

Struktur-Funktions-Beziehungen
der extrazellulären Calcium-bindenden Proteine
SC1/Hevin und TSC-36/FRP

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Harald Hambrock
aus Vechta i.O.

Köln 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Paulsson

Prof. Dr. R. Sterner

Tag der Mündlichen Prüfung: 03. Juli 2001

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2 | Elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem SC1 | 32 |
| 3.3 | Massenspektrometrische Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine und ihrer posttranslationalen Modifizierungen | 33 |
| 3.4 | Untersuchungen zur Calciumbindung und Sekundärstruktur | 34 |
| 3.4.1 | CD-Spektroskopie | 34 |
| 3.4.2 | Fluoreszenz-Spektroskopie | 36 |
| 3.5 | Herstellung und Charakterisierung des SC1-Antikörpers | 37 |
| 3.5.1 | Untersuchung der Spezifität und der Kreuzreaktivität | 38 |
| 3.6 | Endogene Expression von SC1 in verschiedenen Zelllinien | 39 |
| 3.7 | Gewebeverteilung von SC1 | 41 |
| 3.7.1 | Immunoblot von Gewebeextrakten | 41 |
| 3.7.2 | Verifizierung der Immunoblot-Banden durch Inhibierung | 42 |
| 3.7.3 | Immunhistochemische Untersuchung | 43 |
| 3.8 | Interaktionsstudien des SC1 mit Komponenten der ECM im Festphasen-Immunoassay | 46 |
| 3.8.1 | Auswahl potentieller Bindungspartner | 46 |
| 3.8.2 | Eingrenzung der Bindungsdomäne innerhalb des SC1 | 46 |
| 3.8.3 | Calcium-Abhängigkeit der SC1-Kollagen IV-Bindung | 47 |
| 3.9 | Colokalisation von SC1 und Kollagen I bzw. IV in der Niere | 49 |
| 3.10 | Colokalisation von SC1 und Kollagen I in der Matrix der Zelllinie SaOS-2 | 50 |
| 3.11 | Kristallisationsversuche der EC-Domäne | 51 |
| IV | Ergebnisse TSC-36 | 52 |
| 4.1 | Klonierung der cDNA, rekombinante Expression und Reinigung des TSC-36 und seiner Fragmente | 52 |
| 4.1.1 | Rekombinante Expression des TSC-36 und seiner Fragmente | 52 |
| 4.1.1.1 | Restriktionsanalyse und Klonierung der TSC-36 cDNA | 53 |
| 4.1.1.2 | Expression der TSC-36-Fragmente in EBNA-293 Zellen | 54 |
| 4.1.2 | Isolierung der TSC-36-Fragmente | 55 |
| 4.1.2.1 | Aufreinigung des rekombinanten TSC-36 | 55 |
| 4.1.2.2 | Aufreinigung des rekombinanten Proteins EC-3 _{tag} | 55 |
| 4.1.2.3 | Aufreinigung des rekombinanten Proteins EC _{tag} | 56 |
| 4.2 | Massenspektrometrische Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine und ihrer posttranslationalen Modifizierungen | 57 |

| | | |
|---------|--|-----------|
| 4.3 | Untersuchungen zur Calciumbindung und Sekundärstruktur | 58 |
| 4.3.1 | CD-Spektroskopie | 58 |
| 4.3.2 | Fluoreszenz-Spektroskopie | 59 |
| 4.4 | Charakterisierung der beiden Isoformen des TSC-36 | 60 |
| 4.4.1 | Auftrennung des TSC-36 in zwei Isoformen | 60 |
| 4.4.2 | Massenspektrometrische Analyse der Isoformen | 61 |
| 4.4.3 | Monosaccharid-Analyse | 62 |
| 4.4.4 | Unterscheidung der beiden Isoformen aufgrund ihrer Sialinsäure- zusammensetzung | 63 |
| 4.4.4.1 | Analyse des Sialinsäuregehalts der Glykane mittels Ionenautauschchromatographie | 63 |
| 4.4.4.2 | Analyse der Proteine nach Behandlung mit Sialidase | 66 |
| 4.5 | Herstellung und Charakterisierung des TSC-36-Antikörpers | 66 |
| 4.5.1 | Untersuchung der Spezifität und der Kreuzreaktivität | 67 |
| 4.6 | Endogene Expression von TSC-36 in verschiedenen Zelllinien | 68 |
| 4.7 | Gewebeverteilung von TSC-36 | 69 |
| 4.7.1 | Immunoblot von Gewebeextrakten | 69 |
| 4.7.2 | Verifizierung der Immunoblot-Bande bei 25 kDa durch Inhibierung | 70 |
| 4.7.3 | Immunhistochemische Untersuchung | 71 |
| 4.8 | Interaktionsstudien des TSC-36 mit Komponenten der ECM im Festphasen- Immunoassay | 73 |
| 4.9 | Lokalisation von TSC-36 und Kollagen I bzw. IV in der Niere | 74 |
| 4.10 | Lokalisation von TSC-36 und Kollagen I in der Matrix der Zelllinie SaOS-2 | 74 |
| 4.11 | Kristallisationsversuche der Isoformen des TSC-36 A und B | 75 |
| | V Diskussion | 76 |
| 5.1 | Rekombinante Expression der SC1- und TSC-36-Fragmente | 76 |
| 5.2 | Charakterisierung der Isoformen von TSC-36 | 80 |
| 5.3 | Expression von SC1 und TSC-36 in Zelllinien und Geweben | 82 |
| 5.4 | Konformation und Calciumbindung von SC1 und TSC-36 | 86 |
| 5.5 | Charakterisierung der Interaktion von SC1 und TSC-36 mit anderen Proteinen der extrazellulären Matrix | 89 |
| 5.6 | Bedeutung der EC-Domänen in der BM-40 Proteinfamilie | 92 |
| 5.7 | Ausblick | 93 |

| | |
|--|-----------|
| VI Material und Methoden | 95 |
| 6.1 Molekularbiologische Arbeiten | 95 |
| 6.1.1 Allgemeine molekularbiologische Verfahren | 95 |
| 6.1.2 Klonierung der Plasmide zur rekombinanten Expression der SC1- und TSC-36-Fragmente | 98 |
| 6.1.3 Nukleinsäuresequenzierung | 99 |
| 6.2 Rekombinante Expression und Kultur eukaryontischer Zellen | 100 |
| 6.2.1 Zellkultur Arbeiten | 100 |
| 6.2.2 Herkunft und Kultur der untersuchten Zelllinien | 103 |
| 6.3 Antikörper und Immunhistologie | 103 |
| 6.3.1 Immunhistochemie auf Gewebe und Zellen | 103 |
| 6.3.1.1 Gewebepräparation | 103 |
| 6.3.1.2 Gewebefärbung mit Immunfluoreszenz und alkalischer Phosphatase | 104 |
| 6.3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen | 105 |
| 6.3.2 Herstellung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper | 105 |
| 6.3.3 Immunoblot und Inhibitionsversuche | 106 |
| 6.4 Proteinchemische Arbeiten | 107 |
| 6.4.1 Allgemeine proteinchemische Verfahren | 107 |
| 6.4.2 Chromatographische Verfahren | 109 |
| 6.4.3 Proteinextraktion aus Gewebe | 111 |
| 6.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen | 111 |
| 6.5 Festphasen-Immunoassay | 112 |
| 6.6 Circular Dichroismus Spektroskopie | 114 |
| 6.7 Fluoreszenz-Spektroskopie | 115 |
| 6.8 Elektronenmikroskopische Arbeiten | 116 |
| 6.9 MALDI-TOF-Massenspektrometrie | 117 |
| 6.10 Analyse der Glykosylierung der TSC-36 Isoformen | 117 |
| 6.10.1 Freisetzung und Isolierung der N-Glykane | 117 |
| 6.10.2 Fluoreszenzmarkierung der freigesetzten Oligosaccharide für die HPLC-Analytik | 118 |
| 6.10.3 Abspaltung der Sialinsäuren der freigesetzten Oligosaccharide | 118 |
| 6.10.4 HPLC-Analyse der 2-AB markierten Oligosaccharide | 118 |
| 6.10.5 Monosaccharid-Analyse | 119 |

| | |
|----------------------------------|-----|
| 6.11 N-terminale Ansequenzierung | 120 |
| 6.12 <i>In-silico</i> Methoden | 120 |

VII Literatur **121**

| | |
|-----------------------------|-----|
| Verzeichnis der Abkürzungen | 131 |
|-----------------------------|-----|

Danksagung

Erklärung

Kurzzusammenfassung

Abstract

Lebenslauf

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden extrazellulären Proteine SC1 und TSC-36, die beide zu der modulären BM-40-Proteinfamilie gehören, untersucht. Verschiedene Fragmente sowie die Voll-Länge Proteine von SC1 und TSC-36 wurden rekombinant in eukaryontischen Systemen exprimiert und mittels diverser chromatographischer Methoden in nativer Form aufgereinigt. Für die Fragmente I-FS_{tag}, FS-EC und EC von SC1 sowie EC-3_{tag} von TSC-36 konnte gezeigt werden, daß es sich um eigenständige Faltungseinheiten handelt, welche in gefalteter Form von den eukaryontischen Zellen sekretiert werden. Die EC-Domäne von TSC-36 scheint durch Domäne III stabilisiert zu werden. Die mittels Ionenaustauschchromatographie getrennten Isoformen TSC-36 A und B konnten mittels Massenspektrometrie und Glykosylierungsstudien genauer analysiert werden. Der Ladungsunterschied der beiden Isoformen konnte auf einen unterschiedlichen Gehalt an Sialinsäuren zurückgeführt werden.

Bei TSC-36 beträgt der N-Glykan-Anteil 21% des Gesamtgewichts, wobei die Zucker auf der EC- bzw. dem EC-3-Fragment lokalisiert wurden. SC1 ist ebenfalls posttranslational modifiziert, hier befinden sich die N-Glykane jedoch auf Domäne I und der FS-Domäne, während die EC-Domäne nicht modifiziert ist.

Die Sekundärstruktur der Proteine wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Für SC1 konnte ein großer Gehalt an α -helikalen Strukturen in der EC-Domäne und ein großer Anteil an ungeordneten Strukturen in Domäne I gefunden werden. Bei TSC-36 handelt es sich um ein Protein mit großem α -Helix Gehalt, wobei Domäne III einen großen Anteil an β -Faltblatt-Strukturen aufzuweisen scheint. Für SC1 und TSC-36 konnte mittels CD-Spektroskopie keine durch Calcium induzierte Konformationsänderung nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie konnte für SC1 eine Bindung von Calcium gezeigt werden, für TSC-36 hingegen nicht. Die Gewebeverteilung von SC1 und TSC-36 wurde mit spezifischen Antikörpern untersucht. Für SC1 konnte im Immunoblot eine breite Expression in vielen Geweben und fast allen untersuchten Gebieten in Gehirn nachgewiesen werden. SC1 zeigte ein apparentes Molekulargewicht von 110 kDa. Eine prominente 55 kDa Bande konnte durch Inhibierungsexperimente mit rekombinantem Protein auf den Immunoblot als SC1 verifiziert werden. Bei TSC-36 konnte hingegen nur eine Expression im Gehirn, der Niere und den Testis nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu rekombinantem TSC-36 mit einem apparenten Molekulargewicht von 42-50 kDa wurden im Gewebeblot Banden bei ungefähr 25 kDa beobachtet. Diese Bande konnten ebenfalls durch Inhibierungsexperimente als TSC-36

verifiziert werden. Bei der Untersuchung der Überstände kultivierter Zelllinien konnte für SC1 nur eine schwache Expression u.a. in einigen Osteosarkom- und Fibroblasten-Zelllinien festgestellt werden, wobei auch hier Banden von ca. 55 kDa entdeckt wurden. TSC-36 konnte vor allem in allen untersuchten Osteosarkom-Zelllinien als breite Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 42-50 kDa nachgewiesen werden. Somit scheint *in-vivo* eine gewebe-spezifische Prozessierung sowohl von SC1 als auch von TSC-36 stattzufinden.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine Expression von SC1 in vielen Geweben, wie z.B. im Bindegewebe der Haarfollikel und der Muskeln und in den Gefäßen des Auge und der Niere. Bei Immunfluoreszenzfärbungen mit SC1 und Kollagen I und IV konnte eine Colokalisation von SC1 und Kollagen IV in den Gefäßen der Niere beobachtet werden. Ein Festphasen-Immunoassay zeigte eindeutig die Bindung von SC1 an Kollagen IV mit einem apparenten K_d von 50 nM. Diese Bindung war strikt Calcium-abhängig, in Abwesenheit von Calcium konnte keine Bindung detektiert werden. In einem Zellkulturmodell, in dem Osteosarkom-Zellen eine extrazelluläre Matrix synthetisieren, konnte SC1 in einem extrazellulären Netzwerk bzw. als punktförmige Signale detektiert werden, das mit Kollagen colokalisiert war.

Immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper gegen TSC-36 zeigten eine Expression von TSC-36 in neuronalen Zellen des Cerebellum, des Hippocampus und des Cortex, was sehr gut mit der breiten Expression, die im Gewebeblut verschiedener Hirnregionen gezeigt wurde, übereinstimmt. In der Niere konnte eine Colokalisation mit Kollagen IV in den großen Gefäßen entdeckt werden. Im Festphasen-Immunoassay ergab sich für TSC-36 jedoch keine Bindung an Kollagen IV und in einem weiteren Satz putativer Bindungspartner konnte keine Bindung mit TSC-36 bestimmt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu SC1 und TSC-36 zeigen gemeinsame und unterschiedliche Eigenschaften der beiden Proteine aus der BM-40-Proteinfamilie. Obwohl die Sequenz der Calcium-bindenden EF-Hände konserviert ist, unterscheiden sich die Proteine der Familie sehr stark in der Calcium-induzierten Konformationsänderung. Auch die Expressionsmuster sind z.T. überlappend, z.T. aber auch sehr unterschiedlich, was auf eine unterschiedliche physiologische Funktion hindeutet.

I Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Der Begriff extrazelluläre Matrix ist als die Gesamtheit aller Makromoleküle definiert, die in den Geweben den Raum zwischen den Zellen ausfüllen. Sie besteht aus einem hochorganisierten Netzwerk von Kollagenen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und nicht-kollagenen Proteinen.

Die extrazelluläre Matrix dient in Wirbeltieren als Strukturgerüst des Körpers und kommt hauptsächlich in Bindegewebe vor. Während im Gehirn nur wenig davon zu finden ist, bestehen Knochen und Knorpel hauptsächlich aus Bindegewebe. In diesen Geweben nimmt die extrazelluläre Matrix (ECM) mehr Raum ein als die in ihr liegenden Zellen und bestimmt so deren physikalische Eigenschaften. Ein eindruckvolles Beispiel hierfür stellt die von Chondrocyten gebildete extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels dar, wie er z.B. in Gelenken vorkommt. Das sehr stabile Grundgerüst des Knorpels besteht aus den fibrillären Kollagenen II, IX und XI und dient den Zellen und anderen Komponenten der ECM als Verankerung. Darin eingelagert ist die sogenannte Grundsubstanz, die aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen besteht und durch die Bindung von Wasser eine gelartige Konsistenz aufweist. Durch die hohe negative Ladungsdichte der Glykosaminoglykane entsteht ein hoher osmotischer Quelldruck, der durch die Kollagenfibrillen aufgefangen wird. Bei der Einwirkung von Druck sorgt die Grundsubstanz für eine elastische Abfederung und die Kollagene für Zugfestigkeit. Die extrazelluläre Matrix kann auch als durchsichtige Matrix der Augenhornhaut oder seilartige Matrix der Sehnen auftreten.

An der Grenze zwischen Bindegewebe und Epithelzellschichten, welche alle Hohlräume des Körpers auskleiden, findet man die extrazelluläre Matrix als Basalmembran (Vracko, 1974). Basalmembranen bilden eine 20 bis 300 nm dicke Schicht und können die verschiedensten Funktionen erfüllen, z.B. verleihen sie Geweben Struktur, dienen bei der Wundheilung Zellen als Substrat zur Migration bzw. Adhesion oder wirken in den renalen Glomeruli als makromolekularer Filter.

Neben einer strukturellen Funktion kommt der ECM auch eine dynamische Rolle als Vermittler von Informationen zu (Aumailley und Gayraud, 1998). Dabei interagiert die Matrix direkt mit den Oberflächen-Rezeptoren der Zellen und initiiert so Signalkaskaden, die deren Differenzierung beeinflussen. Dabei stellen Integrine eine wichtige Klasse von

Rezeptoren dar, welche, z.B. durch die Bindung von Laminin, Epithelzellen beeinflussen (Timpl, 1989; Paulsson 1992). Auch bei der Wundheilung und Metastasierung von Tumoren sind Integrine von entscheidender Bedeutung (Hynes, 1987; Paulsson, 1992).

Die extrazelluläre Matrix spielt auch bei der Bindung und Speicherung von Wachstumsfaktoren oder Proteinen, die diese Faktoren binden eine aktive Rolle (Streuli, 1999).

1.2 Der Domänenaufbau extrazellulärer Matrixproteine

Die meisten Proteine der extrazellulären Matrix zeichnen sich durch einen Aufbau aus Domänen aus. Eine Domäne ist als unabhängige selbständige Faltungseinheit mit einer Länge von ca. 30 bis 300 Aminosäuren definiert (Bork et al., 1996). Homologe Domänen zeichnen sich durch Ähnlichkeiten auf Sequenzebene und in der Sekundär- und Tertiärstruktur aus. Aufgrund von strukturellen Homologien zu bereits bekannten Proteinen, können in unbekannt Proteinen Domänen postuliert werden. Eine endgültige Zuordnung kann jedoch erst nach Aufklärung der Faltung durch NMR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse erfolgen.

Die für extrazelluläre Matrixproteine charakteristische Multidomänenstruktur umfaßt bisher ca. 50 verschiedene Domänen, von denen z.B. die EGF-ähnliche Domäne bzw. die Fibronectin-Domäne häufiger vorkommen als andere. In der Evolution zählen ECM-Proteine zu den "neueren" Proteinen, die durch Genduplikation aus "alten" Proteinen entstanden. Die Mosaikstruktur kommt durch sogenannte mobile Domänen zustande, die sich dadurch auszeichnen, daß ein oder mehrere Exons eine unabhängig gefaltete Domäne auf dem entsprechenden Gen kodieren und daß jedes Exon an beiden Seiten durch Introns identischer Phase flankiert wird. Man kann nach der Lage der Spleißstelle drei Phasen unterscheiden: Phase 0 bezeichnet eine Spleißstelle hinter dem Basentriplett, Phase 1, wenn sie sich zwischen dem ersten und zweiten Nukleotid befindet und Phase 2, wenn sie zwischen dem zweiten und dritten Nukleotid liegt. Durch *Exon-shuffling*, d.h. zufällige genetische Rekombinationsereignisse in den Introns können Proteine mit neuen Domänenstrukturen entstehen. Dabei ist die Kompatibilität und Symmetrie der Phasengrenzen wichtig, weil es sonst zu einem Abbruch des Leserasters kommen würde. Von den drei möglichen Kombinationen der Phasengrenzen 0-0, 1-1, und 2-2 findet man an den Domänengrenzen extrazellulärer Proteine häufig die Phasengrenze 1-1 (Patthy, 1991).

1.3 Proteine der extrazellulären Matrix

Die Proteine der extrazellulären Matrix können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden; in nicht-kollagene Glykoproteine, wie z.B. Thrombospondine, Laminine, BM-40 und Matriline (Déak et al., 1999), Proteoglykane (z.B. Aggrecan) und Faserproteine (z.B. Kollagene). Daneben existieren noch Moleküle wie Hyaluronsäure, die als Glykosaminoglykane keinen Proteinanteil aufweisen. Im folgenden werden die wichtigsten Vertreter exemplarisch vorgestellt, um einen Eindruck über die Vielfalt der Makromoleküle der extrazellulären Matrix zu vermitteln.

1.3.1 Laminine

Bei den Lamininen handelt es sich um heterotrimere Glykoproteine, die aus jeweils einer α -, β - und γ -Kette zusammengesetzt sind. Sie sind ein wichtiger Bestandteil aller Basalmembranen. Bis heute sind 12 verschiedene Lamininformen bekannt, die sich aus der unterschiedlichen Kombination der fünf α -Ketten, drei β -Ketten und drei γ -Ketten ergeben. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß Laminine eine typische kreuzförmige Struktur mit drei kurzen und einem langen Arm ausbilden (Beck et al., 1990). Laminin-5 stellt aufgrund der Zusammensetzung aus den verkürzten $\alpha 3$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Ketten eine Ausnahme dar. Die Trimerisierung der Ketten kommt durch die Ausbildung einer α -helikalen coiled-coil Domäne zustande, die innerhalb des langen Arms liegt und über Cysteinbrücken stabilisiert wird (Barlow et al., 1984; Paulsson et al., 1985).

Am C-terminalen Ende der α -Ketten befindet sich eine globuläre G-Domäne, die aus fünf Modulen aufgebaut ist (Sasaki et al., 1988; Beck et al., 1990) und z.B. an Heparin und α -Dystroglykan bindet. Aus Perlecan, Agrin und anderen Proteinen sind ähnliche G-Domänen bekannt (Rupp et al., 1991; Kallunki et al., 1992). Am N-Terminus der Ketten befindet sich die globuläre Domäne VI, die an der Calcium-abhängigen Aggregation der Laminine zu einem Geflecht beteiligt ist (Yurchenco und Schittny, 1990). Desweiteren sind an den N-terminalen Enden LE-(laminin-like epidermal growth factor like)-Domänen zu finden, die homolog zu den klassischen EGF-Domänen sind, statt der sechs konservierten Cysteine jedoch zwei zusätzliche aufweisen (Maurer und Engel, 1996). Laminine spielen in der Embryonalentwicklung bei der Ausbildung erster Basalmembranen eine wichtige Rolle. Es

konnte gezeigt werden, daß Defekte in den Laminin-Genen, die zu einem Fehlen der β 1- oder γ 1-Kette führen, schon im frühen Stadium der Entwicklung letal sind (Henchcliffe et al., 1995; Smyth et al., 1999). Mutationen in anderen Laminin-Ketten können Muskeldystrophien (α 2, β 2) oder schwere blasenbildende Hautkrankheiten (α 3, β 3, γ 2) verursachen (Guicheney et al., 1997; Kivirikko et al., 1995). Auch für die Wundheilung und Regeneration von Nerven (Edgar, 1996) sind Laminine von Bedeutung.

1.3.2 Kollagene

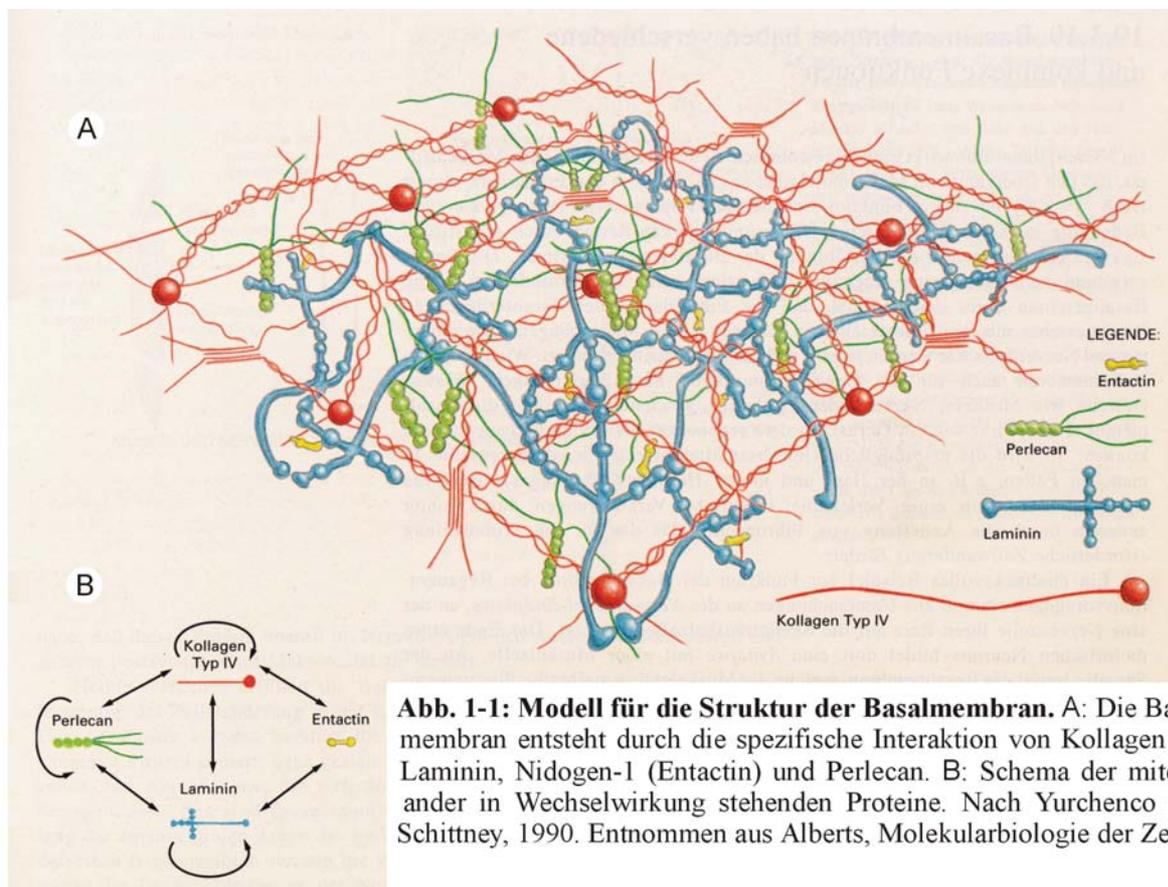
Die Kollagene sind eine Familie von Faserproteinen, die in allen vielzelligen Organismen vorkommen. Sie sind wichtiger Strukturbestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel, Blutgefäßen und Zähnen. Kollagene machen bei Säugetieren etwa 25% des Gesamtprotein-gewichts aus. Sie werden als Familie von genetisch unterschiedlichen, aber verwandten Proteinen betrachtet, da aus verschiedenen Geweben isolierte Kollagene eindeutige Unterschiede in ihrer Struktur aufweisen. Bis heute sind mindestens 19 verschiedene Kollagene beschrieben worden. Nach ihrer Struktur werden sie in fibrilläre, fibrillen-assoziierte, netz-bildende, verankernde und perlenkettenartige Kollagene eingeteilt. Die fibrillären Kollagene Typ I, II, III, V und XI können Fibrillen mit einer Länge von mehreren Mikrometern und einem Durchmesser von 10-300 nm bilden und gehören zu den am weitesten verbreiteten Kollagenen. Kollagen Typ I macht 90% des gesamten Kollagens im Körper aus und ist Hauptbestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Bändern und des Bindegewebes der inneren Organe. Von den netzbildenden Kollagen Typ IV, VIII und X, ist Kollagen Typ IV eine wichtiger Bestandteil aller Basalmembranen. Die Kollagene des Typs IX, XII, XIV XVI und XIX weisen Unterbrechungen der Tripelhelix durch ein oder zwei nicht helikale Bereiche auf (Olsen, 1997) und befinden sich auf der Oberfläche von Fibrillen. Sie werden deshalb als fibrillen-assoziierte Kollagene bezeichnet (*fibril associated collagens with interrupted triple helix*, FACIT). Sie sorgen für eine Verknüpfung der Kollagenfibrillen untereinander und mit anderen Molekülen der extrazellulären Matrix. Kollagen Typ VII bildet durch Dimerisierung verankernde Fibrillen aus, die die Basalmembran mit dem darunterliegenden Bindegewebe verknüpft. Perlenkettenartige Fibrillen werden durch Kollagen Typ VI gebildet und spielen möglicherweise eine Rolle bei der Verbindung von Zellen mit Kollagenfibrillen.

1.3.3 Proteoglykane

Proteoglykane bestehen aus Glykosaminoglykan-Ketten, die kovalent an einen Proteinkern (Core-Protein) gebunden sind. Die Bindung der Glykosaminoglykane erfolgt über ein spezielles Kopplungstrisaccharid an Serinreste im Proteinkern. Es gibt eine Vielzahl von Core-Proteinen mit einer Masse von 10 bis 600 kDa. Proteoglykane sind leicht von anderen Glykoproteinen durch Art, Menge und Anordnung der Glykan-Seitenketten zu unterscheiden. Per Definition muß ein Proteoglykan mindestens eine Glykosaminoglykan-Kette aufweisen. Der Kohlenhydratanteil am Gesamtgewicht kann bis zum 95% ausmachen. Bei Glykosaminoglykanen handelt es sich um unverzweigte Polysaccharidketten, die aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten aufgebaut sind. Ein Disaccharid-Baustein ist ein Aminozucker (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin) an den eine Sulfatgruppe gebunden ist. Bei dem zweiten Baustein handelt es sich meist um Glucuron- oder Iduronsäure. Die Saccharide können neben den Sulfat- auch Carboxylatgruppen tragen und verleihen den Glykosaminoglykanen so eine starke negative Ladung. Aufgrund der Saccharidreste, der Art ihrer Verbindung und der Anzahl und Position der Sulfatgruppen erfolgt eine Einteilung der Glykosaminoglykane in vier Hauptgruppen: 1. Hyaluronsäure, 2. Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, 3. Keratansulfat und 4. Heparansulfat und Heparin. Hyaluronsäure besteht aus bis zu 25.000 sulfatfreien Disaccharideinheiten. Es kommt in allen Körperflüssigkeiten und Geweben vor und erfüllt wichtige Aufgaben während der Zellproliferation und -migration sowie der Embryonalentwicklung (Fraser und Laurent, 1996). Aggrecan ist das wichtigste und häufigste Proteoglykan des Knorpels, das durch den Aufbau eines Quelldrucks, Belastungen entgegenwirkt. Perlecan ist in der Basalmembran der Glomeruli der Niere für die Filtration von Blut von Bedeutung (Timpl et al., 1993, Kanwar et al., 1980). Proteoglykane erfüllen durch die Bindung von Wachstumsfaktoren eine wichtige Aufgabe bei der Signalübertragung zwischen Zellen (Yamaguchi et al., 1990). Sie können auch andere Proteine, z.B. Proteasen, binden und diese damit in ihrer Funktion und Aktivität beeinflussen (Ruoslahti und Yamaguchi, 1991).

1.4 Die Basalmembran

Basalmembranen sind eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix (Paulsson, 1992; Timpl, 1996). Sie sind überall dort anzutreffen wo sich Parenchymzellen (z.B. Epithelzellen, Endothelzellen, Nervenzellen, Fettzellen, Muskelzellen, u.a.) in direktem Kontakt zum Bindegewebe befinden. Basalmembranen bilden schichtartige Strukturen aus und trennen so Gewebe voneinander (Vracko, 1974). Bei den Proteinen, die an der Ausbildung der Basalmembran beteiligt sind, handelt es sich um Kollagen IV, verschiedene Laminine, Nidogen-1, Proteoglykane (z.B. Agrin, Perlecan), und Calcium-bindende Proteine, wie Fibulin-1, -2 und BM-40.



Die Basalmembran besteht aus zwei Netzwerken, die durch die Polymerisation von Kollagen IV bzw. der Calcium-abhängigen Polymerisation von Laminin gebildet werden. Die Verbindung der Netzwerke untereinander erfolgt durch Nidogen-1. Das in Abb. 1-1 gezeigte Modell beruht auf *in-vitro* Experimenten und stellt nur eine stark vereinfachte Näherung dar. Da Basalmembranen vielfältige physikalische und biologische Funktionen ausüben können (Lindblom und Paulsson, 1996), müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um die

Aufgabe anderer, mit der Membran assoziierter Proteine, wie z.B. BM-40 oder Agrin herauszufinden.

1.5 BM-40 (SPARC/Osteonectin)

BM-40 ist ein extrazelluläres Glykoprotein, welches ursprünglich aus Knochenmatrix isoliert wurde und als Osteonectin bezeichnet wurde (Termine et al., 1981). Später wurde entdeckt, daß es mit dem von Endothelzellen und Fibroblasten sezernierten SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteines; Sage et al., 1984) und mit einem aus dem Basalmembran produzierenden Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor gereinigtem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 40 kDa (BM-40; Dziadek et al., 1986) identisch ist.

BM-40 ist in einer Vielzahl von Prozessen involviert, in denen eine Umorganisation von Gewebe stattfindet, z.B. bei der Wundheilung (Reed und Sage 1996), bei der Angiogenese (Sage und Vernon, 1995; Sage, 1996) oder der Entstehung von Tumoren (Ledda et al., 1997; Sage, 1997). Es konnte gezeigt werden, daß BM-40 verschiedene Effekte auf Zellen haben kann, wie z.B. die Induktion der Expression von Matrix-Metalloproteasen in Fibroblasten (Tremble et al., 1993), die Beeinflussung der Zellmorphologie (Sage et al., 1989; Lane und Sage, 1990), die Regulation der Zelldifferenzierung (Bassuk et al., 1999), die Zerstörung von Fokal-Kontakten von Zellen (Murphy-Ullrich et al., 1995), die Modulation des Zell-Zyklus (Funk und Sage, 1991; 1993) und die Inaktivierung einer zellulären Antwort auf verschiedene Wachstumsfaktoren (Hasselar und Sage, 1992; Raines et al., 1992; Kupprion et al., 1998).

Mäuse deren Gen für BM-40 durch homologe Rekombination entfernt wurde, entwickeln Katarakte in den Augen (Gilmour et al., 1998; Norose et al., 1998) und Osteopenie (Delany et al., 1998; 2000).

BM-40 ist aus drei Domänen aufgebaut: einer sauren Domäne I ohne Homologien zu bekannten Proteinen, einer Follistatin-ähnlichen Domäne (FS) und einer extrazellulären Domäne (EC). Domäne I kann aufgrund von zwei N-terminalen Glutaminresten als Transglutaminasesubstrat dienen (Hohenadl et al., 1995). BM-40 war das erste extrazelluläre Protein für das ein EF-Hand Motiv vorhergesagt wurde (Engel et al., 1987). Mit Hilfe der CD-Spektroskopie konnte eine reversible Calcium-abhängige Konformationsänderung nachgewiesen werden (Maurer et al., 1992). Nachdem es gelungen war die EC-Domäne zu kristallisieren (Maurer et al., 1995), zeigte die Röntgenstrukturanalyse zwei EF-Hand Motive

(Hohenester et al., 1996). Hiermit wurde zum ersten Mal der Beweis für EF-Hand Motive in extrazellulären Proteinen erbracht. Die EC-Domäne weist eine kompakte Struktur mit einem großen Anteil an α -Helices auf (Abb. 1-2). Aufgrund der Insertion eines Prolins in die Konsensussequenz der EF-Hand, konnte die erste EF-Hand nicht aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Durch die Ausbildung einer ungewöhnlichen *cis*-Peptidbindung zwischen Histidin 224 und Prolin 225 wird die sperrige Seitenkette des Prolins so gedreht, daß das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe die Koordination des Calciums übernehmen kann und so die EF-Hand Struktur erhalten bleibt (Abb. 1-2).

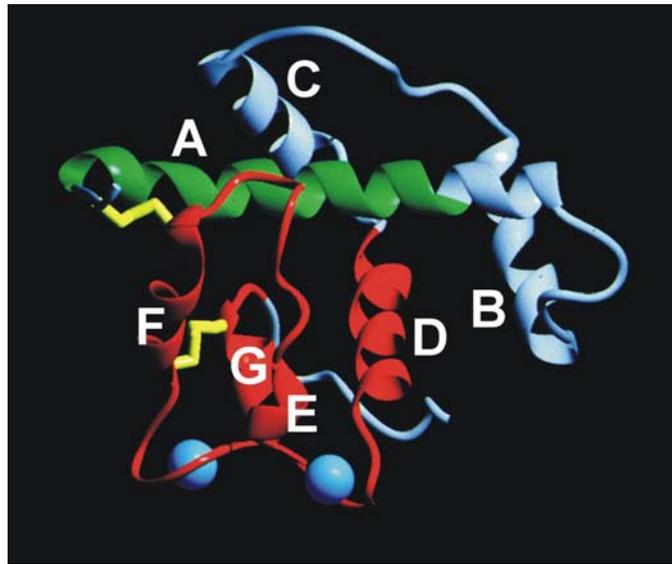


Abb. 1-2: Kristallstruktur der extrazellulären Calcium-bindenden (EC) Domäne von BM-40. Die lange aminoterminalen Helix A (grün) ist über die beiden Helices B und C (grau) mit den beiden EF-Händen (rot) verbunden. EF-Hand 1 wird durch Helix D und E und einer verbindenden Schleife, und EF-Hand 2 durch Helix F und G und einer verbindenden Schleife gebildet. Die Ca^{2+} -Ionen werden durch die blauen Kugeln dargestellt, Disulfidbrücken sind gelb. Entnommen aus Hohenester et al., 1996.

Die FS-Domäne enthält 10 Cysteine und weist eine Ähnlichkeit zu einer in Follistatin vorkommenden Domäne auf (Maurer et al., 1995). Follistatin ist ein sezerniertes Protein der TGF- β -Proteinfamilie und spielt als Antagonist von Activin und BMPs (Bone Morphogenetic Protein) während der Entwicklung eine Rolle (Nakamura et al., 1990; Iemura et al., 1998). Allerdings konnte für diese Domäne im BM-40 bislang keine Funktion entdeckt werden. Anhand der Kristallstruktur (Hohenester et al., 1997) konnte gezeigt werden, daß diese Follistatin-ähnliche Domäne aus einem N-terminalen β -hairpin und einem Proteinanteil mit

kleinem hydrophoben Kern aus α - und β -Strukturen besteht (Abb. 1-3), der eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Serin-Protease-Inhibitoren der Kazalfamilie aufweist.

Die Kontaktfläche zwischen der FS- und der EC-Domäne ist klein (550 \AA^2) und hauptsächlich polar. Dabei interagiert das Faltblatt $\beta 5$ und die vorhergehende Schleife der FS-Domäne über die EF-Hand 1 und die Schleife, die beide EF-Hände verbindet, mit der EC-Domäne. Interessanterweise ist an dieser Wechselwirkung auch das Histidin 224, welches an der *cis*-Peptidbindung in EF-Hand 1 beteiligt ist, involviert (Hohenester et al., 1996). Dieses Histidin ist auch in den homologen Proteinen SC1 (Johnston et al., 1990) und QR1 (Guermah et al., 1991) konserviert und macht eine ähnliche Interaktion der Domänen wahrscheinlich. Die FS-Domäne scheint auch einen stabilisierenden Effekt auf die EC-Domäne auszuüben, da die isolierte EC-Domäne Calcium mit einer 10-fach schwächeren Affinität bindet als BM-40 (Maurer et al., 1995; Busch et al., 2000).

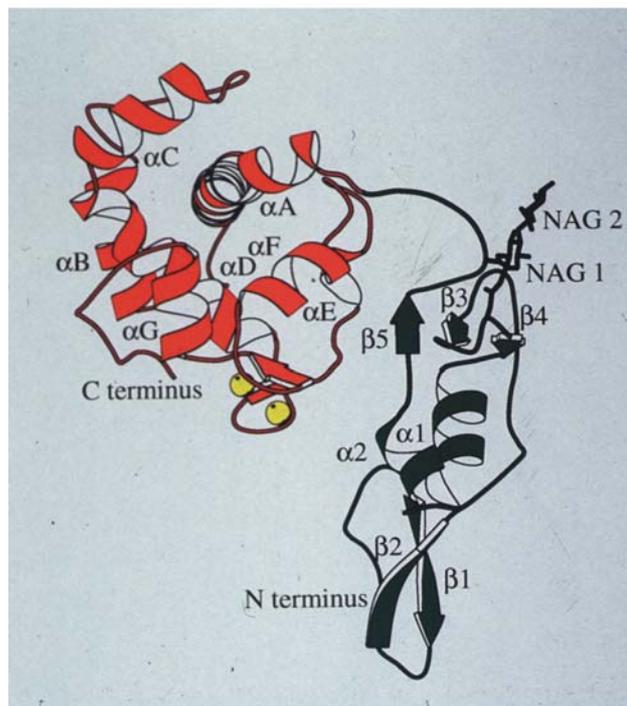


Abb. 1-3: Die Kristallstruktur des Domänenpaares FS-EC von BM-40. Diese schematische Zeichnung, die auf Röntgenstrukturdaten beruht, zeigt die FS-Domäne in grün, die EC-Domäne in rot und die gebundenen Ca^{2+} -Ionen als gelbe Kugeln. Die Glykosylierung der FS-Domäne ist durch die beiden ersten N-Acetylglucosamine (NAG-1, -2) angedeutet. Entnommen aus Hohenester et al., 1997. Nähere Erläuterungen im Text.

1.6 Die Proteine der BM-40 Proteinfamilie

Die Entdeckung extrazellulärer EF-Hand Motive in der EC-Domäne von BM-40 und die Tatsache, daß die Exon-Intron Grenzen der FS- und der EC-Domäne im Gen von BM-40 (McVey et al., 1988) alle die Phasengrenze 1-1 aufwiesen, die von mobilen Domänen bevorzugt wird (Patthy, 1991), führte zu der Frage, ob noch andere Proteine mit diesen beiden Domänen existieren. Eine Datenbanksuche ergab vier weitere Proteine, die diese Tandemanordnung von FS- und EC-Domäne enthielten. Dabei handelte es sich um SC1, das aus Rattenhirn isoliert wurde (Johnston et al., 1990), QR1 aus der Retina von Wachteln, das interessanterweise nach dem Schlüpfen der Wachteln nicht mehr nachzuweisen ist (Guermah et al., 1991), TSC-36, ein durch Behandlung von Osteoblasten mit dem Wachstumsfaktor TGF- β induziertes Protein (Shibanuma et al., 1993) und Testican, ein aus humaner Samenflüssigkeit isoliertes Proteoglykan (Alliel et al., 1993). Die Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek fügte zwei weitere Testicane hinzu (Vannahme et al., 1999), sowie die beiden Proteine SMOC-1 und -2 (Secreted MODular Calcium-binding protein; C. Vannahme, persönliche Mitteilung).

SC1 und QR1 haben den gleichen Domänenaufbau wie BM-40, zeichnen sich aber durch eine längere, sehr saure N-terminale Domäne aus. TSC-36 verfügt noch über eine zusätzliche C-terminale Domäne. Die Testicane unterscheiden sich durch eine Thyroglobulin-Domäne und einer nachfolgenden unbekanntem Domäne mit zwei Verankerungsstellen für Glykosaminoglykane. Die erst kürzlich klonierten Proteine SMOC-1 und -2 weichen von der für alle anderen Proteine geltenden Tandemanordnung der FS- und EC-Domäne ab und tragen zwei Thyroglobulin-Domänen sowie eine neue Domäne (Abb. 1-4).

