden die Proben in einem 1.5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das PCR-DNA-Fragment für das WT-Allel hat eine Größe von 1.2 kb, während das PCR-DNA-Fragment für das mutierte Allel 0.7 kb groß ist (Abb. 2-23).

5.2.1.7.2 PCR zur Detektion des β -Galaktosidase Gens

Reaktionsansatz:

Matrize: ~100 ng genomische Maus DNA

Oligonukleotide: G1-G4 je 60 ng

dNTPs: Endkonzentration 0,2mM

Puffer: 10x Standardpuffer (Sigma) mit 15 mM MgCl₂

DMSO: Endkonzentration 5%

Polymerase: 0,125 U Taq/Ansatz

Reaktionsvolumen: mit H₂O auf 30 μ l

Temperaturprogramm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten:

Zyklus	Temperatur	Schritt	Zeit(min)	Anzahl
Initiales Schmelzen	94°C	Denaturierung	4'	1 Zyklus
Amplifikation	94°C	Denaturierung	1'	35 Zyklen
	56°C	Anlagerung	2'	
	72°C	Kettenverlängerung	3'	
Auffüll-Zyklus	72°C	Kettenverlängerung	10'	1 Zyklus

Für die Analyse der PCR-Reaktion wurden die Proben in einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das *lacZ*-spezifische PCR-DNA-Fragment ist 822bp groß. Als Positivkontrolle dient die Amplifizierung des Maus Rap-Syn Gens, das ein 590bp PCR-DNA-Fragment liefert (Hanley *et al.*, 1991).

5.2.1.7.3 PCR-DNA-Fragmente für die chromosomale Lokalisation

Reaktionsansatz:

Matrize: 50, bzw. 5 ng genomische DNA aus der Leber einer 129 Sv Wildtyp-Maus

Oligonukleotide 100 ng P8/P9 bzw. P10/P11

dNTPs: Endkonzentration 0.2mM

Puffer 10x Standardpuffer mit 15 mM MgCl₂,

Polymerase 0,125 U Taq/Ansatz,

Reaktionsvolumen mit H₂O auf 30 μ l

Temperaturprogramm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten:

Zyklus	Temperatur	Schritt	Zeit(min)	Anzahl
Initiales Schmelzen	94°C	Denaturierung	4'	1 Zyklus
Amplifikation	94°C	Denaturierung	1'	35 Zyklen
	60°C	Anlagerung	2'	
	72°C	Kettenverlängerung	3'	
Auffüll-Zyklus	72°C	Kettenverlängerung	10'	1 Zyklus

5.2.1.7.4 Weitere PCR-Reaktionen

Bei sonstigen PCR-Reaktionen wurde das Temperatur-Programm aus 5.2.1.7.1 verwendet. 100ng genomische DNA diente als Matrize, weiterhin wurden 100ng der entsprechenden Oligonukleotide, 0,2 mM dNTPs, der 10x Standard-PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂ (Sigma), 10% DMSO und 0,125 U Taq-Polymerase/Ansatz Enzym in einem Gesamt-Reaktionsvolumen von 30µl eingesetzt.

5.2.1.8 Reverse Transkriptase-PCR

Reverse Transkriptase-(RT)-PCR Reaktionen wurden mit 100 ng gesamt RNA aus Niere, bzw. 10ng polyA⁺-RNA als Matrize und je 100ng Oligonukleotide mit Hilfe des 'One Step RT-PCR'-Kit (Qiagen) mit halbierten Reaktionsansätzen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Temperaturprogramm zur Herstellung von RT-PCR-DNA-Fragmenten

Zyklus	Temperatur	Schritt	Zeit(min)	Anzahl
<u>RT-Reaktion</u>				
Synthese von DNA-Ketten	50°C	Ketten-Bildung	30'	1 Zyklus
Aktivierung der Polymerase/ Inaktivierung der RT	95°C	Denaturierung/Aktivierung	15'	1 Zyklus
<u>PCR-Reaktion</u>				
Amplifikation	94°C	Denaturierung	1'	35 Zyklen
	58,5°C	Anlagerung	1'	
	72°C	Kettenverlängerung	1'	
Auffüll-Zyklus	72°C	Kettenverlängerung	10'	1 Zyklus

5.2.1.9 Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten

Für die Klonierung der PCR DNA-Fragmente wurde das TOPO TA Cloning Kit pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.2.1.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Cycle Sequencing nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger *et al.*,1977). Die Reaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die einzelnen Reaktionen wurden 100ng Matrize und 5pmol Oligonukleotide eingesetzt. Übersichtsskizzen der verwendeten Oligonukleotide und Matrizen siehe Abb. 2-3 bis Abb. 7-4. Die DNA-Sequenzreaktionen wurden anschließend von Herrn M. Boicu (Abteilung Molekulare Strukturbiologie, MPI für Biochemie, Martinsried) auf einem 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems) analysiert. Die Auswertung der Sequenzdaten aus den Sequenzierungsreaktionen erfolgte mit dem Computerprogramm Packet GCG (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wisconsin, USA).

5.2.2 Proteinchemische Methoden

5.2.2.1 Herstellung von Gewebe Gewebeextrakten

Präparierte Gewebe wurden mit 1ml Extraktionspuffer/200mg Frischgewebe in ein stabiles Polypropylenröhrchen gegeben. Die Zerkleinerung der Gewebbe erfolgte durch einen Homogenisator (Ultra-Turax T25). Der Zelldebris wurden in einer Beckman TL-100 Ultrazentrifuge (Rotor TLA-100; Palo Alto, Kalifornien, USA) mit 35.000 rpm für 45 min abzentrifugiert. Das Proteinlysate wurde dekantiert und bei -80°C in Portionen gelagert. Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Reagentien A und B (Pierce) nach Angaben des Herstellers.

5.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Transfer

Für die Proteinanalysen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli *et al.*,1970) wurden 7.5% Gele (100 x 90 x 0.5 mm) mit 4% Sammelgel verwendet. Die Proteinproben wurden im Protein-Probenpuffer 5 min gekocht, bei einer konstanten Spannung von 200 V gelelektroforetisch aufgetrennt. Als Standard diente ein Gemisch aus Proteinen definierter Molekularmasse (Broad Range-SDS-PAGE Molecular Weight Standards, BioRad).

10 ml 7.5% Acrylamidgel (Trenngel): 2.5 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 4.845 ml H_2O , 2.5ml 1.5M Tris-HCl pH=8.8, 100 μl 10% SDS, 50 μl 10% APS, 5 μl TEMED

5 ml 4% Acrylamidgel (Sammelgel): 0,7ml 30% Acrylamid/Bisacrylamidlösung,
2,972 ml H₂O, 1,25ml 0.5M Tris-HCl pH=6.8, 50µl
10% SDS, 25µl 10% APS, 3µl TEMED

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden entweder mit einer Coomassie-Lösung angefärbt oder mit Hilfe des Nassblotverfahrens in einer 40 mM Natriumtetraborat-Lösung (4 °C, 1 mA/cm², 4-16 h) auf eine Optitran-Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell) übertragen. Die Kontrolle der Transfereffizienz erfolgte durch die Anfärbung der Membranen mit Ponceau-S-Färbelösung (Sigma) für 1 min bei Raumtemperatur.

5.2.2.3 Immunblotting

Der Nachweis bestimmter Proteine auf Optitran Nitrozellulosemembranen durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Western-Transfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen ü.N. mit 5% Milchpulver in TBS bei 4°C geblockt. Nach dem Waschen der Membranen in TBS mit 2%Tween erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (siehe 5.1.1.6) in TBS mit 5% Milchpulver für eine h.

Anschließend wurde die Membran zweimal in TBS mit 2%Tween für je 5 min gewaschen. Dann erfolgte Inkubation mit dem sekundären Antikörper (HRP-Konjugierter anti-Kaninchen-IgG-spezifischer Schwein-AK; NEB, Schwalbach) in einer Verdünnung von 1:2000 in TBS mit 5% Milchpulver für 1h. Danach wurde die Membran in TBS mit 2%Tween zweimal für 5 min. gewaschen. Für die Anfärbung der spezifische Protein-Detektion wurde der ECL-Kit (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.2.2.4 Radioaktive Markierung rekombinanter Proteine

Die ¹²⁵I-Markierung der rekombinanten Proteine für den Radioimmunoassay (siehe 5.2.2.5) wurden von Frau V. van Delden, am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, nach folgendem Protokoll durchgeführt:

10µg der rekombinanten Proteine Nidogen-1 und -2, sowie Laminin γ 1 wurden mit 0.1 ml ChloraminT (1.67 mg/ml PBS; Merck) und 0.5 mCi Na ¹²⁵I inkubiert. Nach 10min wurde die Reaktion mit 0.1 ml Natriummetabisulfit (1.67 mg/ml H₂O)gestoppt. Das Volumen wurde auf 2.5ml aufgefüllt und die überschüssigen Radioaktivität durch Dialyse gegen PBS/Tween20 (0.04%) entfernt.

5.2.2.5 Radioimmunitest (RIA)

Die Analyse der Proteinextrakte aus Niere und Skelettmuskel durch den RIA führte Frau H. Reiter, am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, nach einem Standardprotokoll (Nischt *et al.*, 1991) mit Antiseren gegen Nidogen-1, -2 und Laminin $\gamma 1$ durch (siehe 5.1.1.6). Als Epitope wurden die radioaktiv markierten rekombinanten Proteine Nidogen-1 und -2, sowie Laminin $\gamma 1$ verwendet (siehe 5.2.2.4).

5.2.3 Histologie

5.2.3.1 Fixierung und Einbetten der Gewebe

Entsprechende Gewebe wurden präpariert und für 1h in 4% Paraformaldehyd/PBS pH=7,4 auf Eis fixiert und dann mehrmals mit PBS gewaschen.

Für die Anfertigung von Paraffin-Präparaten wurden die fixierten Gewebe in einer Zitadelle (Shandon Citadel 2000) entwässert und in Paraffin überführt (Programmschritte: 70% EtOH >4h, 80% EtOH 1h, 90% EtOH 1h, 3x100% EtOH je 1h, 2xXylol je 1.5h, 2xParaffin je 1h). Danach wurden die Gewebe in Edelstahlröhrchen mit Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Für Gefrierschnitte wurden die Gewebe in einem speziellen Einbettmedium (Shandon; Cryomatrix frozen Specimen Embedding Medium) mit Isopentan, das durch flüssigen Stickstoff abgekühlt war, eingefroren. Die Blöcke wurden bei -80°C gelagert.

5.2.3.2 Anfertigung histologischer Schnitte

Paraffin-Gewebeschnitte wurden mit einem Mikrotom (Gerätetyp 1130, Leica, Wetzlar) angefertigt. Die 5-10 μm dicken Schnitte wurden auf Super Frost[®] Objektträgern (Menzel-Gläser; Braunschweig) gezogen und bei 37°C ü.N. getrocknet.

Gefrierschnitte mit einer Dicke von ca. $5\mu\text{m}$ wurden mit einem Jung CM3000 Cryotom (Leica, Wetzlar) angefertigt und auf Super Frost[®] Objektträgern (Menzel-Gläser; Braunschweig) aufgezogen. Die Schnitte wurden bei -20°C gelagert.