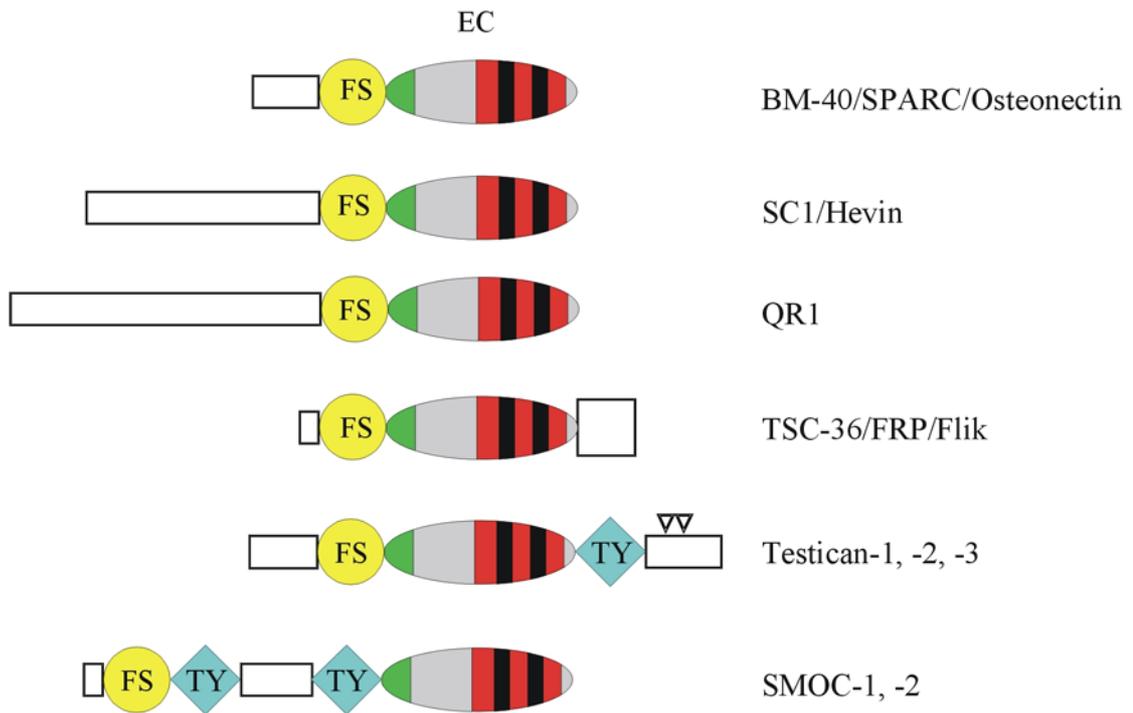


Abb. 1-4: Domänenorganisation der BM-40 Proteinfamilie. Alle Proteine sind durch eine extrazelluläre Calcium-bindende Domäne (EC) und eine Follistatin-ähnliche Domäne (FS) charakterisiert. Die Proteoglykan-Unterfamilie der Testicane sowie SMOC-1 und -2 verfügen über eine Thyroglobulin-ähnliche Domäne (TY). Die umgekehrten Dreiecke kennzeichnen potentielle Verankerungsstellen für Glykosaminoglykane. Offene Rechtecke stellen Domänen ohne erkennbare Homologien dar bzw. bei TSC-36 eine N-terminale Verlängerung von 12 Aminosäuren. Die dritte Domäne von TSC-36 weist jedoch eine schwache Ähnlichkeit mit einer halben von Willebrand Faktor C-Domäne auf.

1.6.1 Calciumbindung

Nachdem in anderen Proteinen EF-Hand Motive entdeckt wurden, konnten Vorhersagen zur Calciumbindung dieser Proteine gemacht werden (Abb. 1-5). Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der EF-Hände fällt auf, daß SC1 und QR1 dieselbe Insertion eines Prolins in der ersten EF-Hand wie BM-40 besitzen. TSC-36 hingegen hat in EF Hand 1 eine Aminosäuredeletion, die eine Bindung von Calcium nicht unbedingt in Frage stellt, wie die Röntgenkristallstrukturanalyse der *scallop myosin essential light chain* beweist (Xie et al., 1994). Bei den anderen EF-Händen handelt es sich um klassische Konsensus-Sequenzen (Nakayama und Kretsinger, 1994; Kretsinger et al., 1991). Die zweite EF-Hand der Testicane weicht mit einem Phenylalanin bzw. Tyrosin allerdings davon ab (Abb. 1-5).

| | EF-hand 1 | EF-hand 2 | exp. | vorhergesagt |
|---------------------|---------------|---------------|------|--------------|
| | * * * * | * * * * | | |
| BM-40 human | DQHPIDGYLSHTE | DLNDKYIALDE | + | + |
| BM-40 C. elegans | DQHPIDGYLSHTE | DLNDKYIALDE | + | + |
| BM-40 drosophila | DG.DTDRSVSRHE | DSNKDHRITLVE | ? | + |
| QR1 | DQHPMDRVLTHSE | DGDQDKLITLKE | ? | + |
| SC1 | DQHPVDRVLTHSE | DPNKDKHITLKE | ? | + |
| TSC-36 | D..NGDWKLSFQE | DENADWKLSFQE | ? | + |
| Testican-1 human | D.MNYDLLLDPSE | DSFKDGKLSNNE | + | + |
| Testican-2 human | D.TSADLFLDQTE | DTYKDGKRVSTAE | + | + |
| Testican-3 human | D.TNYDLLLDQSE | DTYKDSLISNNE | ? | + |
| Testican drosophila | D.LNNDGQLSLQE | DLDTSSINTRE | ? | + |
| SMOC-1 | D.ANSSNDINKRE | DLNKDKVISLPE | ? | + |
| SMOC-2 | D.KNSSGDIGKKE | DVNNDSKISVQE | ? | + |

Abb. 1-5: Sequenzvergleich der EF-Hand Motive der Proteine der BM-40 Proteinfamilie. Für alle Proteine ist eine Bindung von Calcium vorhergesagt. Eine experimentell bestätigte Calciumbindung ist unter *exp.* mit einem Pluszeichen versehen. Bei den klassischen EF-Hand Motiven sind an den Positionen 1, 3, 5 und 12 saure Aminosäuren zu finden, diese Positionen sind oben durch Sternchen gekennzeichnet und rot unterlegt, Abweichungen davon sind in violett bzw. grün unterlegt.

1.6.2 Kollagenbindung

Es wurde gezeigt, daß die Bindung von BM-40 an die fibrillären Kollagene Typ I, II, II und V und an das in Basalmembranen vorkommende Kollagen Typ IV Calcium-abhängig ist. Die Bindung von BM-40 an Kollagen Typ I scheint eine physiologische Bedeutung zu haben, da in Mäusen mit einem Null-Allel für Kollagen I, BM-40 nicht in der extrazellulären Matrix gebunden werden kann (Iruela-Arispe et al., 1996). Die Bindung weist eine moderate Affinität mit einem K_d von $\approx 1\text{-}2 \mu\text{M}$ auf. Die Bindungsstelle konnte in der EC-Domäne lokalisiert werden (Maurer et al., 1995; 1997; Sasaki et al., 1997). Durch eine zielgerichtete Mutagenese des Epitops für die Kollagenbindung konnte die Bindungsstelle innerhalb der EC-Domäne genauer lokalisiert und die fünf dafür essentiellen Aminosäuren bestimmt werden (Sasaki et al., 1998).

Da SC1/Hevin und QR1 eine Übereinstimmung der fünf für die Bindung notwendigen Aminosäuren mit BM-40 zeigt, konnte eine Bindung an Kollagen vorhergesagt werden. Für TSC-36, Testican-1, -2 und 3 und SMOC-1 und -2 wurde aufgrund der fehlenden Homologie keine Kollagenbindung erwartet (Abb. 1-6).

| | Helix α A | Linker | Kollagenbindung | |
|---------------------|------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| | | | exp. | vorhergesagt |
| | * * | * ** | | |
| BM-40 human | RMRDWLKN | LIPME | + | |
| BM-40 C.elegans | RMADWLFQ | VIPME | + | + |
| BM-40 drosophila | RMRDWLFN | LVSLE | ? | + |
| QR1 | RMRDWLKN | LVPME | ? | + |
| SC1 | RMRDWLKN | LVPME | ? | + |
| | | 7 | | |
| TSC-36 | RIIQWELE | NETAI | ? | - |
| Testican-1 human | RLKDWFGA | LDKYE | - | - |
| Testican-2 human | RLRDWFQL | LDKYE | ? | - |
| Testican-3 human | RLRDWFKA | LDKNE | ? | - |
| Testican drosophila | RLLDWFSV | HDQNE | ? | - |
| SMOC-1 | SLLDALTT | LRKKS | ? | - |
| SMOC-2 | SVLDALST | VKKKA | ? | - |

Abb. 1-6: Sequenzvergleich der Helix α -A der EC-Domäne und der Verbindungsregion (Linker) zwischen den beiden EF-Händen von BM-40 und mit den entsprechenden Regionen der anderen Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie. Eine experimentell bestätigte Kollagenbindung ist unter *exp.* mit einem Pluszeichen versehen. Die für die Kollagenbindung essentiellen Aminosäuren sind mit einem Sternchen versehen (Sasaki et al., 1998).

1.7 SC1/Hevin

SC1 ist mit einer Ähnlichkeit von 70% auf Aminosäureebene das am nächsten zu BM-40 verwandte Protein, unterscheidet sich aber durch eine sehr viel längere saure N-terminale Domäne I. SC1 wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpergemisches gegen Glykoproteine aus dem synaptischen Spalt aus einer Rattenhirn cDNA-Bank kloniert (Johnston et al., 1990). SC1 wird während der Entwicklung im Gehirn bzw. Cerebellum (Mendis et al., 1994; 1996; Mothe et al., 2000) und nach der Traumatisierung des Gehirns in der reaktiven Astrocytose (McKinnon et al., 1996; Mendis et al., 1996; 2000) exprimiert. SC1 mRNA wird

bereits an Tag 8,5 der Embryonalentwicklung exprimiert (Ringuette et al., 1998) und ist während der Entwicklung in vielen Geweben zu finden, nach Tag 12 beschränkt sich die Expression überwiegend auf das sich entwickelnde Nervensystem (McKinnon et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, daß SC1 von Astrocyten synthetisiert wird (McKinnon et al., 1996). SC1 interagiert mit B-Vorläufer-Zellen (Oritani und Kincade, 1996) und regt diese zusammen mit Interleukin-7 zur Proliferation an (Oritani et al., 1997) und könnte somit eine Rolle in der Lymphopoese spielen. Das humane Orthologe zu SC1 trägt den Namen Hevin, weil es aus einer cDNA-Bibliothek aus Hoch-Endothelzellen (High Endothelial Venules) der Tonsillen kloniert wurde (Girard und Springer, 1995). Diese Hoch-Endothelzellen bilden die Übergänge zwischen Lymphsystem und Blutbahn und sind z.B. in den Mandeln und Lymphknoten zu finden. Für Nicht-Kleinzell Lungenkrebs und metastasierende Prostata Adenocarcinome und andere Carcinome konnte eine Herunterregulation von Hevin nachgewiesen werden (Bendik et al., 1998; Nelson et al., 1998; Claeskens et al., 2000).

In-vitro Versuche zeigten, daß Hevin die Bildung von Fokal-Kontakten unterbindet und so die Anheftung und Ausbreitung von Endothelzellen an ein Substrat verhindert (Girard und Springer, 1996). Diese "antiadhesiven" Eigenschaften konnten auch bei BM-40 festgestellt werden (Goldblum et al., 1994; Lane and Sage 1994).

Das Gen für SC1 besteht aus elf Exons und konnte dem Chromosom 5 der Maus zugeordnet werden (McKinnon et al., 1996), die Inaktivierung dieses Gens führte zu keinem offensichtlichen Phänotyp (McKinnon et al., 2000). Weder durch histologische noch durch immunhistochemische Untersuchungen konnten anatomische Veränderungen festgestellt werden. Auch die Analyse der reaktiven Astrocytose nach einer Traumatisierung des Gehirns, zeigte im Vergleich zu Kontroll-Mäusen keinen Unterschied.

Die biologische Funktion von SC1 konnte bisher nicht aufgeklärt werden, doch die in vielen Geweben überlappende Expression könnte zu einer Kompensation der Funktion von SC1 durch BM-40 führen (Soederling et al., 1997). Die Kreuzung SC1-defizienter Mäuse mit BM-40-defizienten Mäusen wird vielleicht weiteren Aufschluß über die Funktion dieser beiden Proteine geben.

1.8 TSC-36/FRP/Flik

TSC-36 ist ein extrazelluläres Glykoprotein und weist am wenigsten Ähnlichkeit zu BM-40 auf. Der erste Teil von TSC-36 umfaßt nur 12 Aminosäuren. An die EC-Domäne schließt sich

eine weitere Domäne mit schwacher Homologie zu einer von Willebrand-Faktor C-Domäne an. TSC-36 (TGF- β Stimulated Clone 36) wurde als TGF- β induziertes Protein aus einer Osteoblastenzelllinie der Maus kloniert. In Fibroblasten konnte die Expression von TSC-36 durch Transfektion mit den Onkogenen *v-ras* und *v-myc* unterdrückt werden. Die Onkogene *v-src*, *v-raf* und *v-abl* hatten jedoch keinen Einfluß auf die Expression (Mashimo et al., 1997). TSC-36 mRNA konnte in aggressiven, stark proliferierenden Lungenkrebszelllinien nicht nachgewiesen werden. Eine Überexpression in diesen Zellen zeigte eine antiproliferative Wirkung (Sumitomo et al., 2000). Mit Hilfe einer subtraktiven cDNA-Bibliothek nicht transformierter bzw. *v-fos* transformierter Fibroblasten (FBR-*v-fos*), wurde TSC-36 als eines in *v-fos* transformierten Zellen herunterreguliertes Gen entdeckt. In einem *in-vitro* Assay zur Tumorinvasion wanderten die FBR-*v-fos*-Zellen, die mit einem Vektor zur Expression von TSC-36 transfiziert waren, nicht in das Matrigel im Gegensatz zu den untransfizierten Zellen. Aufgrund dieser Tatsache wird TSC-36 auch eine antiinvasive Wirkung zugeschrieben (Johnston et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von TSC-36 durch Östrogen und Tamoxifen hochreguliert wird (Ohashi et al., 1997).

Das orthologe Protein der Ratte wurde zufällig bei der Reinigung einer extrazellulären Superoxid-Dismutase entdeckt und gereinigt. Mit Hilfe von degenerierten Primern wurde die vollständige cDNA-Sequenz des Proteins aus Ratte und Mensch ermittelt (Zwijssen et al., 1994). Mit Hilfe von Antikörpern, die aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis isoliert wurden, konnte TSC-36 als Autoantigen aus einer λ -Phagen-Expressionsbibliothek kloniert werden (Tanaka et al., 1998).

Flik (Follistatin-like), das orthologe Protein aus dem Huhn, wurde aus einer embryonalen cDNA-Bank kloniert. Flik wurde eine mögliche Rolle bei der mesodermalen Dorsalisation, der neuralen Induktion (Patel et al., 1996) und bei der nachfolgenden Aufrechterhaltung der *sonic hedgehog* vermittelten Signalkaskade in der *midline* (Towers et al., 1999) während der embryonalen Entwicklung des Huhns zugeschrieben. Dabei ist es auch in der Kompartimentbildung der Somiten und der Myogenese involviert (Amthor et al., 1996). In der Mausentwicklung wird TSC-36 ab Tag 7,5 der Embryogenese exprimiert (De Groot et al., 2000). Für *Xenopus* TSC-36 konnte mit dem Beginn der Gastrulation, am Tag 10 der embryonalen Entwicklung eine Expression nachgewiesen werden. Die genaue biologische Funktion von TSC-36 konnte bisher nicht aufgeklärt werden (Okabayashi et al., 1999).

1.9 Die physiologische Bedeutung von Calcium

Calcium spielt eine wichtige Rolle für die Struktur und Funktion eines lebenden Organismus und ist das am meisten vertretene Kation im Körper. Bei Erwachsenen sind 99% des Calciums als Hydroxylapatit in Knochen und Zähnen eingebaut. Neben der mechanischen Funktion dient der Knochen auch als Calciumspeicher. Extrazelluläres Calcium macht ungefähr 0,1% aus und ist hauptsächlich im Serum zu finden, wo ca. 40% vorwiegend an Albumin, aber auch an Globuline, 5% an Phosphat, Citrat und Laktat gebunden ist. Ionisiertes freies Calcium macht ca. 55% aus (Krück, 1994). Die Konzentration von extrazellulärem Calcium liegt bei 1,1-1,3 mM und wird strengstens reguliert. Abweichungen davon führen zu pathologischen Erscheinungen, wie z.B. Mikrocalcificationen in Augen und Knorpel, Herzflimmern, Verhaltensänderungen und sogar Koma (Perault-Straub et al., 1990; Norris et al., 1991; Robertson et al., 1981). Die Konzentration von freiem Calcium im Cytosol von Zellen liegt bei 0,1 μM und kann bei Aktivierung der Zelle auf 10 μM ansteigen (Davis, 1990; Skelton et al., 1995). Intrazellulär haben Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Aufgabe als sekundäre Botenstoffe bei intrazellulären Signalkaskaden und bei der Übersetzung von extrazellulären Signalen, die zu der Freisetzung von Neurotransmittern, Zellteilung, Muskelkontraktion und Apoptose führen, dabei unterliegt die intrazelluläre Calcium-Konzentration auch einer strengen Regulation (Berridge, 1997). Ein wichtiges intrazelluläres Signalprotein ist das Calmodulin, daß Calcium-abhängig an über 100 verschiedene Zielproteine binden kann (Celio et al., 1997). Dabei kommt es durch die Bindung von vier Calcium-Ionen in den zwei EF-Hand Paaren des Calmodulin zu einer Konformationsänderung die eine Interaktion mit den Zielproteinen ermöglicht (Cazin, 1995).

Die Bedeutung von extrazellulärem Calcium bei der Vermittlung von Matrix-Matrix-, Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten wird durch die selektive Isolierung von extrazellulären Matrixproteinen aus verschiedenen Geweben mit EDTA (Paulsson et al., 1987; Mörgelin et al., 1992) und die Störung der Zell-Zell-Adhesion bzw. Zellmigration durch EDTA (Takeichi, 1995) belegt. Für extrazelluläres Calcium sind viele statische Funktionen bekannt, z.B. die Stabilisierung von Proteinstrukturen, Bildung supramolekularer Strukturen, Bildung von aktiven Zentren in Enzymen und Calcium-Transport (McPhalen et al 1991). Bei den Zink-abhängigen Matrix-Metalloproteasen (MMP) z.B. stabilisiert Calcium wahrscheinlich Strukturen die für die Substratbindung verantwortlich sind (Dhanaraj et al., 1996). MMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Morphogenese, Wundheilung (Woessner, 1991) bzw. bei rheumatoider Arthritis und der Metastasierung von Tumoren (Docherty et al., 1992). Für die Ver-

mittlung von Matrix-Matrix-Kontakten ist die Calcium-abhängige Bindung von BM-40 und Kollagen IV ein Beispiel. Calcium-Ionen sind auch bei der Blutgerinnung von Bedeutung, indem sie Prothrombin über γ -Carboxyglutamat an Phospholipidmembranen binden, die nach einer Verletzung aus Blutplättchen entstanden sind. γ -Carboxyglutamatreste existieren auch in den Faktoren VII, IX und X der Blutgerinnungskaskade, sowie in Osteocalcin, welches für die Knochenbildung wichtig ist.

Es gibt einige Kompartimente im Körper bei denen die Calcium-Konzentration nicht mit der des Blutes übereinstimmt. Ein Anstieg des extrazellulären Calcium-Spiegels innerhalb einer halben Stunde nach der Geburt scheint zum Beispiel wichtig für die richtige Atmung zu sein, da die Funktion des Lungen *surfactants* auf hohe Calcium-Konzentrationen angewiesen ist (Strang, 1991). Calcium-Gradienten sind auch bei der Knochenresorption, in der Haut (Menon et al., 1994) und im Gehirn beobachtet worden. Hier wurden während normalen und pathologischen Prozessen, z.B. Gehirnverletzungen und Epilepsien, Calcium-Konzentrationen bis hinab zu 0,1 mM gemessen (Nicholson, 1980; Jefferys, 1995). Es wäre somit denkbar, daß Calcium-Ionen bei diesen Prozessen nicht nur strukturelle Aufgaben erfüllen, sondern vielleicht an der Vermittlung und Modulation von Signalen beteiligt sind (Maurer et al., 1996).

II Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie strukturell und funktionell näher charakterisiert werden. Es handelt sich dabei um SC1, welches eine 70%ige Homologie auf Aminosäureebene zu BM-40 aufweist und TSC-36, welches weniger homolog zu BM-40 ist. Beide Proteine besitzen eine extrazelluläre Calcium-bindende-(EC)-Domäne deren Funktion weitgehend unbekannt ist. Die rekombinante Expression in einem eukaryontischen Zellsystem sollte eine korrekte Faltung und posttranslationale Modifikationen sicherstellen. Es sollten verschiedene Proteinfragmente exprimiert und gereinigt werden. Mit Hilfe der Proteine sollten spezifische Antiseren hergestellt werden, um eine immunochemische Analyse der Expression der Proteine in Zelllinien und Geweben durchzuführen. Aufgrund der EC-Domäne wurde eine Calciumbindung vorhergesagt, diese sollte mittels CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie nachgewiesen werden. Durch Festphasen-Immunoassays sollten potentielle Bindungspartner ermittelt werden und mit Hilfe der verschiedenen Fragmente sollte eine Lokalisation der Bindungsdomäne erfolgen. In diesem Zusammenhang sollte insbesondere die in der EC-Domäne befindliche Kollagenbindungsdomäne untersucht werden. In Zusammenarbeit mit Erhard Hohenester (Birkbeck College, London) sollte versucht werden einzelne Proteine zu kristallisieren. Durch die Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen, dieser beiden innerhalb der BM-40 Proteinfamilie sehr unterschiedlichen Mitglieder, wurde ein tieferes Verständnis der Funktion der EC-Domänen erwartet.

III Ergebnisse SC1

3.1 Rekombinante Expression und Reinigung des SC1 und seiner Fragmente

3.1.1 Rekombinante Expression des SC1 und seiner Fragmente

SC1 besteht aus drei Domänen. Zusätzlich zu dem vollständigen SC1 wurden noch drei weitere Proteine rekombinant exprimiert, um den Domänenaufbau zu charakterisieren, die Bindungsstellen potentieller Bindungspartner zu lokalisieren, Kristallisationsversuche zu unternehmen, die Bindung von Calcium zu untersuchen und Antikörper zu produzieren. Es handelt sich um das Domänenpaar aus der ersten sehr sauren Domäne I und der Follistatin-ähnlichen Domäne FS, dem Domänenpaar aus FS- und der extrazellulären Calciumbindenden Domäne EC und der EC-Domäne alleine. Das Protein I-FS_{tag} verfügt N-terminal noch über ein Bindungsmotiv, um eine einfachere Identifikation und Reinigung zu ermöglichen (Abb. 3-1).

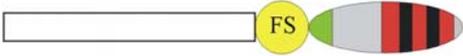
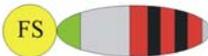
| | Bezeichnung | DNA [bp] | MW _{theoret.} [Da] | pI _{theoret.} |
|---|---------------------|----------|-----------------------------|------------------------|
|  | SC1 fl | 1911 | 70986 | 4,49 |
|  | I-FS _{tag} | 1581 | 57632 | 4,31 |
|  | FS-EC | 711 | 27473 | 6,95 |
|  | EC | 468 | 18585 | 6,14 |

Abb. 3-1: Rekombinant exprimierte SC1-Fragmente. Das Rechteck bezeichnet die Domäne I, FS steht für die Follistatin-ähnliche Domäne und das Oval repräsentiert die extrazelluläre Calcium-bindende (EC)-Domäne. Die beiden schwarzen Balken stellen die zwei EF-Hand Motive dar. Bei *tag* handelt es sich um eine Proteinsequenz aus 6 Histidinen, der myc Antikörpererkennungsstelle und einer Enterokinaschnittstelle. SC1 fl (full-length) ist die Bezeichnung für das vollständige Protein und I-FS_{tag}, FS-EC und EC für die anderen Proteine. Außerdem sind die Länge der cDNA, das theoretische Molekulargewicht und der theoretische pI angegeben.

Proteine der extrazellulären Matrix werden meistens posttranslational modifiziert, dazu gehören u.a. die Bildung von Disulfidbrücken und Glykosylierungen. Es wurden eukaryontische Expressionssysteme gewählt, um eine richtige Verknüpfung der Disulfidbrücken und damit eine korrekte Faltung sicherzustellen. Die Domänengrenzen wurden nach einem strukturbasierten Homologievergleich mit der durch Röntgenkristallographie bestimmten Raumstruktur von BM-40 (Hohenester et al., 1997) ausgewählt.

3.1.1.1 Klonierung der SC1 Fragmente

Die cDNA von SC1 wurde von Dr. Peter McKinnon, St. Jude Children's Hospital, Memphis, Tennessee (USA) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe geeigneter Primerpaare wurden die den Fragmenten entsprechenden cDNA-Sequenzen mittels PCR amplifiziert. Die Ligation in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) erfolgte über die durch Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen Nhe I und Not I. Der Vektor pCEP-Pu trägt das EBNA-Gen und ein Gen für Puromycinresistenz. Das EBNA-Gen (Epstein-Barr Nuclear Antigen) kodiert für ein virales DNA-bindendes Protein, dessen Bindungsstelle im *oriP*-Bereich des Vektors pCEP-Pu liegt und somit eine episomale Replikation des Plasmids und eine stabile Verteilung auf die proliferierenden Zellen sicherstellt. Die EBNA-293 Zellen tragen ebenfalls das EBNA-Gen, um eine hohe Expression zu gewährleisten. Die sich am 5'-Ende der multiplen Klonierungssequenz befindende Sequenz für das Signalpeptid von BM-40 führt zu einer N-terminalen Extension der exprimierten Proteine. Dieses Signalpeptid führt zur Sekretion der Proteine in das extrazelluläre Medium und wird während der Passage durch das endoplasmatische Reticulum abgespalten, wobei die vier Aminosäuren APLA zurückbleiben. Bei dem Expressionsvektor für das Konstrukt I-FS_{tag} befinden sich nach Abspaltung des BM-40-Signalpeptids noch 44 Aminosäuren am N-Terminus.

Alternativ wurde die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 verwendet, welche schon erfolgreich von Nischt et al. (1991) zu Expression von extrazellulären Proteinen eingesetzt wurde. Zur Transfektion der HT1080 Zellen wurde die DNA-Sequenz für das SC1 fl sowie das BM-40-Signalpeptid in den Vektor pRcCMV umkloniert.

Nach der Klonierung der Fragmente in die Expressionsvektoren wurde durch Sequenzierung sichergestellt, daß keine ungewollten Mutationen eingeführt wurden und daß sich die Sequenzen im richtigen Leseraster zum Signalpeptid befinden.

3.1.1.2 Expression der SC1-Fragmente in HT1080 bzw. EBNA-293 Zellen

Zur rekombinanten Expression wurden die EBNA-293 Zellen mit 5 µg DNA elektroporiert. Die Selektion mit Puromycin wurde nach 48 Stunden begonnen und war nach zwei Wochen abgeschlossen. Nach Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium wurden die Zellkulturüberstände nach TCA-Fällung mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fragmente FS-EC und EC zeigten eine hohe Expression und wurden subkultiviert. Die konfluenten Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen kultiviert und alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die Überstände wurden nach der Ernte mit Proteaseinhibitoren versetzt und gesammelt.

Das Protein SC1 fl wurde nur schwach exprimiert und außerdem konnte im Immunoblot ein Abbau des Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3-2), deswegen wurden HT1080 Zellen als Alternative gewählt. Der Vektor pRcCMV/SC1 fl wurde in die Zellen transfiziert und die Zellen auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen verteilt. Nach der Selektion mit G418, die nach 6 Wochen beendet war, wurden die positiven Klone auf ihre Expression hin untersucht und der Klon mit der stärksten Expression ausgewählt. In den HT1080 Zellen kam es auch zu einem Abbau des Proteins, welcher durch Zugabe von nicht cytotoxischen Proteaseinhibitoren wie Aprotinin, Leupeptin und Ovomuroid in das Zellkulturmedium nicht verhindert werden konnte (Abb. 3-2). Da die Expression des I-FS in den EBNA-293 Zellen nur sehr schwach war, wurde dieses Konstrukt in eine Variante des Plasmids pCEP-Pu mit N-terminalem Histidin-myc Motiv kloniert und in EBNA-293 Zellen exprimiert, um die Reinigung zu vereinfachen.

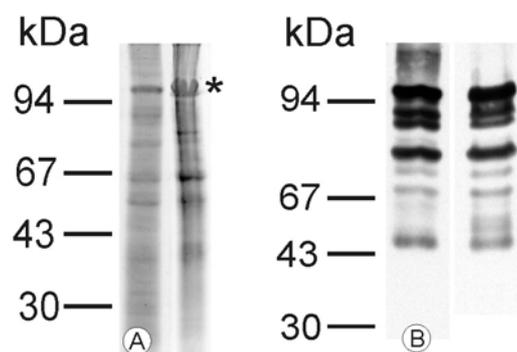


Abb. 3-2: Expression von SC1 fl in EBNA-293 Zellen und in HT1080 Zellen. A: 1 ml serumfreier Zellkulturüberstand (links: EBNA-293-, rechts: HT1080-Überstand) wurde mit TCA gefällt, in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt. Die stärkere Expression des SC1 fl bei ca. 110 kDa (Sternchen) in HT1080 Zellen ist auf der rechten Seite deutlich zu erkennen. B: Im Immunoblot analysierte Zellkulturüberstände. Der Antikörper gegen SC1 zur Detektion der Banden wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und charakterisiert (s. 3.5). Auf der

linken Seite ist der proteolytische Abbau des SC1 in EBNA-293 Zellen zu sehen. Auf der rechten Seite wurde während der Kultivierung mit Leupeptin, Aprotinin und Ovomucoïd versetzter Überstand von HT1080 Zellen analysiert. Der Wechsel des Expressionssystems führte zu keiner Änderung des proteolytischen Abbaus und konnte auch nicht durch nicht cytotoxische Proteaseinhibitoren verhindert werden.

3.1.2 Isolierung der SC1-Fragmente

Die Reinigung der Proteine erfolgte in allen Fällen unter nicht denaturierenden Bedingungen, um die ursprüngliche Faltung zu erhalten. Die Isolierung nativer Proteine ist wichtig für die Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie, die Untersuchung der Calciumbindung, Kristallisationsversuche und Bindungsstudien. Bei der Suche nach Interaktionspartnern könnte eine Denaturierung der Proteine zu unspezifischen Wechselwirkungen führen. Auch zur Gewinnung von Antikörpern und deren Funktionalität in der Immunhistochemie ist die korrekte Faltung der Proteine unter Umständen von Bedeutung.

3.1.2.1 Aufreinigung des rekombinanten SC1

Der theoretische isoelektrische Punkt des rekombinant exprimierten SC1 liegt bei 4,32. Der serumfreie Zellkulturüberstand wurde gegen 20 mM BisTris, pH 7,0, dialysiert und auf eine Anionenaustauschersäule mit DEAE-Fast Flow-Matrix aufgetragen, die zuvor mit 20 mM BisTris, pH 7,0, äquilibriert wurde. Bei der Elution mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 1 M NaCl wurden die SC1 enthaltenden Fraktionen von 260-330 mM NaCl aufgefangen und gesammelt. Eine weitere Reinigung konnte durch Rechromatographie auf einer Q-Sepharose FF-Säule erzielt werden. Die bei 350-390 mM eluierten SC1 enthaltenden Fraktionen wurden gegen 10 mM Natriumphosphat, pH 7,0, dialysiert und auf eine Heparin HiTrap Säule gegeben; SC1 eluierte bei 220 mM NaCl. Nach einer Aufkonzentration auf einer ResourceQ-Säule äquilibriert in 20 mM BisTris, pH 6,0, wurden die SC1 enthaltenden Fraktionen auf eine Gelfiltrationssäule mit Sephadex G-75 Matrix gegeben, die mit 5 mM Tris, pH 7,4, äquilibriert war. Abschließend erfolgte eine erneute Aufkonzentrierung auf einer ResourceQ-Säule und anschließende Dialyse gegen 5 mM Tris, pH 7,4. Gereinigtes SC1 fl ist unter reduzierenden sowie nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE als Bande bei 110 kDa zu sehen (Abb. 3-3).

3.1.2.2 Aufreinigung des rekombinanten Proteins I-FS_{tag}

Der Zellkulturüberstand wurde gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 8,2, mit 100 mM NaCl dialysiert und auf eine Affinitätssäule mit Cobalt-Talon-Matrix aufgetragen. Die bei 20-70 mM Imidazol eluierenden, das Protein I-FS_{tag} enthaltenden, Fraktionen wurden gesammelt und auf einer Gelfiltrationssäule (Sephadex G-75, äquilibriert mit TBS, pH 7,4) zur Homogenität gereinigt. Das Protein läuft in der SDS-PAGE bei ungefähr 95 kDa (Abb. 3-3).

3.1.2.3 Aufreinigung des rekombinanten Proteins FS-EC

Das Konstrukt FS-EC hat einen theoretischen pI von 6,95. Der serumfreie Zellkulturüberstand wurde gegen 50 mM Tris, pH 8,6, dialysiert und anschließend auf eine DEAE-FF-Säule gegeben. Durch N-terminale Ansequenzierung konnte das im Durchfluß vermutete Protein nachgewiesen werden. Zur weiteren Reinigung wurde der Durchfluß gegen 50 mM NaOAc, pH 4,9, dialysiert und auf eine SP-Sepharose-Säule geladen. Nach Elution mit einem linearen Gradienten bis 1 M NaCl wurden die, das rekombinante Protein enthaltenden, Fraktionen von 350-770 mM NaCl gesammelt. In einer Ultrafiltrationseinheit wurde das Volumen reduziert und danach auf eine Gelfiltrationssäule mit Sephadex G-50 Matrix äquilibriert in 200 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,6, aufgetragen. Nach Konzentration auf einer ResourceS-Säule (äquilibriert in 20 mM MES, pH 6,0) wurde das Protein gegen 5 mM Tris, pH 7,4, dialysiert und aliquotiert. Das FS-EC-Domänenpaar zeigt unter reduzierenden Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht in der SDS-PAGE von 30 kDa, und unter nicht reduzierenden Bedingungen von 33 kDa (Abb. 3-3).

3.1.2.4 Aufreinigung des rekombinanten Proteins EC

Der theoretische pI der EC-Domäne liegt bei 6,6. Nach Dialyse des Zellkulturüberstandes gegen 50 mM Tris, pH 8,6, sollte dieses Protein an einen DEAE FF-Anionenaustauscher binden, wurde aber ebenso wie das FS-EC-Domänenpaar im Durchfluß gefunden, was auch durch N-terminale Ansequenzierung bestätigt wurde. Zur weiteren Reinigung wurde der pH-Wert des Durchflusses auf 9,0 eingestellt und zur Aufkonzentrierung auf eine HiTrapQ-Säule gegeben. Das Protein wurde mit 500 mM NaCl eluiert und das Volumen durch anschließende Ultrafiltration weiter reduziert. Danach erfolgte eine Gelfiltration auf einer Sephadex G-75 Säule, die in 5 mM Tris, pH 7,4, äquilibriert war. Die EC-Domäne zeigt in guter Übereinstimmung mit ihrem theoretischen Molekulargewicht eine Bande bei 17 kDa (Abb. 3-3).

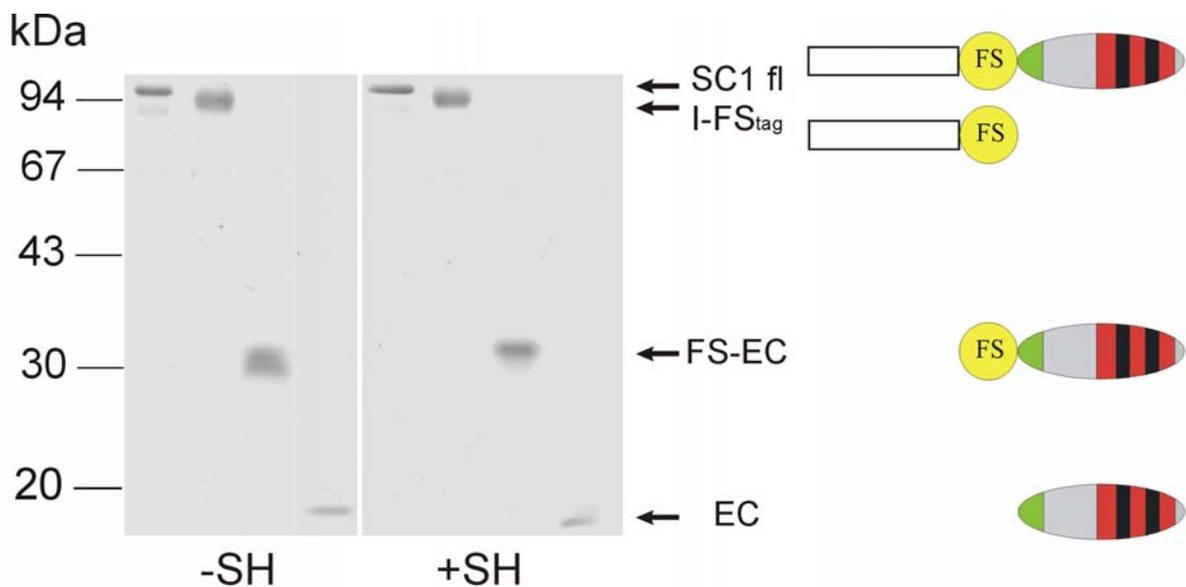


Abb. 3-3: Rekombinant exprimierte SC1-Fragmente. Die bis zur Homogenität gereinigten Proteine wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (+SH: unter reduzierenden Bedingungen, -SH: unter nicht reduzierenden Bedingungen) und mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt.

3.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem SC1

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die molekulare Erscheinungsform des SC1 untersucht. Die dabei verwendete Methode wird als Negativkontrastierung bezeichnet. Bei SC1 handelt es sich um Monomere mit einer Länge von ca. 25 nm. Sie bestehen aus einer globulären Einheit mit einem Durchmesser von ca. 9,5 nm, an die sich eine längliche flexible Einheit von ca. 15,5 nm anschließt (Abb. 3-4).

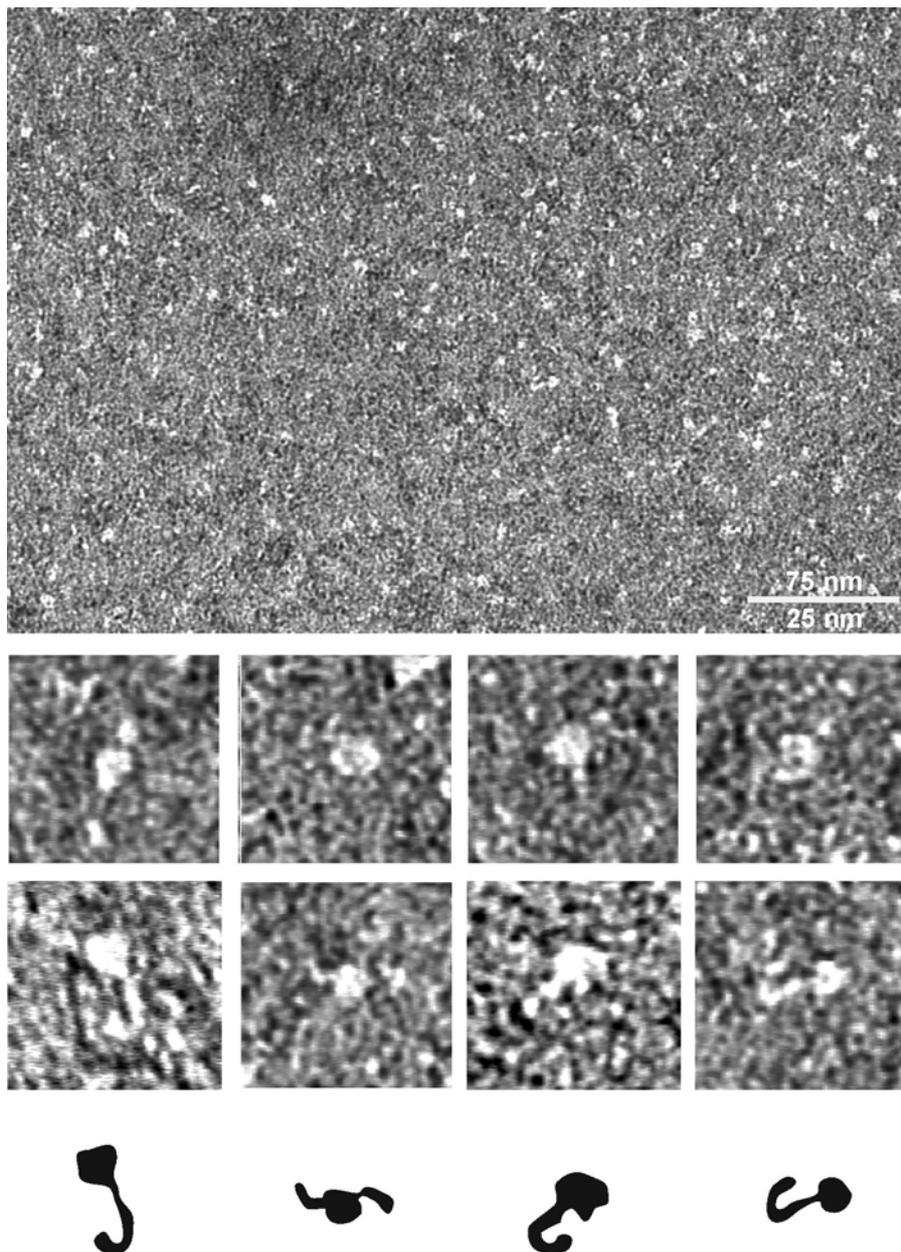


Abb. 3-4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinant exprimiertem SC1 fl nach Negativkontrastierung mit Uranylformiat. Der Balken entspricht 75 nm im oberen Bild und 25 nm in den unteren Einzelaufnahmen der SC1-Moleküle. Unterhalb der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Erscheinungsformen des SC1 schematisch wiedergegeben.

3.3 Massenspektrometrische Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine und ihrer posttranslationalen Modifizierungen

Die massenspektrometrische Analyse der Proteine wurde mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Reflex III, Bruker) durchgeführt. Es wurden die Massen der gereinigten Proteine bestimmt, als auch ihre Massen nach Behandlung mit N-Glykosidase F bzw. Endoglykosidase H (Tab. 1). SC1 verfügt über vier potentielle N-Glykosylierungsstellen, drei befinden sich auf Domäne I bei Asn 12, 131 und 151, eine weitere auf der FS-Domäne bei Asn 444.

Tab. 3-1: Massenspektrometrisch bestimmte Molekulargewichte (MW) der rekombinant exprimierten Proteine. Es wurden jeweils 20 pmol der Proteine (nicht reduziert) vermessen. Die eingeklammerten Werte stellen zusätzliche Signale dar, die einen unvollständigen Abbau durch die Glykosidasen anzeigen.

| | SC1 fl | I-FS _{tag} | FS-EC | EC |
|--|--------|---------------------|------------------|-------|
| MW _{theoretisch} [Da] | 70986 | 57632 | 27473 | 18585 |
| MW _{bestimmt} [Da] | 87775 | 74367 | 29583 | 18589 |
| mittleres MW nach N-Glykosidase F [Da] | 83017 | 69575 | 27474 (29395) | 18606 |
| mittleres MW der N-Glykane [Da] | 4758 | 4792 | 2109 | 0 |
| mittleres MW der restlichen posttranslationalen Modifikationen [Da] | 12031 | 11943 | 0 | 17 |
| mittleres MW nach Endoglykosidase H [Da] | 85335 | 71984 | 27769 (29524) | 18606 |
| mittleres MW der <i>high</i> -Mannose- bzw. <i>hybrid</i> -Zucker [Da] | 2440 | 2383 | 1814 | 0 |

Alle rekombinant exprimierten Proteine, mit Ausnahme der EC-Domäne, wurden posttranslational modifiziert. Aus der Tabelle kann man entnehmen, daß die N-glykosidisch gebundenen Zucker ungefähr 4,8 kDa ausmachen, wovon sich ca. 2,7 kDa auf die Domäne I und 2,1 kDa auf die FS-Domäne verteilen. Es befinden sich ca. 12 kDa an posttranslationalen Modifikationen auf der Domäne I, die nicht auf eine N-Glykosylierung zurückzuführen sind. Der Anteil der *high*-Mannose- bzw. *hybrid*-Zucker beträgt ca. 2,4 kDa. Der Glykan-Anteil auf

dem Domänenpaar FS-EC ist überwiegend Endoglykosidase H sensitiv. Die EC-Domäne selbst trägt keine posttranslationalen Modifikationen.

3.4 Untersuchungen zur Calciumbindung und Sekundärstruktur

3.4.1 CD-Spektroskopie

Zur Analyse der Sekundärstruktur der verschiedenen Proteine wurden CD-Spektren aufgenommen. Aufgrund der beiden EF-Hand Motive in der EC-Domäne von SC1 (Abb. 3-5) wurde eine Änderung der Konformation durch Zugabe von Calcium erwartet. Um diese Frage zu klären, wurden die Spektren nach Zugabe von Calcium bzw. EDTA gemessen. Nachdem die Spektren auf die spezifische Elliptizität normiert worden sind, erfolgte die theoretische Berechnung der Sekundärstrukturanteile mit dem Programm SELCON (Tab. 2).

Die CD-Spektren für SC1 fl und I-FS_{tag} deuten mit einem Minimum bei 200 nm auf einen großen Anteil an ungeordneten Strukturen hin. Mit SELCON wurde für SC1 fl 29% und für I-FS_{tag} 36% an ungeordneten Elementen berechnet. Ihr Gehalt an α -Helix ist mit 12% bzw. 11% gering. Die Proteine FS-EC und EC weisen mit 18% bzw. 22% einen geringeren Gehalt an ungeordneten Elementen auf. Die EC-Domäne verfügt mit 32% über den größten α -Helix-Anteil, gefolgt von dem Domänenpaar FS-EC mit 21%. Der Sekundärstrukturanteil an β -Faltblättern wurde für SC1 fl und I-FS_{tag} auf 31% bzw. 25% bestimmt und für FS-EC und EC auf 30% bzw. 18%.

Eine Calcium induzierte Änderung der Sekundärstruktur wurde durch Vergleich von CD-Spektren vor und nach Zugabe von Calcium zu in Puffer gelöstem Protein untersucht. Die Reversibilität der Konformationsänderung wurde durch anschließende Zugabe eines Überschusses EDTA untersucht. Um auszuschließen, daß das Protein im Puffer (ungefähr 3-20 μ M Calcium) in der Calcium-gesättigten Form vorliegt, wurde in parallelen Ansätzen auch 2 mM EDTA zu im Puffer gelöstem Protein gegeben (Abb. 3-5). Die Fragmente I-FS_{tag}, FS-EC und EC des SC1 zeigten dabei eine reversible Änderung der Sekundärstruktur.

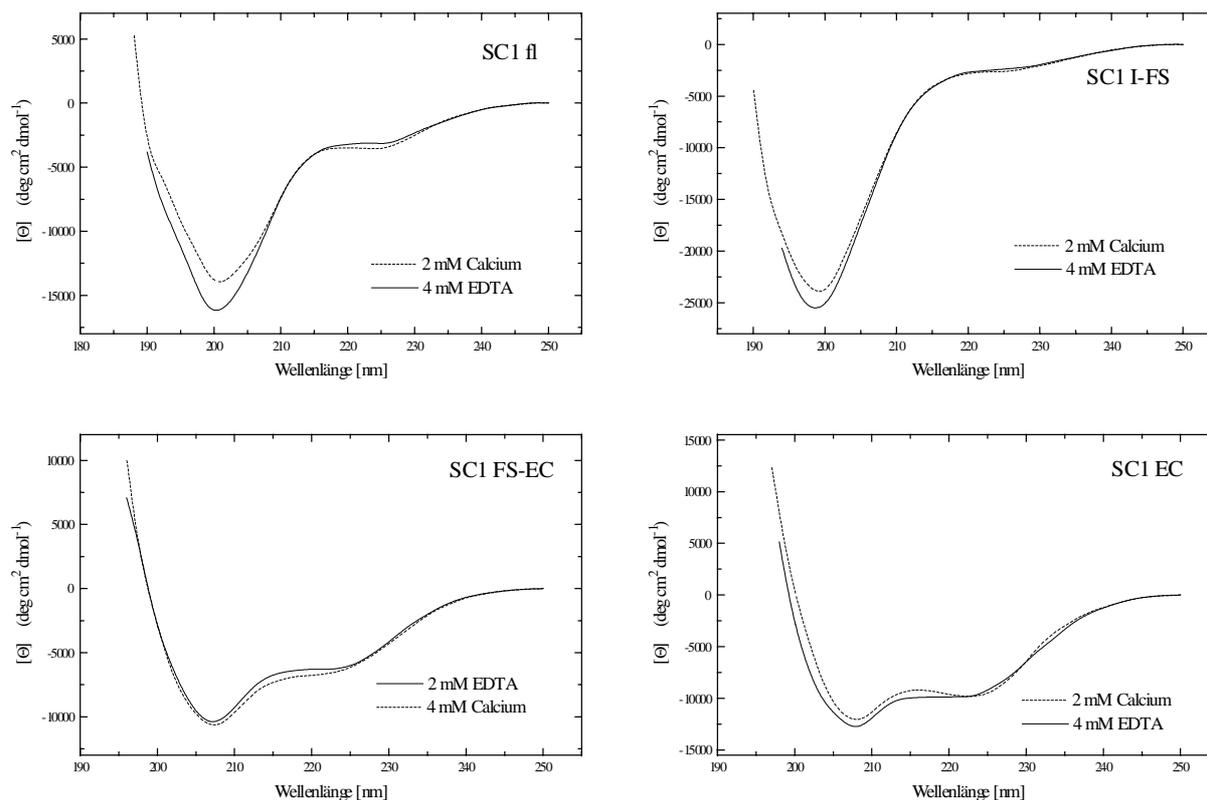


Abb. 3-5: CD-Spektren der Proteine SC1 fl, I-FS_{tag}, FS-EC und EC. Die CD-Spektren der rekombinanten Proteine SC1 fl (134 µg/ml), I-FS_{tag} (150 µg/ml) und FS-EC (198 µg/ml) wurden in 5 mM Tris, pH 7,4, und EC (108 µg/ml) in TBS, pH 7,4, aufgenommen. Die Messungen erfolgten in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke. Die Kurven zeigen die Spektren in Anwesenheit von Calcium (gestrichelte Linie) bzw. in Anwesenheit von EDTA (durchgezogene Linie). Aus den Daten kann man ersehen, daß der durch Calcium induzierte Konformationswechsel nur sehr gering ist.

Tab. 3-2: Berechnete Sekundärstrukturanteile von SC1 und Fragmenten. Die Zahlen beziehen sich auf die Werte der mit Calcium gesättigten Proteine, die Zahlen in den Klammern stehen für die Werte der Proteine ohne Calcium. Die Sekundärstrukturanteile sind aufgrund des Programmes zur Berechnung der Sekundärstrukturanteile nicht 100% normiert. SELCON konnte mit den Daten des Spektrums der FS-EC ohne Calcium keine Ergebnisse berechnen, k.N. bedeutet, daß keine Näherung möglich war.

| | | SC1 fl | I-FS _{tag} | FS-EC | EC |
|--------|-------------|-----------|---------------------|------------|-----------|
| SELCON | α-Helix | 12% (11%) | 11% (8%) | 21% (k.N.) | 32% (32%) |
| | β-Faltblatt | 31% (32%) | 25% (29%) | 30% (k.N.) | 18% (18%) |
| | Schleife | 28% (30%) | 29% (32%) | 30% (k.N.) | 27% (28%) |
| | ungeordnet | 29% (28%) | 36% (33%) | 18% (k.N.) | 22% (23%) |

Die Analyse der Sekundärstrukturen in An- und Abwesenheit von Calcium bestätigt das qualitative Bild aus den Spektren.

3.4.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie konnte keine eindeutige durch Calcium induzierte Konformationsänderung beobachtet werden, deswegen wurden alle Proteine auch mittels Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht.

SC1 verfügt über vierzehn Tyrosine und vier Tryptophane, die so auf die einzelnen Domänen verteilt sind, daß alle Proteine Signale in der Fluoreszenzspektroskopie ergeben. Die SC1-Fragmente zeigten bei einer Anregung bei 280 nm Emissionsmaxima in der mit Calcium gesättigten Form zwischen 340 nm und 351 nm. Die Proteine SC1 fl, FS-EC und EC zeigten bei Zugabe von Calcium eine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Durch die Zugabe eines Überschusses an EDTA, konnte eine Umkehrung dieses Effektes erreicht werden (Abb. 3-6). Im Gegensatz dazu reagierte I-FS_{tag} auf die Zugabe von Calcium als auch von EDTA mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. In diesem Fall war die Calciumbindung nicht reversibel und konnte somit nicht mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie bestimmt werden (Abb. 3-6).

Bei Sättigung mit Calcium nahm die Fluoreszenzintensität bei SC1 fl um 24%, bei FS-EC um 64% und bei EC um 97% ab. In Gegenwart von Calcium zeigte SC1 fl eine leichte Rotverschiebung, wohingegen FS-EC und EC eine geringe Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums ergaben. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Proteine in der Fluoreszenz-Spektroskopie einen durch Calcium hervorgerufenen Konformationswechsel zeigten.

Tab. 3-3: Messung der intrinsischen Fluoreszenz von SC1 fl, I-FS_{tag}, FS-EC und EC.

| | Fluoreszenzintensität bei 350 nm: F ₃₅₀ | | Fluoreszenzänderung bei 350 nm: ΔF ₃₅₀ | | Fluoreszenzmaximum λ _{max} (bei Anregung mit 280 nm) | | |
|--------|--|-----------------------------------|---|--|---|-----------------------------|---------------|
| | Ca ²⁺ -frei (Units/μM) | Ca ²⁺ -ges. (Units/μM) | ΔF/c _[Prot.] (Units/μM) | ΔF/F _{Ca²⁺-ges. %} | Ca ²⁺ -frei (nm) | Ca ²⁺ -ges. (nm) | Änderung (nm) |
| SC1 fl | 1310 | 1056 | 254 | 24 | 345 | 347 | 2 |
| I-FS | 661* | 650* | - | - | 351* | 351* | 0 |
| FS-EC | 575 | 351 | 224 | 64 | 342 | 340 | 2 |
| EC | 815 | 433 | 382 | 97 | 340 | 339 | 1 |

*Fluoreszenzänderung des I-FS war nicht reversibel.

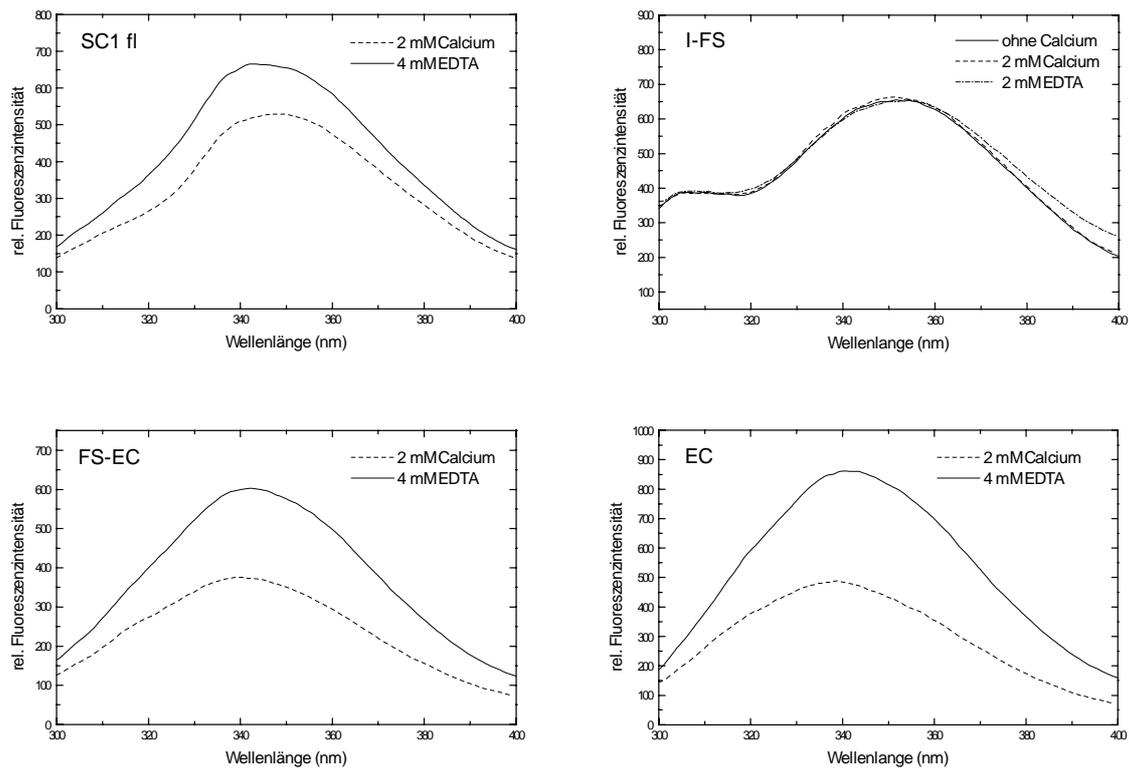


Abb. 3-6: Spektren der durch Calcium induzierten Fluoreszenzänderungen von SC1 fl, I-FS_{tag}, FS-EC und EC. Die Fluoreszenzspektren von SC1 fl (0,5 μ M), I-FS_{tag} (1 μ M), FS-EC (1 μ M) wurden in 5 mM Tris, pH 7,4, aufgenommen. Die Messung der EC-Domäne (1 μ M) erfolgte in TBS, pH 7,4.

3.5 Herstellung und Charakterisierung des SC1 Antikörpers

Für die immunochemische Charakterisierung des SC1 wurde gegen das Domänenpaar FS-EC ein polyklonales Antiserum in Kaninchen von der Firma Pineda hergestellt. Das erhaltene Antiserum wurde zur Erhöhung der Spezifität affinitätsgereinigt. Dazu wurden 400 μ g rekombinantes SC1 FS-EC-Domänenpaar an eine aktivierte CNBr-Sepharosesäule gekoppelt und das polyklonale Serum aufgetragen; die Elution erfolgte mit 3 M Kaliumthiocyanat.

3.5.1 Untersuchung der Spezifität und der Kreuzreaktivität

Die Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie zeichnen sich auf Aminosäureebene durch eine hohe Sequenzidentität in der Follistatin- und der EC-Domäne aus. Ähnlichkeiten in diesen beiden Domänen sind deswegen das Kriterium für die Zuordnung zu dieser Familie. Aufgrund dieser Sequenzähnlichkeiten mußte aber ausgeschlossen werden, daß der affinitätsgereinigte Antikörper eine Kreuzreaktivität gegen die anderen Proteine dieser Familie aufweist. Diese Kreuzreaktivität kann zum einen unter den nativen Proteinen, wie sie z.B. bei der Untersuchung von Gewebeschnitten mittels Immunofluoreszenz vorkommen, oder zum anderen unter den denaturierten Proteinen, wie sie z.B. beim Immunoblot von Zellkulturüberständen vorliegen, auftreten. Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität der nativen Proteine wurde ein Slot-Blot durchgeführt, bei dem die Proteine direkt auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen werden. Im Immunoblot nach SDS-PAGE wurden die denaturierten Proteine untersucht. Alle hierfür verwendeten Proteine sind im Institut für Biochemie II (Medizinische Fakultät) als rekombinante Proteine vorhanden.

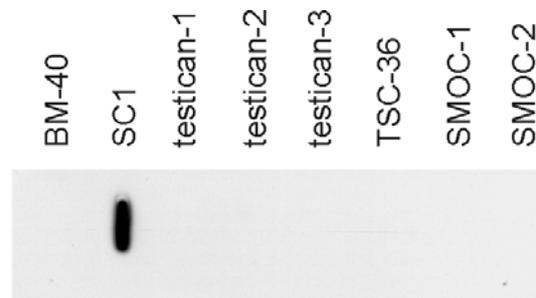


Abb. 3-7: Kreuzreaktivität der nativen Proteine im Slot-Blot. Es wurden jeweils 50 ng der verschiedenen Proteine der BM-40 Familie auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und mit dem affinitätsgereinigten Antikörper aus Kaninchen in der Verdünnung 1:500 inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers und anschließender ECL-Reaktion.

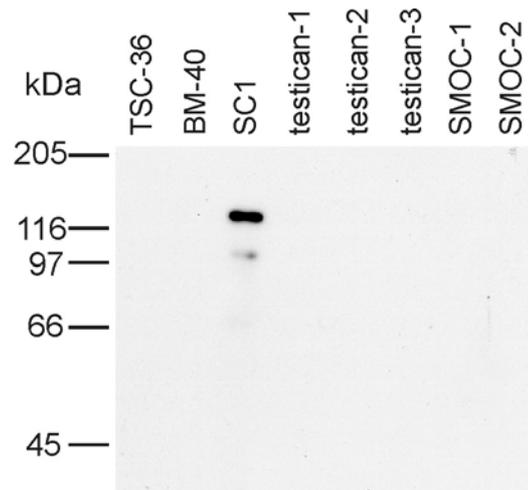


Abb. 3-8: Kreuzreaktivität der denaturierten Proteine im Immunoblot nach SDS-PAGE. Es wurden je 50 ng der verschiedenen Proteine auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antikörper aus Kaninchen in der Verdünnung von 1:500 wurden die Signale mit Hilfe eines Zweitantikörpers und nachfolgender ECL-Reaktion sichtbar gemacht.

Der SC1 Antikörper erkannte rekombinantes SC1 sowohl in nativer (Abb. 3-7) als auch in denaturierter (Abb. 3-8) Form. Eine Kreuzreaktivität gegen die anderen Proteine der BM-40 Familie konnte bei identischer Proteinkonzentration nicht festgestellt werden. Somit konnten die gefundenen Gewebeverteilungen und Funktionen eindeutig dem SC1 zugeordnet werden.

3.6 Endogene Expression von SC1 in verschiedenen Zelltypen

Es wurden verschiedene Zelllinien auf die Expression von SC1 hin untersucht. Dazu wurden sie unter Zellkulturbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Die serumfreien Zellkulturüberstände wurden geerntet und im Immunoblot getestet (Abb. 3-9).

Die Osteosarkom-Zelllinie UMR-108 und die Melanom-Zellen A-375 zeigten eine Doppelbande bei ungefähr 100 kDa. Doppelbanden bei ca. 90 kDa konnten für die Fibrosarkom-Zellen HT1080 und die Lungenfibroblasten L132 detektiert werden. Bei den Osteosarkom-Zellen UMR-108 kann zusätzlich noch eine Bande bei ca. 55 kDa beobachtet werden, die auch bei den Osteosarkom-Zelllinien U-2OS, HOS, den Maus-Keratinocyten Pam212, den epithelialen Brustzellen HBL 100 und der Fibroblasten-Zelllinie Wi26 auftritt. Die Chondro-

sarkom-Zellen HTB94 zeigen als einzige Zelllinie eine starke Bande bei ungefähr 150 kDa. Man erkennt, daß die Expression teilweise nur sehr schwach ist. Bei den Banden unter dem Molekulargewicht von SC1 von 110 kDa könnte es sich um eine Prozessierung des Proteins oder Kreuzreaktivität handeln. Da der Nachweis mit einem affinitätsgereinigten Antikörper erfolgte, der keine Kreuzreaktivität mit anderen Mitgliedern der BM-40 Proteinfamilie zeigte (s. 3.5.1) kann diese Möglichkeit als unwahrscheinlich angesehen werden. Es sei denn, es handelt sich um eine echte Kreuzreaktivität mit einem anderen Protein mit ähnlichem Epitop. Zur Überprüfung der Spezifität der Signale bei 55 kDa wurde ein Inhibierungsversuch unternommen (s. 3.7.2).

Bei den Osteosarkomzelllinien MHH-ES1, MG-63, SaOS-2 und MN-7, den C₆Gliom-Zellen, den Keratinocyten-Zelllinien HaCat und SSC25, den epidermalen Carcinom-Zellen A-431, den Astrocyten S6E, den human Nierenzellen EBNA-293, den Brustkrebszellen T47D, den Ovarialcarcinom-Zellen OVCAR, den Colon-Adenocarcinom Zellen CaCO2 und den embryonalen Mauszellen Pys2 konnte keine Expression nachgewiesen werden. Der affinitäts-gereinigte Antikörper erkannte humanes SC1 und murines SC1.

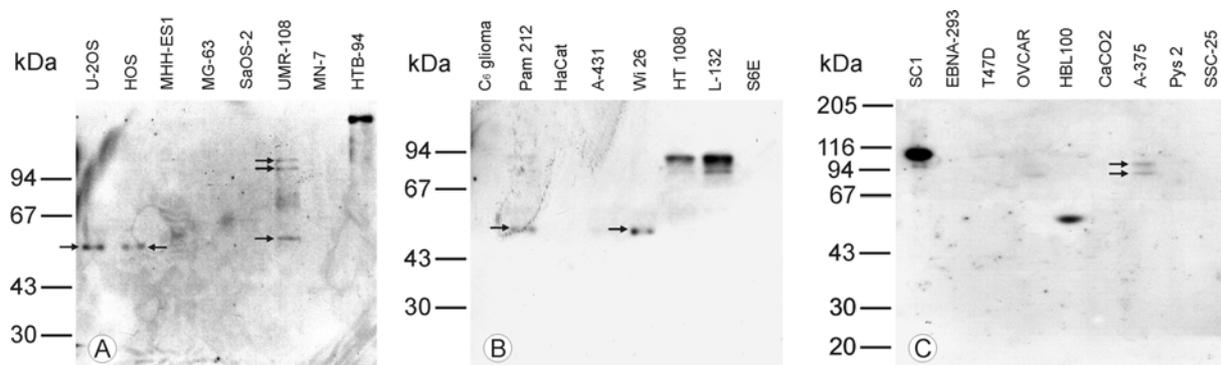


Abb. 3-9: Endogene Expression von SC1 in verschiedenen Zelllinien. Jeweils 1 ml der serumfreien Zellkulturüberstände wurde mit TCA gefällt und nach Reduktion auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Gel A, B: 12%, Gel C: 8-22%). Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen SC1 (1:500). Die Detektion wurde mittels Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper und folgender Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt. Die Pfeile markieren die schwach exprimierten Proteine.

3.7 Gewebeverteilung von SC1

3.7.1 Immunoblot von Gewebeextrakten

Zur proteinchemischen Analyse der Gewebeverteilung des SC1 wurden Gewebeextrakte von verschiedenen Geweben der Maus angefertigt und im Immunoblot untersucht (Abb. 3-10). SC1 zeigte eine weit verteilte Expression in verschiedenen Geweben. Die stärksten Signale traten bei ungefähr 116 kDa in Gehirn, Cerebellum und Lunge auf. Weitere Signale mit dem gleichen apparenten Molekulargewicht waren in Herz, Auge, Muskel, Thymus, Colon, Sternum und sehr schwach in Calvaria zu finden. Eine weitere prominente Bande konnte, wie bereits bei der Analyse der Zellkulturüberstände, bei ca. 55 kDa detektiert werden, und zwar in Gehirn, Cerebellum, Auge, Muskel, Thymus, Colon, Sternum und Niere. Auffällig ist, daß diese Bande in Niere das einzige Signal darstellt, wobei es sich bei den anderen Geweben um eine zusätzliche Bande handelt. In Testis konnte ebenfalls eine Doppelbande beobachtet werden, die jedoch deutlich höher als 110 kDa, bei ca. 130 und 150 kDa läuft. Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, trägt SC1 (theoretisches Molekulargewicht von 71 kDa) 17 kDa posttranslationale Modifikationen, wird in der SDS-PAGE jedoch bei 110 kDa detektiert. Das abnorme Laufverhalten in der SDS-PAGE ist wahrscheinlich auf die sehr saure Domäne I zurückzuführen. Ein ähnlich abnormales Laufverhalten in der SDS-PAGE wurde bei den sauren Proteinen GAP-43 und PM-Scl 75 beobachtet (Johnston et al., 1990; Alderuccio et al., 1991). Bei den Banden unter 110 kDa kann es sich auch hier um Abbauprodukte handeln. Um die Spezifität der 55kDa-Bande zu überprüfen, wurde ein Inhibierungsversuch mit rekombinantem Protein unternommen (s. 3.7.2).

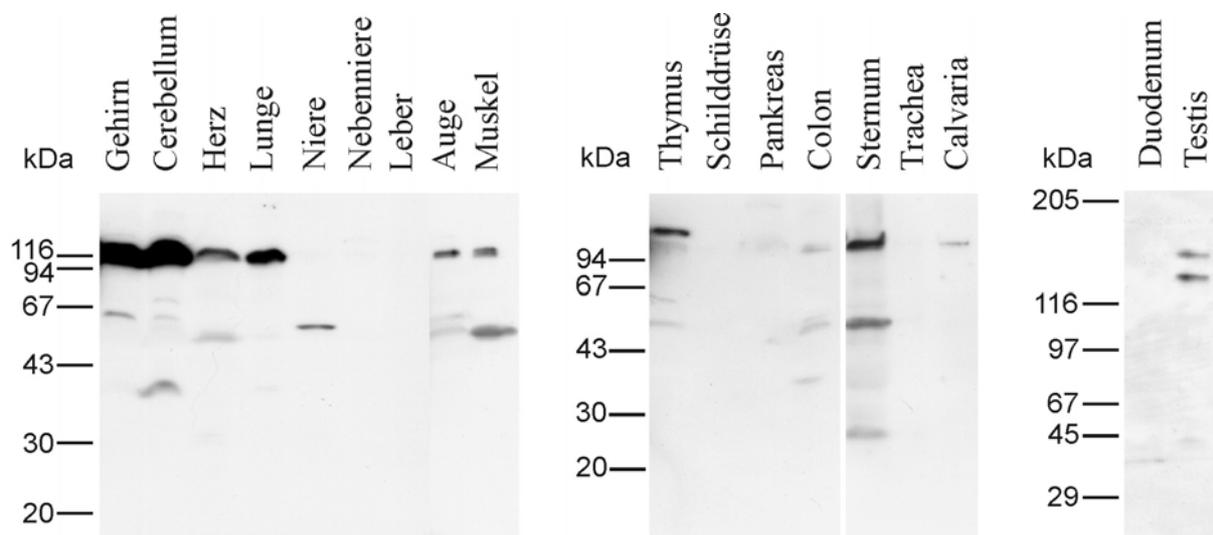


Abb. 3-10: Immunoblot verschiedener Gewebe mit dem Antikörper gegen SC1. Die angegebenen Gewebe wurden mit TBS, 10 mM EDTA und einem Proteaseinhibitorcocktail extrahiert und nach Reduktion und Auftrennung mittels SDS-PAGE im Immunoblot untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem affinitäts-gereinigten Antikörper gegen SC1, einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper und anschließender Chemilumineszenz-Reaktion. Die Banden der Markerproteine sind in kDa angegeben.

Da SC1 im Gehirn sehr stark exprimiert wird, wurden zur genaueren Bestimmung der Expression von SC1, bestimmte Gehirnregionen präpariert und im Immunoblot analysiert (Abb. 3-11). Dabei konnte SC1 in allen Hirnarealen als bei ca. 100 kDa migrierende Bande nachgewiesen werden. Die Hypophyse zeigte keine Expression von SC1. Banden unter einem Molekulargewicht von 100 kDa wurden u.U. aufgrund der geringeren Probenmenge nicht beobachtet.

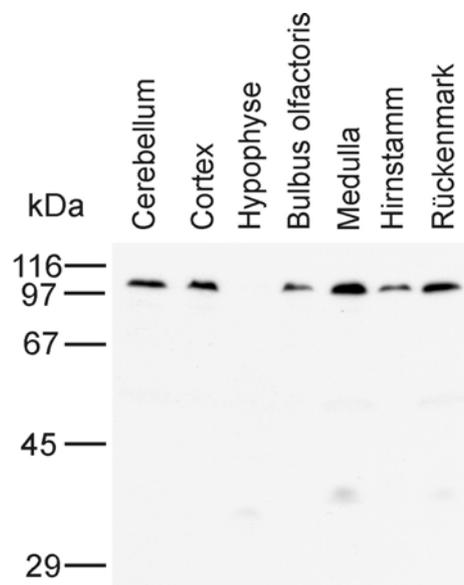


Abb. 3-11: Immunoblot verschiedener Gehirngebiete mit dem Antikörper gegen SC1. Die verschiedenen Gewebe wurden mit TBS, 10 mM EDTA und einem Proteaseinhibitorcocktail extrahiert. Nach Reduktion und Auftrennung mittels einer 10%igen SDS-PAGE wurde die Expression im Immunoblot untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen SC1 (1:500) gefolgt von einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper und anschließender Chemilumineszenz-Reaktion.

3.7.2 Verifizierung der Immunoblot-Banden durch Inhibierung

Bei der Untersuchung der Expression von SC1 in den Zellkulturüberständen verschiedener Zelllinien sowie in verschiedenen Gewebeextrakten traten im Immunoblot trotz Verwendung von affinitätsgereinigtem Antiserum Banden auf, die diesem Protein nicht eindeutig zugeordnet

werden konnten. Um zu überprüfen, ob es sich bei den Banden bei ca. 55 kDa um SC1 handelt, wurde ein Inhibierungsversuch durchgeführt (Abb. 3-12). Dazu wurden rekombinantes SC1 fl als Positivkontrolle und Gewebeextrakt der Niere beispielhaft ausgewählt. Durch Vorinkubation des affinitätsgereinigten Antikörpers mit einem Überschuß an rekombinantem Protein konnte die Bindung der Antikörper an diese Banden verhindert werden und somit die Spezifität der Antikörper nachgewiesen werden.

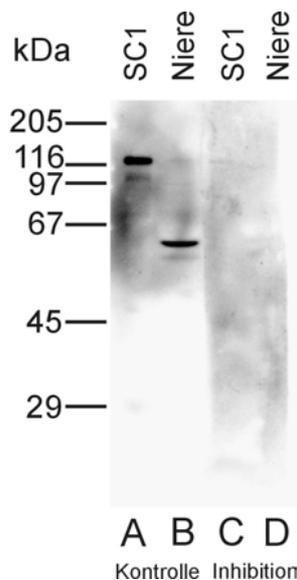


Abb. 3-12: Verifizierung der Banden bei ca. 50 und 55 kDa durch Inhibierung mit rekombinantem Protein im Immunoblot. Die, im Vergleich zum Gewebelot (Abb. 3.10), zusätzliche Bande bei 50 kDa ist aufgrund der größeren Beladung zu detektieren. Es wurden 200 ng rekombinantes SC1 fl (A und C) und 40 µl des Gewebeextraktes der Niere (B und D) auf einem 8-20%igem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zwei Antikörperverdünnungen (1:250) wurden angesetzt, zur Inhibition wurde eine davon mit 50 µg rekombinantem FS-EC versetzt und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation der Membranen mit den entsprechenden Verdünnungen wurden die Signale mit Hilfe eines Zweitantikörpers und folgender ECL-Reaktion sichtbar gemacht.

3.7.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Expression von SC1 wurde bisher durch *in-situ* Hybridisierung in Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Nebenniere, Auge, Leber, Milz, Speicheldrüse (G. submandibularis), Testis und Epididymis nachgewiesen (Soederling et al., 1997). Immunhistochemische Untersuchungen beschränken sich auf die Analyse der Expression von SC1 im Gehirn während der Entwicklung (Mendis et al., 1994; 1996). Außerdem konnte während der reaktiven Astrocytose nach Traumatisierung des Gehirn eine verstärkte Expression von SC1 beobachtet werden

(McKinnon et al., 1996; Mendis et al., 1996; 2000). Eine immunohistochemische Analyse der Expression des humanen SC1 ist an Tonsillen durchgeführt worden (Girard und Springer, 1996).

Zur weiteren Untersuchung der Expression des Proteins mittels Immunfluoreszenz wurden in der vorliegenden Arbeit Paraffin- und Cryoschnitte von verschiedenen Mausgeweben verwendet. Die Färbungen wurden mit dem unter 3.5.1 näher charakterisierten Antikörper gegen SC1 durchgeführt.

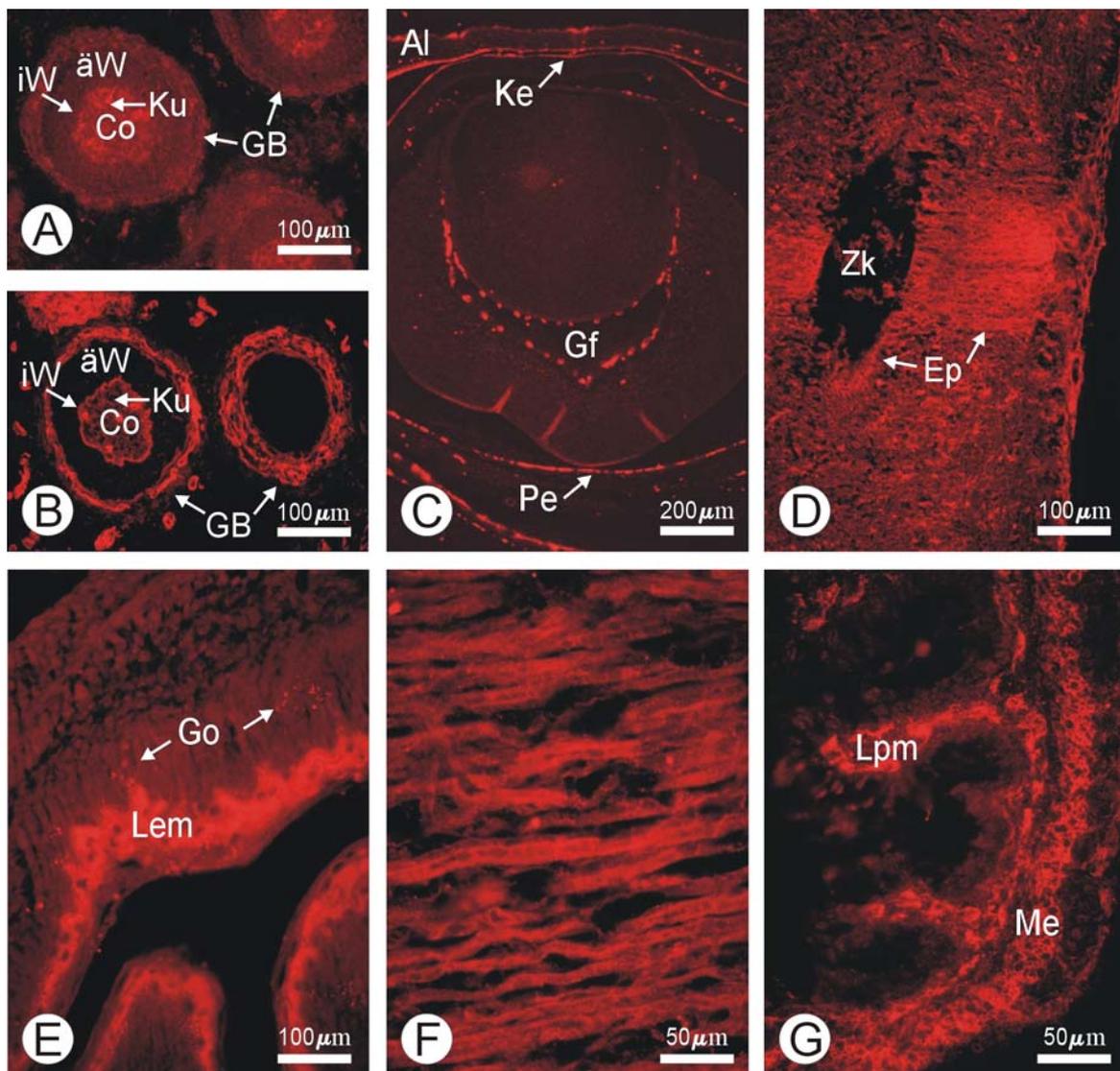


Abb. 3-13: Immunhistochemische Analyse zur Expression von SC1 in verschiedenen Geweben von neugeborenen Mäusen (A, B, D, G) und Tag 18 der Maus-Embryogenese (C, E, F). A, B: Haarfollikel C: Auge D: Rückenmark E: Oesophagus F: Skelettmuskel G: Dünndarm. Nach Inkubation mit dem affinitäts-gereinigten Antikörper gegen SC1 (A,C-G) bzw. Laminin-1 (B) erfolgte die Detektion mit dem sekundären fluoreszierenden Cy3-Antikörper. Nähere Erläuterungen im Text.

Haarfollikel bestehen aus mehreren konzentrisch angeordneten Schichten. Im Zentrum befindet sich der Cortex (Co) und die Kutikula (Ku), die von der inneren Wurzelscheide (iW), gefolgt von der äußeren Wurzelscheide (äW) umgeben sind. Die abschließenden Schichten bilden (eine starke Basalmembran) die Glashaut und eine Bindegewebsschicht (GB). Zum Vergleich der Expression wurde eine Färbung mit einem Antikörper gegen Laminin-1 durchgeführt. SC1 konnte in allen Schichten der Haarfollikel nachgewiesen werden (Abb. 3-13: A), wohingegen Laminin-1 nicht in der äußeren Wurzelscheide gefunden wurde (Abb. 3-13: B).

Das Auge ist aus einer äußeren, mittleren und inneren Augenhaut, den Augenkammern, der Linse und dem Glaskörper aufgebaut. Die äußere Augenhaut besteht aus Sklera und Kornea. Die Kornea setzt sich aus fünf Schichten zusammen, dem vorderen Korneaepithel, der Bowman-Membran, dem Stroma, der Descemet-Membran und dem hinteren Korneaepithel. Die Expression von SC1 konnte im vorderen Korneaepithel (Ke) gezeigt werden. Desweiteren konnte SC1 im Augenlid (Al), in den Gefäßen (Gf) des hyaloiden Plexus und dem Pigmentepithel der Retina (Pe) beobachtet werden (Abb. 3-13: C).

Das Rückenmark ist ein Bestandteil des zentralen Nervensystems. Gehirn und Rückenmark sind über ein gemeinsames Hohlraumssystem verbunden, dem inneren Liquorraum. Dieser Liquorraum besteht aus den Ventrikeln im Gehirn und dem Zentralkanal (Zk) im Rückenmark. Das Ependym ist aus Gliazellen zusammengesetzt und kleidet dieses System aus. Die Expression von SC1 konnte im Ependym (Ep) nachgewiesen werden (Abb. 3-13: D).

In der Speiseröhre konnte eine Expression in der Lamina epithelialis mucosae (Lem), einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel gezeigt werden. Desweiteren ist eine punktförmige Färbung von Drüsenpaketen, den Glandulae oesophagae (Go), in der Tela submucosa zu erkennen (Abb. 3-13: E).

In der Skelettmuskulatur sowie im Herzmuskelgewebe konnte SC1 nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um eine Färbung des Endomysiums, einem lockeren Bindegewebe, daß die Muskelfasern umgibt (Abb. 3-13: F).

Der Dünndarm besteht aus drei Abschnitten dem Duodenum, dem Jejunum und dem Ileum. Die letzteren beiden machen den längsten Teil des Dünndarms aus. Die Lamina propria mucosae (Lpm) und der Muscularis externa (Me) des Dünndarms zeigten eine Expression von SC1 (Abb. 3-13: G).

Die immunhistochemische Analyse der Expression von SC1 in der Niere wird unter 3.9 behandelt.

3.8 Interaktionsstudien von SC1 mit Komponenten der ECM im Festphasen-Immunoassay

3.8.1. Auswahl potentieller Bindungspartner

Aufgrund der sehr weit verbreiteten Expression von SC1 in den verschiedensten Geweben kommen viele extrazelluläre Proteine als potentielle Bindungspartner in Frage. Die Kollagene gehören zu den am stärksten vertretenen Proteinen im Bindegewebe. Nach ihrer Struktur werden die Kollagentypen I, II, III und V als fibrilläre Kollagene bezeichnet. Kollagen I stellt in Haut und Knochen das häufigste Kollagen dar, wobei die Kollagen I-Fibrillen mit den Kollagenen III und V assoziiert sind. Knorpelmatrix besteht hauptsächlich aus Kollagen II und Aggrecan. Bei Kollagen IV handelt es sich um ein netzbildendes Kollagen, das neben Laminin einen wichtigen Bestandteil der Basalmembran darstellt. Fibronectin und Laminin gehören zu den Adhäsionsproteinen und sind an der Bindung zwischen extrazellulärer Matrix und Zellen beteiligt. BM-40 und TSC-36 sind Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie und Heparin ist ein Beispiel für Glykosaminoglykane. Als potentielle Interaktionspartner wurden die Kollagene I, II, III, IV und V, Laminin-1, Fibronectin, BM-40, und Heparin als charakteristische Vertreter der einzelnen Molekülgruppen ausgewählt. Zusätzlich wurden noch Decorin, welches mit Kollagen I assoziiert ist, und TSC-36 untersucht.

3.8.2 Bestimmung der potentiellen Bindungspartner von SC1

Zur Identifizierung potentieller Bindungspartner und gleichzeitiger Eingrenzung der Bindungsdomäne wurden die Proteine I-FS_{tag} und FS-EC verwendet (Abb. 3-14); SC1 fl konnte aufgrund der gering vorhandenen Mengen nicht eingesetzt werden. Die Untersuchung der EC-Domäne war, wegen nicht zu bewältigender Probleme mit dem Hintergrund, trotz der Untersuchung aller zur Verfügung stehenden Blockierungsmittel (1% BSA, 1% NGS, 1% Casein und 5% Milchpulver) nicht möglich.

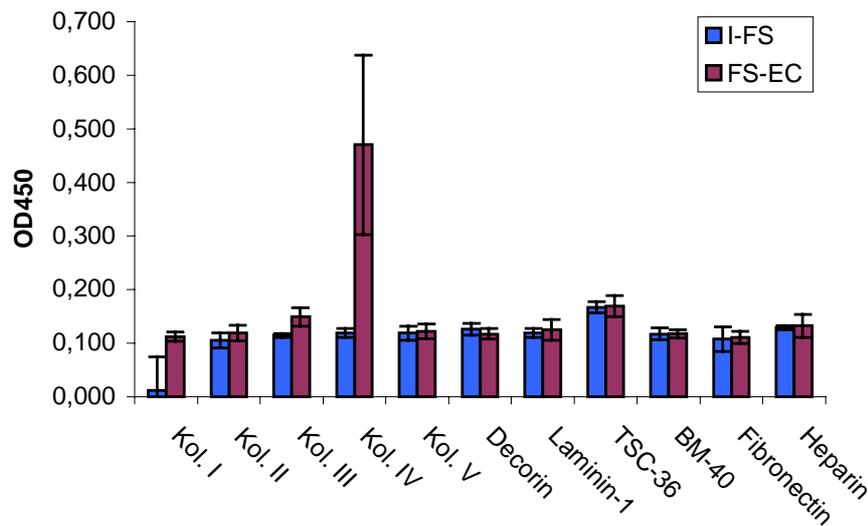


Abb. 3-14: Interaktion der Domänenpaare I-FS_{tag} und FS-EC mit ausgewählten ECM-Proteinen. 5 µg/ml Kollagen I-V in 0,5 M Essigsäure und 10 µg/ml Laminin-1, Fibronectin, BM-40, Heparin und TSC-36 in TBS wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit 5 µg/ml der einzelnen Domänenpaare (I-FS_{tag}: 85 µM, FS-EC: 180 µM) inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten in TBS, bei der Inkubation der Liganden wurde 2 mM Calcium zugegeben. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers und nachfolgender Farbreaktion. Die Absorption des Farbstoffes wurde bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

Kollagen IV ist das einzige Protein, das eine Bindung an SC1 zeigt. Die Bindungsstelle befindet sich in der EC-Domäne, weil für das Domänenpaar I-FS keine Bindung beobachtet werden konnte, sondern nur für das Domänenpaar FS-EC. Die Kollagenbindungsdomäne von BM-40 wurde 1997 von Sasaki et al. auf der EC-Domäne lokalisiert und für SC1 vorhergesagt. Diese Vorhersage konnte mit diesem Experiment bestätigt werden.

3.8.3 Calcium-Abhängigkeit der SC1-Kollagen IV-Bindung

Die Calcium-Abhängigkeit der Bindung von BM-40 an Kollagen IV wurde 1997 von Maurer et al. gezeigt. Um dies für SC1 zu überprüfen, wurden verschiedene Konzentrationen des FS-EC-Domänenpaares mit Kollagen IV unter Zugabe von 4 mM Calcium bzw. 4 mM EDTA inkubiert. In Anwesenheit des Chelators EDTA konnte selbst bei hohen FS-EC-Konzentrationen keine Bindung gemessen werden, während in der Anwesenheit von Calcium FS-EC eindeutig an Kollagen IV bindet. Für SC1 konnte somit eine klare Calcium-Abhängigkeit der Bindung an Kollagen IV nachgewiesen werden (Abb. 3-15).