5.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E)

Die Schnitte wurden in einer Shandon Linistain GLX Färbemaschine nach folgendem Schema gefärbt: 6x Xylol, absteigende Alkoholreihe 2x 100%, 1x 95%, 1x 90%, 1x 80%, 1x 70% EtOH, 2x H₂O, 1x Hämalaun, 2x H₂O, 3x Eosin, 2x H₂O, aufsteigende Alkoholreihe 1x 70%, 1x 80%, 1x 90%, 1x 95%, 2x 100% EtOH, 2x Xylol, jeder Schritt entsprach ca. 5 min. Die Färbelösungen setzten sich aus 3:1 mit H₂O verdünnten Hämalaun (Merck), bzw. mit 1000ml H₂O verdünnten 1g Eosin (Merck), welches nach Filterung mit ca. 30µl Eisessig angesäuert wurde, zusammen. Die Schnitte wurden in Roti-Histokit (Roth) eingebettet.

5.2.3.4 Immun-Fluoreszenz-Mikroskopie

Gefrier- und Paraffinschnitte wurden zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt. Entparaffinisierte Paraffinschnitte wurden gesondert für 20 min bei 37°C einer Trypsin-Behandlung unterzogen (0,1% Trypsin/PBS), um den primären AK den Zugang zu den Antigenen zu erleichtern. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für Gefrier- und Paraffinschnitte in 1% BSA in PBS bei 4°C ü.N. oder bei RT für 1h. Nach kurzem Eintauchen in PBT (PBS/0,4% Tween) wurde der entsprechende 1. AK (siehe 5.1.1.6) in 1% BSA/PBS auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug mind. 1h in einer lichtdichten, feuchten Kammer. Nach dreimaligen waschen für je 5 min. in PBT erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper für 1h bei Raumtemperatur (siehe 5.1.1.6). Die Schnitte wurden dann zweimal für 5 min und einmal für 10min in PBS gewaschen und in Evanol (Hoechst, Frankfurt) eingebettet. Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen). Die verwendeten Filtersätze waren: Für CY3 (rot) Anregungsfilter (AF): 546nm; Farbteiler (FT): 580; Sperrfilter (SF): 590; und für CY2 (grün) AF: 490nm; FT: 510nm; SF: 515-565nm. Digitale Bilder wurden mit einer 12-bit-CCD-Kamera (SensiCam; PCO, Kehlheim) unter Verwendung des Computerprogramms SensiControl 4.03 (PCO, Kehlheim) angefertigt.

5.2.3.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Analyse der Nid2 -/- Maus führte Dr. Nicolai Miosge, am Zentrum für Anatomie, Abteilung Histologie, Universität Göttingen nach einem Standardprotokoll durch (Miosge *et al.*, 2000 b).

6 Literaturverzeichnis

- Ackley B.D., Crew J.R., Elamaa H., Pihlajaniemi, Kuo C.J., and Kramer J.M., 2001. The NC1/Endostatin Domain of *Caenorhabditis elegans* Type XVIII Collagen Affects Cell Migration and Axon Guidance. *J. Cell Biol.* 152:1219-1232
- Adam S., Göhring W., Wiedemann H., Chu M.L., Timpl R., and Kostka G., 1997. Binding of fibulin-1 to nidogen depends on its C-terminal globular domain an a specific array of calcium-binding epidermal growth factor-like (EG) modules. *J. Mol. Biol.* 272:226-236
- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., *et al.*, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* *Science* 287(5461):2185-95
- Aeschlimann D., and Paulsson M., 1991. Cross-linking of Laminin-Nidogen Complexes by Tissue Transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 266 (23):15308-15317
- Aeschlimann D., Paulsson M., and Mann K., 1992. Identification of Gln⁷²⁶ in Transglutaminase-catalyzed Cross-linking of Laminin-Nidogen Complexes. *J. Biol. Chem.* 267 (16):11316-11321
- Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; and Watson J.D., 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing; c1994.
- Andac Z., Sasaki T., Mann K., Brancaccio A., Deutzmann R., and Timpl R., 1999. Analysis of heparin, α -dystroglycan and sulfate binding to the G domain of the laminin α 1 chain by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 287, 253-264.
- Arcangelis A. De, and Georges-Labouesse E., 2000. Integrin and ECM functions, roles in vertebrate development. *TIGS* 16(9):389-395
- 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
- Aszódi A., Pfeifer A., Wendel M., Hiripi L., Fässler R., 1998. Mouse models for extracellular matrix diseases. *J. Mol. Med.* 76:238-252
- Aumailley M., Wiedemann H., Mann K, and Timpl R., 1989. Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* 184:241-248
- 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., Gimond C., and Rousselle P., 1996. Integrin-mediated cellular interactions with laminins. In: *The laminins* (Eds. Ekblom, P. & Timpl, R.), Harwood Academics Publisher, Reading, UK, S.127-158.
- Aumailley M., and Gayraud B. 1998. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 76:253-265.
- Aviezer D., Hecht D., Safran M., Eisinger M., David G., and Yayoon A., 1994. Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79:1005-1013

- Balling R., 2001. ENU MUTAGENESIS: Analysing Gene Function in Mice.
Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:463-92
- Barker D.F., Hostikka S.L., Zhou J., Chow L.T., Oliphant A.R., Gerken S.C., Gregory M.C., Skolnick M.H., Atkin C.L., and Tryggvason K., 1991. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome.
Science 248(4960):1224-7.
- Battaglia C., Mayer U., Aumailley M., and Timpl R., 1993. Basement membrane heparan sulphate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core.
Eur. J. Biochem. 208:359-366
- Baumgartner R., Czisch M., Mayer U., Pöschl 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
- Bork P., Downing A.K., Kieffer B., and Campbell I.D., 1996. Structure and distribution of modules in extracellular proteins.
Q. Rev. Biophys. 29(2):119-67
- Brady K.P., Rowe L.B., Her H., Stevens T.J., Eppig J., Sussman D.J., Sikela J., and Beier D.R., 1997. Genetic Mapping of 262 Loci Derived from Expressed Sequences in a Murine Interspecific Cross Using Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis.
Genome Research 7(11):1085-1092
- Brekken R.A., and Sage E.H., 2000. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication.
Matrix Biology 19:816-827.
- Brown J.C., Wiedemann H., and Timpl R., 1994. Protein binding and cell adhesion properties of two laminin isoforms ($A_mB1_cB2_e$, $A_mB1_sB2_e$) from human placenta.
J. Cell Sci. 107(Pt1):329-38.
- Brown J.C., and Timpl R., 1995. The collagen superfamily.
Int. Arch. Allergy Immunol. 107(4):484-90
- Brown J.C., Sasaki T., Göhring 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
- Bruckner-Tuderman L., 1993. Epidermolysis Bullosa.
In: Royce P.M. and Steinmann B. (Eds.), *Connective Tissue and Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects.* John Wiley & Sons Inc., Publication, New York, USA pp.507-531
- Bruckner-Tuderman L., Bruckner P., 1998. Genetic diseases of the extracellular matrix: more than just connective tissue disorders.
J. Mol. Med. 76:226-237
- Bucher P., 1990. Weight matrix description of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences.
J. Mol. Biol. 20:563-578
- Burgeson R. and Christano A.M., 1997. The dermal-epidermal junction.
Curr. Opin. Cell Biol. 7:491-498
- Bustin S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
J. Mol. Endocrinol. 25(2):169-93

- Butte A.J., Dzau V.J., and Glueck S.B., 2001. Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues".
Physiol. Genomics 7:95-96
- Capecchi M.R., 2001. Generating mice with targeted mutations.
Nat. Med. 7(10):1086-1090
- Carlin B., Jaffe R., Bender B., and Chung A.E., 1981. Entactin, a novel basal lamina-associated glycoprotein.
J. Biol. Chem. 256:5209-5214
- Chelly J., Concordet J.P., Kaplan J.C., and Kahn A., 1989. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86(8):2617-21
- Cohen M.W., Jacobson C., Yurchenco P.D., Morris G.E., and Carbonetto S., 1997. Laminin-induced Clustering of Dystroglycan on Embryonic Muscle Cells: Comparison with Agrin-induced Clustering.
J. Cell. Biol 136(5):1047-1058
- Colognato H., Winkelmann D.A., and Yurchenco P.D., 1999. Laminin Polymerization Induces a Receptor-Cytoskeleton Network.
J. Cell Biol. 145(3):619-631
- Colognato H., Yurchenco P.D., 2000. Form and Function: The Laminin Family of Heterotrimers.
Dev. Dyn. 218:213-234
- Copeland N.G., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Eppig J.T., Maltais L.J., *et al*, 1993. A Genetic Linkage Map of the Mouse: Current Applications and Future Prospects.
Science 262:57-66
- 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., Aszódi A., Morgelin M., Bloch W., Hunziker E., Addicks K., Timpl R., and Fässler R., 1999. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes.
J. Cell Biol. 147:1109-1122
- Couser W.G., 1999. Glomerulonephritis.
THE LANCET 353:1509-15
- Dedhar S., Jewell K., Jojiani M., and Gray V., 1992. The Receptor for the Basement Membrane Glycoprotein Entactin Is the Integrin $\alpha 3/\beta 1$.
J. Biol. Chem. 267 (26):18908-18914
- Denny P., Justice M.J., 2000. Mouse as the measure of man?
TIG 16(7):283-287
- Doolittle R.F., 1995. The Multiplicity of Domains in Proteins.
Annu. Rev. Biochem. 64:287-314
- Durkin M.E., Chakravarti S., Bartos B.B., Liu S.H., Friedman R.L., and Chung A.E., 1988. Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor.
J. Cell Biol. 107 (6 Pt 2): 2749-2756
- Durkin M.E., Wewer U.M., and Chung A., 1995. Exon Organization of the Mouse Entactin Gene Corresponds to the Domains of the Polypeptide and Has Regional Homology to the Low-Density Lipoprotein Receptor Gene.
Genomics 26:219-228

- Dziadek M., and Timpl R., 1985. Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells.
Dev. Bio. 111:372-382
- Dziadek M., Paulsson M., Aumailley M., and Timpl R., 1986. Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from a basement membrane tumor.
Eur. J. Biochem. 172:455-464
- Dziadek M., 1995. Role of laminin-nidogen complexes in basement membrane formation during embryonic development.
Experientia 51:901-91
- Eble J.A., Golbik R., Mann K., and Kühn K., 1993. The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]2 alpha 2(IV).
EMBO J. **12**, 4795-4802.
- Eklom P., Eklom 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
- Elliot R.W., Manly E.F., and Hohman C., 1999. A Radiation Hybrid Map of Mouse Chromosome 13.
Genomics 57:365-370
- Engel J., Odermatt E., Engel A., Madri J.A., Furthmayr H., Rohde H., and Timpl R., 1981. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix.
J. Mol. Biol. 150:97-120
- Engel J., 1991. Common structural motifs in proteins of the extracellular matrix.
Curr. Opin. Cell Biol. 3:79-785
- Engel J., 1992. Laminins and other strange proteins.
Biochemistry 31:10643-10651
- Erickson E.C., and Couchman J.R., 2000. Still More Complexity in Mammalian Basement Membranes.
J. Histochem. Cytochem 48:1291-1306
- Ervasti J.M., Ohlendieck K., Kahl S.D., Gaver M.G., and Campell K.P., 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle.
Nature 345:315-319
- Ervasti J.M., and Campell K.P., 1991. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin.
J. Cell Biol. 122: 809-823
- Fässler R., Georges-Labouesse E., and Hirsch E., 1996. Genetic analyses of integrin function in mice.
Curr. Opin. Cell Biol. 8:641-646
- Festing M.F., Simpson E.M., Davisson M.T., and Mobraaten L.E., 1999. Revised nomenclature for strain 129 mice.
Mamm. Genome. 10(8):836
- Flaherty L., and Herron B., 1998. The new kid on the block-a whole mouse radiation hybrid panel.
Mamm. Genome 9:417-418
- Flinter F., 1997. Alport's syndrome.
J. Med. Genet. 10:326-330
- 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 to laminin and collagen type IV.
EMBO J. 10:3137-3146.