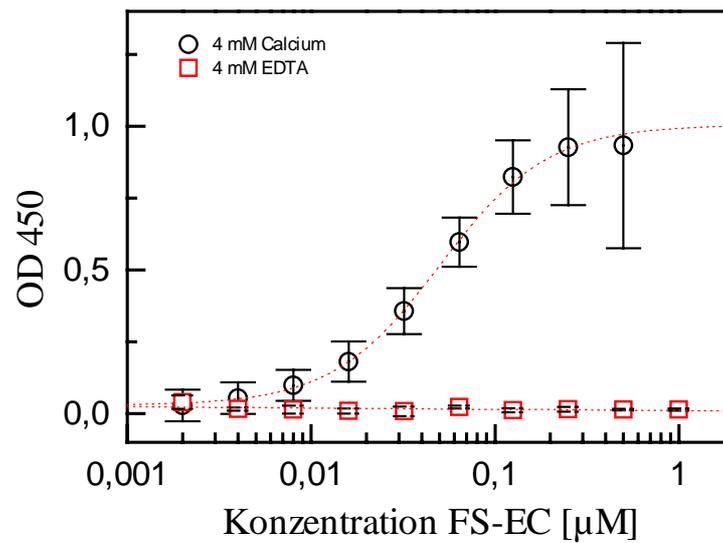


Abb. 3-15: Interaktion des FS-EC-Domänenpaares mit Kollagen IV im Festphasen-Immunoassay. Zur Bestimmung der Sättigung der Bindung wurden 5 µg/ml Kollagen IV auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Das Protein FS-EC wurde in Konzentrationen von 1-500 nM in Gegenwart von 4 mM Calcium bzw. 4 mM EDTA als Ligand inkubiert. Die dargestellten Werte sind gemittelte Werte von Dreifachbestimmungen von drei unabhängigen Versuchen. Es wurde nur ein Versuch mit 4 mM EDTA berücksichtigt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers, die Absorption des in der nachfolgenden Farbreaktion entstandenen Farbstoffes wurde bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

Zur Bestimmung des apparenten K_d -Wertes im Festphasen-Immunoassay wurde eine konstante Kollagen IV Konzentration mit verschiedenen Konzentrationen des FS-EC-Domänenpaares in Anwesenheit von Calcium betrachtet. Die halbmaximale Sättigung der Bindung konnte bei einer Konzentration von 48 nM FS-EC erreicht werden. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt und der apparente K_d -Wert gemittelt.

3.9 Colokalisation von SC1 und Kollagen I bzw. IV in der Niere

Im Festphasen-Immunoassay konnte die Bindung von SC1 an Kollagen IV gezeigt werden (3.8.2), deswegen wurde eine Colokalisation im Gewebe untersucht. Dazu wurden Gefrierschnitte adulter Niere mit Antikörpern gegen SC1, Kollagen I und Kollagen IV gefärbt. Kollagen IV ist ein integraler Bestandteil aller Basalmembranen. In Abb. 3.16 (A) erkennt man eine Vielzahl von Strukturen, die von Basalmembranen umgeben sind. Es handelt sich dabei um Tubuli (Tb), Glomeruli (Go) und Gefäße (Gf). In den Glomeruli unterscheidet man zwei extrazelluläre Komponenten, die Basalmembran der Kapillarknäuel und die extrazelluläre Matrix der Mesangiumzellen. SC1 und Kollagen IV sind in den Blutgefäßen (Gf) und Glomeruli (Go) colokalisiert (Abb. 3-16: A, B). In den Glomeruli könnte SC1 mit Kollagen I hingegen nur teilweise colokalisiert sein (Abb. 3-16: B, C).

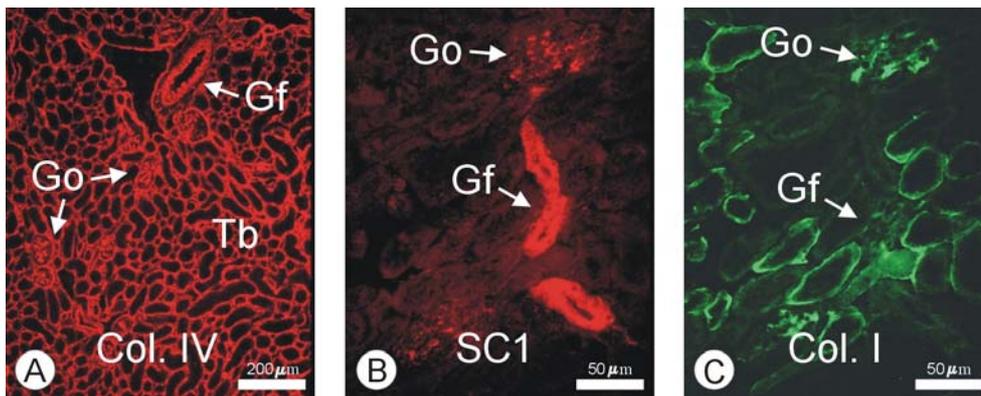


Abb. 3-16: Immunhistologische Untersuchung zur Colokalisation von SC1, Kollagen I und Kollagen IV in der Niere. Die Detektion wurde mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen SC1, einem Antikörper gegen Kollagen IV und einem Antikörper gegen Kollagen I durchgeführt. Für SC1 und Kollagen IV wurde ein Cy3-konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper verwendet. Bei dem Zweitantikörper gegen Kollagen I handelt es sich um einen DATF-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper. Nähere Erläuterungen im Text.

3.10 Colokalisation von SC1 und Kollagen I in der Matrix der Zelllinie SaOS-2

Es wurden humane Osteosarkom-Zellen (SaOS-2) eine Woche mit Ascorbat im Medium kultiviert, um die Bildung eines Kollagennetzwerkes zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen immunhistochemisch auf die Expression von SC1 und Kollagen I untersucht. Eine Expression von SC1 konnte gezeigt werden, obwohl es im Kulturüberstand dieser Zelllinie (s. 3.6) nicht detektiert werden konnte. Als Kontrolle erfolgte eine Kultivierung ohne Ascorbat. Zur Analyse der Colokalisation von SC1 und Kollagen I wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und mittels eines konfokalen Lasermikroskopes untersucht. Kollagen I wird als Heterotrimer aus zwei $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ - und einer $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ -Kette von den Zellen synthetisiert, die sich nach Sezernierung ins extrazelluläre Medium und einer N- und C-terminalen Prozessierung zu Fibrillen zusammenlagern.

Kollagen I ist in Anwesenheit von Ascorbat extrazellulär als Netzwerk zu erkennen. SC1 bildet extrazellulär ebenfalls ein netzartiges bzw. ein punktförmiges Muster. Bei der Überlagerung beider Signale ist eine teilweise Colokalisation festzustellen (Abb. 3-17). In Abb. 3-18 (Pfeile) kann eine punktförmiges Auftreten von SC1 auf einer Kollagen I-Fibrille ausgemacht werden. Allerdings ergibt die Färbung mit dem für SC1 spezifischen Antikörper auch Signale, welche nicht mit Kollagen I zusammen auftreten.

Bei der Kultivierung der Zellen ohne Ascorbat, wodurch kein Kollagenetzwerk entsteht, unterbleibt auch die Ausbildung der zuvor beobachteten Strukturen für SC1 (Abb. 3-19).

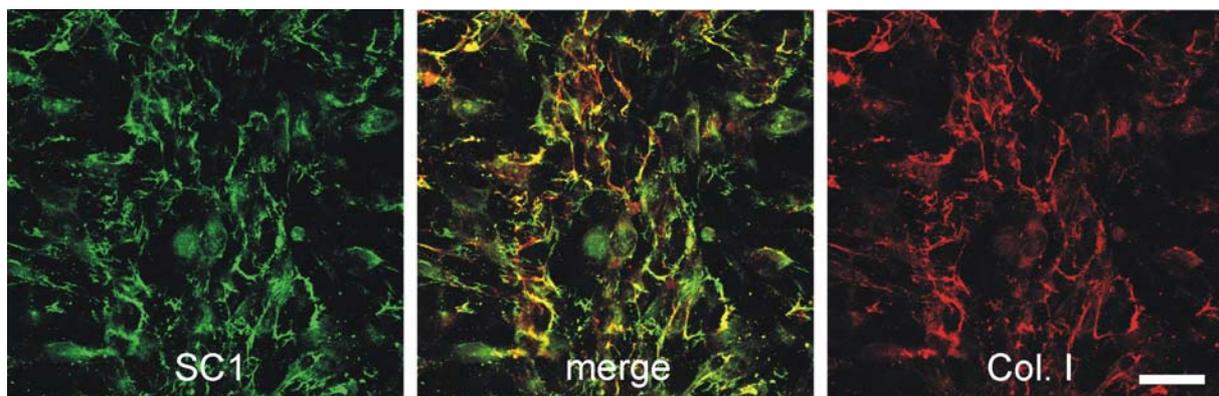


Abb. 3-17: Immunfluoreszenzfärbung von SC1 und Kollagen I in der extrazellulären Matrix von SaOS-2-Zellen. Die Zellen wurden unter Zugabe von Ascorbat kultiviert. Die Detektion des SC1 erfolgte mit einem DATF-konjugierten anti-Kaninchen IgG und die Detektion des Kollagen I mit einem Cy3-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper. Der Balken entspricht 40 μm .

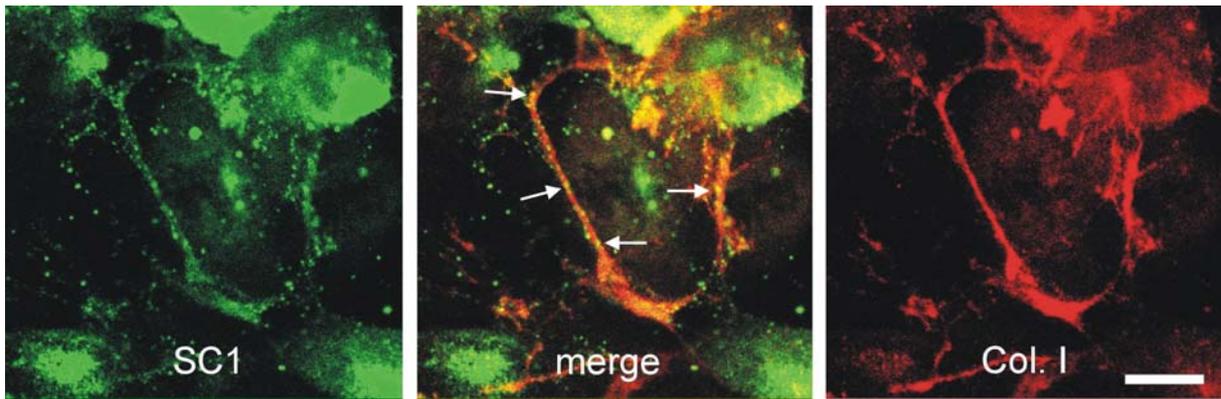


Abb. 3-18: Immunfluoreszenzfärbung von SC1 und Kollagen I in der extrazellulären Matrix von SaOS 2-Zellen. Auf der langen Struktur in der Mitte des Bildes sind die punktförmigen Signale des SC1 (Pfeile) auf einer Kollagen I-Fibrille zu erkennen. Der Balken entspricht 5 µm.

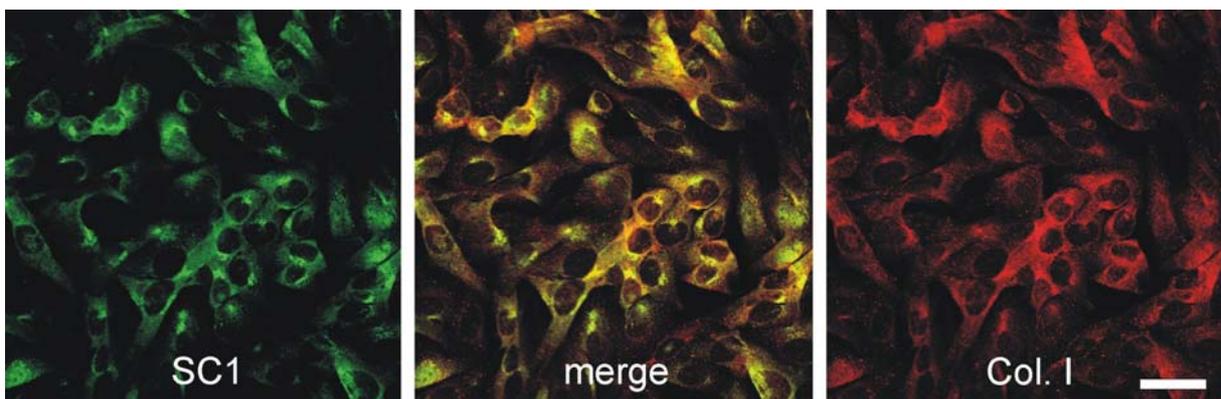


Abb. 3-19: Immunfluoreszenzfärbung von SC1 und Kollagen I in Zellkulturen von SaOS-2-Zellen. In Abwesenheit von Ascorbat bildet sich erwartungsgemäß kein Kollagen-Netzwerk aus. Interessanterweise kann dann auch mit dem SC1 spezifischen Antikörper keine extrazelluläre Färbung mehr nachgewiesen werden. Bei der Kultivierung ohne Ascorbat gibt es keine extrazellulären Signale für SC1 und Kollagen I. Da beide jedoch weiterhin exprimiert werden, ist vor allem eine positive Färbung im Golgi-Apparat zu detektieren. Der Balken entspricht 30 µm.

3.11 Kristallisationsversuche

In Zusammenarbeit mit Dr. Erhard Hohenester (Birkbeck College, London) wurde versucht die EC-Domäne des SC1 zu kristallisieren. Trotz eines breitgefächerten Screens verschiedener Kristallisationsbedingungen konnten bisher keine Kristalle erhalten werden.

IV Ergebnisse TSC-36

4.1 Klonierung der cDNA, rekombinante Expression und Reinigung des TSC-36 und seiner Fragmente

4.1.1 Rekombinante Expression des TSC-36 und seiner Fragmente

TSC-36 ist hauptsächlich aus drei Domänen aufgebaut. N-terminal findet man 12 Aminosäuren an die sich eine Follistatin-ähnliche Domäne (FS) anschließt, es folgt eine extrazelluläre Calcium-bindende Domäne (EC) und eine Domäne III mit geringer Ähnlichkeit zu einer halben von Willebrand Faktor C-Domäne. Neben dem vollständigen Protein wurden das Domänenpaar aus der EC-Domäne und der Domäne III und die EC-Domäne allein rekombinant exprimiert. Die letzten beiden Proteine trugen N-terminal ein Bindungsmotiv mit Hexahistidinmotiv, myc-Motiv und eine Enterokinase-Schnittstelle um ihre Reinigung zu vereinfachen (Abb. 4-1). Mit Hilfe dieser verschiedenen Fragmente sollte eine Charakterisierung des Domänenaufbaus, die Untersuchung der Bindung von Calcium, die Lokalisation der Bindungsstellen potentieller Interaktionspartner, Kristallisationsversuche und die Produktion von Antikörpern erfolgen.

| | Bezeichnung | DNA [bp] | MW _{theoret.} [Da] | pI _{theoret.} |
|---|---------------------|----------|-----------------------------|------------------------|
|  | TSC-36 fl | 882 | 33008 | 5,49 |
|  | EC-3 _{tag} | 726 | 27643 | 4,86 |
|  | EC _{tag} | 492 | 18979 | 4,62 |

Abb. 4-1: Rekombinant exprimierte TSC-36-Fragmente. Das kurze Rechteck bezeichnet die N-terminale Verlängerung von 12 Aminosäuren, FS steht für die Follistatin-ähnliche Domäne und das Oval repräsentiert die extrazelluläre Calcium-bindende EC-Domäne. Die beiden schwarzen Balken stellen die zwei EF-Hand Motive dar. Das Quadrat repräsentiert die Domäne III. Bei *tag* handelt es sich um eine Proteinsequenz aus 6 Histidinen und der Antikörpererkennungstelle myc gefolgt von einer Enterokinaseschnittstelle. Die Auswahl der Domänen-

grenzen erfolgte durch einen Homologievergleich, der auf der durch Röntgenkristallographie bestimmten Raumstruktur von BM-40 (Hohenester et al., 1997) beruhte.

4.1.1.1 Restriktionsanalyse und Klonierung der TSC-36 cDNA

Die cDNA von TSC-36 wurde von Dr. Kiyoshi Nose, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University (Tokyo) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um die beiden Plasmide pGEM4Z/TSC-36 and pRcCMV/TSC-36, die beide die vollständige cDNA des TSC-36 enthalten sollten. In einer PCR auf dem Plasmid pGEM4Z/TSC-36 wurden die den Fragmenten entsprechenden cDNA-Sequenzen mit Hilfe geeigneter Primerpaare amplifiziert. Die Ligation in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) erfolgte über die durch die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen Nhe I und NotI.

Nach der Sequenzierung der Expressionsvektoren pCEP-Pu/TSC-36 fl, pCEP-Pu/EC-3 bzw. pCEP-Pu/EC, stellte sich heraus, dass neun Basen fehlten, die durch das Restriktionsenzym ApoI deletiert waren. Die drei dadurch kodierte Aminosäuren FLK befinden sich direkt hinter der ersten EF-Hand in der EC-Domäne, so dass alle Konstrukte betroffen waren.

Nach Restriktionsanalyse und partieller Sequenzierung des Vektors pRcCMV/TSC-36 stellte sich heraus, dass die cDNA bis zu einer EcoRI-Schnittstelle kurz vor den Aminosäuren FLK, sowie ein Bereich der nicht kodierenden 3'-Region fehlten. Durch die Entwicklung einer geeigneten Klonierungsstrategie konnte ein Voll-Länge Klon des TSC-36 erstellt werden (Abb. 4-2). Dazu wurde die Voll-Länge cDNA mit den fehlenden 9 bp und der Sequenz für das BM-40 Signalpeptid aus dem Vektor pCEP-Pu/TSC-36 fl in das Plasmid pBluescript umklont. Anschließend wurde das defekte cDNA-Fragment EcoRI-NotI (426 bp) gegen das korrekte cDNA-Fragment aus dem Plasmid pRcCMV/TSC-36 ausgetauscht. Dabei handelte es sich um das 2068 bp große am 3'-Ende der cDNA liegende Fragment mit den fehlenden 9 bp.

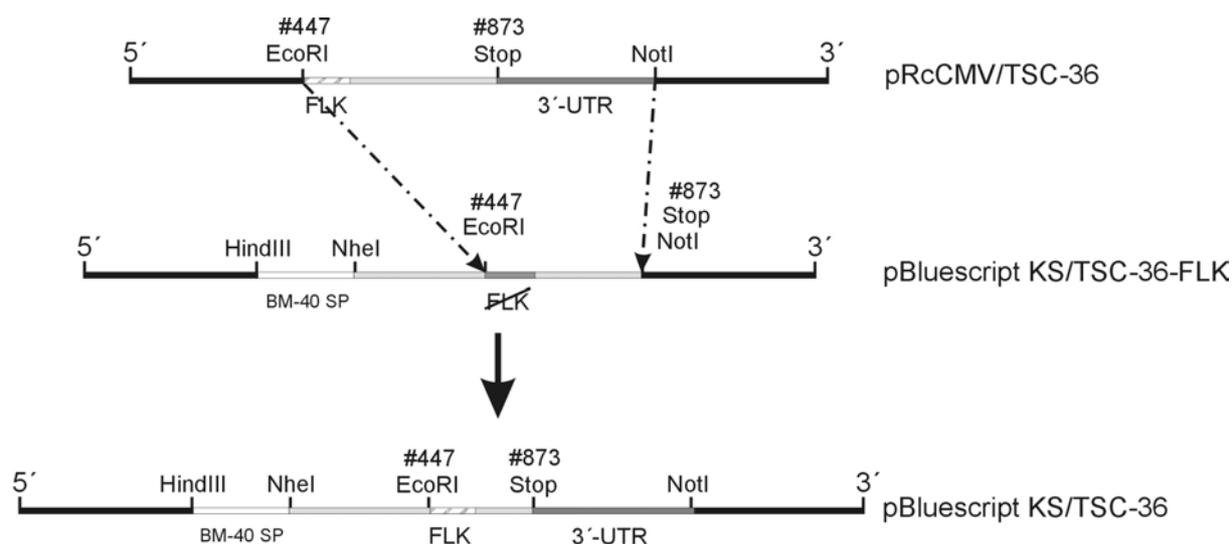


Abb. 4-2: Klonierungsstrategie zur Erzeugung einer vollständigen TSC-36 cDNA. #447 und #873 bezeichnen die Basen der cDNA. FLK steht für die Aminosäuren, die durch die fehlenden 9 bp kodiert werden. Die 3'-UTR und die Sequenz für das BM-40 Signalpeptid (BM-40 SP) sind gekennzeichnet.

Mit der korrigierten cDNA wurden die den Fragmenten entsprechenden cDNA-Sequenzen erneut in einer PCR amplifiziert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) ligiert. Die Fragmente für das Domänenpaar EC-III sowie die EC-Domäne wurden in den Vektor pCEP-Pu/his₆mycEK mit Histidinmotiv, myc und einer Schnittstelle für Enterokinase kloniert. Die in die Expressionsvektoren klonierten cDNA-Sequenzen wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

4.1.1.2 Expression der TSC-36-Fragmente in EBNA-293-Zellen

Die Expressionsvektoren wurden in EBNA-293 Zellen transfiziert und mit Puromycin selektioniert (s. Expression von SC1). Nach Überprüfung der Expression der rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE, wurden die Zellen subkultiviert, serumfrei gesetzt und die Zellkulturüberstände alle zwei Tage geerntet.

4.1.2 Isolierung der TSC-36-Fragmente

4.1.2.1 Aufreinigung des rekombinanten TSC-36

Der gesammelte serumfreie Zellkulturüberstand wurde gegen 50 mM Tris, pH 8,6, dialysiert, auf eine DEAE-Sepharose FF-Säule gegeben und mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-1 M NaCl eluiert. Die Fraktionen von 100-200 mM NaCl wurden gesammelt und gegen 40 mM Natriumphosphat, pH 7,0, mit 180 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dialysiert. Bei der Auftragung auf eine C₄-Butyl-Sepharose-FF konnten Verunreinigungen an die Säule gebunden werden. Das im Durchfluß befindliche rekombinante TSC-36 wurde gegen 50 mM Tris, pH, 8,6, dialysiert und mittels Bindung an einer DEAE-Sepharose FF-Säule aufkonzentriert. Durch eine anschließende Gelfiltration auf einer Sephadex G-75 Säule, äquilibriert in 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, konnte eine weitere Reinigung erzielt werden. Fraktionen, die fast sauberes TSC-36 erhielten, wurden auf eine ResourceQ Säule aufgetragen (50 mM Tris, pH 9,5). Dabei konnte eine Fraktion, die TSC-36 enthielt, bei 150 mM eluiert werden und eine zweite Fraktion bei 200 mM NaCl. Diese werden im folgenden als Isoform A bzw. B bezeichnet. Im SDS-Polyacrylamid Gel wird unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen die Isoform A bei einem apparenten Molekulargewicht von 45-51 kDa beobachtet und für die Isoform B von 48-55 kDa (Abb. 4-3).

4.1.2.2 Aufreinigung des rekombinanten Proteins EC-3_{tag}

Der serumfreie Zellkulturüberstand wurde durch Ultrafiltration eingeeengt, gegen 300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0, dialysiert und auf eine Affinitätssäule mit Cobalt-Talon-Matrix gegeben. Es wurde mit einem Imidazolgradienten bis 200 mM eluiert. Die Fraktionen von 50-130 mM Imidazol wurden gesammelt. Nach Dialyse gegen 50 mM BisTris, pH 6,0, wurde das Protein auf einer ResourceQ-Säule in zwei Isoformen A (Elution bei 160 mM) und B (Elution bei 260 mM) aufgetrennt. Vor dem Aliquotieren wurde gegen 5 mM Tris, pH 7,4, dialysiert. Bei Analyse der Proteine mittels einer SDS-PAGE wurde für Isoform A ein apparentes Molekulargewicht von 42-48 kDa und für Isoform B von 45-50 kDa festgestellt. Die Reduktion der Proteine veränderte ihr Migrationsverhalten in der Elektrophorese nicht. Alle weiteren Versuche wurden mit der homogeneren Isoform A durchgeführt (Abb. 4-3).

4.1.2.3 Aufreinigung des rekombinanten Proteins EC_{tag}

Der Zusatz von 2 mM EDTA als Proteaseinhibitor beim Sammeln der Zellkulturüberstände macht die Verwendung einer Ionenaustauschersäule als ersten Reinigungsschritt sinnvoll, um einen Dialyseschritt zur Abtrennung des EDTA vor der Cobalt-Talon-Chromatographie zu vermeiden. Nach Dialyse gegen 50 mM Tris, pH 7,4, wurde der Zellkulturüberstand auf eine Q-Sepharose FF-Säule aufgetragen und mit einem Gradienten von 0-1 M NaCl eluiert. Die Fraktionen von 200-300 mM NaCl wurden aufgefangen und gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, dialysiert. Nach dem Auftragen auf eine Affinitätssäule mit Cobalt-Talon-Matrix wurde mit 10 mM Imidazol gewaschen. Bei einem Gradienten bis 250 mM Imidazol eluierte das Protein bei 20-50 mM Imidazol. Eine Gelfiltration auf eine Sephadex G-50 Säule äquilibriert mit 50 mM NH₄HCO₃ war notwendig, weil unter nicht reduzierenden Bedingungen bei doppeltem Molekulargewicht eine breite Bande zu erkennen war, die wahrscheinlich auf die falsche Knüpfung von Disulfiden zurückzuführen ist. Nach der Dialyse gegen TBS wurde das Protein aliquotiert. Die EC-Domäne zeigt unter nicht reduzierenden Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von 28-35 kDa, unter reduzierenden Bedingungen verbreitert sich die Bande auf 22-35 kDa.

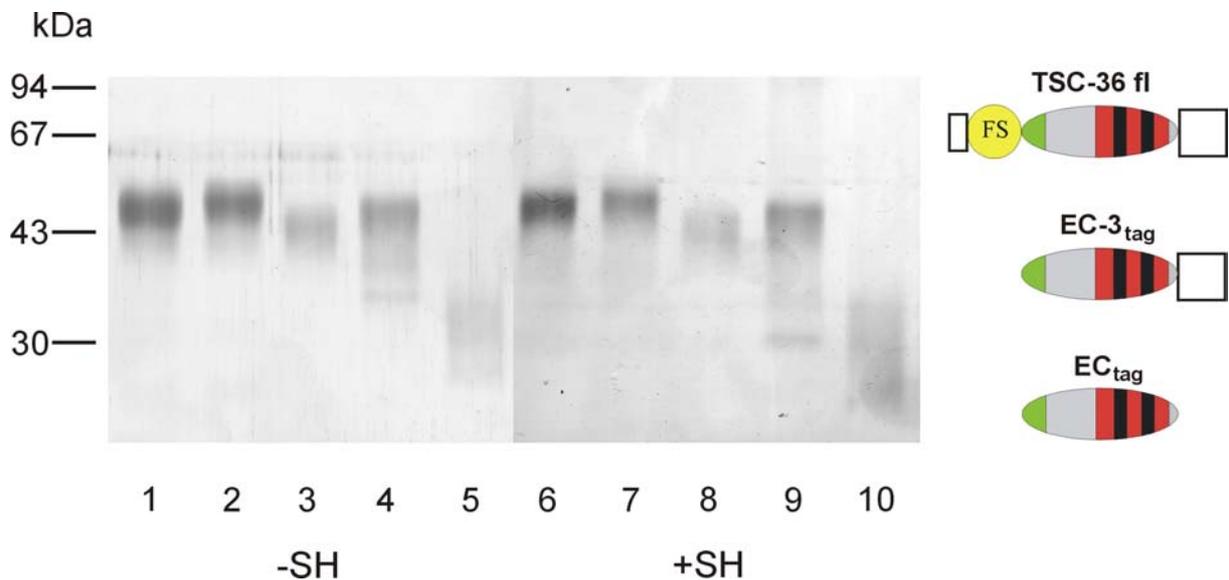


Abb. 4-3: Rekombinant exprimierte TSC-36 Fragmente. Die gereinigten Proteine wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (-SH: unter nicht reduzierenden Bedingungen, +SH unter reduzierenden Bedingungen) und mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. In Spur 1 und 6 ist TSC-36 fl Isoform A, in Spur 2 und 7 TSC-36 fl Isoform B, in Spur 3 und 8 bzw. 4 und 9 EC-3_{tag} Isoform A bzw. B und in Spur 5 und 10 EC_{tag} aufgetragen.

4.2 Massenspektrometrische Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine und ihrer posttranslationalen Modifizierungen

Die rekombinant exprimierten Proteine wurden massenspektrometrisch mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Reflex III, Bruker) analysiert. Dazu wurden die Massen der gereinigten Proteine sowie ihre Massen nach Behandlung mit N-Glykosidase F (Tab. 4.1) bestimmt. TSC-36 weist drei potentielle N-Glykosylierungsstellen auf, die sich alle auf der EC-Domäne befinden, und zwar bei Asn 126, 157 und 162. Die Spektren zeigten Molekülionensignale mit einer großen Peakbreite von ca. ± 3500 Da, woraus sich auf eine heterogene Glykosylierung schließen lässt. Die Isoformen von TSC-36 fl A und B weisen die gleiche Masse auf. Nach Abspaltung der N-Glykane mit N-Glykosidase F ergeben sich für beide Formen ebenfalls ein gleiches mittleres Molekulargewicht ca. 33650 Da. Für beide Isoformen errechnet sich somit ein N-Glykan Anteil von ca. 21% am gesamten Molekulargewicht. Die Proteine EC-3_{tag} A und B weisen eine Massendifferenz von ca. 2600 Da auf. Der Verdau mit N-Glykosidase F führt in beiden Fällen jedoch zu einem fast identischen Molekulargewicht von ca. 28150 Da. Der Unterschied ist somit in der Masse der N-Glykane begründet. Bei der Behandlung des Proteins EC_{tag} mit N-Glykosidase F wurden zwei Peaks bei 19688 Da und bei 22617 Da erhalten, wobei der letztere Peak ein Übergangsprodukt darstellt, welches aus einem unvollständigen Abbau resultiert. EC_{tag} besitzt einen Anteil von ca. 5300 Da an N-Glykanen. Alle Proteine weisen noch andere posttranslationale Modifikationen auf, die nicht auf eine N-Glykosylierung zurückzuführen sind.

Tab. 4-1: Massenspektrometrisch bestimmte Molekulargewichte (MW) der rekombinant exprimierten Proteine. Es wurden jeweils 20 pmol der Proteine (nicht reduziert) vermessen. MW_{gem.} = gemittelttes Molekulargewicht, *^a = zusätzliches Signal durch unvollständigen Abbau.

| | TSC-36 fl A | TSC-36 fl B | EC-3 _{tag} A | EC-3 _{tag} B | EC _{tag} |
|---|-------------|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| MW _{theoretisch} [Da] | 33008 | 33008 | 27643 | 27643 | 18979 |
| MW _{bestimmt} [Da] | 42310 | 41880 | 35387 | 37985 | 25023 |
| MW _{gem. nach N-Glykosidase F} [Da] | 33828 | 33467 | 28148 | 28168 | 22617* ^a , 19688 |
| MW _{gem. der N-Glykane} [Da] | 8482 | 8797 | 7239 | 9817 | 5335 |
| MW _{gem. der restlichen posttranslationalen Modifikationen} [Da] | 820 | 459 | 505 | 525 | 709 |

4.3 Untersuchungen zur Calciumbindung und Sekundärstruktur

4.3.1 CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde die Konformation der gereinigten Proteine bestimmt und mit dem Programm SELCON die theoretischen Sekundärstrukturanteile berechnet. Da TSC-36 ebenso wie SC1 in seiner EC-Domäne über zwei EF-Hand-Motive verfügt, wurde auch ein möglicher Einfluß der Calciumbindung auf die Sekundärstruktur untersucht (Abb. 4-4).

Die CD-Spektren für alle drei Proteine TSC-36 fl, EC-3_{tag} und EC_{tag} zeigen ein Minimum bei 207 nm und eine Schulter bei 222 nm, welche für Proteine mit einem hohen Anteil an α -Helix charakteristisch sind. Die Analyse der Spektren mit dem Programm SELCON ergab für TSC-36 fl einen α -Helix Anteil von 29% und für EC_{tag} einen Anteil von 22%. Für das Domänenpaar EC-3_{tag} wurde mit 11% der geringste Gehalt an α -Helix berechnet, mit 38% aber der größte Anteil an β -Faltblatt-Strukturen, was auf einen hohen Anteil an β -Faltblatt-Strukturen in Domäne III hindeutet. Bei der Berechnung der angegebenen Werte wurden die Spektren der Calcium gesättigten Proteine zugrunde gelegt (Tab. 4-3).

Die Zugabe von Calcium führte nur zu einem sehr kleinen Effekt für alle drei Fragmente. Eine hochaffine Calciumbindung wurde durch die Zugabe von 4 mM EDTA überprüft. Auch hierbei konnte keine signifikante, reversible Änderung der Spektren detektiert werden.

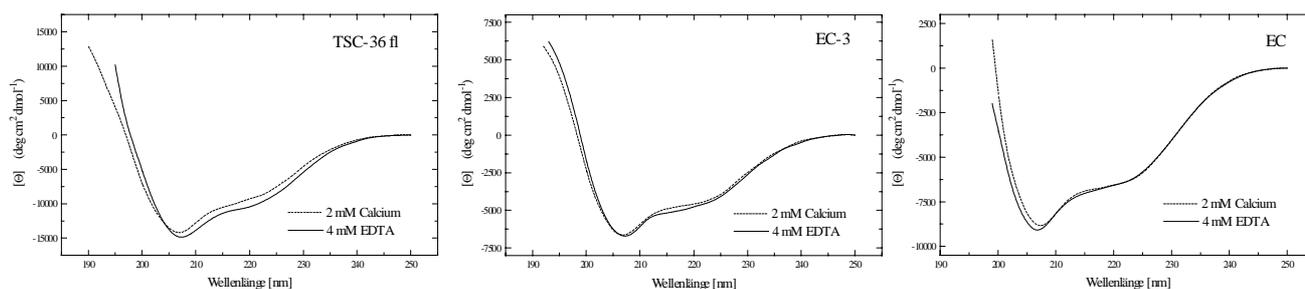


Abb. 4-4: CD-Spektren von TSC-36 fl, EC-3_{tag} und EC_{tag}. Die CD-Spektren der rekombinanten Proteine TSC-36 fl (108 $\mu\text{g/ml}$) und EC-3_{tag} (150 $\mu\text{g/ml}$) wurden in 5 mM Tris, pH 7,4, und EC_{tag} (251 $\mu\text{g/ml}$) in TBS, pH 7,4, aufgenommen. Die Messungen erfolgten in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke. Die Kurven zeigen die Spektren in Anwesenheit von Calcium (gestrichelte Linie) bzw. in Anwesenheit von EDTA (durchgezogene Linie).

Tab. 4-2: Berechnete Sekundärstrukturanteile der Proteine TSC-36 fl, EC-3_{tag} und EC_{tag}. Die Zahlen bezeichnen die prozentualen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente der mit Calcium gesättigten Proteine. Zum Vergleich sind die Werte für die Proteine ohne Calcium in Klammern angegeben. Die Sekundärstrukturanteile sind programmbedingt nicht auf 100% normiert.

| | | TSC-36 fl | EC-3 _{tag} | EC _{tag} |
|--------|-------------|-----------|---------------------|-------------------|
| SELCON | α-Helix | 29% (32%) | 11% (11%) | 22% (19%) |
| | β-Faltblatt | 14% (10%) | 38% (37%) | 24% (24%) |
| | Schleifen | 22% (28%) | 19% (19%) | 17% (22%) |
| | ungeordnet | 35% (33%) | 33% (33%) | 33% (33%) |

4.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Da in der CD-Spektroskopie keine eindeutig durch Calcium induzierte Konformationsänderung beobachtet werden konnte, wurden alle Proteine auch mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Aminosäuresequenz von TSC-36 enthält acht Tyrosine und vier Tryptophane, die so auf die einzelnen Domänen verteilt sind, daß alle Proteine Signale in der Fluoreszenzspektroskopie ergeben. Bei einer Anregung bei 280 nm zeigten die TSC-36-Fragmente Emissionsmaxima zwischen 342 und 346 nm.

Die Zugabe von Calcium führte bei TSC-36 fl und EC-3_{tag} zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt war jedoch nicht reversibel, da die Fluoreszenzintensität durch einen Überschuß EDTA nicht wieder auf den ursprünglichen Wert zurückgeführt werden konnte. Bei der EC-Domäne hingegen kam es durch Zugabe von Calcium zu einer sehr kleinen Zunahme der Fluoreszenzintensität, die auch nicht durch einen Überschuß an EDTA aufgehoben werden konnte (Abb. 4-5). In der Fluoreszenzspektroskopie konnte somit für alle drei Proteine kein durch Calcium hervorgerufener Konformationswechsel gezeigt werden.

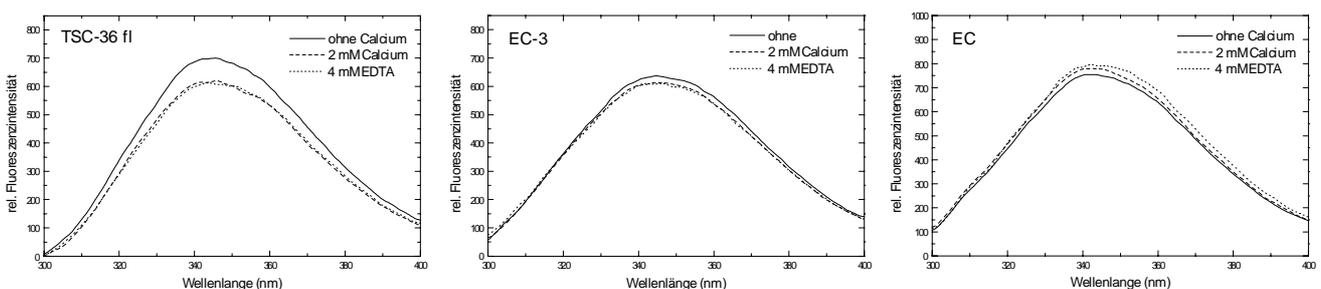


Abb. 4-5: Fluoreszenzspektren der Proteine TSC-36 fl, EC-3_{tag} und EC_{tag}. Die Fluoreszenzspektren von TSC-36 fl (1 µM), EC-3_{tag} (1 µM), EC_{tag} (1 µM) wurden in 5 mM Tris, pH 7,4, aufgenommen.

4.4 Charakterisierung der beiden Isoformen des TSC-36

4.4.1 Auftrennung des TSC-36 in zwei Isoformen

Der letzte Reinigungsschritt auf einem Ionenaustauscher führte zu einer Auftrennung des TSC-36 in zwei Fraktionen: Isoform A wurde bei 150 mM NaCl und Isoform B bei 200 mM eluiert. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Eigenschaften der Isoformen wurden beide nochmals unter den gleichen Bedingungen auf den Ionenaustauscher gegeben. Beide Isoformen konnten bei den für sie charakteristischen Salzkonzentrationen eluiert werden (Abb. 4-6). Daraus kann abgeleitet werden, daß Isoform B mehr negative Ladungen trägt als Isoform A.

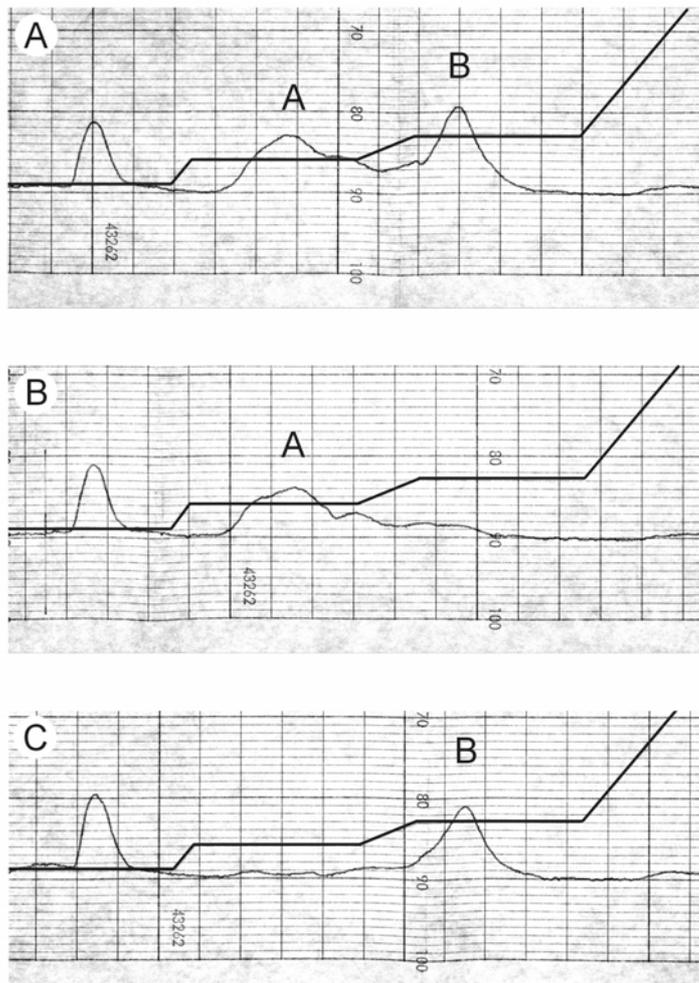


Abb. 4-6: Analytische Ionenaustauschchromatographie zum Nachweis der beiden Isoformen des TSC-36. A zeigt die Trennung eines Gemisches beider Spezies. In B und C ist zu beobachten, daß die charakteristischen Eigenschaften von TSC-36 A und B reproduzierbar sind. Bei dem ersten Peak handelt es sich um einen Lösungsmittelleffekt.

4.4.2 Massenspektrometrische Analyse der Isoformen

Der Ladungsunterschied und die daraus resultierenden Eigenschaften der beiden Isoformen können auf unterschiedliche posttranslationale Modifizierungen oder einen Unterschied auf Proteinebene zurückzuführen sein. Da es sich um ein rekombinant exprimiertes Protein handelt, sind Splice-Varianten auszuschließen. Durch N-terminale Ansequenzierung konnte die Identität beider Proteine bestätigt werden. Zur weitergehenden Analyse der Proteine wurden sie reduziert, alkyliert, mit N-Glykosidase F behandelt und nach Trypsinabbau im MALDI-TOF-Massenspektrometer auf Unterschiede untersucht. Dadurch konnten 86% der Aminosäuren der Isoform A und 80% der Aminosäuren der Isoform B erfaßt werden und sichergestellt werden, daß auch der C-Terminus der Proteine bis auf die letzten sieben Aminosäuren intakt ist. Die vollständige Analyse der letzten sieben Aminosäuren am C-Terminus war aufgrund des tryptischen Abbaus in Tripeptide und eine einzelne Aminosäure nicht möglich. Nicht modifizierte Peptide, die potentielle N-Glykosylierungsstellen tragen, konnten nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Programmes NetOGlyc wurden zwei O-Glykosylierungsstellen vorhergesagt. Ob diese tatsächlich glykosyliert sind, konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Es wurden zwar Peptide, deren Molekulargewichte denen der nicht glykosylierten Form entsprechen, gefunden, trotzdem ist es nicht auszuschließen, daß daneben noch glykosylierte Proteine existieren, da die O-Glykosylierung häufig unvollständig ist (Abb. 4-7).

Die Wahrscheinlichkeit, daß der Ladungsunterschied durch eine unterschiedliche Aminosäure-Zusammensetzung hervorgerufen wird, ist damit verhältnismäßig gering.

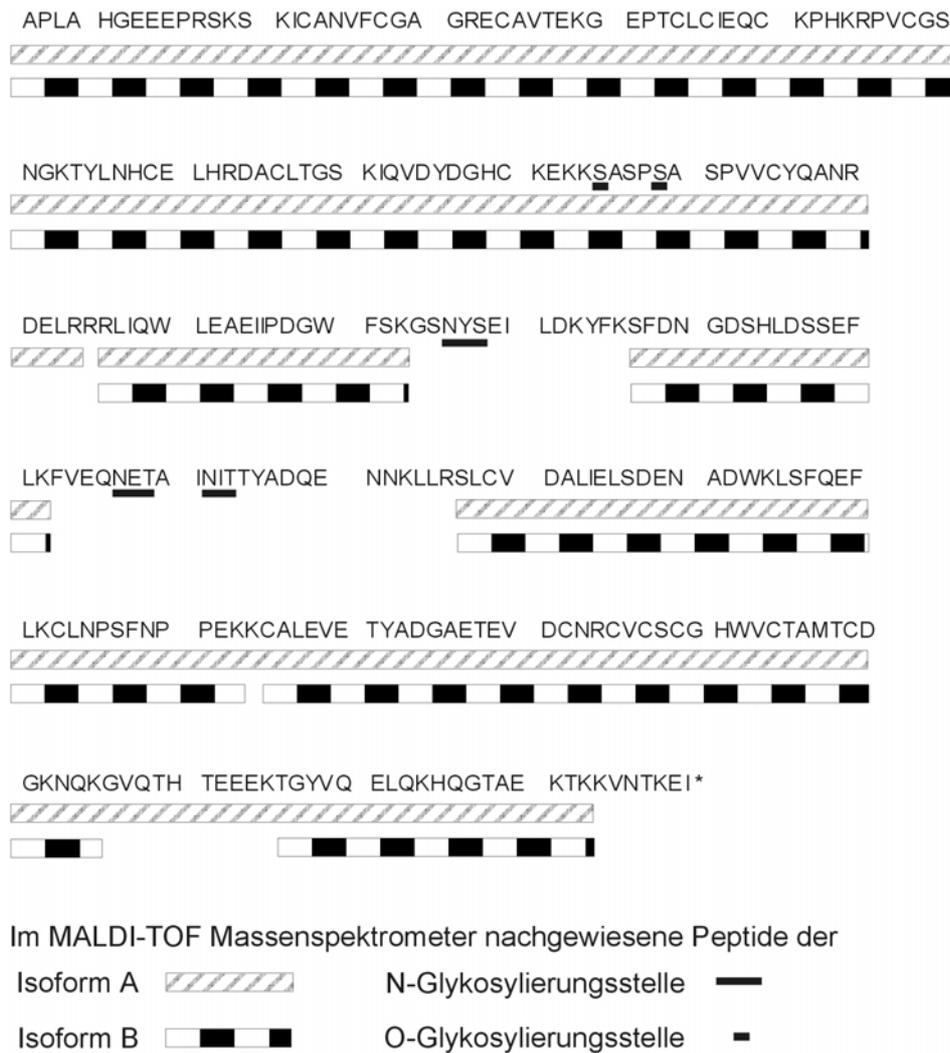


Abb. 4-7: Massenspektrometrische Analyse der Aminosäuresequenz der TSC-36 Isoformen. Die Abdeckung der Aminosäuresequenz durch die einzelnen massenspektrometrisch gefundenen Fragmente der beiden Formen A und B sind eingezeichnet. Die drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen. Die mit dem Programm NetOGlyc vorhergesagten O-Glykosylierungsstellen sind gekennzeichnet.

Der Ladungsunterschied kann auch durch posttranslationale Modifikationen, z.B. Phosphorylierungen oder Glykosylierungen verursacht sein. Da TSC-36 in der SDS-PAGE eine breite Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 45-55 kDa zeigte, lag die Untersuchung der Glykane nahe.

4.4.3 Monosaccharid-Analyse

Die qualitative Monosaccharid-Analyse wurde nach Chaplin (1986) durchgeführt. Dazu wurden die peptidgebundenen Glykane durch eine methanolische Acidolyse in ihre Mono-

saccharid-Bausteine zerlegt und zu 1-O-Methyl-per-Trimethylsilylester umgesetzt. Die Identifizierung der veresterten Glykane erfolgte in einem GC-MS-System über die Retentionszeiten und charakteristischen Fragmentierungen. In der Tab. 4-4 sind die ermittelten Monosaccharide aufgeführt.

Tab. 4-3: Nachgewiesene Monosaccharid-Bausteine der Isoformen A und B

| Glykan | TSC-36 A | TSC-36 B |
|----------------------|----------|----------|
| Mannose | + | + |
| Galactose | + | + |
| Glucose* | + | + |
| N-Acetylglucosamin | + | + |
| Acetyl-Neuraminsäure | + | + |
| N-Acetylgalactosamin | - | - |

* = Kontamination

Die beiden Isoformen lassen sich nicht aufgrund ihrer qualitativen Monosaccharid-Zusammensetzung unterscheiden. Da bei der Analyse kein N-Acetylgalactosamin gefunden wurde, kann eine O-Glykosylierung ausgeschlossen werden, damit wurden die in der massenspektrometrischen Peptidanalyse gefundenen Ergebnisse bestätigt. Ein Ladungsunterschied der beiden Proteine kann durch einen unterschiedlichen Gehalt an geladenen Kohlenhydraten sowie Sialinsäure begründet sein. Sialinsäuren sitzen terminal an vielen Glykanstrukturen und tragen jeweils eine negative Ladung.

4.4.4 Unterscheidung der beiden Isoformen aufgrund ihrer Sialinsäurezusammensetzung

4.4.4.1 Analyse des Sialinsäuregehalts der Glykane mittels Ionenaustauschchromatographie

Zur Analyse der Sialinsäuren wurden die N-Glykane mit N-Glykosidase F von den Proteinen abgetrennt. Nach Fällung der Proteine befanden sich die Glykane im Überstand und wurden dann mit 2-AB fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine Ionenaustauschersäule gegeben. Die Detektion der fluoreszenzmarkierten Oligosaccharide erfolgte mit

einem an die HPLC angeschlossenen LIF-Detektor. Nach Behandlung der Zucker mit Sialidase wurde nur ein Peak detektiert, der für beide Isoformen an gleicher Stelle von der Säule eluierte.

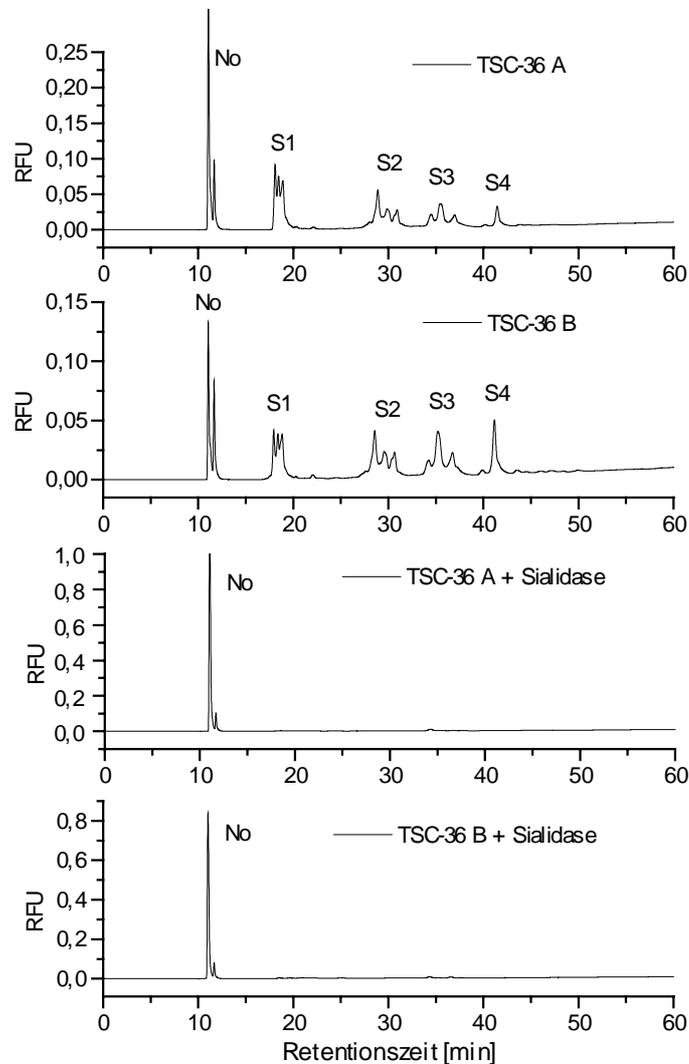


Abb. 4-8: Analyse des Sialinsäuregehaltes der Isoformen TSC-36 A und B. Die 2-AB fluoreszenzmarkierten Glykane wurden über eine HyperQ-Ionenaustauschersäule auf der HPLC getrennt. Die oberen beiden Chromatogramme zeigen die aufgetrennten Zucker. No bezeichnet die Neutralzucker, S1 Monosialozucker, S2 Disialozucker, S3 Trisialozucker und S4 Tetsialozucker. Nach dem zur Kontrolle durchgeführten Sialidaseverdau sind in den unteren Chromatogrammen nur noch Neutralzucker zu erkennen.

Tab. 4-4: Prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Sialinsäuren an den Glykanstrukturen der Isoformen TSC-36 A und B. Die Prozentangaben wurden aus den Peakflächen bestimmt.

| | | Glykane TSC-36 A in % | Glykane TSC-36 B in % |
|------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| Neutralzucker | N ₀ | 20,0 | 11,0 |
| Monosialozucker | S ₁ | 41,3 | 31,9 |
| Disialozucker | S ₂ | 17,9 | 20,7 |
| Trisialozucker | S ₃ | 16,0 | 24,5 |
| Tetrasialozucker | S ₄ | 4,8 | 11,9 |

Der erste Peak in den Chromatogrammen stellt die Neutralzucker dar, Isoform A verfügt über ca. 9% mehr Neutralzucker als Isoform B. Bei der Betrachtung der Sialinsäurezusammensetzung fällt auf, daß die Isoform B deutlich mehr Di-, Tri- und Tetrasialozucker trägt und somit auch eine höhere negative Ladung. Dadurch läßt sich das unterschiedliche Verhalten auf dem Ionenaustauscher erklären. Die Proteine sollten somit nach Sialidaseverdau ähnliche Eigenschaften auf dem Ionenaustauscher zeigen. Die Ermittlung der hypothetischen Ladungszahl Z nach Hermentin et al. (1996) erfolgt durch die Multiplikation der aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile der ladungsmäßig einheitlichen Peakgruppen mit der Anzahl der entsprechenden N-Acetyl-Neuraminsäuren. Der Vergleich von Z für Isoform A (Z=144) und Isoform B (Z=201) zeigt, das Isoform B mehr negative Ladungen trägt.

4.4.4.2 Analyse der Proteine nach Behandlung mit Sialidase

TSC-36 A und B wurden mit Sialidase verdaut und auf einer Ionenaustauschersäule untersucht. Beide Isoformen konnten bei 150 mM NaCl von der Säule eluiert werden. Dies zeigt, daß die verschiedenen Ladungszustände der beiden Proteine auf einen unterschiedlichen Sialinsäuregehalt zurückzuführen sind.

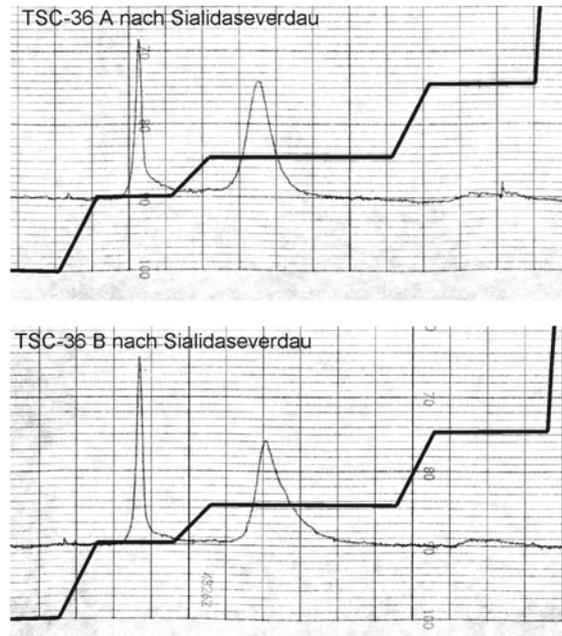


Abb. 4-9: Qualitative Analyse der Isoformen TSC-36 A und B. Die Proteine wurden mit Sialidase verdaut und auf einem Ionenaustauscher analysiert. Beide Isoformen eluieren bei 150 mM NaCl.

4.5 Herstellung und Charakterisierung des TSC-36-Antikörpers

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen TSC-36 wurden 500 µg rekombinantes Protein zur Immunisierung eines ausgewählten Kaninchens an die Firma Eurogentec geschickt. Da das erhaltene Antiserum eine hohe Kreuzreaktivität gegen Keratine zeigte, wurde es mit Hilfe einer Affinitätssäule, bestehend aus TSC-36 gebunden an Sepharose, gereinigt. Dieser affinitätsgereinigte Antikörper wurde zur immunochemischen Charakterisierung des TSC-36 verwendet.

4.5.1 Untersuchung der Spezifität und der Kreuzreaktivität

Aufgrund der unter 3.5.1 näher diskutierten Gründe wurde der Antikörper gegen TSC-36 auf seine Spezifität und Kreuzreaktivität gegenüber den Proteinen der BM-40 Proteinfamilie hin untersucht, und zwar gegenüber den nativen als auch den denaturierten Proteinen. Alle hierzu verwendeten Proteine sind im Institut für Biochemie II (Medizinische Fakultät) als rekombinante Proteine vorhanden.

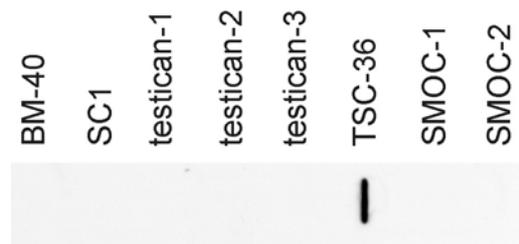


Abb. 4-10: Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen die nativen Proteine im Slot-Blot. 50 ng der verschiedenen Proteine der BM-40 Familie wurden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen TSC-36 in der Verdünnung 1:200 inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers und nachfolgender ECL-Reaktion detektiert.

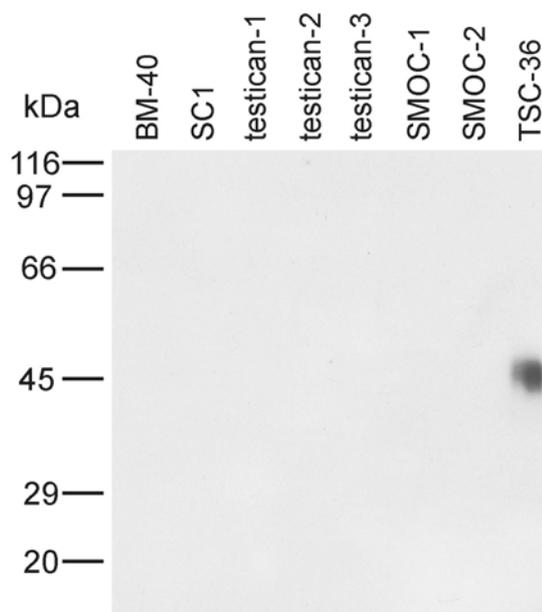


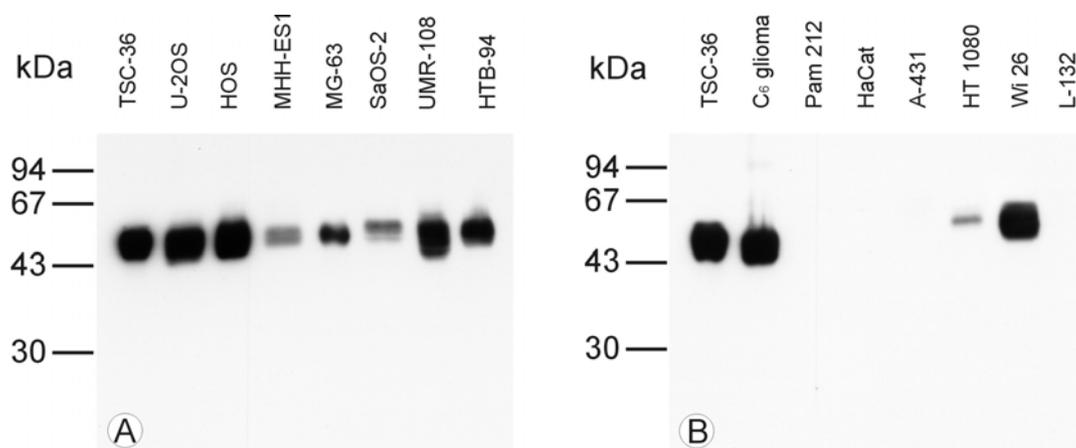
Abb. 4-11: Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen die denaturierten Proteine im Immunoblot nach SDS-PAGE. 50 ng der einzelnen Proteine wurden nach Reduktion auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen TSC-36 aus Kaninchen in der Verdünnung von 1:500 wurden die Signale mittels eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers und nachfolgender ECL-Reaktion sichtbar gemacht.

Der Antikörper gegen TSC-36 erkannte rekombinantes TSC-36 sowohl in nativer (Abb. 4-10) als auch in denaturierter (Abb. 4-11) Form. Gegen die anderen Proteine der BM-40 Familie konnte bei identischer Proteinkonzentration keine Kreuzreaktivität festgestellt werden. Die gefundenen Gewebeverteilungen und Funktionen konnten damit eindeutig dem TSC-36 zugeordnet werden.

4.6 Endogene Expression von TSC-36 in verschiedenen Zelllinien

Verschiedene Zelllinien wurden auf die Expression von TSC-36 untersucht. Sie wurden unter Zellkulturbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und die serumfreien Zellkulturüberstände gesammelt und im Immunoblot getestet.

TSC-36 konnte in allen untersuchten Osteosarkom-Zelllinien (U-2OS, HOS, MHH-ES1, MG-63, SaOS-2 und UMR-108) als auch der Chondrosarkom-Zelllinie HTB-94 nachgewiesen werden. Die Astrocyten-Zelllinie S6E, C₆-Glioma-Zellen, Fibrosarkom-Zellen HT1080 und die Fibroblasten Wi-26 zeigten auch eine Expression von TSC-36, die Lungenfibroblasten L132 jedoch nicht. Für die beiden Brustkrebs-Zelllinien MDA MB-231 und ZR 75-1 konnte auch ein Signal im Immunoblot erhalten werden, für die Brustkrebs-Zelllinien T47D und MCF-7 hingegen nicht. Keratinocytenzellen (Pam212, SSC25), Epithelzellen (HaCat, A-431, HBL100), parietale endodermale Zellen (Pys2), embryonale Nierenzellen (EBNA-293), maligne Melanomzellen (A-375), Gebärmuttercarcinom-Zellen (OVCAR) und Colon-Adenocarcinom Zellen (CaCO2) zeigten im Immunoblot kein Signal. Es konnte gezeigt werden, daß der affinitätsgereinigte Antikörper murines, humanes TSC-36 und TSC-36 aus Ratte erkennt.



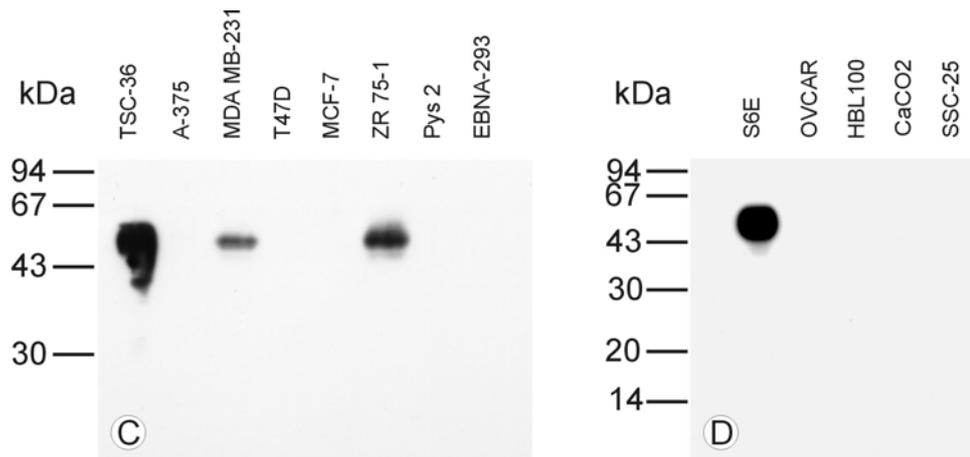


Abb. 4-12: Endogene Expression von TSC-36 in verschiedenen Zelllinien. 1 ml der serumfreien Zellkulturüberstände wurden mit TCA gefällt und nach Reduktion auf 12%igen (A, B, C) bzw. 15%igen (D) SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgtem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen TSC-36 inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels eines an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers und nachfolgender Chemilumineszenz-Reaktion.

4.7 Gewebeverteilung von TSC-36

4.7.1 Immunoblot von Gewebeextrakten

Zur Bestimmung der Gewebeverteilung von TSC-36 wurden von verschiedenen Geweben der Maus Gewebeextrakte hergestellt und im Immunoblot untersucht. Eine Expression von TSC-36 konnte nur in Gehirn, Cerebellum, Testis bzw. Niere und Nebenniere (Abb. 4-13) mit einem apparenten Molekulargewicht von 25 kDa gefunden werden. Zur genaueren Bestimmung der Gewebeverteilung im Gehirn wurden weitere Gewebeextrakte untersucht. TSC-36 konnte in allen Teilen des Gehirns sowie dem Rückenmark nachgewiesen werden. In der Hypophyse wurde nur eine schwache Expression beobachtet. Alle beobachteten Banden liefen bei einem apparenten Molekulargewicht von 25 kDa. Das als Positivkontrolle verwendete Rekombinante TSC-36 war erwartungsgemäß bei 45-55 kDa zu erkennen. Zur Überprüfung der Spezifität dieser Bande bei 25 kDa wurde ein Inhibierungsexperiment durchgeführt (s. 4.7.2).

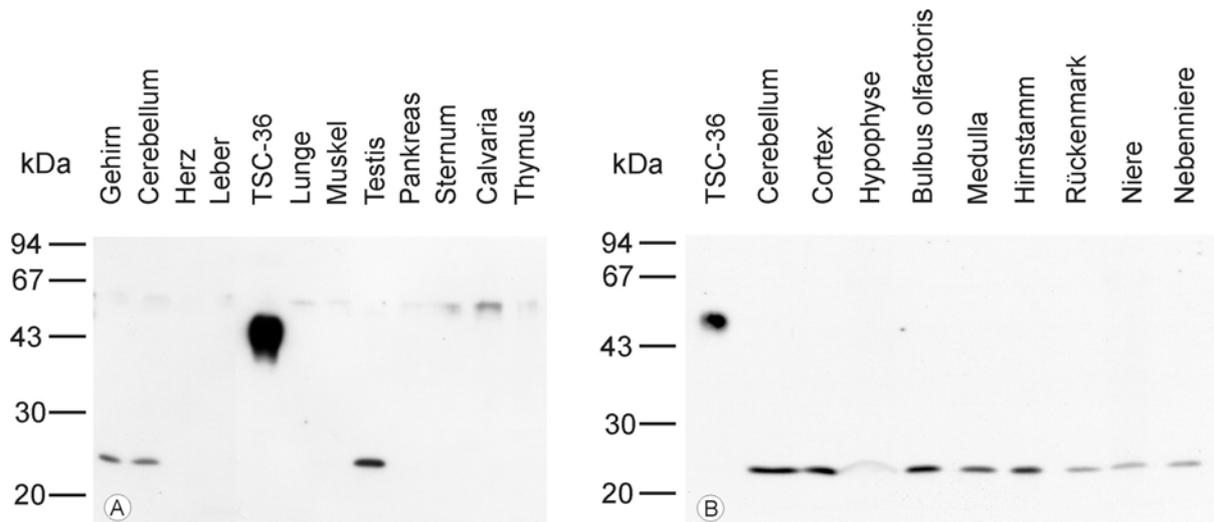


Abb. 4-13: Immunoblot verschiedener Gewebeextrakte mit dem Antikörper gegen TSC-36. Die Gewebe wurden mit TBS, 10 mM EDTA und einem Proteaseinhibitorcocktail extrahiert. Nach Auftrennung der reduzierten Proben mittels SDS-PAGE (Gel A,B: 12%) wurden sie im Immunoblot untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen TSC-36 (1:500), einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und anschließender Chemilumineszenzreaktion. Die Banden bei ca 50 kDa sind wahrscheinlich auf eine schwache Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit Keratin zurückzuführen. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

4.7.2 Verifizierung der Immunoblot-Bande bei 25 kDa durch Inhibierung

Bei der Analyse von TSC-36 in Gewebeextrakten wurde, trotz der Verwendung eines affinitätsgereinigten Antiserums, ausschließlich eine Bande bei 25 kDa beobachtet. Durch einen Inhibierungsversuch sollte die Spezifität dieser Bande nachgewiesen werden; dazu wurde als Positivkontrolle rekombinantes TSC-36 und Gewebeextrakt des Gehirns ausgewählt. Die Detektion dieser 25 kDa Bande konnte erfolgreich durch die Vorinkubation des affinitätsgereinigten Antikörpers mit einem Überschuss an rekombinanten TSC-36 verhindert werden und somit die Spezifität der Antikörper gezeigt werden (Abb. 4-14).

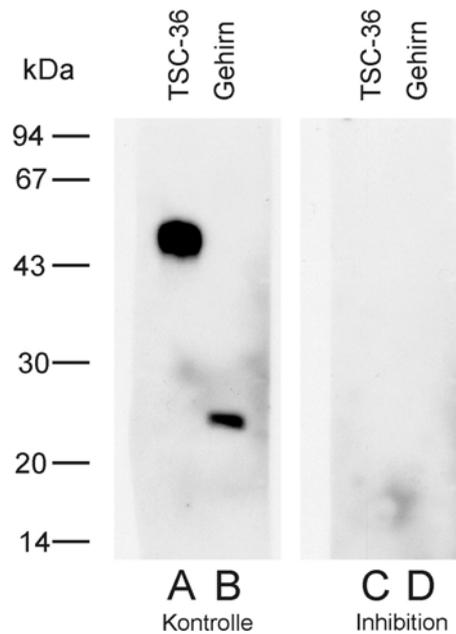


Abb. 4-14: Verifizierung der Banden bei ca. 25 kDa durch Inhibition mit rekombinantem TSC-36 im Immunoblot. Es wurden 200 ng rekombinantes TSC-36 (A und C) und 40 μ l des Gewebeextraktes des Gehirns (B und D) auf einem 8-20%igen SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Antikörperverdünnungen (1:400) wurden ohne (A, B) bzw. zur Inhibition mit 100 μ g rekombinantem TSC-36 versetzt (C, D) und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Membranen mit diesen Lösungen inkubiert und die Signale mit Hilfe eines Zweitantikörpers und folgender ECL-Reaktion sichtbar gemacht.

4.7.3 Immunhistochemische Untersuchung

Untersuchungen der Gewebeverteilung von TSC-36 und seiner Homologe beschränken sich meist auf die Analyse der Expression während der Entwicklung durch *whole mount in-situ* Hybridisierung (Patel et al., 1996; Amthor et al., 1996; Okabayashi et al., 1999; Towers et al., 1999, De Groot et al., 2000). Daneben ist die Analyse der mRNA Expression von TSC-36 in den Alveolen der Lunge adulter Mäuse durch *in-situ* Hybridisierung nachgewiesen worden (Mashimo et al., 1997). Desweiteren gibt es aufgrund einer Northern-Blot Analyse Hinweise, daß TSC-36 mRNA in Gehirn, Duodenum, Herz, Niere, Leber und Ovar vorkommt (Patel et al., 1996). Aufgrund der breiten Expression von TSC-36 im zentralen Nervensystem (s. 4.7.1), wurde das Gehirn, insbesondere das Cerebellum und der Hippocampus, zur näheren immunhistochemischen Analyse ausgewählt.

Das Kleinhirn besteht aus Mark (weiße Substanz, nervenfaserreich) und Rinde (graue Substanz, nervenzellreich). Die Rinde setzt sich aus Molekularzellschicht (MZS), Granulärzellschicht (GZS) und der dazwischen liegenden Purkinjezellschicht (PZS) zusammen. Die Expression von TSC-36 konnte in allen Teilen der Rinde nachgewiesen werden, desweiteren konnte TSC-36 in den tiefen Cerebellumkernen (tCk) entdeckt werden (Abb. 4-15: A). Im Hippocampus konnte TSC-36 in den Granulärzellen des Gyrus dentatus (GD) und in den Pyramidenzellen der Hippocampusregionen CA1, CA2, CA3 und CA4 lokalisiert werden. Der Cortex (Co) zeigte ebenfalls eine Expression von TSC-36 (Abb. 4-15: B).

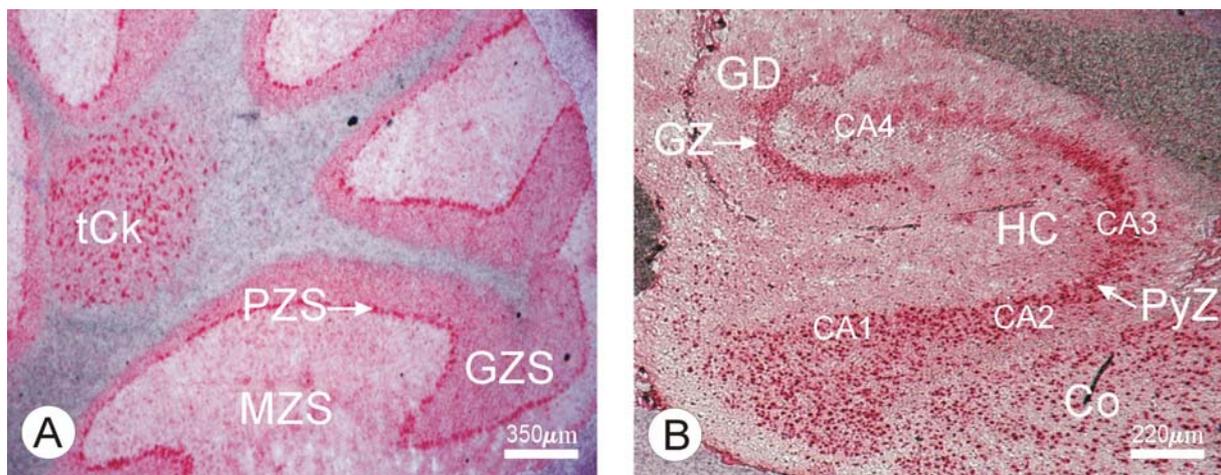


Abb. 4-15: Immunhistochemische Lokalisierung von TSC-36 in Cerebellum und Hippocampus an Gefrierschnitten einer adulten Maus. Die Detektion erfolgte mittels alkalischer Phosphatase. TSC-36 konnte im Cerebellum (A) in den tiefen Cerebellumkernen (tCk), der Granulärzellschicht (GZS), der Molekularzellschicht und der dazwischen liegenden Purkinjezellschicht beobachtet werden. Im Hippocampus wurde eine Expression in den Granulärzellen (GZ) des Gyrus dentatus (GD), den Pyramidenzellen (PyZ) der Hippocampusregionen CA1-4 beobachtet. Im Cortex (Co) wurde auch eine Expression festgestellt.

4.8 Interaktionsstudien des TSC-36 mit Komponenten der ECM im Festphasen-Immunoassay

Die Auswahl der Bindungspartner stimmt mit der für SC1 unter 3.8.1 getroffenen überein. Im Festphasen-Immunoassay konnte für TSC-36 kein Bindungspartner gefunden werden. Alle beobachteten Interaktionen waren zu gering, als daß sie als Bindung hätten interpretiert werden können.

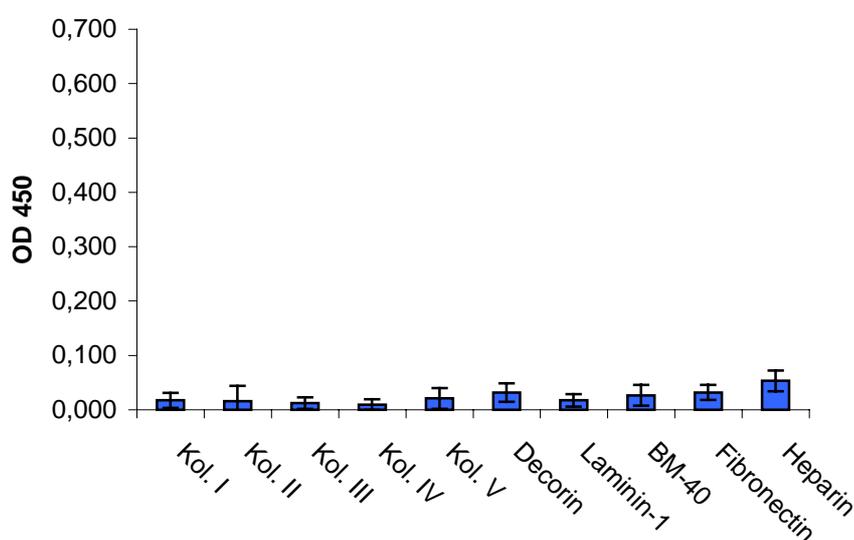


Abb. 4-16: Interaktion von TSC-36 mit ausgewählten ECM-Proteinen. 5 µg/ml Kollagen I-V in 0,5 M Essigsäure und 10 µg/ml Laminin, Fibronectin, BM-40 und Heparin in TBS wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit 5 µg/ml (150µM) TSC-36 inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten in TBS, bei der Inkubation der Liganden wurde 2 mM Calcium zugegeben.

4.9 Lokalisation von TSC-36 und Kollagen I bzw. IV in Niere

Zur Untersuchung einer möglichen Colokalisation von TSC-36 mit Kollagen I und Kollagen IV wurden Gefrierschnitte von Nieren adulter Mäuse mit Antikörpern gegen TSC 36, Kollagen I und IV gefärbt. In Abb. 4-17 A erkennt man, daß Kollagen IV in sehr vielen Strukturen vorkommt. Es handelt sich dabei um eine Färbung von Basalmembranen, die Tubuli (Tb), Glomeruli (Go) und Blutgefäße (Gf) umgibt (Abb. 4-17). TSC-36 kann nur in den kleinen und großen Gefäßen der Niere detektiert werden, die Glomeruli bleiben ungefärbt. Kollagen I ist dagegen deutlich in den Glomeruli und schwach in einem größeren Gefäß zu erkennen. Bei dem Vergleich der Expression fällt auf, daß TSC-36 mit Kollagen I und Kollagen IV lediglich in den großen Gefäßen colokalisiert ist.

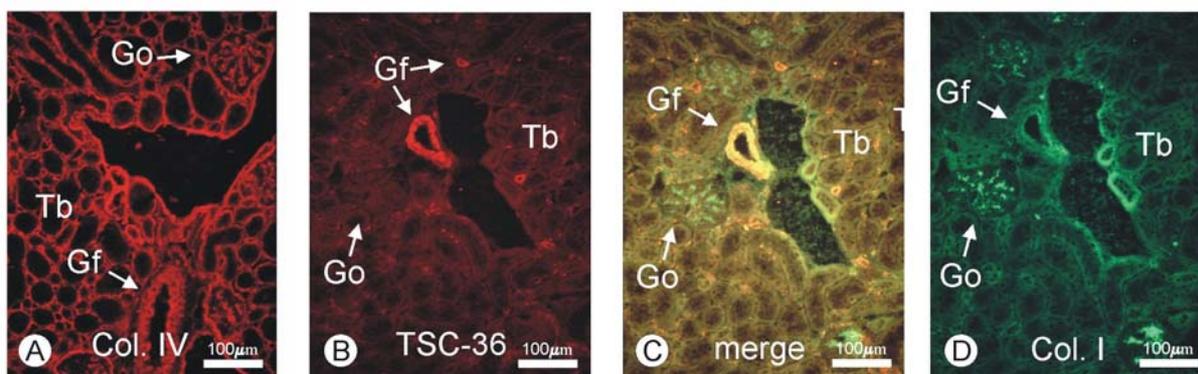


Abb. 4-17: Immunhistochemische Analyse der Expression von TSC-36, Kollagen I und Kollagen IV in der Niere. Die Detektion der Signale wurde mit einem Zur Untersuchung der Lokalisation von TSC-36 Kollagen. Die Detektion des TSC-36 und des Kollagen IV erfolgte mit einem Cy3-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper. Kollagen I wurde mit einem DATF-konjugierten anti-Kaninchen IgG detektiert. Nähere Erläuterungen im Text.

4.10 Lokalisation von TSC-36 und Kollagen I in der Matrix der Osteosarkom-Zelllinie SaOS-2

Humane Osteosarkom-Zellen (SaOS-2) wurden eine Woche mit Ascorbat im Medium kultiviert, um die Bildung einer extrazellulären Matrix zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen immunhistochemisch auf die Expression von TSC-36 und Kollagen I untersucht. Eine Expression von TSC-36 konnte gezeigt werden. Bei dieser Zelllinie wurde TSC-36 schon im Mediumüberstand detektiert (s. 3.6). Als Kontrolle erfolgte eine Kultivierung ohne Ascorbat.

Zur Analyse der Colokalisation von TSC-36 und Kollagen I wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und mittels eines konfokalen Lasermikroskopes untersucht. Kollagen I wird als Heterotrimer aus zwei pro α 1(I)- und einer pro α 2(I)-Kette von den Zellen synthetisiert, die sich nach Sezernierung ins extrazelluläre Medium und einer N- und C-terminalen Prozessierung zu Fibrillen zusammenlagern.

Wie schon bei der Untersuchung von SC1 gezeigt werden konnte, bildet Kollagen I ein extrazelluläres Netzwerk. Bei der Untersuchung der TSC-36 Expression kann keine extrazelluläre Färbung erkannt werden, intrazellulär ist ein Signal im Golgi-Apparat zu sehen.

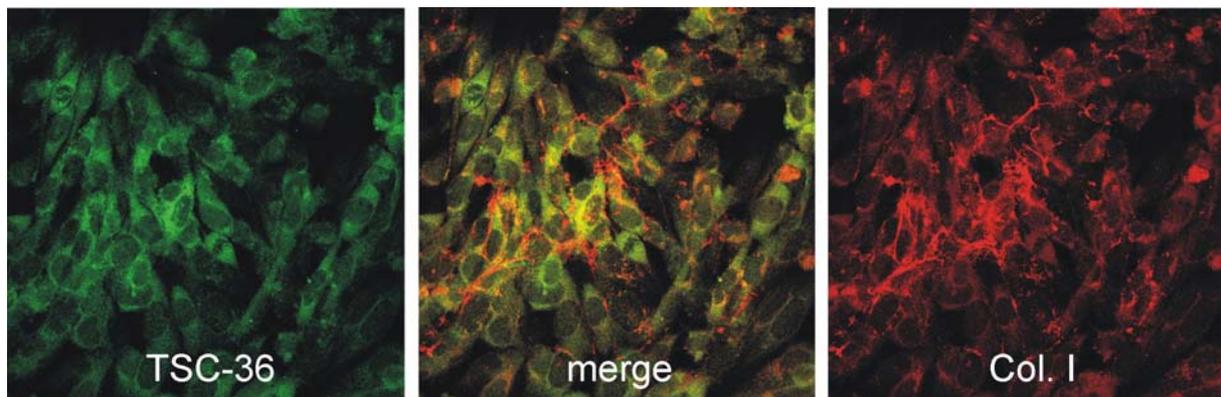


Abb. 4-18: Immunfluoreszenzfärbung von TSC-36 und Kollagen I in der extrazellulären Matrix von SaOS-2-Zellen. Die Zellen wurden unter Zugabe von Ascorbat kultiviert. Die Detektion des TSC-36 erfolgte mit einem DATF-konjugierten anti-Kaninchen IgG und die Detektion des Kollagen I mit einem Cy3-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper.

4.11 Kristallisationsversuche

In Zusammenarbeit mit Dr. Erhard Hohenester (Birkbeck College, London) wurde versucht die beiden Isoformen des TSC-36 fl zu kristallisieren. Trotz eines breitgefächerten Screens verschiedener Kristallisationsbedingungen konnten bisher keine Kristalle erhalten werden.

V Diskussion

5.1 Rekombinante Expression der SC1- und TSC-36-Fragmente

Zur Charakterisierung von SC1 und TSC-36 wurde die Expression der Proteine in einem eukaryontischen System durchgeführt, um eine möglichst physiologische posttranslationale Modifikation der Proteine sicher zu stellen. Gerade bei Proteinen der extrazellulären Matrix sind solche Modifikationen sehr häufig anzutreffen und stellen einen wichtigen Beitrag zur Funktionalität und authentischen Struktur der Proteine dar. Zu den posttranslationalen Modifikationen bei Proteinen der ECM gehören vor allem Glykosylierungen und die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken. Die Stabilisierung durch Disulfide ist insbesondere essentiell für die Ausbildung der beiden EF-Hand Motive in der EC-Domäne der Proteine der BM-40 Familie und damit für die Bindung von Calcium. Auch die FS-Domäne ist durch Disulfide stabilisiert.

SC1

Die Konstrukte I-FS_{tag}, FS-EC, EC wurden in den episomalen Vektor pCEP-Pu kloniert und erfolgreich in EBNA-293-Zellen exprimiert. SC1 fl wurde in diesem Expressionssystem nur schwach exprimiert, und es wurden zusätzlich zum intakten Protein Degradationsprodukte beobachtet (s. 3.1.1.2). Eine deutlich höhere Expression konnte dann allerdings durch die Verwendung von HT1080 Zellen und dem in das Genom der Zellen integrierenden Vektor pRcCMV erzielt werden. Obwohl durch die Verwendung dieses Expressionssystems der Abbau anderer Proteine erfolgreich unterdrückt werden konnte (SMOC-1, Christian Van-nahme, persönliche Mitteilung), konnte die teilweise Degradation des SC1 fl nicht verhindert werden. Daß selbst die Zugabe der nicht cytotoxischen Proteaseinhibitoren: Ovomuroid, Leupeptin (inhibiert Serin- und Cysteinproteasen) und Aprotinin (inhibiert Serinproteasen) den Abbau nicht aufhalten konnten, könnte in einem intrazellulären Abbau bzw. auf einen Abbau durch nicht durch die zugesetzten Proteaseinhibitoren inhibierbare Enzyme im extrazellulären Medium begründet liegen. Die Spaltung des Proteins scheint innerhalb der Domäne I stattzufinden, weil bei den Fragmenten FS-EC und EC kein Abbau festgestellt wurde. Das nicht degradierte Protein konnte im Verlauf der Reinigung fast vollständig von den

Degradationsprodukten getrennt werden. Bei I-FS_{tag} konnte durch die Verwendung eines Histidinmotives zur Affinitätsreinigung und einer nachfolgenden Gelfiltration eine effektive Reinigung erreicht werden.

Alle Proteine können im SDS-Polyacrylamidgel als scharfe Banden beobachtet werden, was zeigt, daß sich die Fragmente FS-EC bzw. I-FS_{tag} und EC individuell als Domänenpaare bzw. einzelne Domäne exprimieren lassen. Die Proteine FS-EC und EC laufen beide bei einem apparenten Molekulargewicht, welches mit dem theoretischem gut übereinstimmt. SC1 fl und I-FS_{tag} hingegen zeigen beide eine abnormales Laufverhalten, d.h. sie laufen um etwa 40 kDa höher als erwartet bei ca. 110 kDa bzw. 95 kDa statt bei ihren theoretischen Molekulargewichten von 71 kDa bzw. 58 kDa. Dafür könnte die sehr saure Domäne I des SC1 mit 106 sauren Aminosäuren auf insgesamt 400 Aminosäuren verantwortlich sein. Dieses ungewöhnliche Laufverhalten wurde auch schon für SC1 aus Ratte und andere Proteine, z.B. das ebenfalls sehr saure GAP-43 (Johnston et al., 1990) und PM-Scl 75 (Alderuccio et al., 1991) beschrieben.