- Fujiwara S., Shinkai H., Mann K., and Timpl R., 1993. Structure and localization of O- and N-linked oligosaccharide chains on basement membrane protein nidogen. *Matrix* 13:215-222
- Gee S.H., Blacher R.W., Douville P.J., Provost P.R., Yurchenco P.D., and Carbonetto S., 1993. Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J. Biol. Chem.* 268:14972-14980
- George E.L., and Hynes R.O., 1994. Gene Targeting and Generation of Mutant Mice for Studies of Cell-Extracellular Matrix Interactions. *Meth. Enzymol.* 245:386-421
- Gerl M., Mann K., Aumailley M., and Timpl R., 1991. Localization of a major nidogen-binding site to domain III of laminin B2 chain. *Eur. J. Biochem.* 202:167-174
- Giancotti F.G., and Ruoslahti E., 1999. Integrin Signaling. *Science* 185:1028-1032
- Giltay R., Timpl R., and Kostka G., 1999. Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biol.* 18:469-480
- Gustafsson E., and Fässler R., 2000. Insight into Extracellular Matrix Functions from Mutant Mouse Models. *Exp. Cell Res.* 261:52-68
- Halter W., Dong S., Schurer B., Osanger A., Schneider W., Ruegg M., and Cole G.J., 2000. Composition, synthesis, and assembly of the embryonic chick retinal basal lamina. *Dev. Biol.* 220(2):111-28
- Handford P.A., Downing A.K., Reinhardt D.P., and Sakai L.Y., 2000. Fibrillin: from domain structure to supramolecular assembly. *Matrix Biol.* 19(6):457-70
- Handler M., Yurchenco P.D. & Iozzo R.V. (1997): Developmental expression of perlecan during murin development. *Dev. Dyn.* 210:130-145.
- Hanley T., and Merlie J.P., 1991. Transgene Detection in Unpurified mouse Tail DNA by Polymerase Chain Reaction. *Biotechniques* 10(1):56
- Hardouin S.N., and Nagy A., 2000. Mouse models for human disease. *Clin. Genet.* 57:237-244
- Henry M.D., and Campell K.P., 1998. A Role for Dystroglycan in Basement Membrane Assembly. *Cell* 95:859-870
- Hogan B., Beddington R., Constantini F., and Lacy E., 1994. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Hollenberg S.M., Sternglanz R., Cheng P.F., and Weintraub H., 1995. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.* 14(7):3813-3822
- Hopf M., Göhring 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., Göhring W., Ries A., Timpl R., and Hohenester E., 2001. Crystal structure and mutational analysis of a perlecan-binding fragment of nidogen-1.
Nat. Struc. Biol. 8(7):634-640
- Howe K.M., and Watson R.J., 1991. Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myc protein.
Nucleic Acids Res. 25(14):3913-9
- Hutter H., Vogel B.E., Plenefisch J.D., Norris C.R., Proenca R.B., Spieth J., Guo C., Mastwal S., Zhu X., Scheel J., and Hedgecock E.M., 2000. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes.
Science 287(5455):989-94
- Hynes R.O. and Zhao Q, 2000. The evolution of cell adhesion.
J. Cell Biol. 2000 150(2):89-96
- Iozzo R.V., 1998. MATRIX PROTEOGLYCANS: From Molecular Design to Cellular Function.
Annu. Rev. Biochem. 67:609-52
- Jenkins N.A., Justice M.J., Gilbert D.J., Chu M.L., and Copeland N.G., 1991. Nidogen/Entactin (Nid) maps to the proximal end of mouse chromosome 13 linked to beige (bg) and identifies a new region of homology between mouse and human chromosomes.
Genomics 9:401-403
- Jeon H., Meng W., Takagi J., Eck M.J., Springer T.A., and Blacklow S.C., 2001. Implications for familial hypercholesterolemia of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair.
Nat. Struc. Biol. 8(6):499-504
- Joki T., Machluf M., Atala A., Zhu J., Seyfried N.T., Dunn I.F., Abe T., Carroll R.S., and Black P.McL., 2001. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells from tumor therapy.
Nat. Biotech. 19:35-39
- Jones F.S., and Jones P.L., 2000. The Tenascin Family of ECM Glycoproteins: Structure, Function, and Regulation During Embryonic Development and Tissue Remodeling.
Dev. Dyn. 218:235-259
- Justice M.J., 2000. Capitalizing On Large-Scale Mouse Mutagenesis Screens.
Nat. Rev. Genet. 1:109-114
- Kadoya Y., Salmivirta K., Talts J.F., Kadoya K., Mayer U., Timpl R., and Ekblom P., 1997. Importance of nidogen binding to laminin $\gamma 1$ for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland.
Development 124(3):683-91.
- Kang S.H. And Kramer J.M., 2000. Nidogen Is Nonessential and Not Required for Normal Type IV Collagen Localization in *Caenorhabditis elegans*.
Molecular Biology of the Cell 11:3911-3923
- Kilby N.J., Snaith, and Murray J.A.H., 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering.
TIG 9(12):413-421
- Kim S. and Wadsworth W.G., 2000. Positioning of Longitudinal Nerves in *C.elegans* by Nidogen.
Science 288:150-154
- 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.
- Kluge M., Mann K., Dziadek M., and Timpl R., 1990. Characterization of a novel calcium-binding 90-kDa glycoprotein (BM-90) shared by basement membranes and serum.
Eur. J. Biochem. 193(3):651-9

- Koch M., Olson P.F., Albus A., Jin W., Hunter D.D., Brunken W.J., Burgeson R.E. and Champlaud M.F., 1999. Characterization and expression of the laminin $\gamma 3$ chain: A novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J. Cell Biol.* 145:605-618.
- Kohfeldt E., Sasaki T., Gohring W., Timpl R., 1998. Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J. Mol. Biol.* 282(1):99-109
- Kowal R.C., Jolsin J.M., Olson E.N., and Schultz R.A., 1999. Assignment of fibulin-5 (FBLN5) to human chromosome 14q31 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 87(1-2):2-3
- Kozak M., 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15:8125-8147
- Kühn K., Wiedemann H., Timpl R., Risteli J., Dieringer A., Voss T., and Glanville R.W., 1981. Molecular structure of basement membrane collagens. Identification of 7S collagen as a crosslinking domain of type IV collagen. *FEBS Lett.* 125:123-128
- Kühn K., 1994. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol.* 14:439-445
- Kumagai C., Fessler L., Kramerov a., and Baumgartner S., 1999. Nidogen: sequence expression and isolation of an ECM protein during *Drosophila* development. *A Dros. Res. Conf.* 40:64
- Kuo C.J., LaMontagne K.R., Garcia-Cardeña G., Ackley B.D., Kalman D., Park S., Christofferson R., Kamihara J., Ding Y.H., Lo K.M., Gillies S., Folkman J., Mulligan R.C., Javaherian K., 2001. Oligomerization-dependent Regulation of Motility and Morphogenesis by Collagen XVIII NC1/Endostatin Domain. *J. Cell Biol.* 152:1233-1246
- Lane T.F., and Sage E.H., 1994. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* 8:163-173
- Lee M., and Cheung H.T., 1996. Isolation and characterization of *Caenorhabditis elegans* matrix. *Biochem. Biophys. res. Commun.* 221:503-509
- Lemmink H.H., Mochizuki T., van den Heuvel L.P., Schroder C.H., Barrientos A., Monnens L.A., van Oost B.A., Brunner H.G., Reeders S.T., and Smeets H.J., 1994. Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 3(8):1269-73.
- Levassasseur F., Mayer U., Guillouzo A., and Clement B., 1994. Influence of Nidogen Complexed or not With Laminin on Attachment, Spreading, and Albumin and Laminin B2 mRNA Levels of Rat Hepatocytes. *J. Cell. Phys.* 161:257-266
- Liddington R.C., 2001. Mapping out the basement membrane. *Nat. Struc. Biol.* 8(7):573-4
- Lindblom A., and Paulsson M., 1996. Basement membranes. In: Comper W.D. (Ed.), *Extracellular Matrix. Volume 1. Tissue Function.* Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam, Netherlands pp. 132-174
- Mann K., Deutzmann R., Aumailley M., Timpl R., Raimondi L., Yamada Y., Pan T., Conway D. and Chu M.L., 1989. Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J.* 8:65-72

- Mayer U., Aumailley M., Mann K., Timpl R., and Engel J., 1991. Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin/SPARC) to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* 198:141-150
- Mayer U., Mann K., Timpl R., and Murphy G., 1993a. Sites of nidogen cleavage by proteases involved in tissue homeostasis and remodeling. *Eur. J. Biochem.* 217:877-884
- Mayer U., Nischt R., Pöschl E., Mann K., Fukuda K., Gerl M., Yamada Y., and Rupert T., 1993b. A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J.* 12 (5):1879-1885
- Mayer U., and Timpl R., 1994. Nidogen: A Versatile Binding Protein of Basement Membranes. In Birk DE., and Mecham RP. (Eds.). *Extracellular Matrix Assembly and Structure.* Academic Press, San Diego :389-416
- Mayer U., Zimmermann K., Mann K., Reinhardt D, Timpl R., and Nischt R., 1995. Binding properties and protease stability of recombinant human nidogen. *J. Biochem.* 227:681-686
- Mayer U., Kohfeldt E., and Timpl R., 1998. Structural and genetic analysis of laminin-nidogen interaction. *Ann. N Y Acad. Sci.* 857:130-42
- McCarthy L.C., Terrett J., Davis M.E., Knights C.J., Smith A.L., Critcher R., Schmitt K., Hudson J., Spurr N.K., and Goodfellow P.N., 1997. A First-Generation Whole Genome-Radiation Hybrid Map Spanning the Mouse Genome. *Genome Research* 7: 1153-1161.
- Michael K., Liu Z., and Zandi E., 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:240-246
- Miner J.H., and Sanes JR., 1996. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): Implications for Alport syndrome. *J. Cell Biol.* 135:1403-1413
- Miner J.H., Cunningham J., and Sanes J.R., 1998. Roles for laminin in embryogenesis: encephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin $\alpha 5$ chain. *J. Cell Biol.* 143: 1713-1723
- 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
- Miosge N., Heinemann S., Leissing A., Klenczar C. and Herken R., 1999. Ultrastructural Triple Localization of Laminin-1, Nidogen-1, and Collagen Type IV Helps Elucidate Basement Membrane Structure In Vivo. *The Anatomical Record* 254:382-388
- Miosge N., Köther F., Heinemann S., Kohfeld E., Herken R. and Timpl R., 2000 a. Ultrastructural colocalization of nidogen-1 and nidogen-2 in murine kidney basement membranes. *Histochem. Cell Biol.* 113:115-124
- Miosge N., Quondamatteo F., Klenczar C., and Herken R., 2000 b. Nidogen-1: Expression and Ultrastructural Localization During the Onset of Mesoderm Formation in Early Mouse Embryo. *J. Histochem. Cytochem* 48:229-237
- Miosge N., Sasaki T., Timpl R., Murshed M., Smyth N. and Nischt R., in work. Evidence for nidogen-2 compensation of nidogen-1 deficiency in transgenic mice.
- Mitchell K.J., Pinson K.I., Kelly O.G., Brennan J., Zupicich J., Scherz P., Leighton P.A., Goodrich L.V., Lu X., Avery B.J., Tate P., Dill K., Pangilinan E., Wakenight P., Tessier-Lavigne M., Skarnes W.C., 2001.

- Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development.
Nat. Genet. 2001 28(3):241-9
- Mitchell P.J., and Tjian R., 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.
Science 245:371-378
- Miyagoe Y., Hanaoka K., Nonaka I., Hayasaka M., Nabeshima Y., Arahata K., Nabeshima Y., and Takeda S., 1997. Laminin alpha2 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
- Mochizuki T., Lemmink H.H., Mariyama M., Antignac C., Gubler M.C., Pirson Y., Verellen-Dumoulin C., Chan B., Schroder C.H., Smeets H.J, *et al.*, 1994. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome.
Nat Genet. 8(1):77-81.
- Mohan P.S., and Spiro R.G., 1986. Macromolecular organization of basement membranes. Characterization and comparison of glomerular basement membrane and lens capsule components by immunochemical and lectin affinity procedures.
J. Biol. Chem. 261:4328-4336
- Molnar A., and Georgopoulos K., 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins.
Mol. Cell. Biol. 14(12):8292-303
- 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(18):7007-7012
- Nagase H. and Woessner J.F Jr., 1999. Matrix Metalloproteinases.
J. Biol. Chem. 274(31): 21491-21494
- Nakagoshi H., Nagase T., Kanei-Ishii C., Ueno Y., and Ishii S., 1990. Binding of the c-myc proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription.
J. Bio. Chem. 265(6):3479-83
- Nagayoshi T., Sanborn D., Hickok N.J., Olsen D.R., Fazio M.J., Chu M.L., Knowlton R., Mann K., Deutzmann R., Timpl R., and Uitto J., 1989. Human nidogen: complete amino acid sequence and structural domains deduced from cDNAs, and evidence for polymorphism of the gene.
DNA 8 (8), 581-594
- Nakae H., Sugano M., Ishimori Y., Endo T., and Obinata T., 1993. Ascidian entacin/nidogen. Implication of evolution by shuffling two kinds of cystein-rich motifs.
Eur. J. Biochem. 213:11-19
- Nischt R., Pottgiesser J., Krieg T., Mayer U., Aumailley M., and Timpl R., 1991. Recombinant expression and properties of the human calcium-binding extracellular matrix protein BM-40.
Eur. J. Biochem. 200(2):529-36
- Noakes P.G., Miner J.H., Gautam M., Cunningham J.M., Sanes J.R., and Merlie J.P, 1995a. The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin β 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin β 1.
Nat. Genet. 10:400-406
- Noakes P.G., Gautam M., Mudd J., Sanes J.R., and Merlie J.P, 1995b. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin β 2.
Nature 274:258-262
- Nolan P.M., Peters J., Strivens M., *et al.*, 2000. A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis program for gene function studies in the mouse.
Nat. Genet. 25:440-443

- O'Grady P., Thai T.C., and Saito H, 1998. The Laminin-Nidogen Complex is a Ligand for a Specific Splice Isoform of the Transmembrane Protein Tyrosine Phosphatase LAR.
J. Cell Biol. 141 (7):1675-1684
- O'Reilly M.S., Boehm T, Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., and Folkman J., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.
Cell 88:277-285
- Olsen B.R., 1999. Life without Perlecan has its Problems.
J. Cell Biol. 147:909-911
- Olson D.R., Nagayoshi T., Fazio M., Mattei M.G., Passage E., Weil D., Timpl R., Chu M.L., and Uiotto J., 1989. Human Nidogen: cDNA cloning, cellular expression and mapping of the gene to chromosome 1q43.
Am. J. Hum. Genet 44:876-885
- Ohno I., Hashimoto J., Takaoka K., Ochi T., Okubo K., and Matsubara K. The cloning and characterization of a cDNA for the novel bone matrix. Unpublished. 1996
- Ohno I., Okubo K., and Matsubara K. Human osteonidogen gene: intron-exon junctions and chromosomal localization. Unpublished. 1998
- Orkin R.W., Gehron P., McGoodwin E.B., Martin G.R., Valentine T., and Swarm R., 1977. A murine tumor producing a matrix of basement membrane.
J. Exp. Med. **145**:204-220.
- Pan T.C., Sasaki T., Zhang R.Z., Fässler R., Timpl R., and Chu M.L., 1993. Structure and Expression of Fibulin-2, a Novel Extracellular Matrix Protein with Multiple EGF-like Repeats and Consensus Motifs for Calcium Binding.
J. Cell Biol. 123(5):1269-1277
- Patty L., 1991. Exons – original building blocks of proteins.
Bioessays 13:187-192
- Paulsson M., Dziadek M., Suchanek D., Huttner W.B., and Timpl R., 1985. Nature of sulfated macromolecules in Reicherts membrane. Evidence for tyrosine-O-sulfate in basement membrane proteins.
Biochem. J. 231:571-579
- Paulsson M., Deutzmann R., Dziadek M., Nowack H., Timpl R., Weber S., and Engel J., 1986. Purification and properties of intact and degraded nidogen obtained from a tumor basement membrane.
Eur. J. Biochem. 166:11-19
- Paulsson M., Yurchenco P.D., Ruben G.C., Engel J., and Timpl R., 1987: Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane.
J. Mol. Biol. 197, 297-313.
- Paulsson M., 1988. The role of Ca²⁺ binding in the self-aggregation of laminin-nidogen complexes.
Eur. J. Chem. 263:5425-5430
- Pomp D., 1997. Genetic dissection of obesity in polygenic animal models.
Behav. Genet. 27(4):285-306
- Pöschl 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 γ 1 chain.
EMBO 13 (16):3741-3747
- Pöschl 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 γ 1 chain.
EMBO 15 (19):5154-5159
- Potter M. (ed), 1985. The BALB/c mouse. Current Topics in Microbiol. Immunol. 122.
Springer-Verlag, Berlin, New York, Tokyo.

- Pujuguet P., Simian M., Liaw J., Timpl R., Werb Z. and Bissel M.J., 2000. Nidogen-1 regulates laminin-1-dependent mammary-specific gene expression.
J. Cell Science 113:849-858
- Pulkkinen L., Uitto J., 1999. Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa.
Matrix Biology 18:29-42
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., and Werner T., 1995. MatInd and MatInspector – New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.
Nucleic Acids Res. 23:4878-4884
- Read T.-A., Sorensen D.R., Mahesparan R., Enger P.Ø., Timpl R., Olsen B.R., Hjelstuen M.H.B., Haraldseth O., and Bjerkvig R., 2001. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells.
Nat. Biotech. 19:29-34
- 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
- Ricard-Blum S., Dublet B., and Rest M. van der, 2000. Unconventional Collagens, Types VI, VII, VIII, IX, X, XIV, XVI and XIX.
Oxford, University Press, Great Britain (ISBN: 0198505450)
- Rikke B. A., Zhao Y., Daggett L. P., Reyes R., and Hardies S. C., 1995. *Mus spretus* LINE-1 sequences detected in the *Mus musculus* inbred strain C57BL/6J using LINE-1 DNA probes.
Genetics 139, 901-906.
- Roberts D.D., and Ginsburg V., 1988. Sulfated glycolipids and cell adhesion.
Arch. Biochem. Biophys. 267: 405-415.
- Ruoslathi E., 1996. RGD and other recognition sequences for integrins.
Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 12:697-715
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., and Erlich H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239:487-491
- Sambrook J and Russel D.W., 2001. Molecular cloning, a laboratory manual, third edition. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-7
- Sasaki M., Kato S., Kohno K., Martin G.R., and Yamada Y., 1987. Sequence of the cDNA encoding the laminin B1 chain reveals a multidomain protein containing cystein-rich repeats.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:935-939
- Sasaki M., Kleinman H.K., Huber H., Deutzmann R., and Yamada Y., 1988. Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains.
J. Biol. Chem 263:16536-16544
- Sasaki T., Göhring W., Pan T.C., Chu M.L., and Timpl R., 1995. Binding of mouse fibulin-2 to extracellular matrix ligands.
J. Mol. Biol. 254:892-899
- Sasaki T., Fukai N., Mann K., Göhring W., Olsen B.R., and Timpl R., 1998. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin.
EMBO 17:4249-4256

- Sasaki T., Göhring W., Miosge N., Abrams W.R.; Rosenbloom J., Timpl R., 1999. Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins.
FEBS Letters 460:280-284
- Sasaki T., Larsson H., Tisi D., Claesson-Welsh L., Hohenester E., and Timpl R., 2000. Endostatins Derived from collagens XV and XVIII Differ in Structural and Binding Properties, Tissue distribution and Anti-angiogenic Activity.
J. Mol. Biol. 301:1179-1190
- Schaapveld R.Q.J., Schepens J.T.G., Robinson G.W., Attema J., Oerlemans F.T.J.J., Fransen J.A.M., Streuli M., Wieringa B., Henninghausen L., and Hendriks W.J.A.J., 1997. Impaired Mammary Gland Development and Function in Mice Lacking LAR Receptor-like Tyrosine Phosphatase Activity.
Dev.Biol. 188:134-146
- Schmoeckel C., Stolz W., Sakai L.J., Burgeson R.E., Timpl R., and Krieg T., 1989. Structure of basement membranes in malignant melanoma and nevocytic nevi.
J. Invest. Dermatol. 92:663-668
- Schultz J., Copley R.R., Doerks T., Ponting C.P., and Bork P., 2000. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains.
Nucleic Acids Res. 28(1):231-234
- Schwarzbauer J.E., 1999. Basement membrane: Putting up the barriers.
Curr. Biol. 9(7):242-244
- Schwarzbauer J.E., and Sechler J.L., 1999. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly.
Curr. Opin. Cell Biol. 11:622-627
- Sekido R., Murai F., Funahashi J., Kamachi Y., Fujisawa-Sehara A., Nabeshima Y., and Kondoh H., 1994. The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediates gene activation.
Mol. Cell. Biol. 14(9):5692-700
- Sharp P.A., and Burge C.B., 1997. Classification of Introns: U2-Type or U12-Type.
Cell 91:875-879
- Shim C., Kwon H.B., Kim K., 1996. Differential expression of laminin chain-specific mRNA transcripts during mouse preimplantation embryo development.
Mol. Reprod. Dev. 44:44-55
- Siebold B., Deutzmann R., and Kühn K., 1988. The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, non-collagenous aggregation and cross-linking domain of basement-membrane type IV collagen.
Eur. J. Biochem. 176:617-624
- Skarnes W.C., Auerbach A.B., and Joyer A.L., 1992. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells. the lacZ reporter is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice.
Genes Dev. 6:903-918
- Skarnes W.C., Moss J.E., Hurtley S.M., and Beddington R.S., 1995. Capturing genes encoding membrane and secretory proteins important for mouse development.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6592-6596
- Smyth N., Vatanserver H.S., Murray P., Meyer M., Frie C., Paulsson M., 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
- Springer T.A., 1998. An Extracellular β -Propeller Module Predicted in Lipoprotein and Scavenger Receptors, Tyrosine Kinases, Epidermal Growth Factor Precursor, and Extracellular Matrix Components.
J. Mol. Biol 283:837-862