Zur exakteren Bestimmung der Molekulargewichte der rekombinanten Proteine bzw. ihrer posttranslationalen Modifikationen wurden sie massenspektrometrisch untersucht. Dazu wurden die Proteine unbehandelt und nach Inkubation mit N-Glykosidase F bzw. Endoglykosidase H analysiert. Für das SC1 fl ergab sich anstatt der theoretischen 70986 Da mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie 87775 Da, was einem Beitrag von 17 kDa, verursacht durch posttranslationale Modifikationen, entspricht. Die gleiche Differenz wurde für I-FS_{tag} detektiert. FS-EC enthält nur 2,1 kDa an zusätzlicher Masse, während die EC-Domäne mit dem theoretischen Molekulargewicht übereinstimmt. Aus der Aminosäuresequenz von SC1 wurden vier potentielle N-Glykosylierungstellen vorhergesagt. Drei Glykosylierungstellen befinden sich in der Domäne I und eine in der FS-Domäne.

Mittels enzymatischer Deglykosylierung mit N-Glykosidase F, die alle N-glykosidisch gebundenen Zucker vom Protein abspaltet, konnten 4,8 kDa der 17 kDa einer N-Glykosylierung zugeordnet werden. Der Vergleich der Massen der rekombinanten Proteine nach Behandlung mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H erlaubte eine Zuordnung der N-Glykane auf die verschiedenen Domänen. Auf der FS-Domäne befinden sich überwiegend *hybrid-* bzw. *high*-Mannose-Glykane (1,8 kDa von 2,1 kDa = 86%), während auf Domäne I der *complex*-Glykosylierungstyp (2,1 kDa von 2,7 kDa = 78%) überwiegt.

N-Glykosylierung beginnt im endoplasmatischen Reticulum mit der Übertragung eines Oligosaccharids von Dolicholphosphat auf die Proteine. Dieses wird in mehreren Schritten zu einer *high*-Mannose Struktur abgebaut. Wenn keine weitere Prozessierung des Glykans statt-

findet, wird das Protein sekretiert. Alternativ wird das Kohlenhydrat zu einer *core*-Region aus drei Mannosen und zwei N-Acetylglucosaminen abgebaut, auf welchem dann im nächsten Schritt die *complex*-Typ- bzw. *hybrid*-Typ-Glykosylierung, die im Golgi erfolgt, aufbaut. Die Tatsache, daß auf SC1 *complex*-Typ-Glykane gefunden wurden, zeigt, daß die humane Nierenzelllinie EBNA-293 (I-FS_{tag}) bzw. die humane Fibrosarkomzelllinie HT 1080 (SC1 fl) das Enzymrepertoire für die Synthese dieser Glykane exprimiert. Bei der rekombinanten Expression von BSP (Bone Sialoprotein) und BM-40 in EBNA-293 Zellen wurde dies bestätigt (M. Wuttke; B. Kaufmann, persönliche Mitteilung). Interessanterweise wurde für diese Proteine eine fast ausschließliche *complex*-Typ-Glykosylierung gefunden. Daß SC1 sowohl *complex*-Typ-Glykosylierung als auch *high*-Mannose- bzw. *hybrid*-Typ Glykosylierung aufweist, demonstriert, daß offensichtlich die lokale Umgebung des anfänglich gebundenen *core*-Oligosaccharids dessen Prozessierung beeinflußt und zu dem gezeigten Domänen-spezifischen Glykosylierungstyp führt.

Bei der Berechnung der restlichen posttranslationalen Modifikationen aus der Differenz zwischen dem massenspektrometrisch bestimmten Molekulargewicht nach Behandlung mit N-Glykosidase F und dem theoretisch berechneten Molekulargewicht, ergeben sich für FS-EC keine weiteren Modifikationen, für SC1 fl und I-FS_{tag} jedoch ca. 12 kDa. Mit Hilfe des Programmes NetOGlyc konnten sieben potentielle O-Glykosylierungsstellen für SC1 vorhergesagt werden, die sich alle auf der Domäne I befinden. Bei einer durchschnittlichen Masse von ca. 1 kDa pro O-Glykan könnten so 7 kDa durch eine O-Glykosylierung erklärt werden. Andere Modifikationen, wie z.B. Sulfatierungen oder Phosphorylierungen sind nicht auszuschließen, können den restlichen Massenunterschied von 5 kDa jedoch kaum erklären.

In der SDS-PAGE zeigen SC1 fl als auch I-FS_{tag} ein abnormes Laufverhalten bei einem apparenten Molekulargewicht von 110 kDa, welches selbst bei Berücksichtigung der massenspektrometrisch bestimmten posttranslationalen Modifikationen (87,8 kDa) nicht erklärt werden kann. Dieses wird wahrscheinlich durch die saure Domäne I verursacht.

Zur Untersuchung des Molekulargewichtes von humanem SC1, wurde eine *in-vitro* Translation in Lysaten von Kaninchen Reticulocyten durchgeführt. Das erhaltene Protein zeigte das gleiche apparente Molekulargewicht von ca. 130 kDa nach einer SDS-PAGE, wie das rekombinant in CHO-Zellen exprimierte SC1 (Girard und Springer, 1996). Da in diesem System keine N-Glykosylierung stattfindet, wurde dieses unnormale Laufverhalten der sauren Domäne I zugeschrieben. Dieselben Untersuchungen durch Claeskens et al. (2000) berichten von Monomeren bei 75 kDa und potentiellen Dimeren von 150 kDa. Bei der Untersuchung

von rekombinantem SC1 in dieser Arbeit mittels Elektronenmikroskopie wurden allerdings nur Monomere festgestellt.

Nach Negativkontrastierung zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem SC1 fl eine globuläre Einheit, die mit einer flexiblen länglichen Struktur verbunden war. Bei der globulären Einheit könnte es sich um das FS-EC-Domänenpaar handeln und bei der länglichen Struktur um die Domäne I, die aufgrund der Vielzahl von sauren Aminosäuren eine solche Konformation einnehmen könnte. Es konnte eine Gesamt-Länge von ca. 25 nm festgestellt werden, worauf sich ca. 15 nm der elongierten Struktur und ca. 10 nm der globulären Struktur zuordnen lassen.

TSC-36

Die von K. Nose (Showa University, Tokyo) erhaltenen Plasmide erwiesen sich zu Beginn der Arbeit als fehlerhaft, da bei pRcCMV/TSC-36 der gesamte Bereich bis zur ersten EF-Hand der EC-Domäne fehlte und bei dem Plasmid pGEM4Z/TSC-36 eine Deletion von drei Aminosäuren in der ersten EF-Hand entdeckt wurde. Durch eine geeignete Klonierungsstrategie konnte die vollständige und korrekte cDNA-Sequenz für TSC-36 erhalten werden.

Alle Proteine TSC-36 fl, EC-3_{tag} und EC_{tag} wurden von transfizierten EBNA-293-Zellen in das Kulturmedium sezerniert. Auf einem SDS-Polyacrylamidgel zeigten alle Proteine breite Banden, die auf eine starke heterogene Glykosylierung schließen lassen. TSC-36 fl und EC-3_{tag} konnten als eigenständige und unabhängige Faltungseinheiten exprimiert werden. Bei EC_{tag} hingegen wurde eine breite Bande von 28-35 kDa unter reduzierenden Bedingungen beobachtet, die unter nicht reduzierenden Bedingungen noch eine weitere Bande bei doppeltem Molekulargewicht zeigte, die allerdings mittels einer Gelfiltration abgetrennt werden konnten. Dies zeigt, daß die EC-Domäne scheinbar nur in Anwesenheit der Domäne III stabil zu sein scheint.

Dieses Phänomen kann auf eine falsche Verknüpfung der Disulfide zurückzuführen sein, die teilweise zur Bildung von Dimeren führte und bedeuten, daß die EC-Domäne nur zusammen mit der Domäne III eine stabile Faltungseinheit bildet. TSC-36 fl und EC-3_{tag} konnten auf einem Ionenaustauscher in zwei Isoformen getrennt werden, die aufgrund ihres Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel von ca. 5 kDa unterschieden werden konnten (s. Abb. 4-3). Bei der massenspektrometrischen Bestimmung der Molekulargewichte wurden für alle Proteine Molekülionenpeaks mit einer Breite von ± 3500 Da detektiert. TSC-36 fl hat ein theoretisches Molekulargewicht von 33 kDa. Die Isoformen TSC-36 fl A und B konnten

massenspektrometrisch nicht unterschieden werden, da für beide eine mittlere Masse von ca. 42 kDa bestimmt wurde. Davon sind ca. 8,6 kDa N-Glykane, d.h. 21% der Gesamtmasse des TSC-36. Die beiden Isoformen EC-3_{tag} A und B konnten eindeutig durch ihre unterschiedlichen Anteile an N-glykosidisch gebundenen Zuckern (7,2-8,9 kDa) unterschieden werden, wobei Form B ca. 2,6 kDa mehr N-Glykane aufweist als Form A. Für die EC-Domäne ergab sich eine geringere Glykosylierung von ca. 5,3 kDa, somit scheint die Anwesenheit der Domäne III die Glykosylierung auf der EC-Domäne zu beeinflussen. Bei dem Signal bei 22,6 kDa könnte es sich um ein unvollständig verdautes Übergangsprodukt mit einem N-Glykan Ast handeln.

Bei der Berechnung der restlichen posttranslationalen Modifikationen ergeben sich ca. 500-800 Da, die durch Sulfatierungen, Phosphorylierungen oder andere Modifikationen zu erklären wären.

5.2 Charakterisierung der Isoformen von TSC-36

Schon bei der Reinigung des humanen TSC-36 aus dem Kulturüberstand von C₆-Gliomazellen konnte durch eine 2D-Gelelektrophorese gezeigt werden, daß verschiedene Isoformen mit einem pI von 5,0 -6,0 vorliegen (Zwijzen et al., 1994).

Bei der Reinigung von rekombinantem TSC-36 fl mittels Ionenaustauschchromatographie konnte dieses Gemisch in zwei Isoformen aufgetrennt werden, die bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen von der Säule eluiert werden konnten. Durch eine wiederholte Chromatographie der einzelnen Isoformen unter gleichen Bedingungen konnte nachgewiesen werden, daß es sich um reproduzierbare Eigenschaften handelte. Aus der Tatsache, daß die Isoform B bei einer höheren Salzkonzentration von der Ionenaustauschersäule eluiert werden kann, konnte auf eine größere Anzahl von negativen Ladungen geschlossen werden.

Dieser Unterschied könnte auch auf einen partiellen Abbau einer Form zurückzuführen sein, weshalb eine massenspektrometrische Analyse der Proteine durchgeführt wurde. Dazu wurden beide Isoformen mit N-Glykosidase F behandelt und anschließend mit Trypsin verdaut. Nach Reduktion und Alkylierung erfolgte die massenspektrometrische Analyse der so erhaltenen Peptide. Es konnten von Isoform A 86% und von Isoform B 80% der gesamten Aminosäuresequenz wiedergefunden werden. Es war in beiden Fällen nicht möglich, die deglykosylierten Peptide mit den potentiellen vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen

nachzuweisen. Da bei beiden Proteinen der N- als auch ein identischer C-Terminus gefunden wurden, konnte ein Unterschied auf Aminosäuresequenzebene fast ausgeschlossen werden.

Als weitere Ursache für einen Ladungsunterschied kommen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen in Frage. Da in der SDS-PAGE breite Banden für TSC-36 beobachtet wurden, lag eine Untersuchung der Glykosylierung nahe. Eine qualitative Analyse der Neutralzucker ergab eine gleiche Zusammensetzung für beide Isoformen. Die Annahme aus der massenspektrometrischen Analyse der Proteine, daß TSC-36 keine O-Glykosylierung trägt, konnte bestätigt werden, weil der für O-Glykane essentielle Monosaccharid-Baustein N-Acetylgalactosamin nicht nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu konnten die für N-Glykane typischen Monosaccharid-Bausteine nachgewiesen werden.

Nun lag eine qualitative Analyse geladener Glykane nahe. Eine Unterscheidung der beiden Isoformen aufgrund einer unterschiedlichen Zusammensetzung von Sialinsäuren war bei der massenspektrometrischen Bestimmung der Molekulargewichte nicht möglich. Der Grund dafür liegt darin, daß Sialinsäuren im MALDI-TOF-Massenspektrometer abgespalten werden und man sie deswegen nicht detektieren kann. Da Sialinsäuren in der Regel terminal, d.h. am nicht-reduzierenden Ende der Glykane sitzen, und viel zur Ladung beitragen, wurden sie als erstes untersucht. Dazu wurden die N-Glykane enzymatisch abgespalten und fluoreszenzmarkiert, um sie mittels HPLC auf einer Ionenaustauschersäule zu charakterisieren. Es konnten für TSC-36 A und B Neutral-, Monosialo-, Disialo-, Trisialo- und Tetrasialoglykane beobachtet werden. Isoform B verfügte im Gegensatz zu Isoform A über einen deutlich höheren Prozentsatz an Di-, Tri- und Tetrasialostrukturen, wodurch sich auch die Ladungsunterschiede erklären lassen. Die Berechnung der hypothetischen Ladungszahl Z nach Hermentin zeigt auch, daß Isoform B mit $Z=201$ mehr Ladungen aufweist als Isoform A mit $Z=144$.

Zur Verifizierung wurden beide Proteine mit Sialidase behandelt und nochmals auf einen Ionenaustauscher gegeben. Wie erwartet, konnten nun beide Isoformen unter identischen Bedingungen von der Säule eluiert werden.

5.3 Expression von SC1 und TSC-36 in Zelllinien und Geweben

SC1

Die Expression von SC1 wurde durch immunhistochemische Färbungen und der Analyse von Gewebeextrakten und Zellüberständen im Immunoblot untersucht. Eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen SC1 mit anderen Mitgliedern der BM-40 Proteinfamilie konnte durch einen Immunoblot mit den denaturierten Proteinen und einen Slot-Bot mit den nativen Proteinen ausgeschlossen werden.

Die Analyse verschiedener Gewebeextrakte adulter Mäuse mittels Immunoblot ergab eine große Übereinstimmung mit den existierenden Northern-Blot Ergebnissen. Eine starke mRNA Expression in Gehirn bzw. Cerebellum und eine weniger starke mRNA Expression in Herz, Lunge, Niere, Auge, Testis (Soederling et al., 1997) bzw. Thymus, Pankreas, Colon und Muskel (Girard und Springer, 1995) konnte hier bestätigt werden. In Nebenniere und Leber (Soederling et al., 1997) konnte die SC1 Expression zwar auf mRNA-, jedoch nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dies könnte auf die nur geringe Proteinexpression im Gewebe zurückzuführen sein. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Gewebe auf Proteinebene analysiert, für die bisher keine mRNA Daten vorliegen. Hierbei ergaben sich im Immunoblot positive (Sternum, Calvaria) und negative (Schilddrüse, Trachea, Duodenum) Ergebnisse. Die im Immunoblot detektierten Banden wiesen ein apparentes Molekulargewicht von ca. 100-120 kDa auf, es wurden jedoch auch Banden von meist ca. 60 kDa, 55 kDa und weniger beobachtet. Bei der Niere wurde nur eine einzige Bande bei 55 kDa festgestellt. Diese Proteine mit einem Molekulargewicht von unter ca. 100-120 kDa können Abbauprodukte darstellen, obwohl dies durch die Verwendung eines Proteaseinhibitorcocktails bei der Gewebeextraktion ausgeschlossen sein sollte. Bei der Analyse verschiedener Gebiete im Gehirn der Maus wurde nur eine Bande bei ca. 100 kDa entdeckt. Daher ist eine gewebe-spezifische Prozessierung von SC1 wahrscheinlicher, dafür sprechen die verschiedenen Bandenmuster. Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa werden auch bei der Analyse der Kulturüberstände verschiedener Zelllinien detektiert. Ein alternatives Splicing als Ursache für die verschiedenen Molekulargewichte ist aufgrund eines einzelnen Signals von 2,8 kb in Northern-Blot und RNase *protection assay* verschiedener Gewebe unwahrscheinlich (Soederling et al., 1997). Durch die erfolgreiche Inhibierung der Antikörper mit rekombinantem Protein konnte die Bande bei ca. 55 kDa verifiziert werden. In immunhistochemischen Färbungen konnte SC1 in Haarfollikeln, Auge, Rückenmark,

Oesophagus, Skelettmuskel und Dünndarm nachgewiesen werden. Der Vergleich der Expression von Laminin mit SC1 in den Haarfollikeln zeigt, daß SC1 auch im Bindegewebe zu finden ist. Bei der zusätzlichen Färbung der äußeren Wurzelscheide könnte es sich um die sensorischen Nerven der Haarfollikel handeln, wie durch *in-situ* Hybridisierung auf mRNA-Ebene demonstriert werden konnte (Soederling et al., 1997). Zur genaueren Eingrenzung der Zellen, die SC1 sezernieren, wurden Zellkulturüberstände verschiedener Zelllinien untersucht. Eine Expression konnte in Osteosarkom-, Chondrosarkom-, Melanom-Zellen, Brust-Epithelzellen, Keratinocyten und Fibroblasten beobachtet werden. Es wurden, wie schon in verschiedenen Geweben, Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa detektiert. Im Gegensatz zu den starken Signalen im Gewebeblot, waren in den Kulturüberständen nur schwache Signale nachweisbar. Der Unterschied in der Expression könnte durch die Um-ggebung der Zellen hervorgerufen werden, die im Gewebe in einem Zellverband von extra-zellulärer Matrix umgeben sind, die bei der *in-vitro* Kultur von Zellen jedoch fast fehlt (Soederling et al., 1997) oder durch die geringe Menge an Matrix die sich in den analysierten Kulturüberständen befand. Der Einfluß einer spezifischen Matrix auf Zellen wurde beispielhaft mit Hilfe der Osteosarkomzelllinie SaOS-2 mit bzw. ohne Zugabe von Ascorbat in das Medium überprüft. Durch Ascorbat wird die Ausbildung eines extrazellulären Kollagen I-Netzwerkes gefördert. Ohne Ascorbat konnte kein extrazelluläres Signal für SC1 entdeckt werden, auch nicht im Immunoblot der Zellkulturüberstände, mit Ascorbat konnte jedoch eine punktuelle Colokalisation von SC1 mit Kollagen I beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für das dann auftretende intrazelluläre Signal wäre, daß sobald keine ECM bzw. durch eine extrazelluläre Matrix induzierten Signale vorhanden sind, ein intrazellulärer Abbau stattfindet. Daß kultivierte Zelllinien nicht die *in-vivo* Situation widerspiegeln, könnte zu positiven Signalen im Immunoblot für Rückenmark und einer immunhistochemischen Färbung der Gliazellen im Ependym des Rückenmarks führen, jedoch zu keinen Signalen bei kultivierten Gliazellen (C₆-Glioma-Zellen und S6E-Astrocyten). Die immunhistochemische Untersuchung der Niere bestätigte die durch *in-situ* Hybridisierung (Soederling et al., 1997) gefundene Färbung mittlerer und größerer Gefäße. Im Gegensatz dazu konnten jedoch auch Signale für SC1 in den Glomeruli entdeckt werden. Dies könnte für eine Ablagerung des an anderer Stelle sezernierten Proteins in den Glomeruli sprechen. Auch in der Niere konnte eine teilweise Colokalisation von SC1 mit Kollagen I in den Glomeruli festgestellt werden, die Colokalisation in den Gefäßen ist wegen der schwachen Signale für Kollagen I in den Gefäßen fraglich. Eindeutiger hingegen ist eine Colokalisation von Kollagen IV mit SC1 in den Gefäßen und möglicherweise auch in den Glomeruli zu sehen.

Bei der Untersuchung der Interaktion von SC1 mit anderen Molekülen der extrazellulären Matrix in einem Festphasen-Immunoassay konnte in dieser Arbeit sogar eine signifikante Bindung von SC1 an Kollagen IV nachgewiesen werden. Ob SC1 an Kollagen I bindet, bedarf weiterer Untersuchungen durch z.B. Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Zur weiteren Diskussion siehe 4.5).

Die Herunterregulation von SC1 in verschiedenen Carcinomen legte nahe, daß SC1 eine mögliche Funktion bei der Tumorsuppression haben könnte (Nelson et al., 1998; Bendik et al., 1998; Claeskens et al., 2000). Da jedoch in Kulturüberständen von A-375 Melanom-Zellen und in zwei Osteosarkom-Zelllinien eine Expression von SC1 nachgewiesen werden konnte, scheint dieses Konzept nicht auf alle Carcinom-Zelllinien anwendbar zu sein.

Es bleibt jedoch wiederum die Frage, inwieweit sich die *in-vivo* Situation von Zellen mit Zellkulturexperimenten vergleichen läßt.

TSC-36

Bei der Analyse der Gewebeverteilung konnte TSC-36 nur in Gehirn, Testis, Niere Nebenniere und Rückenmark nachgewiesen werden. Eine genauere Analyse verschiedener Gehirngebiete zeigte eine Expression in allen untersuchten Teilen des Gehirns. In einer Northern-Blot Analyse hingegen konnte TSC-36 nicht in Gehirn und Niere nachgewiesen werden, ergab dafür jedoch eine Expression in Herz und Lunge (Mashimo et al., 1997), die im Immunoblot negativ waren. Widersprüchliche Daten sind in der Literatur über die mRNA-Expression von TSC-36 zu finden. Während Mashimo et al. (1997) TSC-36 mRNA nicht in Gehirn und Niere von adulten Mäusen detektieren konnten, fanden Patel et al. (1996) eine TSC-36 mRNA-Expression in Gehirn, Duodenum, Herz, Niere, Ovar und Lunge des Huhns. TSC-36 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 33 kDa, die im Immunoblot detektierten Banden wiesen jedoch nur ein Molekulargewicht von 25 kDa auf.

Die 25 kDa Bande könnte auf einen proteolytischen Abbau von TSC-36 im Gewebe zurückzuführen sein. Da die EC-Domäne sich zwischen der FS-Domäne und Domäne III befindet, sollte das 25 kDa-Fragment zumindest Teile der EC-Domäne enthalten. Die Erscheinung als scharfe Bande im Gegensatz zu der breiten Bande von endogen exprimiertem TSC-36 aus den verschiedenen Zelllinien, deutet auf eine wesentlich geringere Glykosylierung hin. Zur Klärung dieser Frage müßte das Glykosylierungsmuster von aus Gewebe isoliertem TSC-36 analysiert werden.

Durch die Inhibierung der Antikörper gegen TSC-36 mit gereinigtem, rekombinantem TSC-36 konnte auch hier die Spezifität dieser Banden nachgewiesen werden. Es kann sich trotz der Verwendung von Proteaseinhibitoren bei der Gewebeextraktion um Abbaubanden handeln oder es liegt eine gewebespezifische Prozessierung vor. Dieses Signal mit einer einheitlichen Größe stimmt auch mit dem einzigen Signal (4,4 kb) im Northern-Blot überein (Tanaka et al., 1998). Durch immunhistochemische Färbungen des Gehirns und der Niere konnten in dieser Arbeit die Ergebnisse des Gewebeblots bestätigt werden. Neben der Expression während der embryonalen Entwicklung (Amthor et al., 1996; Patel et al., 1996; Towers et al., 1999) konnte somit auch eine Expression im adulten Gehirn und in der Niere gezeigt werden. Zur genaueren Analyse TSC-36 exprimierender Zellen wurden auch hier die Überstände verschiedener kultivierter Zelllinien im Immunoblot getestet. Dabei wurden im Gegensatz zu den scharfen Banden im Gewebeblot meist breite Banden von ca. 40-50 kDa erhalten, was auf eine heterogene Glykosylierung schließen läßt. Eine Sezernierung von TSC-36 konnte bei allen untersuchten Osteosarkom-, einer Chondrosarkom-, und einer Fibrosarkom-Zelllinie festgestellt werden. Obwohl Lungenfibroblasten kein Signal ergaben, wurde für die Fibroblasten-Zelllinie Wi-26 ein Signal erhalten. Der Nachweis von TSC-36 in den Überständen von C₆-Glioma-Zellen und S6E-Astrocyten könnte auf eine mögliche Expression von TSC-36 durch Glia-Zellen im Gehirn hindeuten, obwohl auf den immunhistochemischen Färbungen neuronale Zellen angefärbt sind.

Bei der Untersuchung verschiedener Tumorzelllinien konnte in Osteosarkom, Colon- und Lungen-Carcinomen keine TSC-36 mRNA nachgewiesen werden. Widersprüchlich ist dabei jedoch, daß bei der untersuchten Osteosarkom-Zelllinie HOS zwar keine mRNA detektierbar war (Mashimo et al., 1997), in dieser Arbeit TSC-36 jedoch im Kulturüberstand nachgewiesen wurde. Die Tatsache, daß einige Tumorzelllinien eine Expression von TSC-36 zeigten und andere nicht, könnte in einer Transformation mit verschiedenen Onkogenen (Mashimo et al., 1997) begründet liegen.

5.4 Konformation und Calciumbindung von SC1 und TSC-36

Die Konformation und Calcium-Bindungseigenschaften der aufgereinigten Proteine wurde mit Circular Dichroismus- und Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht.

SC1

In der CD-Spektroskopie zeigten im Gegensatz zu FS-EC und EC, die Proteine SC1 fl und I-FS_{tag}, welche beide die stark saure Domäne I beinhalten, einen sehr großen Anteil an ungeordneter Struktur. Dies deutet auf einen sehr geringen α -Helix- und β -Faltblatt-Anteil in Domäne I hin. Der Anteil an α -Helix-Strukturen ist bei der EC-Domäne größer als bei dem Domänenpaar FS-EC (Tab. 4-3). Dies wurde schon für die analogen Proteinflragmente von BM-40 festgestellt (Maurer et al., 1995) und stimmt mit der durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Kristallstruktur des FS-EC Domänenpaares von BM-40 überein (Hohenester et al., 1997). Allerdings ergibt die Berechnung der Sekundärstrukturanteile dieser Proteine aus den CD-Spektren mit verschiedenen Algorithmen und Standardproteinsätzen (Greenfield et al., 1995) keine befriedigende Übereinstimmung mit der Kristallstruktur (P. Maurer, persönliche Mitteilung).

Aufgrund eines Sequenzvergleichs von BM-40 mit SC1 wurden für SC1 zwei EF-Hand Motive vorhergesagt (Abb. 1-5). Bei BM-40 konnte eine durch Calcium induzierte Konformationsänderung beobachtet werden, diese wurde auch bei SC1 erwartet, jedoch nur bei den Fragmenten die über eine EC-Domäne verfügen. Die relativen Änderungen der molaren Elliptizität bei 222 nm waren für alle Proteine relativ gering. Für SC1 fl war sie mit 11% am größten, die Calciumbindung war jedoch nicht reversibel. I-FS_{tag} und FS-EC zeigten zwar reversible Änderungen von 4% und 5%, die aber aufgrund der geringen Werte nicht signifikant sind. Die EC-Domäne zeigte keine Änderung des α -Helix-Gehaltes bei Calciumbindung. Aufgrund der geringen Änderungen der Konformation bei Zugabe von Calcium kann keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob eine Calciumbindung stattfindet oder nicht. Diese Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu den für BM-40 erhaltenen Calcium-induzierten Änderung der molaren Elliptizität bei 222 nm (Tab. 5-1), obwohl beide Proteine über eine analoge Sequenz der EF-Hände verfügen (Abb. 1-5).

Eine weitere Möglichkeit zur Verfolgung der Calciumabhängigkeit der Proteinkonformation ist die intrinsische Fluoreszenz von Tryptophanen und Tyrosinen in Abhängigkeit ihrer Umgebung. Für SC1 fl, FS-EC und EC konnte eine reversible Calciumbindung gemessen werden. Dabei zeigte die EC-Domäne mit 97% die größte prozentuale Änderung des

Fluoreszenzsignals bei 350 nm (ΔF_{350} (%)) bei Anregung mit 280 nm), gefolgt von dem FS-EC Domänenpaar mit 64% und dem Volllänge SC1 mit 24%. Für das Protein I-FS_{tag} konnte mittels Fluoreszenzspektroskopie keine Aussage zur Calciumbindung getroffen werden, da die Signaländerungen nicht reversibel waren. Beim Vergleich der für die Calciumbindung bestimmten Werte von SC1 mit BM-40, fällt auf, daß BM-40 auf Calcium-Zugabe mit einer stärkeren Konformationsänderung reagiert als SC1.

Tab. 5-1: Vergleich der für die Calciumbindung von SC1 gemessenen Werte mit denen von BM-40.

a = nicht reversibel, b = humanes BM-40 (Maurer et al., 1995), c = ΔF_{337} für humanes BM-40 (Busch et al., 2000)

| | | full length | FS-EC | EC |
|------------------------|-------|-------------------|------------------|------------------|
| $\Delta[\Theta]_{222}$ | SC1 | +11 _a | +5 | 0 |
| | BM-40 | +33 _b | +33 _b | +43 _b |
| ΔF_{350} | SC1 | -24 | -64 | -97 |
| | BM-40 | -108 _c | -90 _c | -83 _c |

TSC-36

In der CD-Spektroskopie ergaben die rekombinant exprimierten Proteine TSC-36 fl, EC-3_{tag} und EC_{tag} Spektren mit einer Schulter bei 222 nm, die für Proteine mit einem hohen α -Helix-Gehalt charakteristisch sind. Die molare Elliptizität bei 207 nm, die dem Anteil an ungeordneten Strukturen zuzurechnen ist, ist nur gering ausgeprägt. Nach Analyse der Sekundärstrukturanteile mit dem Programm SELCON ergab sich für EC_{tag} mit 22% ein doppelt so großer α -Helix-Gehalt wie für EC-3_{tag}, das aber mit 38% den größten Anteil an β -Faltblatt-Strukturen aufwies. Dies deutet auf einen hohen Anteil an β -Faltblatt-Strukturen in Domäne III hin.

Der Sequenzvergleich mit BM-40 führte zur Entdeckung zweier EF-Hände in TSC-36 (Maurer et al., 1995). Die erste EF-Hand weist jedoch im Vergleich zur kanonischen EF-Hand-Sequenz die Deletion einer Aminosäure auf (Abb. 1-5), die eine Bindung von Calcium aber nicht unbedingt in Frage stellt, wie die durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärte Kristallstruktur der *scallop myosin essential light chain* beweist (Xie et al., 1994). Die zweite EF-Hand stimmt mit der klassischen Konsensus-Sequenz überein. Zur Über-

prüfung der vorhergesagten Calciumbindung wurden CD-Spektren nach Calcium- bzw. EDTA-Zugabe aufgenommen. Für alle drei Fragmente führte die Zugabe von Calcium nur zu einer sehr kleinen Änderung der molaren Elliptizität. Die Überprüfung einer hochaffinen Calcium-bindung durch die Zugabe von 4 mM EDTA resultierte in einer nicht signifikanten, reversiblen Änderung der Spektren.

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie konnte für keines der Proteine TSC-36 fl, EC-3_{tag} und EC_{tag} ein durch Calcium induzierter Konformationswechsel beobachtet werden. Es kam nur zu nicht reversiblen Änderungen der Fluoreszenzintensitäten.

Bei humanem und murinem BM-40 führte die Zugabe von Calcium in der CD-Spektroskopie zu einer Zunahme des α -Helix-Gehaltes bzw. zu einer 95%igen Abnahme der Fluoreszenzintensität in der Fluoreszenz-Spektroskopie (Engel et al., 1987; Maurer et al., 1992, Pottgiesser et al., 1994). Im Gegensatz dazu konnte für BM-40 aus *C. elegans* mittels beider Spektroskopie-Methoden keine Calciumbindung nachgewiesen werden. Dies schließt allerdings eine eventuelle Bindung von Calcium nicht aus, sondern kann auch bedeuten, daß diese Methoden nicht geeignet sind, um eine Bindung festzustellen. Es wird angenommen, daß die Deletion von 23 Aminosäuren in der EC-Domäne vom BM-40 aus *C. elegans*, die zu dem Verlust der α -Helix B führt, zu einer rigideren Struktur als im humanen BM-40 führt und so nur eine geringere Konformationsänderung bei Calcium-Zugabe zuläßt (Maurer et al., 1997). Interessanterweise ist eine ähnliche Deletion von 31 Aminosäuren, die sogar zwei α -Helices betrifft (B und C) in der EC-Domäne von TSC-36 zu finden. Zur Aufklärung einer möglichen Calciumbindung von TSC-36 könnte eine Gleichgewichtsdialyse mit radioaktivem Calcium beitragen bzw. eine Strukturaufklärung durch Röntgenstrukturanalyse. Erste Versuche der Kristallisation von TSC-36 blieben erfolglos, was an dem hohen Anteil (21%) an N-Glykanen liegen könnte. Die drei N-Glykosylierungsstellen von TSC-36 befinden sich alle in der EC-Domäne, und zwar eine vor der ersten EF-Hand und zwei zwischen beiden EF-Händen. Sterische Effekte aufgrund der starken Glykosylierung könnten auch dazu führen, daß entweder kein Calcium gebunden wird oder eine Calciumbindung nicht mit einer Konformationsänderung einhergeht. Für Testican-3 konnte erst nach Abspaltung der Glykosaminoglykanketten eine Calcium induzierte Konformationsänderung gezeigt werden, obwohl auch hier die α -Helix C und die Hälfte von α -Helix D fehlen (18 Aminosäuren), so daß eine sterische Behinderung durch die Glykane in Frage kommt (C. Vannahme, persönliche Mitteilung).

5.5 Charakterisierung der Interaktion von SC1 und TSC-36 mit anderen Proteinen der extrazellulären Matrix

Für alle Experimente wurde in Vorversuchen die optimale Konzentration der Erstantikörper und die am besten geeigneten Blockierungsmittel ermittelt. Zur Kontrolle wurden alle Versuche ohne an die Mikrotiterplatten gebundene Liganden durchgeführt und die dabei ermittelten Werte als Hintergrund von den mit Interaktionspartner durchgeführten Werten abgezogen. Bei allen Werten handelte es sich um Dreifachbestimmungen. Alle Inkubationsschritte wurden in TBS durchgeführt, um durch möglichst physiologische Bedingungen unspezifische Wechselwirkungen zu reduzieren. Da bereits für die Bindung von BM-40 an Kollagen I-V beschrieben wurde, daß diese Interaktion Calcium-abhängig ist (Maurer et al., 1995, 1997), wurden stets 2 mM Calcium zugegeben.

SC1

Aufgrund der vorhergesagten Kollagenbindungsstelle für SC1 (Sasaki et al., 1998; Abb. 1-6) wurden die Kollagene I-V in einem Festphasenimmunoassay untersucht. Zur Analyse potentieller Wechselwirkungen wurden neben in der extrazellulären Matrix häufig vorkommenden Proteinen (Laminin-1, Fibronectin, BM-40) auch TSC-36, Heparin und Decorin ausgewählt. Bei Decorin handelt es sich um ein Proteoglykan, welches auf der Oberfläche von Kollagen I-Fibrillen zu finden ist und eine mögliche Brückenfunktion zwischen SC1 und Kollagen I ausüben könnte.

Kollagen IV zeigte als einziges eine Bindung an SC1, alle anderen getesteten Moleküle zeigten keine signifikante Bindung an SC1. Mit Hilfe der Proteine I-FS_{tag} und FS-EC war es möglich, die Bindungsstelle an Kollagen IV auf die EC-Domäne einzugrenzen, und so die für BM-40 bestimmte und für SC1 vorhergesagte Kollagenbindung über die EC-Domäne zu bestätigen.

Für BM-40 konnte in einem analogen Festphasen-Immunoassay ebenfalls eine Bindung an Kollagen IV, aber keine Bindung an Kollagen I und V gezeigt werden (Mayer et al., 1991). Bei der Untersuchung der Wechselwirkungen mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Biacore) konnte hingegen die Bindung von BM-40 auch an die Kollagene I-V nachgewiesen werden. Somit bedarf es ähnlicher Untersuchungen, um festzustellen, ob sich SC1 genau so wie BM-40 verhält.

Die Bindung von BM-40 an die Kollagene I-V ist streng Calcium-abhängig (Mayer et al., 1991; Maurer et al., 1995, 1997; Sasaki et al., 1997). Die zur Überprüfung der Calcium-

abhängigkeit der Interaktion von SC1 an Kollagen IV durchgeführten Experimente, zeigten nur eine Bindung bei Anwesenheit von Calcium und wurde durch Zugabe von EDTA vollständig unterbunden. Der apparente K_d -Werte der Bindung des FS-EC Domänenpaares an Kollagen IV konnte auf ca. 50 nM bestimmt werden. Ein Vergleich mit dem im Festphasen-Immunoassay für die Bindung von rekombinantem BM-40 an Kollagen IV ermittelten apparenten K_d -Wert von 10 nM für Maus-BM-40 und 100 nM für humanes BM-40 (Nischt et al., 1991) zeigt eine gute Übereinstimmung. Diese Werte weichen stark von denen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz gemessenen Werten von $1,75 \pm 0,4 \mu\text{M}$ für rekombinantes BM-40 ab und kommen den Werten von $190 \pm 40 \text{ nM}$ für aus Gewebe gereinigtes BM-40 am nächsten (Maurer et al. 1997).

Für murines BM-40, welches aus Gewebe gereinigt wurde, konnte eine 10-fach höhere Kollagenbindungsaffinität ermittelt werden, als für murines rekombinant exprimiertes BM-40 (Maurer et al., 1995; 1997). Die Erklärung hierfür lag in der endogenen Proteolyse einer Peptidbindung in der α -Helix C der EC-Domäne des BM-40 der Maus durch verschiedene Matrix-Metalloproteasen, wodurch die darunter befindliche α -Helix A an der Bindung teilnehmen konnte (Sasaki et al, 1998). Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen fällt auf, daß SC1 an der Spaltungsstelle über die gleiche Sequenz wie BM-40 verfügt, und so eine gewebespezifische Prozessierung ebenso möglich wäre, die zu einer erhöhten Kollagenaffinität führen würde. Die Reinigung von SC1 aus z.B. Gehirn, wo es stark exprimiert wird, wie im Immunoblot von Gewebeextrakten gezeigt werden konnte, könnte zur Beantwortung dieser Frage führen.

TSC-36

Zur Ermittlung potentieller Bindungspartner wurden extrazelluläre Matrixproteine mit einer großen Verbreitung ausgewählt (Laminin-1, Fibronectin, BM-40). Zur Überprüfung der Vorhersage, daß TSC-36 nicht an Kollagene bindet (Sasaki et al., 1998) wurden auch die weitverbreiteten Kollagene I-V untersucht. Da TSC-36 bei der Aufreinigung einer extrazellulären Superoxid-Dismutase entdeckt wurde und durch Bindung an einer Heparin-Säule von der Dismutase getrennt werden konnte (Zwijssen et al., 1994), wurde auch Heparin verwendet. Da TSC-36 über eine Follistatin-ähnliche Domäne verfügt und eine Bindung von Follistatin an Activin (Nakamura et al., 1990) bzw. verschiedene BMPs (Iemura et al., 1998) bekannt ist, wurde in nicht näher beschriebenen Versuchen die Bindung von TSC-36 an Activin A, Inhibin A, TGF- β , BMP-4, BMP-7 getestet und aufgrund der Ähnlichkeit zu

BM-40, wurden auch die Kollagene I und II untersucht. Dabei konnte kein Bindungspartner ermittelt werden (Mashimo et al., 1997). Die Auswahl der Bindungspartner ist allerdings schon durch die beschränkte Verfügbarkeit vieler Proteine limitiert, so daß es sich nur um einen ersten Versuch handeln kann, wenn keine konkreten Hinweise auf potentielle Interaktionspartner vorliegen. Da die Bindung von BM-40 an Kollagen streng Calcium-abhängig ist wurde in allen Experimenten 2 mM Calcium bei der Inkubation der Bindungspartner zugegeben. Es konnte keine signifikante Bindung von TSC-36 an Laminin-1, Fibronectin, BM-40 und die Kollagene I-V festgestellt werden. Die Vorhersage von Sasaki et al. (1998) zur Kollagenbindung von TSC-36 und die in der Literatur, ohne gezeigte Ergebnisse, nur erwähnte Untersuchung der Bindung an Kollagen I und II (Mashimo et al., 1997) konnte bestätigt werden. Die Bindung an Heparin kann erst bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl und einem pH von 7,4 als physiologisch relevant gelten. TSC-36 zeigte unter diesen Bedingungen keine Bindung an Heparin, so daß die von Zwijsen et al. (1994) erwähnte Heparinbindung wahrscheinlich auf eine ionische Wechselwirkung von TSC-36 mit den negativen geladenen Heparinmolekülen zurückzuführen ist.

Die durch immunhistochemische Untersuchungen der Niere gefundene Färbung in den Gefäßen ist zwar mit Kollagen I und IV kolokalisiert, eine Bindung konnte durch die durchgeführten Interaktionsstudien im Festphasen-Immunoassay nicht untermauert werden, dafür spricht auch die Vorhersage von Sasaki et al. (1998), daß TSC-36 nicht an Kollagene bindet.

5.6 Bedeutung der EC-Domänen in der BM-40 Proteinfamilie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für SC1, das die größte Homologie zu BM-40 aufweist, eine Affinität für Calcium gezeigt werden. Neben den bereits für beide Proteine gefundenen Eigenschaften, wie z.B. die Verhinderung der Ausbildung von Fokalkontakten (Murphy-Ullrich et al., 1991; Girard und Springer 1996) konnte auch eine Calcium-abhängige Bindung von SC1 an Kollagen IV nachgewiesen werden. Bei Messungen der Calcium-Affinitäten der EC-Domäne von BM-40 und Testican-1 wurden K_d -Werte im Konzentrationsbereich von nM bis μ M ermittelt werden (Busch et al., 2000; Kohfeldt et al., 1997). Bei einer streng regulierten extrazellulären Calcium-Konzentration von 1,2 mM wäre eine strukturstabilisierende Funktion des Calcium anzunehmen. Intrazelluläre Proteine mit EF-Hand Motiven sind an Signalübertragungsprozessen beteiligt, jedoch sind die intrazellulären Calcium-Konzentration mit 0,1 bis 10 μ M sehr viel geringer. Somit ergibt sich die Frage, ob die EF-Hände in den EC-Domänen vielleicht auch durch extrazelluläres Calcium reguliert werden und eine Rolle bei der Vermittlung von Signalen spielt. Extrazelluläre Calcium-Gradienten wurden bereits für Haut (Menon et al., 1985), Placenta (Reitz et al., 1977) und Lunge (Eckenhoff, 1989) beschrieben. In einem Modell zur Hirntraumatisierung konnte ein Abfall der Calcium-Konzentration auf 100 μ M gemessen werden (Nilsson et al., 1993), dasselbe wurde auch während eines künstlichen Zustandes (spreading depression), der einem epileptischen Anfall gleicht (Nicholson et al., 1977) gemessen.

SC1 wurde als Glykoprotein aus dem synaptischen Spalt kloniert (Johnston et al., 1990) und konnte als Astrocyten-Marker identifiziert werden (McKinnon et al., 1996). Der synaptische Spalt bildet ein eigenes Kompartiment und wird von Astrocyten umgeben, so daß während neuronaler Aktivitäten ein Calcium-Gradient auftreten könnte. Bei der synaptischen Signaltransduktion wird Calcium eine wichtige Rolle bei der Ausschüttung von Neurotransmittern zugeschrieben. Testican-1, ein weiteres Calcium-bindendes Protein, mit EC-Domäne wurde mittels Elektronenmikroskopie in der Postsynapse lokalisiert (Bonnet et al., 1996). Für die Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie könnte eine Regulation durch Calcium eine gemeinsame Funktion darstellen.

5.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene rekombinante Proteine des SC1 und des TSC-36 sowie Antikörper gegen beide Proteine hergestellt. Damit wurden die Calciumbindung und die Konformation untersucht, der Domänenaufbau charakterisiert, Bindungspartner gesucht, Zelllinien und Gewebe auf deren Expression untersucht. Ausgehend von diesen Ergebnissen sind eine Reihe weiterer Untersuchungen interessant.

Zur Aufklärung der Struktur der Proteine mittels Röntgenstrukturanalyse könnten Proteine in ausreichendem Maße für Kristallisationsversuche gereinigt werden. Im Falle von TSC-36 könnte die Kristallisation aufgrund der Glykane, die 21% der Gesamtmasse des Proteins ausmachen, gescheitert sein. Deswegen wäre eine Abspaltung der N-Glykane mit N-Glykosidase F sinnvoll. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verhinderung der Glykosylierung durch die zielgerichtete Mutation der an der N-Glykosylierung beteiligten Aminosäuren, wobei dieser Aminosäureaustausch nicht zu einer Änderung der Struktur des Proteins führen darf.

Die Bindung von SC1 an Kollagen IV konnte im Festphasen-Immunoassay gezeigt werden und so die bei BM-40 bestimmte und für SC1 vorhergesagte Bindung bestätigt werden. Da die Bindung der Kollagene I, II, III und V für BM-40 erst in Untersuchungen mittels Oberflächenplasmon-Resonanz zu detektieren waren, sollte auch die Bindung von SC1 an weitere Kollagene in dieser Weise untersucht und charakterisiert werden. Von besonderem Interesse ist, ob aus Gewebe gereinigtes SC1 endogen proteolytisch modifiziert wird. Für BM-40 wurde beschrieben, daß eine solche Prozessierung die Affinität der Bindung an Kollagene erhöht. (Maurer et al., 1995). In dieser Beziehung wäre auch die Untersuchung von der Verteilung von SC1 in Kollagen I defizienten Mäusen interessant, weil in diesen Mäusen BM-40 nicht in der extrazellulären Matrix gefunden wurde (Iruela-Arispe et al., 1996).

Da Kollagen IV ein integraler Bestandteil der Basalmembran ist und eine Colokalisation von SC1 mit Kollagen IV in der Niere gezeigt werden konnte, sind auch Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und Gold-markierten Antikörpern vorstellbar, um eine Bindung in der Basalmembran genauer zu lokalisieren. Ähnliche Untersuchungen könnten mit TSC-36 durchgeführt werden. Für beide Proteine sollte die eventuelle Bindung an andere Matrix-Bestandteile genauer untersucht werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß SC1 Calcium bindet, wäre nun die nähere Untersuchung der Calciumbindung von Bedeutung. Die Anzahl der gebundenen Calcium-Ionen könnte mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt werden. Durch zielgerichtete Mutation einzelner Aminosäuren in den EF-Händen der EC-Domäne könnte gezeigt werden, ob nur eine oder

beide EF-Hände Calcium binden. Mit Hilfe der CD- und Fluoreszenzspektroskopie könnten die Calciumaffinitäten titriert und eine eventuelle Kooperativität der Calciumbindung untersucht werden, wie für BM-40 bereits von Busch et al. (2000) beschrieben. Zur Klärung der Frage, ob TSC-36 Calcium bindet wären Gleichgewichts-Dialysen mit radioaktivem Calcium nötig. Um den Einfluss der Glykosylierung auf eine Calcium-induzierte Konformationsänderung zu untersuchen, könnten Messungen mit deglykosylierten Proteinen durchgeführt werden.

Durch die Reinigung der Proteine aus Gewebe könnte die gewebespezifische Prozessierung und Unterschiede z.B. in der Glykosylierung weiter aufgeklärt werden.

Da im Falle der SC1-defizienten Mäuse kein offensichtlicher Phänotyp beobachtet werden konnte, könnte eine Kreuzung mit BM-40 defizienten Mäusen zu weiteren Erkenntnissen über die biologische Funktion von SC1 bzw. den EC-Domänen führen.

Die Generierung einer TSC-36 defizienten Maus könnte zusätzliche nähere Information gerade für die Rolle während der embryonalen Entwicklung geben.

VI Material und Methoden

6.1. Molekularbiologische Arbeiten

Alle molekularbiologischen Standardmethoden, soweit nicht anders erwähnt, wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Für die Herstellung aller benötigten Lösungen wurde deionisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore) benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Pharmacia Biotech und MWG bezogen.

6.1.1 Allgemeine molekularbiologische Verfahren

Puffer und Stocklösungen

LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

Es wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt und 10 g NaCl eingewogen und in ca. 950 ml deionisiertem Wasser gelöst. Mit 5 M NaOH wird auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Auffüllen des Volumen auf 1 l wurde das Medium durch Autoklavieren sterilisiert.

Ampicillin-Stocklösung

Es wurden 200 mg/ml Ampicillin in H₂O angesetzt. Die Stocklösung wird in einer Verdünnung von 1:1000 zum LB-Medium gegeben, so daß eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml Ampicillin im LB-Medium vorliegt.

RNAse A – Stocklösung (DNase-frei)

RNAse A wurde in 0,1 M Natriumacetat, pH 5,2, gelöst (Endkonzentration: 10 mg/ml). Zur Inaktivierung vorhandener DNAsen wurde 15 min auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumen 1M Tris-HCl, pH 7,4, erhöht. Nach Aliquotierung erfolgte die Lagerung -20°C.

Allgemeine Klonierungstechniken

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Alle verwendeten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Beverly, MA, USA) bezogen. Es wurden ausschließlich die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen sowie Puffer verwendet. Beim Einsatz von zwei Enzymen in einem Ansatz wurde ebenfalls nach Empfehlung des Herstellers verfahren. Für Restriktionsanalysen wurden ca. 2 µg DNA mit 2-10 U (Units) Enzym in 20 µl mindestens 2 h inkubiert. In präparativen Ansätzen wurden 10-20 µg DNA mit 10-20 U in 40-120 µl Gesamtvolumen über Nacht geschnitten.

Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Gelelektrophoresen wurden standardmäßig in TAE-Puffer durchgeführt. Je nach Größe der DNA und des gewünschten Trennbereichs wurden Agarosekonzentrationen von 0,7 % bis 2 % (w/v) verwendet. Die Agarose wurde bis zur Auflösung in TAE-Puffer aufgeköcht, auf ungefähr 50°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Die nativen Agarose-Gele wurden in horizontalen, kombinierten Gieß- und Laufkammern gegossen, in denen auch die anschließende Elektrophorese stattfand. Die DNA-haltigen Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Als Größenmarker diente die DNA-kb-Leiter der Firma Gibco. Die Elektrophorese wurde ungekühlt bei 4-8 Volt/cm durchgeführt und das Gel zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

Verwendete Lösungen:

Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer): 0,04 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA in H₂O

6 x DNA-Probenpuffer: 0,25% Bromphenol-Blau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40% Glycerol und 10 mM EDTA in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Isolierung von DNA-Fragmenten und Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen

Die PCR-Produkte bzw. die DNA-Banden wurden aus den Agarose-Gelen herausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN), des GeneClean[®]Kits (Bio 101) oder mit dem NucleoSpin[®] Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des jeweiligen Herstellers isoliert.

Ligation

Es wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Sie katalysiert die Verknüpfung zwischen der 3'OH-Gruppe und der 5'-Phosphatgruppe von DNA-Molekülen (Bolivar et al., 1990; Weiss et al., 1968). Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

| | | |
|---------------------------|----------|--|
| Standard-Ligationsansatz: | 1 µl | linearisierte Vektor-DNA (10 ng/µl) |
| | x µl | DNA-Fragment (4-5facher molarer Überschuß) |
| | 2 µl | 10 x Ligationspuffer |
| | 0,5 µl | T4 DNA Ligase (400 U/µl, NEB) |
| | ad 20 µl | H ₂ O |

Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

Die Transformation und Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983), dabei wurden *E.coli* Bakterien der Stämme DH5α und JM109 verwendet.

Plasmid-Präparationen

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Bakterienkulturen in kleinem Maßstab (bis 10 µg) erfolgte nach Birnboim (1983). Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des Midi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Extinktionsmessung bei 260 nm, wobei eine OD-Einheit 50 mg/ml dsDNA entspricht. Für reine DNA beträgt das Verhältnis der $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$.

DNA-Fällung

Zur Fällung von DNA wurde Kaliumacetat (pH 4,8) in einer Endkonzentration von 0,3 M und das 2,5-fache Volumen der Nukleinsäure-Ausgangslösung an Ethanol oder das 0,7-fache Volumen an Isopropanol verwendet. Die Lösung wurde nach Zugabe von Salz und Alkohol 30 min. bei 0°C inkubiert und anschließend 30 min. mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in Wasser aufgenommen.

6.1.2 Klonierung der Plasmide zur rekombinanten Expression der SC1- und TSC-36-Konstrukte

Amplifizierung der Expressionskonstrukte mittels PCR

Die Plasmide für SC1 und TSC-36 dienten als Vorlage zur Amplifizierung verschiedener Konstrukte mit Hilfe einer Polymerase-Ketten Reaktion (PCR). Zur Ligation der erzeugten DNA-Fragmente wurden durch die verwendeten Primer Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3'-Ende eingeführt. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarose-Gel gereinigt und in den eukaryontischen Expressionvektor pCEP-Pu kloniert. Dieser Vektor enthält am 5'-Ende die Sequenz für das Signalpeptid von BM-40, um eine Sekretion des rekombinant exprimierten Proteins aus den Zellen zu gewährleisten. Die Plasmid-DNA wurde mit der Polymerase Pfu amplifiziert. Dabei wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

| | |
|--------------------------------|----------|
| PCR-Reaktionspuffer (10-fach): | 5,0 µl |
| dNTP-Mix (25 mM je Nukleotid) | 0,5 µl |
| Antisense-Primer (10 pmol/µl) | 2,5 µl |
| Sense-Primer (10 pmol/µl) | 2,5 µl |
| Pfu-Polymerase (2 Units/µl) | 0,5 µl |
| Template-DNA (100 ng) | x µl |
| mit H ₂ O | ad 50 µl |

Tabelle 6.1: Sequenzen der Oligonukleotide zur Amplifizierung der Expressionskonstrukte. Alle Primer verfügen über eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme (*kursiv*). Die antisense Primer enthalten zusätzlich noch ein Stop-Codon (fett).

| Oligonukleotid | Restriktions-schnittstelle | Sequenz |
|-----------------------|----------------------------|--|
| SC1_P1 (sense) | Nhe I | 5'-GCCCCGCTAGCCCCGACAAGTACAAGGTTTC-3' |
| SC1_P2 (antisense) | Not I | 5'-CAATGACTGCGGCCGCTCAAAGAGGAGGTTTTTCAT-3' |
| SC1_P3 (sense) | Nhe I | 5'-GCCCCGCTAGCCTCTTGCACGAACTTCCAT-3' |
| SC1_P4 (sense) | Nhe I | 5'-GCCCCGCTAGCCCCTGCTTGTACGGACTTT-3' |
| SC1_P5 (antisense) | Not I | 5'-CAATGACTGCGGCCGCTCAAATAGATTTGCAAGCTCCG-3' |
| TSC-36_P1 (sense) | Nhe I | 5'-GCCCCGCTAGCCCACGGCGAGGAGGAACC-3' |
| TSC-36_P2 (antisense) | Not I | 5'-CAATGACTGCGGCCGCTTAGATCTCTTTGGTGTTCAC-3' |
| TSC-36_P3 (sense) | Nhe I | 5'-GCCCCGCTAGCCGTTGTCTGCTATCAAGCTAAC-3' |
| TSC-36_P4 (antisense) | Not I | 5'-CAATGACTGCGGCCGCTTACTCAGGAGGGTTGAAGGAT-3' |

Die DNA für SC1 fl wurde zur Expression in HT 1080-Zellen zusätzlich in den Vektor pRcCMV kloniert. Die DNA-Fragmente für I-FS (SC1) und EC-4 bzw. EC (TSC-36) wurden zur Vereinfachung der Reinigung in den modifizierten Vektor pCEP-Pu-his₆-myc-EK kloniert. Dieser Vektor macht eine Affinitätsreinigung durch ein Bindungsmotiv mit sechs Histidinen möglich. Zusätzlich verfügt das rekombinante Protein über ein myc-Epitop, das einen Nachweis mit einem α -myc-Antikörper erlaubt. Danach folgt eine Enterokinase-Schnittstelle, die die Abspaltung des Bindungsmotives ermöglicht.

6.1.3 Nukleinsäuresequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgte mit einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) Service Labor unter Leitung von Herrn Dr. M. Macht. Für das 'cycle sequencing' wurden 0,3-0,5 μ g Plasmid-DNA und 3,2 pmol Primer in 10 μ l Wasser gemischt. Die Sequenzierreaktion und die Elektrophorese wurden vom ZMMK-Service Labor durchgeführt.

Die Daten wurden mit dem Programm EditView 1.0.1 (Perkin Elmer) bzw. dem Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8.1 (Genetics Computer Group, Inc.) ausgewertet. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide können der Tabelle 5.2 entnommen werden.

Tabelle 6.2: Primer zur Sequenzierung. Neben den in der Tab. 5.1 angegebenen Oligonukleotiden wurden auch die zur PCR verwendeten Oligonukleotide benutzt.

| | |
|-------------------------|------------------------------|
| M13 Universal (sense) | 5'-CGACGTTGTAACGACGGCCACT-3' |
| M13 Reverse (antisense) | 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' |
| BM-40SP (sense) | 5'-GTTCCCAGCACCATGAGGG-3' |
| SC1_P6 (antisense) | 5'-TAGTGTTTCCTCCGTTGG-3' |
| SC1_P7 (sense) | 5'-CTCAACAGAAAAGTCTCCC-3' |
| SC1_P8 (sense) | 5'-AGAGCAATCTGATGACACC-3' |
| SC1_P9 (sense) | 5'-AGATCCAGAGACTTGTCCCCCT-3' |
| SC1_P10 (sense) | 5'-CATTCCTCTCCTATTACC-3' |

6.2 Rekombinante Expression der SC1- und TSC-36 Konstrukte in EBNA-293 und HT1080 Zellen

Alle in der vorliegenden Arbeit rekombinant erzeugten Proteine wurden in EBNA-293 Zellen (Invitrogen) exprimiert. Die einzige Ausnahme stellt das SC1 fl dar, welches in HT1080-Zellen (M. Aumailley, Köln) exprimiert wurde.

Bei EBNA-293 Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, in deren Genom das EBNA-Gen integriert ist. Zur Expression wurde der eukaryontische Vektor pCEP-Pu, bzw. dessen modifizierte Form pCEP-Pu-his6-myc-EK verwendet. Dieser Vektor integriert nicht stabil in das Genom der transfizierten Zellen, sondern liegt episomal vor. Das in den Vektor integrierte EBNA-1 Gen (Epstein-Barr nuclear antigen) kodiert für ein virales DNA-bindendes Protein, welches an den *oriP* des Plasmids pCEP-Pu bindet und so die extrachromosomale Replikation einer großen Anzahl von Episomen in einer Zelle ermöglicht. Dadurch wird eine Aufteilung der Plasmide auf die proliferierenden Zellen sichergestellt. Das Vorhandensein des EBNA-1 Gens in der Zelllinie EBNA-293, als auch im Vektor soll eine hohe Expression der rekombinanten Proteine garantieren und es kann die Transkription verstärken (Yates et al., 1985). Der Vektor pCEP-Pu ist in Bakterien durch die Ampicillin-Resistenz und in EBNA-293-Zellen durch die Puromycin-Resistenz selektionierbar. Das integrierte BM-40-Signalpeptid führt zur Sekretion der exprimierten Proteine.

Bei den HT1080-Zellen handelt es sich um humane Fibrosarkom-Zellen. Die Transfektion dieser Zellen erfolgte mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pRcCMV, der stabil in das Genom der Zellen integriert. Vor der Kultivierung der Zellen, mußten positive Klone mit einer hohen Expression selektioniert werden. Durch die Ampicillin-Resistenz ist der Vektor in Bakterien selektionierbar. Die Selektion in HT1080-Zellen erfolgte durch die Geneticin-Resistenz. Das integrierte BM-40-Signalpeptid führt zur Sekretion der exprimierten Proteine.

6.2.1 Zellkulturarbeiten

Inkubationsbedingungen:

Die Zellen wurden auf Zellkulturschalen (Durchmesser 10 und 15 cm, Falcon[®], Becton Dickinson Labware, Plymouth, England) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer

wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ in einem Heraeus Begasungsbrutschrank B5060 (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland).

Zellkulturmedium:

Als Standardmedium wurde DMEM F-12 (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium F-12) mit 10% FCS (beides von Gibco BRL) verwendet. Zu 500 ml Medium wurden zugegeben:

| | |
|---|--------|
| Glutamin (200 mM, Gibco) | 5 ml |
| Geneticin (50 mg/ml, Sigma) | 3,5 ml |
| Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml, Gibco) | 10 ml |

Alle 2-3 Tage wurde das Medium geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

Bei der Kultur der HT1080-Zellen wurden folgende nicht cytotoxische Proteaseinhibitoren verwendet: Leupeptin 50 µg/ml, Trypsininhibitor 50 µg/ml und Aprotinin 1 µg/ml.

PBS (Phosphat buffered saline):

PBS diente als Wasch- und als Verdünnungspuffer. Es handelt sich um einen isotonischen Puffer mit physiologischem pH und der folgenden Zusammensetzung 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4.

Passagieren von Zellen:

Konfluente Zellen werden, nachdem das Medium abgesaugt wurde, dreimal mit PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit 3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (10-fach-Stocklösung mit 0,5 g Trypsin/0,2 g EDTA, Gibco) 5 min. bei 37°C inkubiert und dadurch vom Untergrund gelöst. Die Enzymaktivität wird durch Zugabe von 3 ml serumhaltigem Medium gestoppt. Die vereinzelt Zellen wurden 5 min. bei 900 x g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in frischem Medium aufgenommen und in geeigneter Verdünnung neu ausplattiert.

Transfektion:

Die Zellen wurden mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen, trypsinisiert, abzentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen. Dann wurde die Anzahl der Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden 5x10⁵ Zellen in 800 µl Medium mit 25 mM NaCl sowie 5 µg Plasmid-DNA vorgegeben. Nach Überführung in eine Elektroporationsküvette (Biorad) wurde 5 min. bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Elektroporation in einem Gene Pulser[®] II

(Bio-Rad) bei einer Stromstärke von 230 V/0,4 cm² und einer Kapazität von 500 µF. Dieser kurze Stromfluß bewirkt das vorübergehende Öffnen der Zellmembranporen, wodurch die Plasmid-DNA aufgenommen wird. Der Transfektionsansatz wird 5 min. bei RT stehen gelassen und anschließend mit frischem Medium ausplattiert.

Selektion der transfizierten EBNA-293-Zellen:

Die Selektion der transfizierten Zellen wird 48 h nach der Elektroporation durch die Zugabe von 0,5 µg/ml Puromycin begonnen. Die Selektion der Zellen ist nach ca. 14 Tagen beendet.

Selektion der transfizierten HT1080-Zellen:

Die Zellen wurden nach der Transfektion in mehrere 24-Mulden-Zellkulturplatten vereinzelt. Nach 48 h wurde durch die Zugabe von 80 µg/ml G418 mit der Selektion begonnen. Nach ca. 5-6 Wochen war die Selektion beendet, und die positiven Klone mit der stärksten Expression konnten durch Analyse des Zellkulturüberstandes mittels SDS-PAGE bestimmt werden.

Einfrieren der Zellen:

Die Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin vereinzelt und bei 900 x g 5 min. abzentrifugiert. Nach Resuspendierung in Selektionsmedium mit 10% DMSO sowie weiteren 10% Serum wurden die Zellen in Cryo-Röhrchen überführt und in einer Einfrierbox (Nalgene Cryo) langsam auf -80°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff.

Auftauen der Zellen:

Die Cryo-Röhrchen wurden möglichst schnell aufgetaut und sofort bei 900 x g 5 min. abzentrifugiert, um die Einwirkdauer des auf die Zellen cytotoxisch wirkenden DMSO zeitlich möglichst stark zu begrenzen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in Selektionsmedium ausplattiert.

Ernte serumfreier Kulturüberstände:

Durch den Anteil von 10% FCS, sind hohe Konzentrationen an BSA im Zellkulturmedium enthalten. BSA ist während der Reinigung der rekombinanten Proteine aber nur schwer zu entfernen, deshalb wurden die Zellen serumfrei kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage gesammelt und mit PMSF (Endkonzentration: 0,5 mM) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C

6.2.2 Herkunft und Kultur der untersuchten Zelllinien

Die für Immunfluoreszenzuntersuchungen verwendete humane Osteosarkom-Zelllinie SaOS-2 (American Type Culture Collection, ATCC) wurde in McCoy's 5a Medium mit 10% FCS kultiviert. Die EBNA-293-Zellen stammen von Invitrogen und die HT1080-Zellen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Aumailley (Köln) zu Verfügung gestellt.

Die Zellkulturüberstände der untersuchten Zelllinien stammen aus dem Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln.

6.3 Antikörper und Immunhistologie

6.3.1 Immunhistochemie auf Gewebe und Zellen

6.3.1.1 Gewebepräparation

Cryoschnitte

Neugeborene Mäuse bzw. Embryos werden präpariert und kurz mit PBS gespült. Nach Einbettung in Tissue Tec (Sakura) erfolgt die Lagerung bei -80°C . Mit Hilfe des Kryostaten (Leica Frigo Cat 2800E) werden bei -10 bis -20°C 7-15 μm dünne Schnitte von den eingebetteten Organen angefertigt. Nach Platzierung auf Objektträgern werden sie kurz bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Paraffineinbettung von Mausgeweben

Die frisch präparierten Mausgewebe wurden in 4% Paraformaldehydlösung für 1-2 h fixiert. Die Gewebe wurden zur Entwässerung wie folgt durch eine Alkoholreihe geführt: jeweils 1,5 h in 50%, 70% und 96% Ethanol und abschließend dreimal je 1,5 h in 100% Ethanol. Es folgte eine Inkubation in Methylbenzoat (über Nacht, danach zweimal 1 h) und Xylol (dreimal 30 min.). Die Gewebe wurden dann bei 65°C mit flüssigem Paraffin behandelt, wobei das Paraffin solange gewechselt wurde bis kein Xylolgeruch mehr wahrgenommen werden konnte. Die Gewebe wurden zur endgültigen Einbettung in Einwegformen mit flüssigem Paraffin überführt und ausgerichtet. Die Aushärtung erfolgte bei RT. Mit dem

Mikrotom wurden von den so eingebetteten Geweben Schnitte von 10 µm Stärke angefertigt. Diese Gewebeschnitte wurden bei 42°C im Wasserbad gestreckt und auf histologische Objektträger (Shannon) aufgezogen. Die Trocknung fand bei 37°C über Nacht statt.

6.3.1.2 Gewebefärbung mit Immunfluoreszenz und alkalischer Phosphatase

Immunfluoreszenz auf Gewebe

Vor der Färbung müssen Paraffinschnitte durch die folgenden Schritte entparaffiniert werden: Inkubation bei 50°C für zweimal 10 min. in Rotihistol[®], danach zweimal 5 min. in Isopropanol und dann jeweils 3 min. in 96% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol und in Wasser.

Für Cryo- und Paraffinschnitte sind die folgenden Schritte identisch: Umrandung der Schnitte mit einem hydrophoben Spezialstift (DAKO Pen). Zur Erzielung einer guten Gewebezugänglichkeit wurden die Schnitte zuerst mit Hyaluronidase für 30 min. bei 37°C (1,5 mg/ml, PBS, pH 5,2) und danach mit Proteinase K für 5 min. bei 37°C verdaut (5 µg/ml, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4). Die nachfolgenden Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer oder in Glasküvetten. Nach zweimal 5 min. in PBS erfolgte eine erneute Fixierung in 4% Paraformaldehyd in PBS. Es wurde dann zweimal für 10 min. mit TBS gewaschen und die Gewebe mit einer Blockierungslösung (1% BSA/TBS) für 60 min. behandelt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte bei 4°C für Paraffinschnitte über Nacht bzw. 2 Stunden für Cryoschnitte. Der erste Antikörper wurde in 1% BSA in TBS verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für jeweils 10 min. folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Cy3 markiertes anti-Kaninchen IgG, DAKO) für 1 h im Dunkeln. Zum Schluß wurden die Schnitte dreimal mit TBS gewaschen und dann mit DAKO Mount und Deckgläsern versiegelt.

| Verwendete Antikörper | Verdünnung |
|---|------------|
| αSC1 (affinitätsgereinigt, polyklonal) | 1:50 |
| αTSC-36 (affinitätsgereinigt, polyklonal) | 1:40 |
| αLaminin-1 (polyklonal) | 1:1000 |
| αCollagen I (monoklonal) | 1:100 |
| αCollagen IV (polyklonal) | 1:100 |

Färbung mit alkalischer Phosphatase

Bei dieser Färbemethode stimmen die Schritte bis zu dem Sekundärantikörper mit dem obigen Protokoll überein. Danach wird dreimal mit PBS gewaschen und mit Biotin-SP-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper (1:1000) in 1% BSA/TBS eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wird mit Streptavidin-konjugierter Alkalischer Phosphatase (1:500) in 1% BSA/TBS eine Stunde inkubiert. Danach wird dreimal mit TBS gewaschen und mit FAST RED TR/Naphtol AS-MX in 100 mM Tris-HCl, pH 8,2 inkubiert. Die Farbreaktion wird mit Wasser gestoppt und die Schnitte durch Deckgläsern und Elvanol konserviert

6.3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die Zellen wurden in einer LabTec-Kammer ausplattiert und mit 10 mM Ascorbinsäure im Medium (Kontrolle ohne Ascorbinsäure) eine Woche lang kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Dann wurde dreimal mit PBS gewaschen und 1 h mit 1% BSA/PBS blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1% BSA/PBS erfolgte für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem Sekundärantikörper für 1 h im Dunkeln inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS und abschließend nach der Entfernung der Kammern und der Gummidichtung das Trocknen und Versiegeln mit DAKO Mount und Deckgläsern.

6.3.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Immunisierung zweier Kaninchen mit je 250 µg TSC-36 erfolgte durch die Firma Eurogentec in Belgien. Das Antiserum gegen das Domänenpaar FS-EC des SC1 wurden von der Firma Pineda in Berlin hergestellt. Es wurden 400 µg zur Immunisierung eines Kaninchens eingeschickt.

Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper

Die Affinitätsreinigung der spezifischen Antikörper aus polyklonalen Seren erfolgte mit einer CNBr-Sepharose 4B Matrix (Amersham Pharmacia). Zur Aktivierung wurden 150 mg der Matrix in 1 ml 1 mM HCl für einige Minuten inkubiert und bei 1000 x g abzentrifugiert.

Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Das gereinigte Protein (500 µg) wurde gegen den Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl) dialysiert und dann in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml mit der aktivierten Matrix über Nacht bei 4°C unter Umschwenken inkubiert. Nach Abzentrifugation der Matrix und Entfernen des Überstandes wurden unspezifische Bindungsstellen durch Behandlung mit 1 M Tris, pH 8,0 für 4 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Matrix jeweils dreimal abwechselnd mit 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0 und 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen.

5 ml des Serums wurden bei 15000 x g, 4°C für 1 h abzentrifugiert, mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 auf 50 ml aufgefüllt und über Nacht bei 4°C mit der Affinitätsmatrix inkubiert. Nach Abzentrifugation der Matrix und Entfernen des Überstandes wurde zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper jeweils fünfmal mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, und 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 0,5 M NaCl gewaschen. Die Antikörper wurden durch wiederholte Zugabe von jeweils 750 µl 3 M KSCN eluiert und die einzelnen Fraktionen wurden sofort gegen PBS dialysiert. Die photometrisch vermessenen Fraktionen wurden bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Titer der Antikörper erfolgte in einem ELISA-Assay.

6.3.4 Immunoblot und Inhibitionsversuche

Immunoblot

Zuerst wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran NC, Schleicher und Schuell) transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Blotkammer (Transphor Electrophoresis Unit, Hoefer, Amerhan Pharmacia Biotech) in Boratpuffer (50 mM Borsäure, 10 % MeOH, pH 8,5) 1 h mit 1000 mA oder mit 100 mA über Nacht. Durch Färbung mit Ponceau S werden die Proteine auf der Membran sichtbar gemacht und die Markerbanden mit einem Rotstift markiert. Nach Entfernung des Farbstoffes durch Inkubation in TBS wird die Membran durch Schwenken in 5% Milchpulver/TBS, pH 7,4, blockiert, um unspezifische Bindungen an die Membran zu vermeiden. Anschließend wurde die Membran mit dem affinitätsgereinigten ersten Antikörper 1 h inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit TBS/Tween 20 (0,01 %) wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Die Inkubation von 1 h mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper (anti-Kaninchen IgG, 1:2000, Dako) erfolgte in Blockpuffer. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS/Tween 20 wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels

Chemolumineszenz unter Einsatz des ECL-(enhanced chemoluminescence)-Kits (Amersham) sichtbar gemacht. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

Im Fall des Slot-Blots liegt eine mechanische Übertragung der Proteine auf die Membran vor, dazu wurde die passende NC-Membran in eine Slot-Blot-Apparatur (Hoefler) eingespannt, die Proteine (200 µl) in die entsprechenden Mulden pipetiert und ein Vakuum angelegt. Die Entwicklung des Slot-Blots erfolgt auf die gleiche oben beschriebene Weise.

Inhibitionsversuche zur Verifizierung von Banden auf einem Immunoblot

Um die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper gegen SC1 bzw. TSC-36 zu überprüfen, wurde eine Antikörperverdünnung von 1:400 in 5% Milchpulver mit 50 µg rekombinantem Protein angesetzt und 1,5 h unter Schwenken bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Lösung ohne rekombinantes Protein angesetzt. Nach Zentrifugation wurden die entsprechenden Membranen damit inkubiert und entwickelt.

6.4 Proteinchemische Arbeiten

6.4.1 Allgemeine proteinchemische Verfahren

Protein-Fällung mit Trichloressigsäure (TCA-Fällung)

Zur Konzentrierung wird 1 ml der zu fällenden Proteinlösung mit 10 µl 10% Triton X-100 versetzt und 250 µl 50% wässriger TCA-Lösung zugeben. Nach 15 min. Inkubation auf Eis werden die präzipitierten Proteine 30 min. mit 20.000 x g bei 4°C abzentrifugiert, mit 1 ml kaltem Aceton gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und dann in einem geeigneten Volumen an Puffer löst.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteinfärbung

In dieser Arbeit wurden isokratische und diskontinuierliche Laemmli-Systeme mit Tris-Glycin-Puffern verwendet (Laemmli, 1970). Ein Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6,8; 4% Acrylamid) überschichtet ein Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8,8; 5 bis 22% Acrylamid). Die Größe der Proteine konnte durch die Verwendung von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht abgeschätzt werden. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (160 V) oder konstantem Strom (15 mA/Gel) unter Wasserkühlung durchgeführt. Nach der

elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel können die Proteine entweder im Gel angefärbt werden (z.B. Coomassie-Färbung) oder durch Immuno Blot auf eine Membran transferiert und weiter analysiert werden.

Vertikal-Elektrophorese: Gelkammern: Mighty Small™ II SE 250 Gel Electrophoresis Unit, Hoefer durchgeführt (Amersham Pharmacia Biotech)

Trenngelpuffer: 5 mM EDTA, 0,3% SDS, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 5 mM EDTA, 0,3% SDS, 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Monomer-Lösung: Protogel (30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)), National Diagnostics, Atlanta, GA, USA

Ansatz für ein X%iges Trenngel: X% Acrylamid/Bisacrylamid; 26% Trenngelpuffer (pH 8,8); ad 100 ml H₂O

Ansatz für ein X%iges Sammelgel: X% Acrylamid/Bisacrylamid; 30% Sammelgelpuffer (pH 6,8); ad 100 ml H₂O

Elektrophoresepuffer: 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 20 mM Tris (pH ca. 8,3)

2-fach-Probenpuffer: 4% SDS, 20% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, zur Reduktion wurden 8% Mercaptoethanol zugesetzt

Marker: LMW (Low Molecular Weight)-Marker, Amersham Pharmacia Biotech;

HMW (High Molecular Weight)-Marker, Boehringer.

Coomassie-Brilliant Blue R250 Färbung

Das Gel wurde ca. 1 h in einer Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% Methanol, 5% Essigsäure) fixiert und gefärbt. Nach der Entfärbung bis zur gewünschten Intensität der Banden mit Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) wurden die Gele in 7%iger Essigsäure aufbewahrt. Die Nachweisgrenze von Coomassie Brilliant Blue R250 liegt bei ca. 0,1 µg Protein.

Silberfärbung

Die Färbung mit Silber erlaubt den Nachweis von 0,1 ng Protein. Nach einer Fixierung der Proteinbanden im Gel durch Essigsäure, folgt die Behandlung mit Glutaraldehyd und einer Silbernitratlösung. Die Entwicklung erfolgt durch Inkubation in einer Natriumcarbonatlösung (Westermeier, 1990; Dunn, 1993).

6.4.2 Chromatographische Verfahren

Zur Reinigung der rekombinant exprimierten Proteine wurden verschiedene chromatographische Verfahren benutzt. Aufgrund der individuellen Eigenschaften der Proteine, wie Netto-Ladung, Größe oder Hydrophobizität binden sie unterschiedlich stark an die verschiedenen Säulenmaterialien. Durch eine geeignete Kombination verschiedener Methoden können sie zur Homogenität gereinigt werden.

Vor Beginn der Reinigung wurden alle serumfreien Mediumüberstände filtriert, um vorhandene Schwebestoffe zu entfernen. Bei der Dialyse gegen den benötigten Puffer wurde 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor zugesetzt.

Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie stellt aufgrund der hohen Trennleistung und der großen Bindungskapazität einen günstigen Schritt für den Beginn einer Proteinreinigung dar. Die Proteine binden in Abhängigkeit von ihrer Nettoladung und dem pH-Wert unterschiedlich stark an die Säulenmatrix der Ionentauscher. Die Proteine werden durch die Erhöhung der Ionenkonzentration im Laufpuffer von den Bindungsstellen verdrängt und eluiert, dabei kommt es zu einer Aufkonzentrierung und einer partiellen Trennung der Proteine.

Folgende Ionenaustauscher wurden bei der Reinigung der Proteine nach Anleitung des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet:

DEAE-Sepharose[®] Fast Flow: Schwacher Anionenaustauscher mit an die Trägermatrix gekoppelten Diethylaminogruppen, die im Bereich von pH 2 bis 9 positiv geladen sind.

Q-Sepharose[®] Fast Flow: Starker Anionenaustauscher mit an die Agarose Trägermatrix gekoppelten quaternären Ammoniumgruppen.

SP-Sepharose[®] Fast Flow: starker Kationenaustauscher, an dessen Matrix Sulphopropylgruppen gekoppelt sind, die einem pH-Bereich von 4 bis 13 negativ geladen sind.

Säulen: XK 26(Pharmacia Biotec), Ø= 2,6 cm, h= 40 cm, Säulenvolumen 200 ml

Chromatographie-Anlage:

UV-Monitor: Pharmacia LKB, Uvicord S II

Fraktionssammler: Pharmacia LKB, Superfrac

Schreiber: Pharmacia LKB, Rec 102

Steuerungseinheit: Pharmacia LKB, Programmer GP-250 Plus

Leitfähigkeitsmesser: Pharmacia LKB, Conductivity Monitor

Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Neben dem Molekulargewicht spielt auch die Form der Proteine eine Rolle für die Trennung. Kleine Proteine können in die porösen Kugeln der Matrix eindringen und legen somit einen längeren Weg durch die Säule zurück, d.h. sie sind langsamer als größere Proteine. Die Qualität der Trennung ist durch das Probenvolumen (max. 5% des Säulenvolumens), die Länge der Säule und langsame Flußraten bestimmt.

Bei der Reinigung der Proteine wurden die folgenden Säulen und Matrices nach Anleitung des Herstellers (Pharmacia Biotec) verwendet:

Sephadex G-75 Superfine: XK 50, $\varnothing = 2,5$ cm, h= 1 m, Säulenvolumen 1 l

Sephadex G-50: Glassäule, $\varnothing = 2,5$ cm, h= 1 m, Säulenvolumen 1 l

Affinitätschromatographie mittels Histidinmotiv

Die Proteine die in der N-terminalen Region über ein His₆-Motiv, ein myc-Epitop und eine Enterokinase-Schnittstelle verfügten, konnten über eine Affinitätschromatographie an Talon-Matrix (Clontech) gereinigt werden. Die Verwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Säule: XK 16, $\varnothing = 1,6$ cm, h= 5 cm, Säulenvolumen 6 ml

FPLC (Fast Performance Liquid Chromatographie)

Mit Hilfe der FPLC, die für höhere Drücke und Flußraten entwickelt wurde, lassen sich mit entsprechenden Ionenaustauschersäulen hohe Trennleistungen erreichen. Es wurden Säulen vom Typ ResourceQ (Anionenaustauscher) und ResourceS (Kationenaustauscher) und eine Chromatographieanlage der Firma Pharmacia verwendet.

FPLC-System: UV-Monitor: UV-M

Fraktionssammler: Fraction Collector FRAC-200

Schreiber: Pharmacia

Steuerungseinheit: Liquid Chromatography Controller LCC-500 Plus

Pumpen: P-500

6.4.3 Proteinextraktion aus Gewebe

Nach der Präparation bestimmter Gewebe der Maus wurden diese mit PBS gewaschen und anschließend in 5-fachen Volumen Homogenisationspuffer (TBS, 10 mM EDTA und einem Proteaseinhibitorcocktail (complete[®], Boehringer Mannheim) in einem Dounce Homogenisator zerkleinert. Die Lösung wird in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 21.000 x g für 15 min. wird der Überstand abgenommen und in SDS-Gelladungspuffer gelöst. Das Pellet und die Überstände wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

6.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine erfolgte durch Messung der UV-Spektren über einen Wellenlängenbereich von 240-360 nm. Die Berechnung erfolgte unter Benutzung des Extinktionswertes bei 280 nm. Zur Korrektur wurde die folgende Formel benutzt: $\log E_{280}^{\text{Trübung}} = 2,49 \cdot \log E_{320} - 1,49 \cdot \log E_{350}$. $E_{280}^{\text{Trübung}}$ gibt den Beitrag der Trübung zur gemessenen Extinktion bei 280 nm wieder. Die korrigierte Extinktion erhält man aus: $E_{280}^{\text{korrigiert}} = E_{280} - E_{280}^{\text{Trübung}}$. Die molaren theoretischen Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm ProtParam am Schweizerischen Institut für Bioinformatik berechnet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

Tabelle 6.3: Theoretische molare Extinktionskoeffizienten der rekombinant exprimierten Proteine.

| Protein | Extinktionskoeffizient (ϵ) [l/mol x cm] | Protein | Extinktionskoeffizient (ϵ) [l/mol x cm] |
|---------|---|----------------|---|
| SC1 fl | 41520 | TSC-36 fl | 34200 |
| I-FStag | 23380 | TSC-36 EC-4tag | 32320 |
| FS-EC | 28150 | TSC-36 ECtag | 23590 |
| EC | 24990 | | |

6.5 Festphasen-Immunoassay

Bei diesem vorwiegend zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzten Verfahren, wird ein Protein an die Oberfläche einer 96-Loch-Platte (Nunc) gebunden. Mit einer Blockierungslösung werden unspezifische Bindungstellen abgesättigt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem potentiellen Liganden. Unspezifisch gebundene Proteine werden zwischen jedem Inkubationsschritt durch gründliches Waschen entfernt. Die Detektion des spezifisch gebundenen Liganden erfolgt über einen spezifischen Primärantikörper, an den ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper bindet. Die Bindung wird durch eine Reaktion mit einem geeigneten Farbstoff sichtbar gemacht. Die Intensität der Farbreaktion ist ein Maß für die Menge des gebundenen Liganden und wird photometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader (Labsystem Multiscan MS) gemessen. Als Negativkontrolle wurde das immobilisierte Protein durch Blockierungslösung ersetzt. In Vorversuchen wurden das geeignete Blockierungsmittel ermittelt und weitere Negativkontrollen durchgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Verwendete Proteine:

Kollagen Typ I aus Kälberhaut (Extraktionmethode nach Gallop)

Kollagen Typ II aus bovinem Tracheaknorpel (Pepsinverdau)

Kollagen Typ III aus humaner Plazenta (Pepsinverdau)

Kollagen Typ IV aus humaner Plazenta (Pepsinverdau)

Kollagen Typ V aus humaner Plazenta (Pepsinverdau)

Alle Kollagene wurden von Sigma bezogen und in 0,5 M Essigsäure gelöst.

Laminin-1, Fibronectin, TSC-36 und BM-40 wurden im Labor von Prof. Paulsson isoliert.

Verwendete Beschichtungskonzentrationen

Kollagene, Decorin: 5 µg/ml

Laminin, Fibronectin, TSC-36, BM-40: 10 µg/ml

Verwendete Ligandenkonzentrationen

SC1 I-FS: 500 ng/100 µl

SC1 FS-EC: 5-2750 ng/100 µl

TSC-36: 500 ng/100 µl

Primärantikörper und Verdünnungen

α-SC1: 1:3500

α-TSC-36: 1:2000

Sekundärantikörper

Peroxidase konjugierter anti-Kaninchen-IgG Antikörper (DAKO), 1:1000

Lösungen

Waschpuffer: TBS/0,04% Tween

Blockierungslösung: 1% BSA bzw. Casein in TBS

Substratlösung: 18 ml H₂O

2 ml 1 M NaOAc/Citronensäure-Puffer pH 6,0

125 µl 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin in DMSO (10 mg/ml)

3 µl 30% H₂O₂

Stopplösung: 20% H₂SO₄

Inkubationszeiten und Volumina:

Beschichtung: über Nacht, RT 100 µl

Blocken: 1 h, RT 200 µl

Ligand: 1-1,5 h, RT 100 µl

1. bzw. 2. Antikörper: 1 h, RT 100 µl

Färbung: 15 bis 90 min., RT 100 µl

6.6 Circular Dichroismus-Spektroskopie

Mittels Circular Dichroismus Spektroskopie kann die Sekundärstruktur eines Proteins in Lösung bestimmt werden. Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung eines rechts und eines links drehenden zirkular polarisierten Lichtstrahles beschrieben werden. Beim Durchdringen einer optisch aktiven Substanz werden diese Lichtstrahlen um verschiedene Winkel gedreht und unterschiedlich absorbiert. Das austretende Licht kann als elliptisch polarisiert beschrieben werden. Die molare Elliptizität $[\Theta]_{\lambda}$ ist ein Maß für die unterschiedliche Schwächung des rechts und links zirkular polarisierten Lichtes beim Durchtritt durch eine chirale Verbindung. Dabei bringt jeder Sekundärstrukturanteil einen eigenen Anteil in das CD-Spektrum eines Proteins ein. Durch die Verwendung verschiedener Algorithmen können aus der molaren Elliptizität die Anteile an α -Helix, β -Faltblatt, Schleifen und ungeordneter Struktur eines Proteins abgeschätzt werden. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können auch Konformationsänderungen eines Proteins, wie sie z.B. bei Calciumbindung stattfinden können, verfolgt werden.

Die CD-Spektren wurden mit einem JASCO 715 CD-Spektrometer (JASCO Corporation, Tokio, Japan) in thermostatierten Quarz-Küvetten (Schichtdicke 1 mm) bei 25° C aufgenommen. Die Proteine lagen in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4, bzw. TBS, pH 7,4. Die Spektren wurden über einen Bereich von 190-250 nm mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/min und einer Response-Zeit von 4 s aufgezeichnet. Zur Verbesserung des Signal-/Rausch-Verhältnisses erfolgte eine Akkumulation von je fünf Spektren. Die dargestellten Spektren wurde mit der geräteeigenen Software bearbeitet. Um die mit Calcium gesättigte Form der Proteine zu messen wurden 2 mM CaCl₂ zugegeben. Die Calcium-freien Form der Proteine wurde nach Zugabe von 4 mM EDTA gemessen.