- Stanford W.L., Cohn J.B., and Cordes S.P., 2001. Gene-Trap Mutagenesis: Past; Present and Beyond.
Nature Reviews Genetics 2:756-768
- 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 g1 Chain Harboring the Nidogen Binding Site.
J. Mol. Biol. 257:644-657
- Subauste J.S., and Koenig R.J., 1995. Comparison of DNA Binding Specificity and Function of v-ErbA and Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$.
J. Biol. Chem. 270(14):7957-7962
- Talts J.F., Andac Z., Göhring W., Brancaccio A., and Timpl R., 1999. Binding of the G domains of laminin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains and perlecan to heparin, sulfatides, α -dystroglycan and several extracellular matrix proteins.
EMBO J. 18, 863-870.
- Tatham A.S., and Shewry P.R., 2000. Elastomeric proteins: biological roles, structures and mechanisms.
Trends Biochem. Sci 25(11):567-71
- Thomas T., and Dziadek M., 1993. Genes coding for basement membrane glycoproteins laminin, nidogen, and collagen IV are differentially expressed in the nervous system and by epithelial, endothelial and mesenchymal cells of the mouse embryo.
Exp. Cell Res. 208:54-67
- Timpl R., Rohde H., Robey P.G., Rennard S.I., Foidart J.M., and Martin G.R., 1979. Laminin-a glycoprotein from basement membranes.
J. Biol. Chem 254:9933-9937
- Timpl R., Wiedemann H., van Delden V., Furthmayr H., and Kühn K., 1981. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes.
Eur. J. Biochem. 120:203-211
- Timpl R. and Risteli L., 1981. Radioimmunoassays in studies of connective tissue proteins.
In: Furthmayr H. (Ed.), *Immunochemistry of the Extracellular Matrix. Volume I, Methods.* CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA: pp.199-235
- Timpl R., Dziadek M., Fujiwara S., Nowack H., and Wick G., 1983. Nidogen a new self-aggregating basement basement membrane protein.
Eur. J. Biochem. 15:455-465
- Timpl R., 1993: Proteoglycans of basement membranes.
Experientia 49:417-428.
- Timpl R. and Brown J.C., 1996. Supramolecular assembly of basement membranes.
Bioessay 18:123-132.
- Timpl R., Tisi D., Talts J.F., Andac Z., Sasaki T., Hohenester E., 2000. Structure and function of laminin LG modules.
Matrix Biol. 19:309-317
- Townley D.J., Avery B.J., Rosen B., and Skarnes W.C., 1997. Rapid sequence analysis of gene trap integrations to generate a resource of insertional mutations in mice.
Genome Res. 7:293-298
- Turner A.N., and Rees A.J., 1996. Goodpasture's Disease and Alport's Syndromes.
Annu. Rev. Med. 47:377-86
- Utani A., Nomizu M., and Yamada Y., 1997. Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences.
J. Biol. Chem. 272:2814-2820

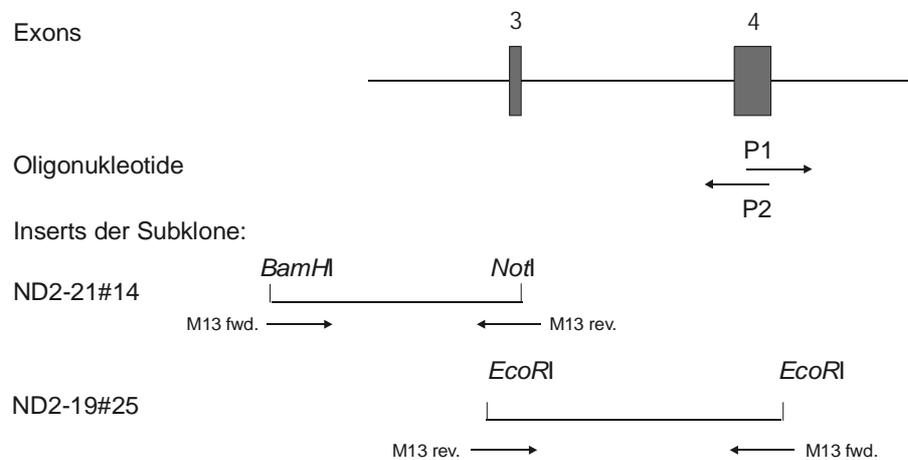
- Van Etten W.J., Stehen R.G., Nguyen H., Castle A.B., Slonim D.K., Ge B., Nusbaum C., Schuler G.D., Lander E.S., and Hudson T.J., 1999. Radiation hybrid map of the mouse genome.
Nat. Genet. 22:384-387
- Venter J.C., *et al.*, 2001. The sequence of the human genome.
Science 291(5507):1304-1351
Erratum in Science 292(5523):1838
- Walker P.D., Kaushal G.P., and Shah S., 1998. Mephrin A, the major matrix degrading enzyme in renal tubules, produces a novel nidogen fragment *in vitro* and *in vivo*.
Kid. Int. 53:1673-1680
- Wang T., Brown M.J., 1999. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection.
Anal Biochem. 1999 269(1):198-201
- Weber S., Dölz R., Timpl, Fessler J., and Engel J., 1988. Reductive cleavage and reformation of the interchain and intrachain disulfide bonds in the globular hexameric domain NC1 involved in network assembly of basement membrane collagen (type IV).
Eur. J. Biochem. 175:229-236
- Wiles M.V., Vauti F., Otte J., Fuchtbauer E.M., Ruiz P., Fuchtbauer A., Arnold H.H., Lehrach H., Metz T., von Melchner H., and Wurst W., 2000. Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells.
Nat. Genet. 24(1):13-4
- Wilson R., Ainscough R., Anderson K., Baynes C., Berks M., Bonfield J., Burton J., Connell M., Copsey T., Cooper J., *et al.*, 1994. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*
Nature 368(6466):32-8
- Wu T.C., Wan Y.J., Chung A.E., and Damajanov I., 1983. Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses.
Dev. Biol. 100:496-505
- Yan Q., and Sage E.H. Sage, 1999. SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions.
J. Histochem. Cytochem 47:1495-1505
- Yelian F.D., Edgeworth N.A., Dong L.J., Chung A.E., and Armant D.R., 1993. Recombinant Entactin Promotes Mouse Primary Trophoblast Cell Adhesion and Migration Through the Arg-Gly-Asp (RGD).
J. Cell Biol. 121 (4):923-929
- Yurchenco P.D., and O'Rear J.J., 1994. Basal lamina assembly.
Curr. Opin. Cell Biol. 6:674-681
- Zhang H., Hasty P., and Bradley A., 1994. Targeting Frequency for Deletion Vectors in Embryonic Stem Cells.
Mol. Cell. Biol. 14 (4):2404-2410
- Zimmermann K., Hoischen S., Hafner M., and Nischt R., 1995. Genomic Sequences and Structural Organization of the Human Nidogen Gene (*NID*).
Genomics 27:245-25
- Zweidler-Mckay P.A., Grimes H.L., Flubacher M.M., and Tschilis P.N., 1996. *Gli-1* Encodes a Nuclear Zinc
Mol. Cell. Biol. 16(8):4024-4034

7 Anhang

7.1 DNA-Sequenzierungsstrategie für das murine Nidogen-2 Gen

Im folgenden sind die Sequenzierungsstrategien zur DNA-Sequenzierung der Exons 3 bis Exon 21 und der flankierenden Introns, sowie der 3'-nicht-translatierten Region des murinen Nidogen-2-Gens dargestellt. Die Sequenzierungsstrategien der Exons 1 und 2 mit flankierenden Regionen, sowie der Promotorregion wurde schon in 2.1.4.1 dargestellt. Die verwendeten Oligonukleotide und die DNA-Matrizen sind tabellarisch aufgeführt (Abb. 7-1- Abb. 7-4)

A)

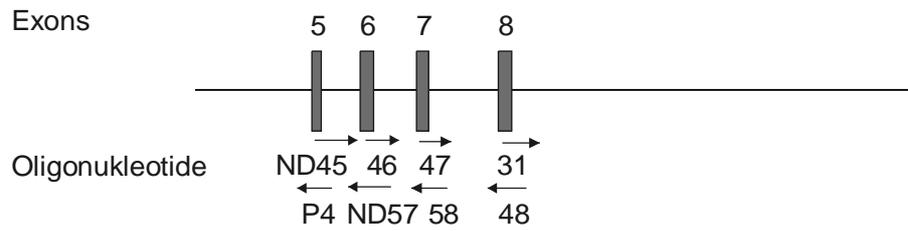


B)

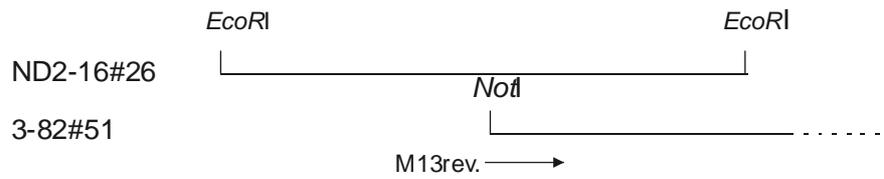
Matrize	Oligo.	Exon	genomische Orientierung
ND2-21#14	M13rev	3	-
ND2-19#25	M13rev	3	+
“	M13fwd	4	-
“	P1	4	+
“	P2	4	-

Abb. 7-1 Schematische Darstellung der Lage (A) und tabellarische Übersicht (B) der verwendeten Oligonukleotide und Matrizen zur Sequenzierung der Exons 3, 4 und der flankierenden Intronregionen.

A)



Inserts der Subklone:

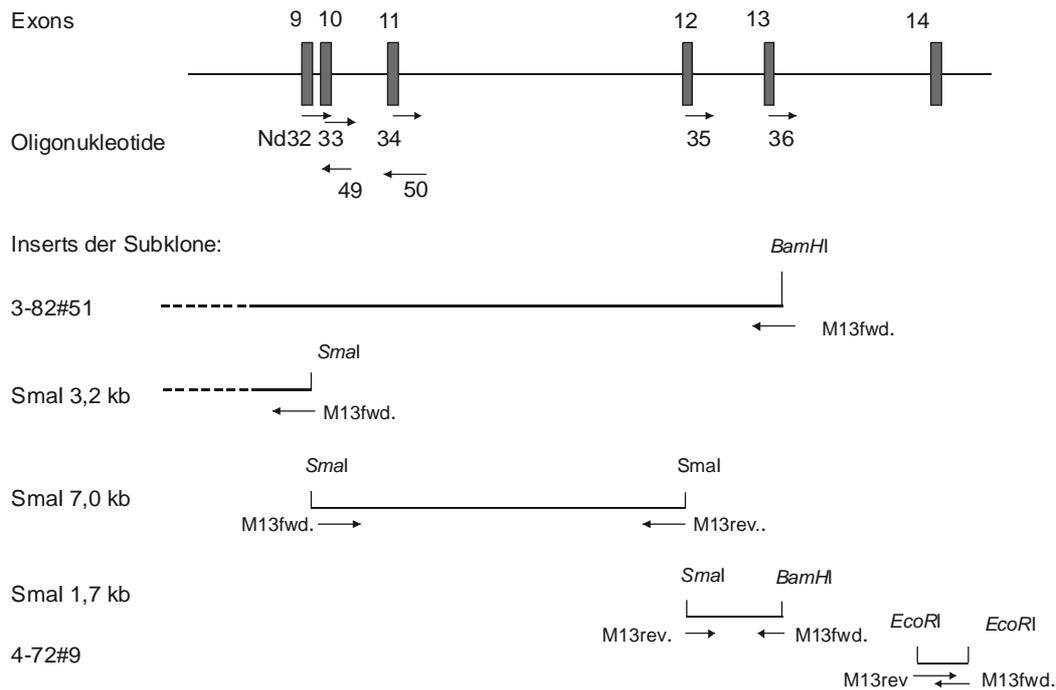


B)

Matrize	Oligo.	Exon	genomische Orientierung
ND2-16#26	ND45	5	+
“	P4	5	-
“	ND46	6	+
“	ND57	6	-
“	ND47	7	+
“	ND58	7	-
“	ND31	8	+
“	ND48	8	-
3-82#51	M13rev	8	+

Abb. 7-2 Schematische Darstellung der Lage (A) und tabellarische Übersicht (B) der verwendeten Oligonukleotide und Matrizen zur Sequenzierung der Exons 5, -6, -7, -8 und der flankierenden Intronregionen.

A)

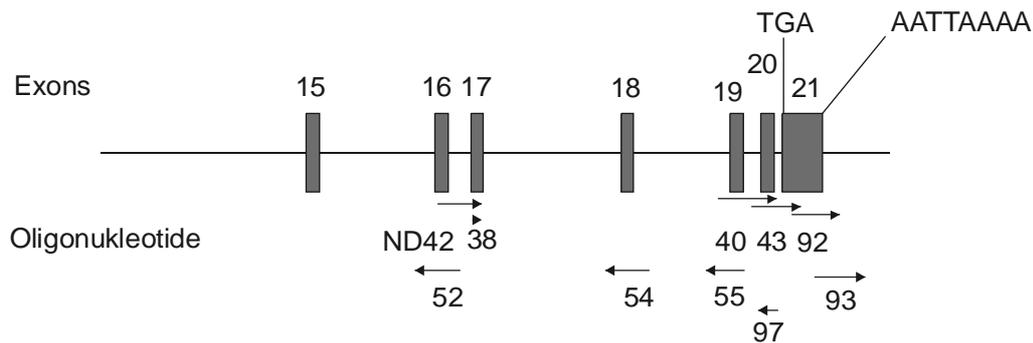


B)

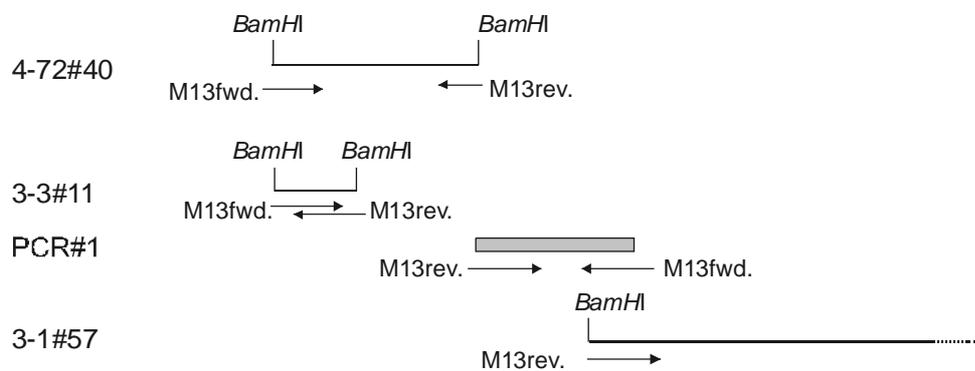
Matrize	Oligo.	Exon	Orientierung
3-82#51	ND32	9	+
<i>Smal</i> -3.2*	M13fwd	9	-
<i>Smal</i> -7.0*	M13fwd	9 +10	+
3-82#51	ND49	9 +10	-
3-82#51	ND34	11	+
3-82#51	ND50	11	-
<i>Smal</i> -7.0*	M13rev	12	-
<i>Smal</i> -1.7*	M13rev	12	+
3-82#51	ND35	12	+
“	ND36	13	+
“	M13fwd	13	-
4-72#9	M13fwd	14	-
“	M13rev	14	+

Abb. 7-3 Schematische Darstellung der Lage (A) und tabellarische Übersicht (B) der verwendeten Oligonukleotide und Matrizen zur Sequenzierung der Exons 9 – 14 und der flankierenden Intronregionen. Alle *Smal*-DNA-Fragmente sind Subfragmente des *NotI/BamHI*-Restriktionsfragmentes 3-82#51, das aus dem rekombinanten λ -Phagen 3-82 in einen Plasmidvektor subkloniert wurde. Die Oligonukleotide ND32, ND33, ND34, ND36, ND37, ND50, ND51 und ND95 wurden für PCR-Reaktionen eingesetzt um die Größen der Introns 11, 12, 13 und 14 zu bestimmen (siehe 2.1.5).

A)



Inserts der Subklone:



B)

Matrize	Oligo.	Exon	Orientierung
3-3#11	M13fwd	15	+
3-3#11	M13rev	15	-
4-72#40	ND42	16	+
“	ND52	16	-
“	ND38	Δ17	+
“	M13rev	Δ17	-
PCR#1	M13rev	17	+
“	M13fwd	18	-
3-1#57	M13rev	18	+
“	ND54	18	-
“	ND40	19	+
“	ND55	19	-
“	ND97	20	-
“	ND43	20 +21	+
“	ND92	21	+
“	ND93	21	+

Abb. 7-4 Schematische Darstellung der Lage (A) und tabellarische Übersicht (B) der verwendeten Oligonukleotide und Matrizen zur Sequenzierung der Exons 15 – 21 und der flankierenden Intronregionen. Das zur Sequenzierung des Exon 17 verwendete PCR-DNA-Fragment (PCR#1) ist in 2.1.4.2 beschrieben (siehe Abb. 2-4). Die Oligonukleotide ND-96, ND-39, ND55, ND40 und ND97 wurden für PCR-Experimente eingesetzt um die Größen der Introns 15, 18 und 19 zu bestimmen (siehe 2.1.5)

Die Exon-Sequenzen mit den flankierenden partialen, bzw. vollständigen Intron-Sequenzen des murinen Nidogen-2 Gens wurden der EMBL-Gendatenbank übermittelt (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK). Die Zusammensetzung der einzelnen Sequenzen und die entsprechenden Registriernummern siehe in Abb. 7-5.

Exons (NT.-Pos)	Introns	Registriernummer
Promotorregion (1-492) Exon 1 (493-720) Exon 2 (1396-1704)	Intron 1 Intron 2 part.	AJ428498
Exon 3 (308-540)	Intron 2 part. Intron 3 part.	AJ428499
Exon 4 (334-1061)	Intron 3 part. Intron 4 part.	AJ428500
Exon 5 (279-428) Exon 6 (1022-1265)	Intron 4 part. Intron 5 Intron 6 part.	AJ428501
Exon 7 (357-557)	Intron 6 part. Intron 7 part	AJ428502
Exon 8 (489-712)	Intron 7 part. Intron 8 part.	AJ428503
Exon 9 (551-694) Exon 10 (1158-1286)	Intron 8 part. Intron 9 Intron 10 part.	AJ428504
Exon 11 (426-569)	Intron 10 part. Intron 11 part.	AJ428505
Exon 12 (570-689)	Intron 11 part. Intron 12 part.	AJ428506
Exon 13 (792-958)	Intron 12 part. Intron 13 part.	AJ428507
Exon 14 (382-603)	Intron 13 part. Intron 14 part.	AJ428508
Exon 15 (459-628)	Intron 14 part. Intron 15 part.	AJ428509
Exon 16 (646-776) Exon 17 (1192-1363)	Intron 15 part. Intron 16 Intron 17 part.	AJ428510
Exon 18 (339-496)	Intron 17 part. Intron 18 part.	AJ428511
Exon 19 (397-520) Exon 20 (1371-1483) Exon 21 (1603-1613) + 3'-UTR	Intron 18 part Intron 19 Intron 20	AJ428512

Abb. 7-5 Tabellarische Übersicht der an die EMBL-Gendatenbank übermittelten murinen Nidogen-2 Gen-Sequenzen. Die Nukleotid-Position (NT.-Pos) der einzelnen Exons in den entsprechenden übermittelten DNA-Sequenzabschnitten sind angegeben.

7.2 cDNA-Sequenz des EST3.1-Klons

Zur Isolierung von Genomklonen für das Nidogen-2 Gen wurde ein DNA-Fragment des murinen EST-Klon 651352 als Hybridisierungsprobe eingesetzt. Dieser Klon ist der in EMBL-Genbank mit der Nummer AA215199 registriert und wurde ursprünglich aus einer murinen Krebszelllinie hergestellt (mu75a09.r1 mouse carcinoma Stratagene #937317). Er enthält eine Nidogen-2 cDNA-Teil-Sequenz, die den proteinkodierenden Nidogen-2 Gensequenzen (siehe 2.1.4.3, Abb. 2-5) von Nukleotid-Position (NT-Pos.) 1983 bis zur Anheftungsstelle des PolyA-Schwanzes entspricht (NT.Pos.:4778). Die 2,8 kb cDNA wurde über die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen *EcoRI* (am 5'-Ende) und *XhoI* (am 3'-Ende) in den Plasmidvektor pBlueskript (Stratagene) kloniert. Den EST-Klon stellte Dr. Eddie Kohfeldt (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteinchemie, Martinsried) freundlicherweise Herrn Dr. B.L. Bader (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteinchemie, Martinsried) zur Verfügung. Er wird in der Doktorarbeit mit EST3.1-Klon bezeichnet. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde die Nidogen-2-kodierenden cDNA-Sequenzen (NT-Pos:1983-4209) des EST3.1-Klons vollständig, sowie die anschließende 3'-nicht-translatierte Region teilweise sequenziert. Für die DNA-Sequenzreaktionen wurden die Oligonukleotide M13fwd., M13 rev., ND33, ND36, ND38 und ND43 (siehe 7.1) und die DNA des EST3.1.-Klons als Matrize verwendet.

Im folgenden ist die cDNA-Sequenz des EST3.1.-Klons dargestellt:

	Polylinker-Sequenzen	<i>EcoRI</i>		Nuc.Pos. 34 in EST3.1-Klon
1	...TGGATCCCCC	GGGCTGCAGG	AATTCGGCAC	GAGAGAAAAC TATCTGAGCA
51	TTAAGACCAA	CATTGAAGGC	CAGGTGCCCT	TCATCCCAGC GAATTTTACA
101	GCCCACATTA	CTCCGTACAA	AGAGTTTTAT	CATTACAGGG ACTCAGTCGT
151	GACGTCCTCC	AGTTCCCGAA	GTTTCTCTCT	CACTTCTGGT TCTATTAACC
201	AAACGTGGTC	CTACCACATT	GACCAGAACA	TCACTTACCA GCGTGCAGG
251	CACGCCCCCA	GACACCTGGC	CATCCCTGCC	ACCCAGCAGC TGACTGTCGA
301	CCGGGCCTTT	GCTTTGTACA	GTGAGGATGA	GGGCGTGCTG AGGTTTGCTG
351	TGACCAATCA	GATTGGCCCT	GTTGAAGTGG	ACTCAGCCCC TGTGGAGTG
401	AATCCTTGCT	ACGACGGAAG	CCACACCTGT	GACACAACAG CAAGGTGCCA
451	CCCGGAACA	GGTGTAGACT	ACACCTGCGA	GTGCACGCCCT GGGTTCCAAG
501	GTGACGGACG	GAGCTGTGTG	GATGTCAATG	AGTGTGCCAC TGGCTTTCAC
551	CGCTGTGGCC	CTAATTCTGT	GTGTGTCAAC	TTGGTGGGAA GCTACAGGTG
601	TGAATGCCGC	AGTGGCTATG	AATTTGCAGA	TGACCAGCAC ACTTGTATCT
651	TGATCGCCCC	ACCTCCCAAC	CCTTGCCTCG	ATGGCAGTCA CACCTGTGCC
701	CCTGAGGGGC	AAGCCAGGTG	CATTACCAT	GGAGGCAGCT CATTCAAGTTG
751	TGCCCTGCTG	CCAGGCTTCA	TTGGCACTGG	GCATCAGTGT TCTGATGTTG
801	ATGAATGTGC	GGAAAACCGA	TGTCATGAGG	CAGCTATCTG CTACAATACC
851	CCCGGGTCTT	TCTCCTGCCG	TTGCCAGCCT	GGGTATCGAG GGGACGGGTT
901	TCACTGCACC	TCTGACACGG	TTCCGGAAGA	TTCCATCTCA GGACTGAAGC
951	CCTGTGAATA	CCAGCAGCGC	TATGCTCAGA	CACAGCACGC CTACCCTGGG
1001	TCACGGATCC	ACATCCCCCA	GTGTGATGAC	CAGGGAAACT TCGTGCCACT
1051	GCAGTGCCAC	GGCAGCACTG	GCTTCTGCTG	GTGTGTGGAC CGAAATGGCC

```

1101  ACGAAGTCCC  TGGCACGCAG  ACTCCACCCG  GCTCCACCCC  GCCCCACTGT
1151  GGACCACCTC  CAGAGCCCAC  CCAGAGGCCT  CGGACTGTCT  GTGAGCGTTG
1201  GCGGGAAAGC  CTGCTGGAAC  ACTACGGAGG  CACACCCAGG  GATGACCAGT
1251  ATGTGCCCCA  GTGTGATGAC  CTGGGCCACT  TCATCCCCCT  GCAGTGCCAT
1301  GGAAAGAGTG  ATTTCTGTTG  GTGTGTGGAC  AAGGATGGCA  GAGAGCTACA
1351  GGGCACGCGC  TCACAGCCAG  GCACCAGGCC  TGCATGCATA  CCCACCGTCG
1401  CTCCACCCGT  GGTCCGGCCC  ACACCCGGC  CCGATGTGAC  TCCTCCATCT
1451  GTGGGCACCT  TCCTGCTCTA  TGCCAGGGC  CAACAGATTG  GCCACTTGCC
1501  CCTCAATGGC  AGCAGGCTTC  AGAAGGACGC  AGCCCGGACC  CTGCTGTCAC
1551  TGCATGGCTC  CATAGTTGTG  GGGATTGACT  ATGACTGCCG  GGAGAGGATG
1601  GTCTACTGGA  CAGACGTTGC  TGGTCGGACC  ATCAGCCGTG  CCAGCTTGA
1651  GGCAGGAGCC  GAACCCGAGA  CCATCATTAC  CTCAGGTTTG  ATAAGCCCGG
1701  AAGGACTTGC  CATCGACCAC  TTCCGTAGAA  CAATGTACTG  GACAGATAGT
1751  GGCCTGGATA  AGATAGAGCG  GGCCGAACTG  GATGGTTCCG  AGCGGAAAAGT
1801  CCTCTTCCAC  ACAGATCTGG  TGAATCCACG  AGCCATCACT  GTGGATCCAA
1851  TCCGAGGCAA  CTTGTACTGG  ACAGACTGGA  ATAGAGAAGC  TCCTAAAATT
1901  GAAACATCAT  CTTTAGATGG  CGAAAACAGA  AGGATTCTGA  TCAACAAAGA
1951  TATTGGATTA  CCCAATGGAT  TGACCTTTGA  CCCCTTCTCC  AAAGTGCTCT
2001  GCTGGGCAGA  TGCAGGAACC  AAAAAACTGG  AGTGTACACT  ACCCGATGGA
2051  ACTGGACGAC  GTGTCATCCA  AAACCACCTC  AATTACCCCT  TCAGCATCGT
2101  CAGCTATGCA  GATCACTTCT  ACCACACGGA  CTGGCGGAGG  GATGGTGTTA
2151  TATCAGTGAA  TAAGGACAGT  GGCCAGTTTA  CTGATGAGTT  TCTCCCTGAG
2201  CAGCGGTCTC  ATCTCTATGG  GATCACTGCA  GTCTACCCGT  ACTGTCCAAC
2251  AGGAAGAAAA  TGAACTAA  ATGTATAGGA  GGATTTCAAG  TTTACAAGAA
2301  TCTTGNCCTA  AGAATATTTG  CTACGAANGC  AAAGACAGTG  GGAAAANGGA
2351  ATTGGGCCTT  TTTGAGCTCT  TGGCACACAA  GTGAGCATTT  TTCAGTGCAG
2401  TGAGACTCAA  GTATATTTTG  NGAATGNAT  ACCNCNATCC  TTACTACTGG
2451  GTTTTTAAAA  ACAAAGGT . . .

```

```

. . .TACANAA  GTATCCCNCA  AAAGTACTCC  GGGTAAAAACN  CCAAAANATGC
AGCAGTTNTT  CAATTTTNTA  TATAATTCCA  ATAAAATATT  TTAAAGCTTT
                                         XhoI
AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA  TCGAGGGGG
GCCCGGTACC  CAATTCGCCC  TATAGTGAGT  CGTATACAGT  TC

```

Abb. 7-6 cDNA-Sequenz des EST3.1-Klons. Der EST3.1-Klon enthält die proteinkodierenden Nidogen-2 cDNA-Sequenzen ab NT-Pos.: 1983 (die entsprechende NT-Pos. 34 in der cDNA-Sequenz des EST3.1-Klons ist mit einem senkrechten Pfeil gekennzeichnet) bis zum PolyA-Schwanz. Das Translationsstopp-Codon TGA und die Polyadenylierungssignal-Sequenz AATAAAA sind fett gedruckt und unterstrichen. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Xho*I sind in den wellenförmig unterstrichenen Polylinker-Sequenzen des Blueskript-Plasmidvektors (Stratagene) fett gedruckt.

7.3 DNA-Sequenzunterschiede zwischen der murinen Nidogen-2 Gensequenz und den bekannten Nidogen-2 cDNA-Sequenzen

Für DNA-Sequenzvergleiche der kodierenden Region zwischen dem murinen Nidogen-2-Gen und den Nidogen-2 cDNA-Sequenzen der Maus standen die vollständige Nidogen-2 cDNA (Kimura *et al.*, 1998) und die unvollständige Nidogen-2 cDNA-Sequenz des EST3.1-Klons (siehe 7.2) zur Verfügung. Die DNA-Sequenzunterschiede in den entsprechenden NT-Pos. bzw. DNA-Sequenz-Regionen sind in der Abb. 7-8 tabellarisch aufgeführt, bzw. als Sequenzvergleich in Abb. 7-9 dargestellt. Alle angegebenen Nukleotid-Positionen (NT-Pos) entsprechen, sofern nicht ausdrücklich erwähnt, den Nukleotid-Positionen der Nidogen-2 Gensequenz (siehe 2.1.4.3 und Abb. 2-5). Die DNA-Sequenzvergleiche und Ergebnisse werden im folgenden zusammengefasst.

Die proteinkodierende Nukleotidsequenz des Nidogen-2 Gens erstreckt sich über 4209 Nukleotide (in Abb. 2-5 gezeigt), vom Translationsstartcodon ATG (NT-Pos.:1-3) bis zum Translationsstopp-Codon TGA (NT-Pos.:4210-4212), gefolgt von der 3'-nicht-translatierten Region (ab NT-Pos.: 4213). Die kodierenden Gen-Sequenzen entsprechen in ihrer Länge der vollständigen cDNA-Nidogen-2-Sequenz von Kimura *et al.* (EMBL-Genbankregistriernummer: AB017202). Die durchgeführten DNA-Sequenzvergleiche dieser Sequenzen in den kodierender Region ergaben an insgesamt 35 Nukleotidpositionen des Nidogen-2-Gens Unterschiede zu der cDNA-Sequenz von Kimura *et al.* (Kimura *et al.*, 1998). Diese Nukleotidaustausche lassen sich in 5 Typen mit unterschiedlicher Häufigkeit einteilen:

Typ	Nukleotid in der Gensequenz	Nukleotid in der cDNA-Sequenz	Zahl
A	C	T	30
B	T	C	1
C	C	G	1
D	C	A	1
E	A	G	2

Abb. 7-7 Tabellarische Übersicht der Häufigkeit der unterschiedlich sequenzierten Nukleotide zwischen der Nidogen-2 Gensequenz und der Nidogen-2 cDNA Sequenz (Kimura *et al.*, 1998).

Diese Nukleotidaustausche führen in 9 Fällen in den entsprechenden Codons zu Unterschieden in der Aminosäure (siehe Abb. 7-8).

Zur Überprüfung dieser Sequenzunterschiede wurde in einem weiteren DNA-Sequenzvergleich die Nidogen-2 cDNA-Sequenz des EST3.1.-Klons für den Gen-Sequenzbereich (NT-Pos. 1983 bis NT-Pos. 4212) mit einbezogen. Dabei zeigte sich jedoch, dass in diesem Bereich in den 17 Positionen, die Nukleotidunterschiede des Typ A zwischen der Gen-Sequenz und der cDNA-Sequenz von Kimura *et al.* (Kimura *et al.*, 1998) aufweisen, in 16 Positionen die EST3.1.-Klon-Sequenz mit der Nidogen-2 Gensequenz übereinstimmen (einzelne NT-Pos. siehe Abb. 7-8). Und in nur einer Nukleotid-Position (NT-Pos.:2596; Nukleotidaustausch von Typ A) stimmen die beiden cDNA-Sequenzen überein und weichen von der Nidogen-2 Gen-Sequenz ab. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich in der Nidogen-2 cDNA-Sequenz von Kimura *et al.* bei den einzelnen Nukleotidaustauschen von Typ A, möglicherweise um einen systematischen Fehler bei der DNA-Sequenzierung handelt.

In einer weiteren Nukleotid-Position (NT-Pos.: 3415; Nukleotidaustausch von Typ D) stimmt wiederum nur die EST3.1.-Klon cDNA-Sequenz mit der Nidogen-2 Gensequenz überein. In den drei restlichen Nukleotid-Positionen (NT-Pos.:2426 Typ E; NT-Pos.:3343 Typ B, NT-Pos.:3919 Typ E) zeigt die Nidogen-2 Gen-Sequenz konservierte Nukleotidaustausche gegenüber den beiden cDNA-Sequenzen.

Nidogen-2 Gens-Sequenz		cDNA-Seq. (Kimura <i>et al.</i>)		Kommentar
AS	NT	AS	NT	
	471-C		T	
	472-C		T	
	589-C		T	
	684-C		T	
251-S	752-C	F	T	AS-Austausch
	765-C		T	
367-A	882-C	V	T	AS-Austausch
375-P	1077-C	H	T	AS-Austausch
386-S	1157-C	W	G	AS-Austausch
	1338-C		T	
496-S	1487-C	F	T	AS-Austausch
	1569-C		T	
	1729-C		T	
651-R	1951-C	C	T	AS-Austausch

Nidogen-2 Gens-Sequenz		cDNA-Seq. (Kimura <i>et al.</i>)		cDNA-Seq. EST3.1-Klon		Kommentar
AS	NT	AS	NT	AS	NT	
	1993-C		T		C	
	2329-C		T		C	
	2356-C		T		C	
810-K	2426-A	E	G	E	G	AS-Austausch
	2596-C		T		T	
876-L	2624-C	F	T		C	AS-Austausch
	2785-C		T		C	
	2884-C		T		C	
	2917-C		T		C	
	2984-C		T		C	
	2989-C		T		C	
	3079-C		T		C	
	3136-C		T		C	
	3343-T		C		C	
	3413-C		T		C	
	3415-C		A		C	
1151-L	3449-C	F	T		C	AS-Austausch
	3550-C		T		C	
	3919-A		G		G	
	3946-C		T		C	
	4066-C		T		C	

Abb. 7-8 Sequenzunterschiede zwischen der Nidogen-2 Gen-Sequenz (Abb. 2-5), dem sequenzierten EST3.1-Klon (siehe 7.2) und der veröffentlichten cDNA-Sequenz von Kimura *et al.* 1998 (Kimura *et al.*, 1998; EMBL-Genbankregistriernummer: AB017202).

Der DNA-Sequenzvergleich der 3'-nicht-translatierten Region des Nidogen-2 Gens (unmittelbar 3' nach dem Translationsstopp-Codon, ab NT.Pos.:4213) mit der Nidogen-2 cDNA-Sequenz von Kimura *et al.* (Kimura *et al.*, 1998) zeigt, dass in der cDNA-Sequenz sich die letzten 64 bp der Protein-kodierenden-Region (einschliesslich des Stopp-Codons TGA; NT.Pos.:4149-4212) als Duplikat 3' nach dem TGA-Codon wiederholen (NT-.Pos. in der cDNA-Sequenz :4256-4319; siehe Abb. 7-9). Diese 64 bp Sequenzduplikation ist weder in der Nidogen-2-Gensequenz noch in der cDNA-Sequenz des EST3.1-Klons (7.2) vorhanden.

Intron 12 (Introngröße: ~2 kb; Intronsequenz wurde nicht vollständig bestimmt):

TC TGGTAAAGTGTAGGAAGACCTGAGTAAACTCGGGAATCTCCAGCTCCTTCCCTCCTATTTTCTCCCTGCCAAGATGGAACTGGACTGAGCCCTGATGGGGGCACCTTTCCAGGCTCTG
GATTCTTCTCAGTACTCTGATGTCCACTGACCGTTAGCTGGTGTGAGCTTCTTGGAGTCTCACCCACCTGTGGCTGCTCTGGTTCACTACCCAAAGTGTATGCTTTGTCTGGGTGTTGTTT
GGGACCATTGAGGGGAAGCTTATTAGTGTAGGAGCTCATGCACTGGTGGCCAAAGTCACTCTGTTGATGCTTTTCATGGCCCTGGCCAAACATACAGCAACATGGCTGCTACTGACCT
GGCTGTCTAGACTTAAGACTCTGGGTCCAAAGAGTGGATGGAGTTAACTTGTCTCTCCAGAGTCTCCAGAAGCCAGGCAGTTTATTTCTTCATTTTGGCCAGATATCAACTGGCCCAAGG
CTGA...

...CTAGGTAGTTGGTAGCAAAGCCCCGAATAAGAACTCAGGACTCTAAAAATGTGAGTGTCCAGGCTGGCGAGATGGCTCAGTGGTTAAGAGACTGAGCTCTTCTGAAGGTCTGAGTTCAAATCCC
AGCAACCACATGGTGGCTCACAACCACCTTAAATAAGCTCTGACTCCCTCTCTGGTGCATCTGAAGTCAAGTTAAGTGTATTTATGTATAATAATAATAATAATCTTTGGGTGAGCAAGTAGG
GACTGAACGAGTGGAGTTGACTGGATAGAGCGAGGCTGACAGGAGCGAGCAGAGTCTTAAAAATTCAAATTCCTAACAAACACATGAAGGCTCACAACCATCTGTACAGCTTCATTTGACTCACA
TACATAAAAATAAATAAGAAATCTTAAATGTAGTGTCTTACTGTTTTTCAATGTCAATAGTAACTTTTCGATTTGATGGAAAGAACTCAGTACAGAAAGACTTTATGGGGCTGGTTAGTGT
GGATGGGTGAGGACCTTTTATTTCTCCCTTATGCTCCCTCAG**ACACG**

Intron 13 (Introngröße: ~ 4 kb; Intronsequenz wurde nicht vollständig bestimmt):

CCAGGTGAGCCTCTGCCACAAAGACATCCCGTATGCCACCTGGCTGGAGTCAAGGGACAGAAATGGCTTTGAACGTGGGTGGTTTATAACCAGCTCTGACTCTGCAGACGTGGGTCTGA
CTGGCTACTGTCTCTCATGGCTTTTCTTCCCTCCAAAGAACACTTGGCTGATATAGACACCCATGTGCATGTTAATGTTCATACGGACATATAGATACAAAGTACATGCAGGATCCTTTATG
C...

...GAGTGCATGGTACAGACTCTCAGAGTCTGACAATGCTCTGCACAGAGGCTGCACATAGCAATGCCATGTGCATCTATCTCACTGGCTGGGTGAGTGCATGGATGGCTGCTGTCTCC
TTGTTCTTGTCTGATGTGGCTGGCCCTCTGTGCCAGGCTCTCTGCTTGGAGATGGGACATCAAGGAACATCAGGGTACTTCTTTCTGGGTTCACAGAGAACTTCTGAGAACACATGTG
CTTCTTGGCCAGTGTCCAGGGCATGGCCAAAGGCTTGAACAGAGGAAAGGAAGGCTAGGAGATCAGGAGTTGGGACTGGAGCTGTACTGATCTTGATTTGGCCATCCAGTTTCTGTTCT
CCATCTTAG**AGCCC**

Intron 14 (Introngröße: ~0,9 kb; Intronsequenz wurde nicht vollständig bestimmt):

GCATGTAAAGTGTGGCATGGCCAGGCACTCCTGAGTGTCACTGAGGTTTTCTGTGGGGTTTTCTGAGGTGGGAATAAAGTCACTCATCAATATGCTGATCATCAAGGTATCTCAGGATCCC
CCGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTGCACCTCGAGGGGGGGCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGTAGTGTATA...

...GACCCTAATACGACTACTATAGGGCGAATTTGGTACCAGGGCCCCCTCGAGGTGCAGGTATCGATAAGCTTGTATTCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCCAATCTGGATTTAAACT
GGCTTTGGCACTGTATAAGAATAGCTTGTCTCAGGCCAGAGTGAAGATTTTGGCCCCAGCCCTGGGTGAAAGGGGACAGTACCACCTTAGGGCCCGAGGTACATTTGGCTGTGTACCAC
ATCCTAAAACCTGGTTAGAAAGCTAGTTTATCTTTATCTTTTGTAGTAAATGGCAGAAATATGAGTAAATTAATCTTCAGGAAAAACAACAAACAAACAAACAAACCTCAGAAACAGGATTTCTTTGAA
ATATGTTCCAGGAAGAAGCTGGTAAATGTGGAGGTTCTTACATACAGAAGTAACTTTCCCTCCCTCTGTCCACCTTCCACAAACAG**GCATA**

Intron 15 (Introngröße: ~2,5 kb; Intronsequenz wurde nicht vollständig bestimmt):

GCATGTAAACTGAGTTTCTCCAGGAGGCTGGGCTCCACAGGAGGGTGGGCTCTGGATGAGGAGGGTGGGCTTGGATGAGGAGGGTGGGCTTGGATGAGGAGGGTGGGCTTGGATGAGGTTGCGCTTCAGGCTTG
TGGGCTGGAGAACTGAGCTTTTGGTTTTCAGAGGGAAATGCAGTGTGTGAGTGCAGGGACTCCTGGCATGCATGCCCTCTGGGCTTCATCTGCTTTAGTGGGCTCAGTTGTGGAAATCA
TGTCTAACCCACTCTAGCCGCTATATCTTGGGGCATCATGAAAGTCCAAATAGCGGAAGAAATTTCCGAGCTGTGTGGCTGTTCATGGGAAGATCCGAATTTCTCCGCCCTATAGTGTAGTGTATTA
CGCGCCGCCACCGCGTGGAGCTCCAGCATTTGTTCCTTTAGTGGGGTTAATTCGGAACGGGGTGA...

...AAAGATTCCAAGGGTTTTTGAATTAAGACGGGTCATTTACGAAAGGAAAGGGGAAAGAACTTACCAAGCCAAAGGCTGGCGACCACAGTCTCCCAAATTTTAAATCACAGGCTCTC
TTGTATCTGCACAACAAATGTCTTATATTAAGAGGCAGGGGTGGCTACACCTTTGGGCTGGGAAAGATTTTCATCTGTTCACCCAGTAGGAAATCTGTGTGGCATGTGTAGCAGATTTTAGAA
AGGGTCTTTAAGAAAGTCCAGGAACACTTAGAAGCGTTTCATCTTTTGCACATTAATATTAAGGGCTTACCTAGCGGGATGCTCCTCTCATCAGGAAAGGGCTGGTTTTTCTCATGAAGTGA
CCGTGTTCACAGCCAGTCTAACAGTACTGGAGGAGCTTGTGTCTGGAGGTAGTCACTGGGCCCTTTATAAATGCCCTTACTGACTGCCGTTTTGGAGAAATGAAGCATGCAGGTTAAACGG
CTGAGCCTGGCTCTGATCCGAGGAGGAGGCTCCCCAGCTCCGACCCACAGCGCAGGTTGTTCACAGTAGTGTGTGTAGCCGTGAACTTAAGGTTGGGATTCAGGAATCTTAATCTTCT
TGATGTCCGCAATGGTCTCAAAG**GGCT**

Intron 16 (Introngröße: 415 bp):

TCAGGTGAGCAGCTCCTCCATGATACTTGGCGTACCTTGTGTGTGCTTCCGTGGCTGTGTGGTCCAGTTTCTCCACGCTCATCTAAAGGGAAGGTTAAGTTCTCTGCTGGTACT
TTAGAAAGGTGGTTTAGGATAGGATGAATGAAGTCCACTCCAGAGTGGTTCGCACTGAGACTGCAGGGCTTGGCAGTTTAGATTGCTGTCCCTAGCACCAGGATGCCAGGTGCCATCAGGG
CAGCAAGGTCAGCAGAGAAGAGACTGGATATGGTTAAAAAGTTAGCCTTGTCTTGGGCTTAAAGCCTTTCTGTCTATGCTCTGGATCTGTGAAGTGTCTCAGCAGACGGGAACTTGATT
TCCCTTCTACACCAGCAATGCTCCTGTCTTACTTTTATTTCCAG**GTTTTG**

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

- Name: Jürgen Schymeinsky
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsort: München, am 12.06.1969
- Adresse: Säbenerstr. 7, 81547 München

Ausbildung

- | | | |
|-------------|--|---------|
| 1975 – 1980 | Agilolfinger Grundschule,
Fromund Hauptschule | München |
| 1980 – 1989 | Maria-Theresia Gymnasium | München |
- Abschluss: Abitur**
- | | | |
|----------------------------|---|--|
| 1989 - 1991 | Zivildienst | |
| 1991 – 1998
1994 - 1995 | Studium der Biologie an der Universität Regensburg
Aulandsstipendium des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes (DAAD) an der
University of Colorado in Boulder. | |
2. Hauptfach: Zoologie/Entwicklungsbiologie
 3. Nebenfächer: Biochemie, Medizinische Mikrobiologie, Physikalische Chemie
- Abschluss: Diplom**

Diplomarbeit

Januar 1997 bis Februar 1998. Durchführung der Arbeit am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III, Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg.
Thema der Arbeit: Molekulare und genetische Charakterisierung der *quo (quo-vadis)*-Region bei *Drosophila melanogaster*

Doktorarbeit

April 1998 bis Januar 2002. Durchführung der Arbeit in der Abteilung Proteinchemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Thema der Arbeit: Das Nidogen-2 Gen der Maus: Genstruktur und Funktionsanalyse.

München, den 24.2.2002

Jürgen Schymeinsky

Ehrenwortliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen Hilfsmittel verwendet, als diejenigen, die im Text angegeben sind. Diese Doktorarbeit wurde in dieser oder einer ähnlichen Form keiner anderen Fakultät oder Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, den 24. Januar 2002

Jürgen Schymeinsky