Nach der Zugabe von Calcium oder EDTA wurde 5 min. inkubiert, um eine neue Einstellung des Gleichgewichtes sicherzustellen. Vor der Berechnung der molaren Elliptizität wurde das Spektrum des reinen Puffer vom Proteinspektrum subtrahiert. Der Verdünnungseffekt durch die Zugabe von Calcium- oder EDTA-Lösung wurde durch Korrekturfaktoren berücksichtigt. Die molare Elliptizität [Θ] [deg cm² dmol⁻¹] wurde wie folgt berechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta * M}{c * d} \quad \Theta: \text{gemessene Elliptizität [mdeg]}$$

M: mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure (M=110 g/mol)

c: Proteinkonzentration [mg/ml]

d: Schichtdicke der Küvette [mm]

Die Sekundärstrukturanteile wurden mit Hilfe der Programme SELCON und CONTIN berechnet.

Berechnung der relativen Signaländerung nach Calciumbindung

Die bei dem Vergleich der calciumfreien Form mit der calciumgesättigten Form beobachtete prozentuale Signaländerung stellt ein Maß für die Konformationsänderung eines Proteins dar. Dazu wurde die molare Elliptizität bei 222 nm aus den Spektren abgelesen und nach der folgenden Formel berechnet:

$$\Delta[\Theta]_{222} = \frac{([\Theta]_{\infty} - [\Theta]_0) \times 100}{[\Theta]_{\infty}} \quad \text{dimensionslos, in [\%]}$$

$[\Theta]_{\infty}$ spezifische Elliptizität des Ca^{2+} -gesättigten Proteins bei $\lambda = 222 \text{ nm}$ [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$]

$[\Theta]_0$ spezifische Elliptizität des Ca^{2+} -freien Proteins bei $\lambda = 222 \text{ nm}$ [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$]

6.7 Fluoreszenz-Spektroskopie

Bei der Anregung von Proteinen zur Fluoreszenz (intrinsische Fluoreszenz) bestimmen die delokalisierten Elektronen der aromatischen Aminosäuren und ihre elektronische Umgebung, die Wellenlängen die absorbiert und emittiert werden. Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 280 nm bestimmt Tryptophan das Emissionsspektrum (300-400 nm) mit einem Maximum bei ungefähr 340 nm aufgrund seines hohen molaren Extinktionskoeffizienten und seiner Quantenausbeute $\phi_{348} = 0,2$. Die Fluoreszenz von Tyrosin ist mit einer Quantenausbeute von $\phi_{303} = 0,14$ etwas geringer und Phenylalanin spielt mit $\phi_{282} = 0,04$ normalerweise keine Rolle (Werte in Wasser, nach: Schmid, 1989). Das Emissionsspektrum ist von der Art der fluoreszierenden Gruppen und ihrer elektronischen Umgebung abhängig. Eine Änderung der Lage und Intensität des Emissionsmaximums entsteht durch eine Konformationsänderung, die die Exposition des Systems delocalisierter Elektronen zum

Lösungsmittel verändern. Mittels Fluoreszenzspektroskopie sollte eine Calcium-bedingte Konformationsänderung der rekombinanten Protein untersucht werden (s. CD-Spektroskopie). Die Proteine wurden in einem Luminescence Spectrometer LS50 B (Perkin Elmer) bei 25°C in einer thermostatisierten Fluoreszenz-Quarzküvette gemessen. Die Anregung erfolgt bei 280 nm und das Emissionsspektrum wurde im Bereich von 300-450 nm aufgezeichnet.

Berechnung der relativen Änderung des Fluoreszenz-Signals nach Calciumbindung

Die bei dem Vergleich der calciumfreien Form mit der calciumgesättigten Form beobachtete prozentuale Signaländerung stellt ein Maß für die Änderung der Struktur in der Umgebung des Fluorophors dar. Sie kann nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$\Delta F_{350} = \frac{(F_{\infty} - F_0) \times 100}{F_{\infty}} \quad \text{dimensionslos, in [\%]}$$

F_{∞} Fluoreszenzsignal des Ca^{2+} -gesättigten Proteins bei 350 nm (Anregung 280 nm)

F_0 Fluoreszenzsignal des Ca^{2+} -freien Proteins bei 350 nm (Anregung 280 nm)

(das Fluoreszenzsignal wurde in dimensionslosen Einheiten gemessen)

6.8 Elektronenmikroskopische Arbeiten

Rekombinantes gereinigtes SC1 (0,17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden gegen 200 mM NH_4HCO_3 dialysiert und an ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfernetz adsorbiert. Dieses Netz wurde zuvor durch elektrische Entladung bei niedrigem Druck hydrophil gemacht. Die adsorbierte Schicht wurde sofort geblottet und nach Waschen mit zwei Tropfen Wasser mit einer 0,75%igen Uranylformiat-Lösung 15 min. gefärbt (Engel et al., 1981).

Die Proben wurden in einem Zeiss 902 Elektronenmikroskop untersucht. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Dipl.-Chem. Patric Nitsche (Köln) durchgeführt.

6.9 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer (Reflex III, Bruker) durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) Service Labor unter Leitung von Herrn Dr. M. Macht durchgeführt.

Zum Vergleich der zwei Isoformen des TSC-36 auf Peptidebene wurden die Proteine erst mit N-Glykosidase F in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, über Nacht bei 37° C inkubiert, dann durch Zugabe von Trypsin abgebaut und nach Reduktion mit DTT und Alkylierung mit Iodacetamid massenspektrometrisch bestimmt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden jeweils 5 µg der rekombinanten Proteine eingesetzt. Die gleichen Mengen wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, mit N-Glykosidase F bzw. in 50 mM Natriumphosphat pH 5,5 mit Endoglykosidase H, über Nacht bei 37°C inkubiert und ebenfalls massenspektrometrisch analysiert.

6.10 Analyse der Glykosylierung der TSC-36 Isoformen

6.10.1 Freisetzung und Isolierung der N-Glykane

Die Abspaltung der N-Glykane von den Isoformen wurde mit Peptid-N-Glykosidase F (rekombinant, Boehringer) durchgeführt. Dazu wurden 100 µg der Proteine mit 9 Volumina Ethanol präzipitiert. Nach Trocknung in der Speed Vac wurde das Protein in 5 µl Lösung A aufgenommen und bei RT für 30 min. inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl Lösung B wurde das Gemisch bei 100°C für 5 min. denaturiert. Darauf wurden 5 µl Lösung C und die N-Glykosidase F (Endkonzentration: 20U/ml) zugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Entsalzung und Entfernung der Proteine erfolgte eine Aufarbeitung des Ansatzes über eine 150 mg Carbonsäule (Carbograph SPE, Alltech) nach Packer et al. (1998). Zuerst erfolgte die Äquilibrierung der Säule mit 2 ml 100% Acetonitril (ACN), 2 ml 80% ACN in 0,1% TFA und 2 ml Wasser. Nach Auftragung des Reaktionsgemisches auf die Säule wurden Salze und Detergenzien durch Waschen mit 2 ml Wasser entfernt. Nach Elution der Glykane mit 2 ml 25% ACN in 0,05% TFA wurden sie in der Speed Vac getrocknet.

Puffer A: 1% SDS, 0,5% β -Mercaptoethanol, 0,1 M EDTA

Puffer B: 0,2 M Natriumphosphat, pH 8,5)

Puffer C: 7,5% Nonidet P-40

6.10.2 Fluoreszenzmarkierung der freigesetzten Oligosaccharide für die HPLC-Analytik

Die Oligosaccharide wurden nach der Methode von Bigge et al. (1995) mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid (2-AB) markiert. Dazu wurden die Glykane in 2 μ l einer 1 molaren Lösung von 2-Aminobenzamid in Essigsäure und 3 μ l einer 2 molaren Lösung von NaBH_3CN in DMSO gelöst. Nach zweistündiger Inkubation bei 65°C wurde das Gemisch auf Chromatographiepapier in 1 μ l Schritten aufgetragen und getrocknet. Überschüssige Markierungsreagenzien wurden durch Chromatographie in n-Butanol:Ethanol:Wasser (Lösungsmittelverhältnis: 4:1:1) entfernt. Das Chromatographiepapier wurde getrocknet und der Auftragungspunkt mit den Kohlenhydraten ausgeschnitten. Die Elution der markierten Glykane erfolgte durch Inkubation mit 200 μ l Wasser bei 50°C.

6.10.3 Abspaltung der Sialinsäuren der freigesetzten Oligosaccharide

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Sialinsäuren, wurden die N-terminalen Sialinsäuren mit Neuraminidase behandelt. Dazu wurden 40 μ l des markierten Glykangemisches mit 1 μ l Neuraminidase (2 U) in 50 mM Natriumcitrat über Nacht inkubiert.

6.10.4 HPLC-Analyse der 2-AB markierten Oligosaccharide

10 μ l des Eluats aus der Papierchromatographie wurden für die HPLC-Analytik eingesetzt. Die Proben wurden auf einem Beckman Gold HPLC-System analysiert und mit einem Shimadzu Fluoreszenzdetektor nachgewiesen. Es wurde eine Ionenaustauschersäule auf Polymerbasis (Beckman, QHyperD10, 10 μ m, 4,6 x 100 mm) mit einer Flußrate von 1 ml/min benutzt. Bei den verwendeten Puffern handelt es sich um Wasser (Puffer A) und 0,5 M NH_4HCO_3 , pH 9,0, (Puffer B).

6.10.5 Monosaccharid-Analyse

Trimethylsilylierung der Monosaccharide

Die Monosaccharidbausteine wurden nach Chaplin (1986) über die gaschromatographische Analyse der 1-O-Trimethylsilylester ermittelt. Die durch N-Glykosidase F abgespaltenen Glykane wurden nach gründlicher Trocknung unter Schutzgas (N_2 oder Argon) mit 1 M Salzsäure (50-500 μ l) und Methylacetat im Verhältnis von 5:1 umgesetzt. Die Proben wurden gründlich gemischt und bei 70°C über Nacht inkubiert. Nach Trocknung bei 60°C unter einem N_2 -Strom wurde durch zweimalige Zugabe von 500 μ l t-Butanol zur Entfernung der Salzsäure nachgetrocknet. Durch Zugabe von Methanol, Pyridin und Essigsäureanhydrid im Verhältnis 10:1:1 für 30 min. bei RT wurden die Aminogruppen selektiv re-N-acetyliert. Die Proben wurden mit 1 ml Toluol versetzt und bei 60°C unter einem N_2 -Strom getrocknet. Der Rückstand wurde mit einem Teil 10% Methylorange in Methanol und 10 Teilen N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) versetzt, gründlich vermischt und durch 5-minütige Inkubation bei 80°C trimethylsilyliert. Nach Abkühlung auf RT wurde zur Entfernung von Schwebeteilchen kurz zentrifugiert.

GC-MS-Analyse der Monosaccharide

Die GC-MS Analysen wurden auf einem Fisins MD800 durchgeführt mit Helium als Trägergas und einer Flußrate von 40 ml/min. Es wurden 1-2 μ l der Proben im splittless-Betrieb auf eine DB5ms Kapillare (0,25 mm x 15 m, J&W Scientific) aufgetragen, mit den angegebenen Temperaturprogrammen aufgetrennt und über ein Verbindungsstück (250°C) in die Elektronenstoß-Ionenquelle (200°C) des Massenspektrometers überführt. Die Ionisation wurde im Positivionen.Modus (EI+) bei 70 eV durchgeführt. Die Spektren wurden im Massenbereich von m/z 50 bis m/z 750 mit aufgezeichnet.

Auf dem Gaschromatographen wurde das folgende Programm gefahren:

| | |
|-----------|---|
| Injektor | 200°C |
| Kapillare | 100°C, 1 min. auf 130°C mit 16°C/min. auf 280°C mit 7,5°C/min. 280°C, 5 min. |

6.11 N-terminale Ansequenzierung

Für die N-terminale Ansequenzierung wurden je 250 pmol SC1 FS-EC, EC und TSC-36 fl A und B eingesetzt. Die Ermittlung der Sequenzen erfolgte mittels Edman-Abbau auf einem Applied Biosystems 473A Sequenzer und wurde durch Dr. M. Macht vom ZMMK durchgeführt.

6.12 *In-silico* Methoden

Alle Sequenzanalysen und Bearbeitungen wurden mittels des GCG-Programmpakets auf der AXP1/CAMPFIRE-UNIX Plattform des Rechenzentrums ausgeführt.

Für *in-silico* Analysen der Proteine wurde der Internet-Server unter <http://www.expasy.ch> genutzt. Das Programm NetOGlyc ist unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> zu finden.

VII Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. (1995). Molekularbiologie der Zelle. (Jaenicke, L., ed.) VCH, Weinheim.

Alderuccio, F., Chan, E.K. and Tan, E.M. (1991). Molecular characterization of an autoantigen of PM-Scl in polymyositis/scleroderma overlap syndrome: a unique and complete human cDNA encoding an apparent 75-kDa acidic protein of the nuclear complex. *J. Exp. Med.* **173**, 941-952.

Alliel, P.M., Périn, J.P., Jollès, P. and Bonnet, F.J. (1993). Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *Eur. J. Biochem.* **214**, 347-350.

Amthor, H., Connolly, D., Patel, K., Brand-Saberi, B., Wilkinson, D.G., Cooke, J. and Christ, B. (1996). The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis. *Dev. Biol.* **178**, 343-362.

Antanitus, D.S. (1999). A theory of cortical neuron-astrocyte interaction. *Neuroscientist* **4**, 154-159.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P. and Haydon, P.G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22**, 208-215.

Aumailley, M. and Gayraud, B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* **76**, 253-265.

Barlow, D.P., Green, N.M., Kurkinen, M. and Hogan, B.L.M. (1984). Sequencing of laminin B chain cDNAs reveals C-terminal regions of coiled-coil alpha helix. *EMBO J.* **3**, 2355-2362.

Bassuk, J.A., Birkebak, T., Rothmier, J.D., Clark, J.M., Bradshaw, A., Muchowski, P.J., Howe, C.C., Clark, J.I. and Sage, E.H. (1999). Disruption of the SPARC locus in mice alters the differentiation of lenticular epithelial cells and leads to cataract formation. *Exp. Eye Res.* **68**, 321-331.

Beck, K., Hunter, I. and Engel, J. (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* **4**, 148-160.

Bendik, I., Schraml, P. and Ludwig, C.U. (1998). Characterization of MAST9/Hevin, a SPARC-like protein, that is down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **58**, 626-629.

Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* **499**, 290-306.

Bigge, J.C., Patel T.P., Bruce, J.A., Goulding, P.N., Charles, S.M. and Parekh, R.B. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.* **230**, 229-238.

Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**, 243-55.

- Bork, P., Downing, K.A., Kieffer, B. and Campbell, I.D. (1996). Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q. Rev. Biophys.* **29**, 119-167.
- Brown, E.M., Vassilev, P.M. and Hebert, S.C. (1995). Calcium Ions as Extracellular Messengers. *Cell* **83**, 679-682.
- Busch, E., Hohenester, E., Timpl, R., Paulsson, M. and Maurer, P. (2000). Calcium affinity, cooperativity and domain interactions of extracellular EF-hands present in BM-40. *J. Biol.Chem.* **275**, 25508-25515.
- Chazin, W.J. (1995) Releasing the calcium trigger. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 707-710.
- Celio, M.R., Pauls, T. and Schwaller, B. (Eds.) *Guidebook to the calcium-binding proteins*. Oxford University Press, 1996.
- Chaplin, M.F. (1986) in Carbohydrate analysis: a practical approach (Chaplin, M.F., Kennedy, J.F.K., Ed.) *IRL Press*, Oxford
- Claeskens, A., Ongenaes, N., Neefs, J.M., Cheyns, P., Kaijen, P., Cools, M. and Kutoh, E. (2000). Hevin is down-regulated in many cancers and is a negative regulator of cell growth and proliferation. *Brit. J. Cancer* **82**, 1123-1130.
- Davis, T.N. (1990). What's new with Ca²⁺? *Cell* **71**, 557-564.
- Deák, F., Wagener, R., Kiss, I. and Paulsson, M. (1999). The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* **18**, 55-64.
- De Groot, E., Feijen, A., Eib, D., Zwijsen, A., Sugino, H., Martens, G. and van den Eijnden-van Raaij, A.J.M. (2000). Expression patterns of follistatin and two follistatin-related proteins during mouse development. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 327-330.
- Delany, A.M., Amling, M., Priemel, M., Dellling, G., Howe, C., Baron, R. and Canalis, E. (1998). Osteonectin-null mice develop severe osteopenia. *Bone* **23**, 199s.
- Delany, A.M., Amling, M., Priemel, M., Howe, C., Baron, R. and Canalis, E. (2000). Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 915-923.
- Dhanaraj, V., Ye, Q.Z., Johnson, L.L., Hupe, D.J., Ortwine, D.F., Dunbar, J.B., Jr., Rubin, J.R., Pavlowsky, A., Humblet, C. and Blundell, T.L. (1996). X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure* **4**, 375-386.
- Docherty, A.J.P., O'Connell, J., Crabbe, T., Angal, S. and Murphy, G. (1992). The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors - prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotech.* **10**, 200-207.
- 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.* **161**, 455-464.

- Edgar, D. (1996). Laminins during neurite growth and nerve regeneration. In *The Laminins*, (P. Ekblom and R. Timpl, eds.), Vol. 2, 251-275, Harwood Academic Publishers.
- Engel, J., Taylor, W., Paulsson, M., Sage, H. and Hogan, B. (1987). Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues. *Biochemistry* **26**, 6958-6965.
- Fraser, J. R. and Laurent, T. C. (1996). Hyaluronan. Extracellular Matrix, Vol. 2, (W.D. Comper, ed.), Harwood Academic Publishers.
- Funk, S.E. and Sage, E.H. (1991). SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2648-2652.
- Funk, S.E. and Sage, E.H. (1993) Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **154**, 53-63.
- Girard, J.P. and Springer, T.A. (1995). Cloning from purified high endothelial venule cells of Hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *Immunity* **2**, 113-123.
- Girard, J.-P. and Springer, T.A. (1996). Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules. *J. Biol. Chem.* **271**, 4511-4517.
- Gilmour, D.T., Lyon, G.J., Carlton, M.B., Sanes, J.R., Cunningham, J.M., Anderson, J.R., Hogan, B.L., Evans, M.J. and Colledge, W.H. (1998). Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J.* **17**, 1860-1870.
- Golblum, S.E., Ding, X., Funk, S.E. and Sage, E.H. (1994). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteines) regulates endothelial cell shape and barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3448-3452.
- Guermah, M., Crisanti, P., Laugier, D., Dezelee, P. Bidou, L., Pessac, B. and Calothy, G. (1991). Transcription of a quail gene expressed in the embryonic retinal cells is shut off sharply at hatching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4503-4507.
- Guicheney, P., Vigner, N., Helbling-Leclerc, A., Nissinen, M., Zhang, X. and Cruaud, C. (1997). Genetics of laminin $\alpha 2$ chain deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromuscular Disorders*, 180-186.
- Hasselar, P., Loskutoff, D.J., Sawdey, M. and Sage, E.H. (1991). SPARC induces the expression of type I plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 13178-13184.
- Hasselaar, P. and Sage, E.H., (1992). SPARC antagonizes the effect of bFGF on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J. Cell Biochem.* **49**, 272-283
- Henchcliffe, C., Garcia-Alonso, L., Tang, J. and Goodman, C.S. (1993). Genetic analysis of laminin A reveals diverse functions during morphogenesis, *Drosophila*. *Development* **118**, 325-337.

- Hohenadl, C., Mann, K.H., Mayer, U., Timpl, M., Paulsson, M. and Aeschlimann, D. (1995). Two Adjacent N-terminal Glutamines of BM-40 (Osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminase-catalysed modification. *J. Biol. Chem.* **270**, 23415-23420.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J.N. and Engel, J. (1996). Structure of a novel extracellular Ca²⁺-binding module in BM-40. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 67-73.
- Hohenester, E., Maurer, P. and Timpl, R. (1997). Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J.* **16**, 3778-3786.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Iemura, S., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H. and Ueno, N. (1998). Direct binding of follistatin to a complex of bone morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9337-9342.
- Iruela-Arispe, M.L., Vernon R.O., Wu, H., Jaenisch, R. and Sage, H. (1996). Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for Fibroblast Function. *Dev. Dyn.* **207**, 171-183.
- Jefferys, J.G.R. (1995). Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol. Rev.* **75**, 689-723.
- Johnston, I.G., Paladino, T., Gurd, J.W. and Brown, I.R. (1990). Molecular Cloning of SC1: A putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to Osteonectin/BM-40/SPARC. *Neuron* **2**, 165-176.
- Johnston, I.M.P., Spence, H.J., Winnie, J.N., McGarry, L., Vass, J.K., Meagher, L., Stapleton, G. and Ozanne, B.W. (2000). Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion. *Oncogene* **19**, 5348-5358.
- Kallunki, P., Sainio, K., Eddy, R., Byers, M., Kallunki, T., Sariola, H., Beck, K., Hirvonen, H., Shows, T.B. and Tryggvason, K. (1992). A truncated laminin chain homologous to the B2 chain: Structure, spatial expression, and chromosomal assignment. *J. Cell Biol.* **119**, 679-693.
- Kanwar, Y.S., Linker, A. and Farquhar, M.G. (1980). Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell Biol.* **86**, 688-693.
- Kivirikko, S., McGrath, J. A., Baudoin, C., Aberdam, D., Ciatti, S. and Dunnill, M.G. (1995). A homozygous nonsense mutation in the $\alpha 3$ chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epidermolysis bullosa. *Hum. Mol. Gen.* **4**, 959-962.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. and Timpl, R. (1997). Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett.* **414**, 557-561.

- Kretsinger, R.H., Tolbert, D., Nakamaya, S. and Pearson, W. The EF-hand homologs and analogs. In: *Novel calcium binding proteins* (Heizmann, C.W., ed.) 17-37 (Springer, Berlin, 1991).
- Krück (ed.): *Pathophysiologie, Pathobiochemie*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 2. Auflage 1994.
- Kupprion, C., Motamed, K. and Sage, H. (1998). SPARC (BM-40, Osteonectin) Inhibits the Mitogenic Effect of Vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 29635-29640.
- Lane, T.F. and Sage, E.H. (1990). Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca^{2+} -binding sites modulate cell shape. *J. Cell Biol.* **111**, 3065-3076.
- Lane, T. F. and Sage, E. H. (1994). The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* **8**, 163-173.
- Ledda, F., Bravo, A.I., Adris, S., Bover, L., Mordon, J. and Podhajcer, O.L. (1997). Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nature Med.* **3**, 171-176.
- Lindblom, A. and Paulsson, M. (1996). *Extracellular Matrix*, Vol. 1, Tissue Function (Comper, W.D., ed.) Harwood Academic Publishers.
- Maurer, P., Mayer, U., Bruch, M., Jenö, P., Mann, K., Landwehr, R., Engel, J. and Timpl, R. (1992). High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin). *Eur. J. Biochem.* **205**, 233-240.
- Maurer, P., Hohenadl, C., Hohenester, E., Göhring, W., Timpl, R. and Engel, J. (1995). The C-terminal portion of BM-40 (SPARC, Osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds Calcium and collagen IV. *J. Mol. Biol.* **253**, 347-357.
- Maurer, P. and Engel J. (1996). Structure of laminins and their chain assembly, in *The Laminins*, (P. Ekblom and R. Timpl, eds.), Harwood Academic Publishers.
- Maurer, P., Hohenester, E. and Engel, J. (1996). Extracellular calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 609-17.
- Maurer, P., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K., Timpl, R. and Nischt, R. (1997). Recombinant and tissue-derived mouse BM-40 bind to several collagen types and have increased affinities after proteolytic activation. *Cell Mol. Life Sci.* **53**, 478-484
- Mashimo, J., Maniwa, R., Sugino, H. and Nose, K. (1997). Decrease in the expression of a novel TGF β 1-inducible and ras-recision gene, TSC-36, in human cancer cells. *Cancer Lett.* **113**, 213-219.
- McKinnon, P.J., Kapsetaki, M. and Margolskee, R.F. (1996). The exon structure of the mouse SC1 gene is very similar to the mouse SPARC gene. *Genome Res.* **6**, 1077-1083

- McKinnon, P.J., McLaughlin S.K., Kapsetaki and Margolskee, R.F. (2000). Extracellular matrix-associated protein SC1 is not essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 656-660.
- McPhalen, C.A., Strynadka, N.C.J. and James, M.N.G. (1991). Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv. Prot. Chem.* **42**, 77-144.
- McVey, J.H., Nomura, S., Kelly, P. Mason, I.J. and Hogan, B.L.M. (1988). Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene: intron/exon organization and an unusual promotor region. *J. Biol. Chem.* **263**, 11111-11116.
- Mendis, D.B., Shahin, S., Johnston, I.G., Gurd, J.W. and Brown, I.R. (1994). Developmental expression in the rat cerebellum of SC1, a putative brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC. *Brain Res.* **633**, 197-205
- Mendis, D.B., Shahin, S., Gurd, J.W. and Brown, I.R. (1996). SC1, a SPARC-related glycoprotein, exhibits features of an ECM component in the developing and adult brain. *Brain Res.* **713**, 53-63
- Mendis, D.B., Ivy, G.O. and Brown, I.R. (1996). SC1, a brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC and follistatin, is expressed by rat cerebellar astrocytes following injury and during development. *Brain Res.* **730**, 95-106
- Mendis, D.B., Ivy, G.O. and Brown, I.R. (2000). Induction of SC1 mRNA encoding a brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC following lesioning of the adult rat forebrain. *Neurochem. Res.* **25**, 1637-1644.
- Menon, G.K., Grayson, S. and Elias, P.M. (1985). Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 508-512.
- Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J. and Paulsson, M. (1992). Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. *J. Biol. Chem.* **267**, 6137-6141.
- Mothe, A.J. and Brown, I.R. (2000). Selective transport of SC1 mRNA, encoding a putative extracellular glycoprotein, during postnatal development of the rat cerebellum and retina. *Mol. Brain. Res.* **76**, 73-84
- Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallero, M.A. and Sage, E.H. (1995). SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the calcium-binding EF-hand. *J. Cell Biol.* **57**, 341-350.
- Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H. (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* **247**, 836-838.
- Nakayama, S. and Kretsinger, R.H. (1994). Evolution of the EF-Hand family of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* **23**, 473-507.

- Nelson, P.S., Plymate, S.R., Wang, K., True, L.D., Ware, J.L., Gan, I., Liu, A.Y. and Hood, L. (1998). Hevin, an antiadhesive extracellular matrix protein, is down-regulated in metastatic prostate adenocarcinoma. *Cancer Res.* **58**, 232-236.
- Nicholson, C. (1980). Modulation of extracellular calcium and its functional implications. *FASEB J.* **39**, 1519-1523.
- Nischt, R., Pottgieser, 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**, 529-536.
- Norose, K., Clark, J.I., Syed, N.A., Basu, A., Heber-Katz, E., Sage, E.H. and Howe, C.C. (1998). SPARC deficiency leads to early-onset cataractogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 2674-2680.
- Norris, V., Chen, M., Goldberg, M., Voskuil, J., McGurk, G. and Holland, I.B. (1991). Ca²⁺ in bacteria: a solution to which problem? *Mol. Microbiol.* **5**, 775-778.
- Ohashi, T., Sato, S., Yoshiki, A. and Kusakabe, M. (1997). TSC-36 (follistatin-related polypeptide) gene expression in Estrogen Receptor positive osteoblastic cell line, CDO7F. *Calcif. Tissue Int.* **61**, 400-403.
- Okabayashi, K., Shoji, H., Onuma, Y., Nakamura, T., Nose, K., Sugino, H. and Asashima, M. (1999). cDNA cloning and distribution of the xenopus follistatin-related protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 42-48.
- Olsen, B.R. (1997). Collagen IX. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 555-558.
- Oritani, K., Kanakura, Y., Aoyama, K., Yokota, T., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins N. A., Tomiyama, Y., Matsuzawa, Y. and Kincade, P.W. (1997). Matrix glycoprotein SC1/ECM2 augments B lymphopoiesis, *Blood* **90**, 3304-3413.
- Oritani, K. and Kincade, P. W. (1998). Lymphopoiesis and matrix glycoprotein SC1/ECM2. *Leukemia and Lymphoma* **32**, 1-7.
- Oritani, K. and Kincade, P. W. (1996). Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J. of Cell Biol.* **134**, 771-782
- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R. and Redmond, J.W. (1998). A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconj. J.* **15**, 737-747.
- Patel, K., Connolly, D. J., Amthor, H., Nose, K. and Cooke, J. (1996). Cloning and early dorsal axial expression of Flik, a chick follistatin-related gene: evidence for involvement in dorsalization/neural induction. *Dev. Biol.* **178**, 327-342.
- Patthy, L. (1991). Exons - original building blocks of proteins. *Bioessays* **13**, 187-192.
- Patthy, L. (1991). Modular exchange principles in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 351-361.

- Paulsson, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Dalzoppo, D., Odermatt, E. and Engel, J. (1985). Evidence for coiled-coil regions in the long arm of laminin. *EMBO J.* **4**, 309-316.
- Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K. and Engel, J. (1987). Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur. J. Biochem.* **166**, 11-19.
- Paulsson, M. (1992). Basement membrane proteins; structure, assembly and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 93-127.
- Perault-Straub, A.M., Staub, J.F. and Milhaud, G. (1990). Extracellular Ca²⁺ homeostasis. *Bone Miner. Res.* **7**, 1-102.
- Raines, W.E., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Ross, R. and Sage, H. (1992). The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1281-1285.
- Reed, M.J. and Sage, E.H. (1996) SPARC and the extracellular matrix: Implications for cancer and wound repair. In G  thert, U. and Birchmeier, W., eds. Attempts to Understand Metastasis Formation I. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **231**, 81-94.
- Ridet, J.L., Malhorta, S.K., Privat, A. and Gage, F.H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *TINS* **20**, 570-577
- Ringuette, M., Rogers, I., Varmuza, S., Rush, S. and Brown, I.R. (1998). Expression of SC1 is associated with the migration of myotomes along the dermomyotome during somitogenesis in early mouse embryos. *Dev. Genes Evol.* **208**, 403-406.
- Robertson, W.G. and Marshall, R.W. (1981). Ionized Ca²⁺ in body fluids. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **15**, 85-125.
- Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* **64**, 867-869.
- Rupp, F., Payan, D.G., Magill-Sole, C., Cowan, D.M. and Scheller, R.H. (1991). Structure and expression of rat agrin. *Neuron.* **6**, 811-823.
- Sage, E.H. (1997). Terms of attachment: SPARC and tumorigenesis - news and views. *Nature Med.* **3**, 144-146.
- Sage, E.H., Johnson, C. and Bornstein, P. (1984). Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.* **259**, 3993-4007.
- Sage, E.H. (1996). Angiogenesis inhibition in the context of endothelial cell biology. *Adv. Oncol.* **12**, 17-29.
- Sage, E.H. and Vernon, R.B. (1995). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *J. Hypertens.* **12**, 145-152.

- Sage, E.H., Vernon, R., Funk, S., Everitt, E. and Angello, J. (1989). SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **109**, 341-356.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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., Hohenester, E., Gohring, W. and Timpl, R. (1998). Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J.* **17**, 1625-1634.
- Sasaki, T., Göhring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knäuper, V., Murphy, G. and Timpl, R. (1997). Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J. Biol. Chem.* **272**, 9237-9243.
- Schmid, F.X. (1989). In (Creighton, T.E., ed.) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. IRL Press, 251-285.
- Shibanuma, M., Mashimo, J., Mita, A., Kuroki, T. and Nose, K. (1993). Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor- β 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur. J. Biochem.* **217**, 13-19.
- Skelton, N.J., Koedel, J., Akke, M., Forsen, S. and Chazin, W.J. (1995). Signal transduction versus buffering activity in Ca²⁺-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 239-245.
- Smyth, N., Vatansever, H.S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. and 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.
- Soederling J. A., Reed M. J., Corsa, A. and Sage E. H. (1997). Cloning and expression of murine SC1, a gene product homologous to SPARC. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 823-835.
- Strang, L.B. (1991). Fetal lung liquid: secretion and reabsorption. *Physiol. Rev.* **71**, 991-1015.
- Streuli, C. (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 634-640.
- Sumitomo, K., Kurisaki, A., Yamakawa, N., Tsuchida, K., Shimizu, E., Sone, S. and Sugino, H. (2000). Expression of a TGF- β 1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* **155**, 37-46
- Takeichi, M. (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin. Cell Biol.* **7**, 619-621.

- Tanaka, M., Ozaki, S., Osakada, F., Mori, K., Okubo, M. and Nakao, K. (1998). Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. *Int. Immunol.* **10**, 1305-1314.
- Termine, J.D., Kleinmann, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L. and Martin, G.R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105.
- Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **180**, 487-502.
- Timpl, R. (1993). Proteoglycans of basement membranes. *Experientia* **49**, 417-428.
- Timpl, R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 618-624.
- Towers, P., Patel, K., Withington, S., Isaac, A. and Cooke, J. (1999). Flik, a chick follistatin-related gene, functions in gastrular Dorsalisation/Neural induction and in subsequent maintenance of midline sonic hedgehog signalling. *Dev. Biol.* **214**, 298-317.
- Tremble, P.M., Lane, T.F., Sage, E.H. and Werb, Z. (1993). SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellularmatrix-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **121**, 1433-1444.
- Vannahme, C., Schübel, S., Herud, M., Gösling, S., Hülsmann, H., Paulsson, M., Hartmann, U. and Maurer, P. (1999). Molecular cloning of testican-2; defining a novel calcium-binding proteoglycan family expressed in brain. *J. Neurochem.* **73**, 12-20.
- Vracko, R. (1974). Basal lamina scaffold-Anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am. J. Pathol.* **77**, 313-346.
- Woessner, F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J.* **5**, 2145-2154.
- Xie, X., Harrison, D.H., Schlichting, I., Sweet, R.M., Kalabokis, V.N., Szent-Gyorgyi, A.G. and Cohen, C. (1994). Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. *Nature* **368**, 306-312.
- Yamaguchi, Y., Mann, D.M. and Ruoslahti, E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* **346**, 281-284.
- Yurchenco, P.D. and Schittny, J.C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* **4**, 1577-1590.
- Zwijnsen, A., Blockx, H., van Arnheim, W., Willems, J., Fransen, L., Devos, K., Raymackers, J., Van de Voorde, A. and Slegers, H. (1994). Characterization of a rat C6 glioma-secreted follistatin-related protein (FRP) Cloning and sequence of the human homologue. *Eur. J. Biochem.* **225**, 937-946.

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Abs. | Absorption |
| AS | Aminosäure |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BM | Basalmembran |
| BM-40 | Basalmembranprotein (Molekulargewicht 40 kDa) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bp | Basenpaar |
| CD | Circular Dichroismus |
| cDNA | komplementäre DNA |
| Col (Y) | Kollagen Typ (Y) |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | Dulbecco´s Modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| EBNA | Epstein-Barr Nuclear Antigen |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| EtOH | Ethanol |
| FACIT | fibril-associated collagen with interrupted triple helix |
| FCS | fetales Kälberserum |
| fl | full-length |
| FRP | Follistatin Related Protein |
| g | Gramm oder Erdbeschleunigung |
| G418 | Genetecin |
| GAG | Glykosaminoglykan |
| GCG | genetic computing group |
| h | Stunde |
| kDa | Kilodalton |
| HRP | Horseradish-Peroxidase |

| | |
|----------|---|
| M | Molar |
| MALDI | matrix assisted laser desorption ionisation |
| min. | Minute |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NP40 | Nonidet P40 |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| PM-Scl | Polymyositis/Scleroderma |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion |
| SDS | Natrium-n-Dodecylsulfat |
| Sek. | Sekunden |
| TBS | Tris-gepufferte Saline |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetraethylendiamin |
| TGF | transforming growth factor |
| TOF | time of flight |
| Tris-HCl | Tri-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid |
| TSC | TGF- β Stimulated Clone |
| ü.N. | über Nacht |
| UTR | untranslated region |
| Vol% | Volumenprozent |
| ZMMK | Zentrum für Molekulare Medizin Köln |

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Mats Paulsson für die sehr interessante Themenstellung und die engagierte Unterstützung und Förderung während der letzten Jahre. Ihm ist es durch seine Persönlichkeit und seine fachliche Kompetenz gelungen, ein Arbeitsklima zu schaffen in dem Forschung sehr viel Freude bereitet.

Bei Prof. Dr. Reinhard Sterner möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Corefferats bedanken.

Bei Dr. Patrik Maurer möchte ich mich ebenfalls für die sehr interessante Themenstellung bedanken. Ganz besonders möchte ich mich für viele anregende und interessante Diskussionen, seine engagierte, konstruktive Kritik und seine immerwährende freundschaftliche Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich bei allen Kollegen für die sehr gute Zusammenarbeit, stete Hilfsbereitschaft und viele sehr interessante Diskussionen bedanken.

Frau Dr. Ursula Hartmann und Herrn Dr. Frank Zaucke möchte ich für viele kompetente Ratschläge, die große Hilfsbereitschaft und die Unterstützung in zellbiologischen Fragen danken.

Herrn Dr. Peter McKinnon und Herrn Dr. Kiyoshi Nose danke ich für die Überlassung der cDNA für SC1 bzw. TSC-36. Herrn Dipl.-Chem. Patric Nitsche danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des SC1. Herrn Dr. Markus Macht möchte ich für die massenspektrometrischen Messungen danken. Für die Unterstützung bei den glykobiologischen Experimenten danke ich insbesondere Dr. Stefan Müller.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester die mich unterstützt haben und immer für mich da waren.

Ganz besonders möchte ich bei meiner Freundin Kerstin Tiedt für ihre stete Unterstützung und das große Verständnis bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Erklärung

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat und noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Paulsson betreut worden. Keine Teilpublikationen.

Köln, den 14.05.2001

Kurzzusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie SC1 und TSC-36 in einem eukaryontischen Expressionssystem rekombinant exprimiert. Die Proteine als auch verschiedene Fragmente wurden gereinigt und als korrekt gefaltete Proteine erhalten. Bei der Ionenaustauschchromatographie von TSC-36 konnten zwei Isoformen isoliert werden, die sich in ihrem Gehalt an Sialinsäuren unterscheiden. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß die EC-Domäne des SC1 einen großen Anteil an α -helikalen, wohingegen die Domäne I sehr viel ungeordnete Strukturen aufweist. TSC-36 verfügt über einen großen Gehalt an α -Helices, wobei die Domäne III einen hohen Anteil an β -Faltblättern besitzt. TSC-36 zeigte in der CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie keine durch Calcium induzierte Konformationsänderung. Für SC1 konnte mittels Fluoreszenz-Spektroskopie eine Calciumbindung bestätigt werden.

Die Expression beider Proteine wurde in Geweben und Zellkulturüberständen verschiedener Zelllinien untersucht. SC1 konnte in einer Vielzahl von Geweben und in einigen Zelllinien nachgewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen von Nierenschnitten zeigten eine Colokalisation von SC1 und Kollagen IV. In einem Festphasen-Immunoassay konnte eine streng Calcium-abhängige Bindung von SC1 an Kollagen IV über die EC-Domäne ermittelt werden (apparente K_d 50 nM). In einem Zellkulturmodell für extrazelluläre Matrix konnte SC1 in einer perizellulären netzwerkartigen Struktur bzw. in einem punktförmigen Muster entdeckt werden und war teilweise mit Kollagen I lokalisiert.

Die Expression von TSC-36 war auf Nervensystem, Testis und Niere begrenzt. Nach SDS-PAGE und Immunoblotting wurde TSC-36 als 25 kDa Bande detektiert. In einem Inhibitionsassay mit rekombinantem Protein konnte diese Bande im Immunoblot als TSC-36 bestätigt werden. In verschiedenen Zellkulturüberständen wurde TSC-36 in Form einer Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 45-55 kDa detektiert und war mit dem Molekulargewicht des rekombinanten Proteins identisch. Immunhistochemische Untersuchungen von Cerebellum, Hippocampus und Cortex zeigten eine Färbung von neuronalen Zellen. Färbungen der Niere konnten eine Colokalisation von TSC-36 und Kollagen IV zeigen. Im Festphasen-Immunoassay konnte jedoch keine Bindung nachgewiesen werden.

SC1 und TSC-36 verfügen beide über EF-Hand Motive, aber nur für SC1 konnte eine Bindung von Calcium nachgewiesen werden. Ihr überlappendes, aber unterschiedliches Expressionsmuster läßt auf verschiedene physiologische Rollen schließen.

Abstract

Two members of the BM-40 protein family, TSC-36 and SC1 were recombinantly expressed in an eukaryotic expression system. The full length proteins as well as several fragments could be purified as properly folded proteins. Ion exchange chromatography of TSC-36 revealed two isoforms, which differed in their content of sialic acid. Secondary structure analysis of SC1 using CD-spectroscopy showed a high α -helix content in the EC-domain, whereas domain I contained mainly unordered structures. In TSC-36 a high proportion of α -helix was detected and domain III exhibited a high proportion of β -structure. Calcium-binding studies using CD and fluorescence spectroscopy failed to show a conformational change in TSC-36 upon addition of calcium. In contrast, calcium-binding to SC1 could be verified by fluorescence spectroscopy.

The expression of both proteins was investigated in tissues and in supernatants of different cell lines. Immunoblotting for SC1 showed a broad expression in a variety of tissues and cell lines. Immunohistochemical staining of kidney sections showed a codistribution of SC1 and collagen type IV. In ELISA-style assays a strictly calcium-dependent binding to collagen type IV via the EC-domain of SC1 could be demonstrated (apparent K_d 50 nM). In a cell culture model for matrix assembly SC1 was found in pericellular network-like structures or in a punctuate staining pattern colocalizing with collagen type I.

The expression of TSC-36 protein was restricted to the nervous system, testis and kidney. After SDS-PAGE and immunoblotting TSC-36 was detected as a 25 kDa band, the identity of which was confirmed by inhibition experiments. In supernatants of different cell lines TSC-36 was detected as a band with an apparent molecular weight of approximately 45-55 kDa, similar to the recombinant protein. Immunohistochemical staining of cerebellum, hippocampus and cortex confirmed the expression in neuronal cells on the protein level. Staining of kidney suggested a codistribution with collagen type IV.

The properties of SC1 and TSC-36 show both similar and distinct features. Although the sequences of the two EF-hand motifs are conserved, they can be distinguished by the different response to addition of calcium. The overlapping but not identical expression patterns suggest different physiological role.

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|-----------------------|-----------------------------|
| Name | <u>Harald</u> Olaf Hambrock |
| Geburtsort und -datum | 21.07.67 in Vechta i.O. |
| Familienstand | ledig |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |

Schulischer Werdegang

| | |
|-------------|--|
| 1974 - 1978 | Besuch der Grundschule Koblenz-Altkarthause |
| 1978 - 1987 | Besuch des Staatl. Gymnasiums auf der Karthause, Koblenz |
| Juni 1987 | Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife |

Grundwehrdienst

| | |
|--------------------------|------------------------------------|
| Juli 1987 - Oktober 1988 | Stabskompanie Sanitätskommando III |
|--------------------------|------------------------------------|

Studium bzw. Promotion

| | |
|-------------------------|--|
| Wintersemester 1988 | Immatrikulation für das Studienfach Chemie (Diplom) an der Universität zu Köln |
| Sommersemester 1992 | Vordiplom im Fach Chemie an der Universität zu Köln |
| Sommersemester 1995 | Ablegen der mündlichen Diplomprüfungen im Fach Chemie an der Universität zu Köln |
| August 1995 - März 1996 | Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. M. Paulsson mit dem Thema: „Rekombinante Expression des Cartilage Matrix Proteins (CMP) und funktionelle Charakterisierung des Proteins |
| April 1996 | Beginn der Dissertation am Lehrstuhl von Prof. M. Paulsson sowie der Betreuung von Medizinstudenten im Rahmen des Biochemiepraktikums (Seminar/Praktikum). Beginn des Promotionsstudiums an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln |